

第二章 基因工程制药

2.10 基因工程药物制造实例

一、课程目标

1) 知识学习目标

常见的几种基因工程药物：干扰素、集落刺激因子、人白细胞介素-2

2) 思政育人(科学精神)

通过干扰素从发现到成功应用于临床过程中不同科学家的贡献的讲解,培养学生不断探索创新的科学精神。

二、思政案例

《干扰素之源——干扰素发明者》、《Alick Isaacs 殊途同归——干扰素发现之争》|》《干扰素抗病毒作用机理的探索历程》、《干扰素的抗病毒应用——从实验室研究到临床实践》

三、课程组织

思政案例引入：就像弗莱明发现青霉素一样，干扰素的出现也充满了神奇和偶然色彩，50 年代之前由病毒造成的传染病大流行严重影响了人类的健康，仅 1918 年的一次全球爆发的流感大流行就造成了 4 千万人的死亡，此外天花、麻疹、脊髓灰质炎等病毒引起的传染病也是非常流行，然而，人类一直没有找到一个象对抗细菌感染一样对抗病毒的有力武器，索性当时免疫学的发展促成了人类疫苗的研制成功，通过疫苗人们成功的抵御住了天花、麻疹、脊髓灰质炎的侵袭，然而，对于流感病毒感染却一直没有取得很好的突破，由于流感病毒容易变种的原因，流感疫苗一直未能研发成功，但仍有很多科学家在不遗余力的进行着流感病毒疫苗及其免疫接种等相关的研究。1957 年，英国医生 Alick Isaacs 在进行流感病毒试验时，发现鸡胚中注射灭活流感病毒后生成了一种物质，这种物质具有“干扰”流感病毒感染的作用，于是 Isaacs 将这种物质称之为“interferon”，也就是今天我们所说的干扰素。后又经过许多科学家的努力，干扰素终于成功从实验室应到临床。

学生任务：根据课前下发的《人类是如何发现干扰素的》文章，总结归纳干扰素从发现到临床应用，不同的科学家做出的贡献。

知识点讲解：

干扰素是人体细胞分泌的一种活性蛋白质，具有广泛的抗病毒、抗肿瘤和免疫调节活性，是人体防御系统的重要组成部分。根据其结构可分为 α 、 β 、 γ 、 ω 4 个类型。 α 干扰素又细分为 α 1b、 α 2a、 α 2b 等亚型。干扰素除具有广谱的抗病毒活性外，还具有抑制细胞分裂，

特别是抑制肿瘤细胞生长和免疫调节等功能,作为一种生物活性蛋白有着良好的临床应用价值。

早期干扰素是用病毒诱导人白血球产生的,产量低、价格昂贵,不能满足众多患者的需要,而现在使用的重组干扰素是利用基因工程技术在大肠杆菌中发酵生产,大大提高了生产效率,降低了生产成本,这一节我们就一起学习一下重组干扰素的生产过程,包括基因工程菌的构建、干扰素的生产、质量控制三部分内容,我们先看第一个部分,基因工程菌的构建。

首先是目的基因的获得:将生产干扰素白细胞的 mRNA 分级分离,然后将不同部分的 mRNA 注入蟾蜍的卵母细胞,并分别测定其卵母细胞合成干扰素的抗病毒活性,结果发现 12SmRNA 的活性最高,因此用这部分 mRNA 合成 cDNA。将 cDNA 克隆到含有四环素和氨苄青霉素抗性基因的质粒 pBR 322 中。

然后将构建的质粒载体转化大肠杆菌,得到几千个重组子克隆,每个克隆都用干扰素的 mRNA 去进行杂交,把杂交阳性克隆中的质粒载体转入体外蛋白合成体系中进行翻译,对翻译后的产物进行抗病毒活性检测,经过多轮筛选获得了产生干扰素的 cDNA,最后将该 cDNA 克隆转入大肠杆菌表达载体中,转化适合表达的大肠杆菌,获得高效表达干扰素的基因工程菌,然后是菌体的培养和产物干扰素的分离纯化。

基因工程干扰素的分离纯化包括以下步骤:首先启开种子、然后是制备种子液、发酵培养、粗提、半成品制备、半成品检定、冻干、分装、成品检定和成品包装。

1、发酵

人干扰素 a2b 基因工程菌的宿主菌是大肠杆菌,质粒含有含氨苄青霉素抗性基因,种子培养基含 1%蛋白胨、0.5%酵母提取物、0.5%氯化钠。接种工程菌到 4 个装有 250 毫升种子培养基的 1000 毫升摇瓶中,30℃培养 10 小时,作为发酵罐种子,用 15 升发酵罐进行发酵,发酵培养基的装量为 10 升,发酵培养基由 1%蛋白胨、0.5%酵母提取物、0.01%氯化铵、0.05%氯化钠、0.6%磷酸氢二钠、0.001%氯化钙、0.3%磷酸二氢钾 0.01%硫酸镁、0.4%葡萄糖、适量的消泡组成,pH 为 6.8,发酵通气量为 1:1,溶氧为 50%。30℃发酵 8 小时,然后在 42℃诱导 2-3 小时完成发酵。

2、产物的提取和纯化

发酵完毕后,冷却,进行每分钟 4000 转离心 30 分钟,得湿菌体 1000 克左右。取 100 克湿菌体重新悬浮于 500 毫升磷酸缓冲液中,于冰浴条件下进行超声波破碎,然后每分钟 4000 转离心 30 分钟,取沉淀部分用含尿素、二巯基苏糖醇的磷酸缓冲液抽提,室温搅拌 2

小时，然后用每分钟 15000 转离心 30 分钟，取上清液，用磷酸缓冲液稀释至尿素浓度为每升 0.5 毫摩尔，加二巯基苏糖醇至每升 0.1 毫摩尔，4℃ 搅拌 15 小时，然后 15000 转每分，离心 30 分钟，除去不溶物。上清液浓缩，然后经过柱子分离，收集人干扰素 α 2b 部分，经 SDS-PAGE 检查。先用葡聚糖凝胶柱进行纯化，再用纤维素柱进行纯化，用磷酸缓冲液分别洗涤，收集含人干扰素 α 2b 的洗脱液。

在分离纯化过程中我们要对产品进行质量控制质量控制标准和要求在质控中需要进行半成品和成品进行质控。

1. 半成品检定

半成品检定包括效价测定、蛋白质含量测定、活性测定、比活性测定、纯度测定、相对分子量测定、核酸含量测定、等电点测定、无菌试验、热源试验等。在这些质控中涉及的检测方法有紫外光谱扫描法、福林-酚法、SDS-PAGE 法、放射性核素或生物素探针法、亲和层析法和等电聚焦电泳等，在这些测定过程中必须采用国际上通用或中国药品生物制品检定所提供的标准蛋白为标准样品。

2. 成品检定

外观检测外观、活性、水分、无菌试验、安全毒性、热源质。成品干扰素冻干品外观呈白色或微黄色，质地疏松，加入注射用水无肉眼可见不溶物，其他检测方法和半成品相同。重组干扰素作为注射用的基因工程药物，其质量控制是其有效性和安全性的根本保证，只有通过严格的严格质控才能保证使用者的健康和安全。