

- 1 概念及主要基因工程产品
- 2 基因工程中常用的工具酶和载体
- 3 基因工程无性繁殖系的组建
- ➔ ● 4 基因工程药物的发酵、纯化与保存（自学）
- 5 基因工程制药技术的研究热点

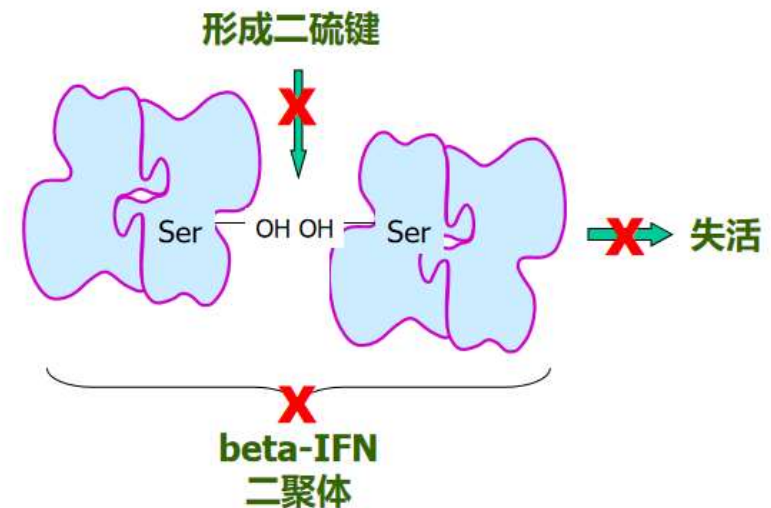
基因工程药物的发酵、纯化与保存

- ➔ ● 影响目的基因在大肠杆菌中表达的因素
- 基因工程菌的不稳定性
- 基因工程药物的分离纯化
- 基因工程药物的保存

影响目的基因在大肠杆菌中表达的因素

- 外源基因的剂量
 - 外源基因的拷贝数
- 外源基因的表达效率
 - 启动子的强弱
 - 核糖体结合位点的有效性
 - SD序列和起始密码的间距
 - 密码子的组成
- 表达产物的稳定性
 - 融合蛋白；信号肽；**改变二硫键**；蛋白酶缺陷型大肠杆菌
- 细胞的代谢负荷
 - 细胞的生长和外源基因的表达分为两个阶段
- 工程菌的培养条件
 - 不同环境条件下培养工艺的优化

二硫键的形成不利于产物的稳定表达



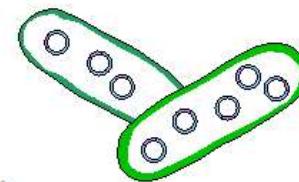
基因工程药物的发酵、纯化与保存

影响外源蛋白在发酵过程中表达的最大问题是基因工程菌的不稳定性

- 影响目的基因在大肠杆菌中表达的因素
- ➔ ●基因工程菌的不稳定性
- 基因工程药物的分离纯化
- 基因工程药物的保存

基因工程菌的不稳定性

质粒的不稳定性



- 分裂不稳定
 - 分裂时出现不含质粒子代菌的现象；
- 结构不稳定
 - 外源DNA从质粒上丢失或碱基重排、缺失所致工程菌性能改变

基因工程菌的不稳定性

质粒的分裂不稳定性



- 含质粒菌产生不含质粒子代菌的频率
 - 与宿主菌、质粒特性和培养条件有关；
- 这两种菌比生长速率差异的大小
 - 丢失质粒的菌在非选择性培养基中一般具有生长优势

提高质粒稳定性的方法

- 选择合适的宿主菌
 - 比生长速率、基因重组系统的特性等；
- 选择合适的载体
 - 增加质粒的拷贝数
- 选择压力
- 分阶段控制培养
- 控制培养条件
- 固定化

工程菌构建

发酵条件优化

基因工程药物的发酵、纯化与保存

- 影响目的基因在大肠杆菌中表达的因素
- 基因工程菌的不稳定性
- ➔ ●基因工程药物的分离纯化
- 基因工程药物的保存

生物药物分离纯化的特点



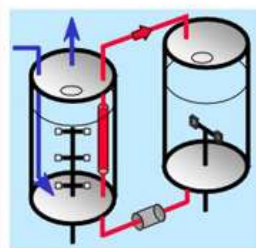
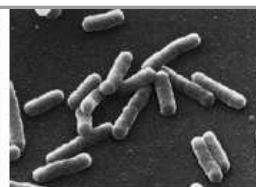
- 一般生物药物有生物活性，对外界条件的刺激敏感，对剪切力也敏感，分子量越大稳定性越差；
- 产品在初始发酵液中的浓度低，特别是动植物细胞培养的产品，分离提纯比较困难；
- 一般人用的药品对纯度要求高，对颜色，溶解度等也有一定要求



生物药物分离纯化的一般步骤

- 细胞破碎；
- 固液分离；
- 浓缩与初步纯化；
- 高度纯化

包含体的生产及其纯化



基因工程药物的发酵、纯化与保存

- 影响目的基因在大肠杆菌中表达的因素
- 基因工程菌的不稳定性
- 基因工程药物的分离纯化
- ➔ ●基因工程药物的保存

基因工程药物的保存方法

- 液态保存
 - 低温保存;
 - 在稳定pH条件下保存;
 - 高浓度保存;
 - 加保护剂保存
- 固态保存
 - 冻干或结晶

General

基因工程制药

Introduction

- 1 概念及主要基因工程药品
- 2 基因工程制药中常用的工具酶和分子载体
- 3 基因工程无性繁殖系的组建
- 4 基因工程药物的发酵生产和分离纯化
- ➔ ● 5 基因工程制药技术的研究热点
 - 5.1 基因诊断 5.2 基因治疗
 - 5.3 反义RNA和iRNA 5.4 转基因动植物

单选题 1分

影响重组人胰岛素在基因工程大肠杆菌中发酵表达的最大问题是

- A 重组人胰岛素不能分泌到胞外
- B 基因工程菌不能得到足够的溶氧
- C 基因工程菌生长性能差
- D 基因工程菌对外源蛋白的表达有不稳定性

1、RED/ET同源重组技术两类关键蛋白的功能分别是 recE / reda 为 [填空1] 酶功能和 recT / $\text{red}\beta$ 为 [填空2] 酶功能。

基因工程制药技术的研究热点

- ➔ ●基因诊断
- 基因治疗
- 反义RNA与干扰RNA
- 转基因动植物

基因工程制药技术的研究热点 基因诊断

用分子生物学的技术对引起疾病的原因—遗传基因,致病微生物和寄生虫,以及某些恶性肿瘤在基因水平上进行病原学和细胞遗传基因的检测和分析。

情景一

- 年纪大了,老张觉得身体不如以前了。
- 昨天听到了一个消息,几十年的老友得了肝癌,因为发现得太迟,已经到了晚期,最多还能活三个月。
- 在单位一年一度的例行身体检查时,基因检测的结果发现了可以导致肺癌的基因,随即住院治疗。
- 治疗的效果相当好,没过多久就可以出院了。
- 医生说,还好发现得及时,要不然也很麻烦。
- 这时传来了老友去世的消息,老张不禁慨叹人生事变化无常,令人唏嘘。

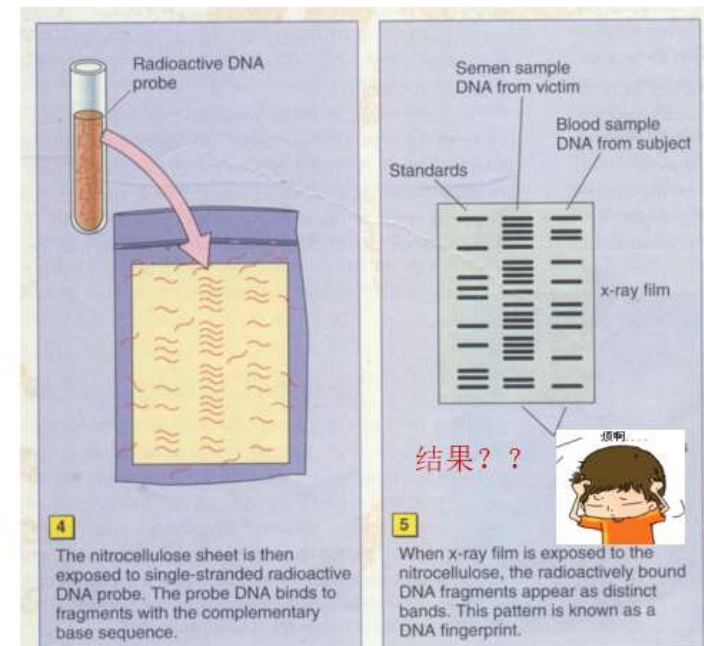
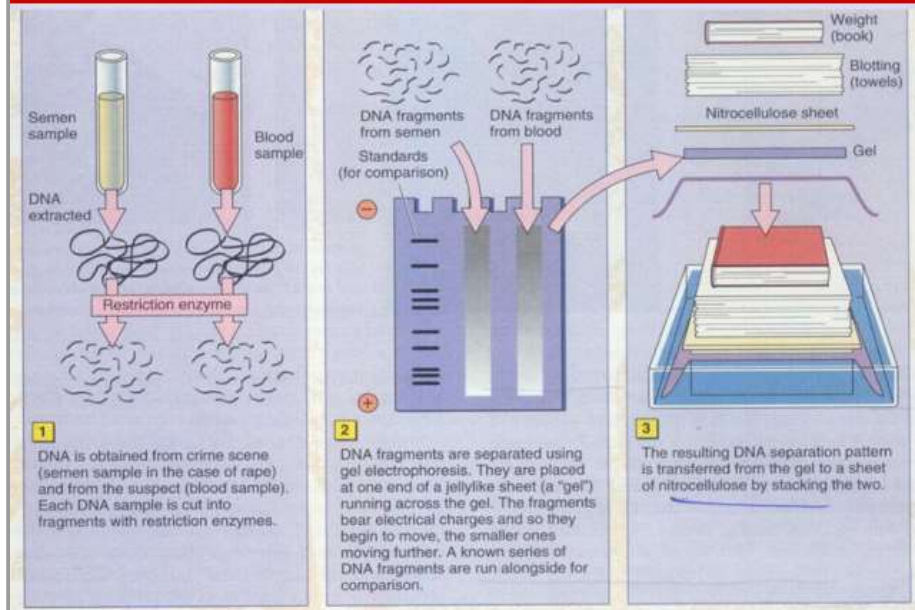
情景二

- 你去应征一份高薪的好工作,且在面试的过程,你表现得很好。
- 过几天,你去理发,理发师用力梳理你的头发。当你走出理发店后,有一个人进来,给这位理发师一些钞票,然后用一个袋子装入你掉在地上的头发。
- 再过几天,你接到通知,不被录用。
- 因为在你的头发细胞中检测出有基因上的缺陷。

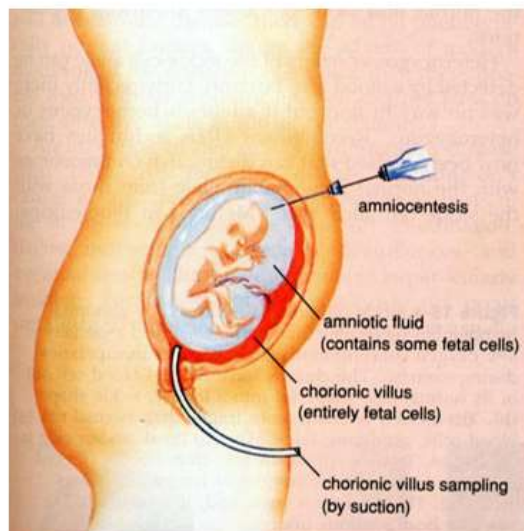
情景三

- 小镇上发生了一起强奸案。
- 受害人和强奸犯发生了打斗,现场留下了罪犯的血迹。
- 警方在现场收集了罪犯留下的血迹和精液。
- 抓获了几名嫌疑犯,但没有确定最后目标。
- 基因检测的结果提供了有力的证据,真正的罪犯低头认罪。

利用基因诊断鉴定犯罪嫌疑人



利用基因诊断进行胎儿早期检查

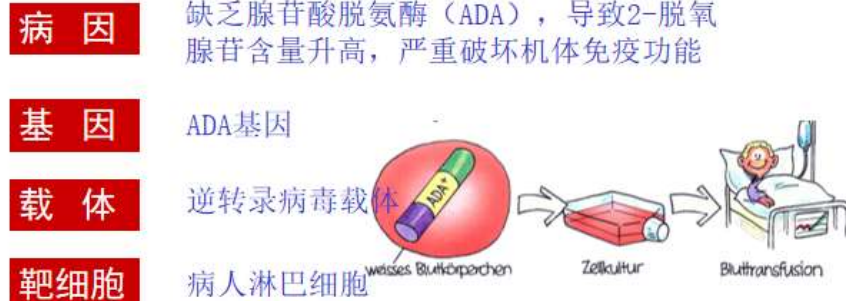


基因工程制药技术的研究热点

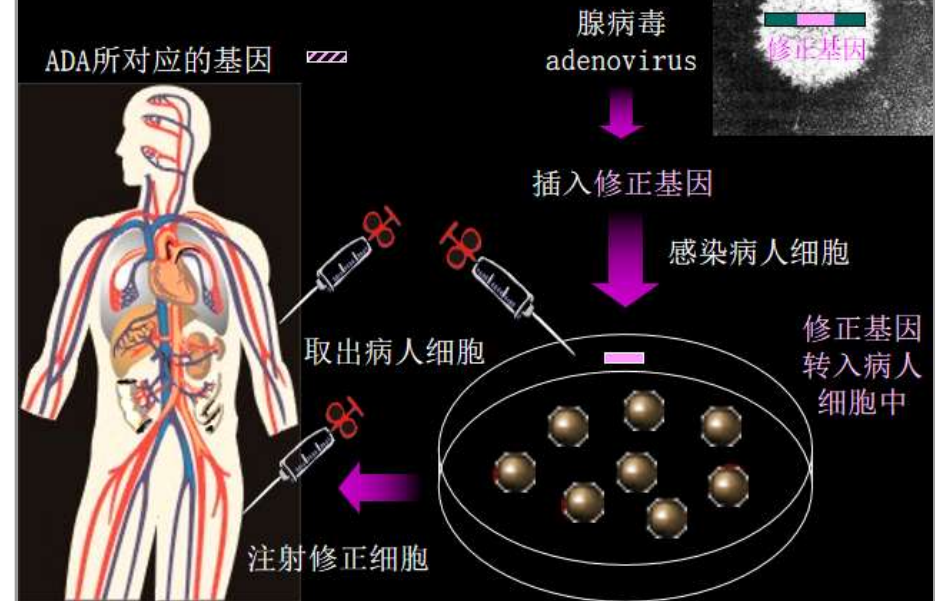
- 基因诊断
- ➔ ● 基因治疗
- 反义RNA与干扰RNA
- 转基因动植物

基因工程制药技术的研究热点 基因治疗

1990年9月14日，一名患严重免疫缺陷症（SCID）的4岁女孩接受了首例基因治疗

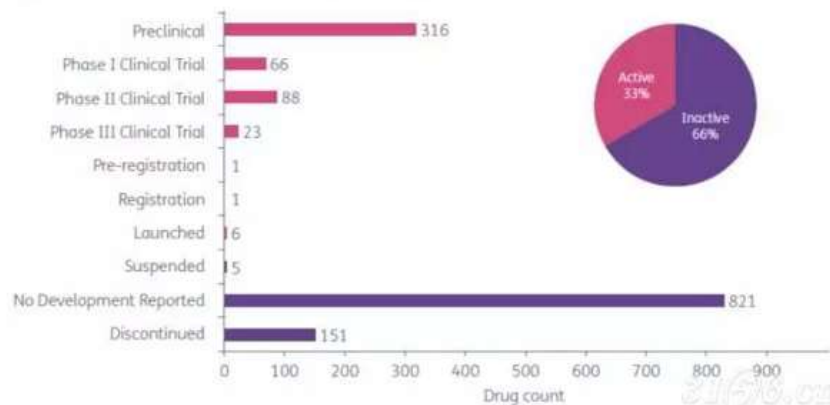


基因治疗



研发中的基因治疗药物

Figure 2: The current status of gene therapies in the pipeline

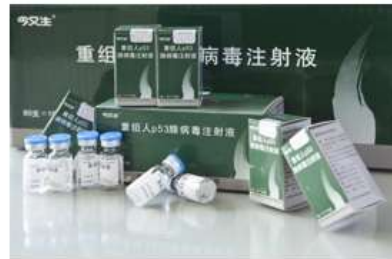


上市基因治疗药物

Table 1: Launched gene therapy drugs

Drug name	Company	Launch year	First launch country	Disease
Oncology indications				
Imlygic	Amgen	2015	USA	Melanoma
Rexin-G	Epius Biotechnologies	2007	Philippines	Solid cancer, unspecified
Oncarin	Shanghai Sunway Biotech	2005	China	Nasopharyngeal & Head and neck cancer
Gendicine	Shenzhen SIBioma GeneTech Co.	2004	China	Head and neck cancer
Non-oncology indications				
Glybera	uniQure & Chiesi	2015	Germany	Lipoprotein lipase deficiency
Neovasculgen	Human Stem Cells Institute	2012	Russia	Peripheral vascular disease & Limb ischaemia

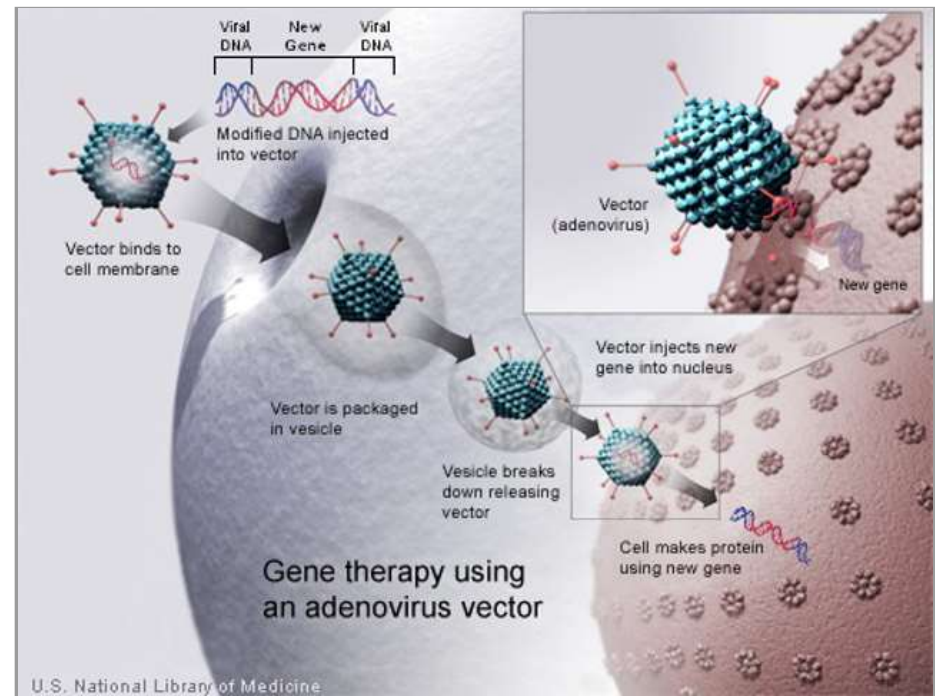
上市基因治疗药物



西百诺 SIBIONO 世界的西百诺，人类的今又生

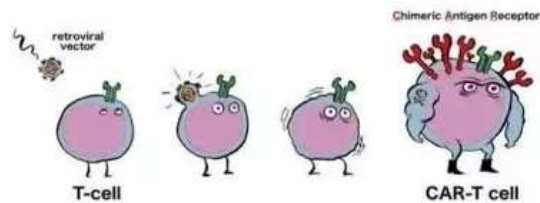


Advexin



上市基因治疗药物

2017年9月，美国食品药品监督管理局（FDA）批准诺华的CAR-T疗法Kymriah 上市，用于治疗急性淋巴细胞白血病（ALL），一次治疗的定价为47.5万美元。这是FDA批准的首款基因治疗药物，近些年来广受关注的CAR-T疗法也终于走向市场。



基因工程制药技术的研究热点

- 基因诊断
- 基因治疗
- ➔ ● 反义RNA与干扰RNA
- 核酶
- 转基因动植物

反义基因

番茄植入反义基因
可防止软化

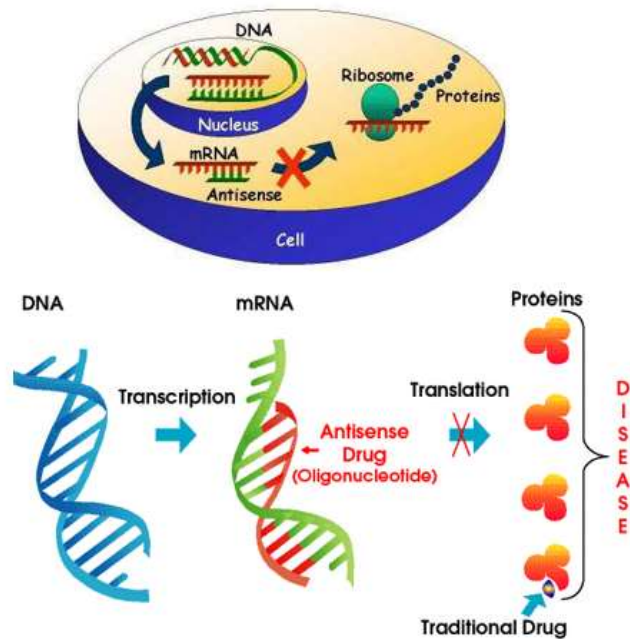
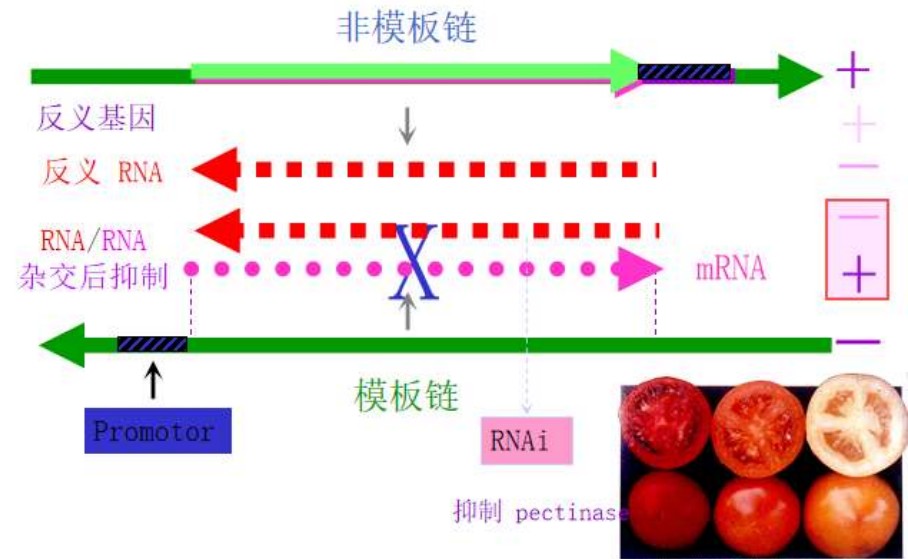


Nature Biotechnology

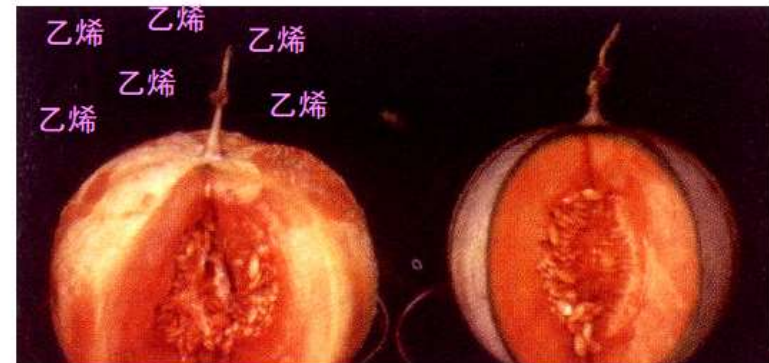


抑制果肉软化的酶
(果胶酶 pectinase)

Antisense RNA 可抑制特定基因的表现



洋南瓜植入 ACC oxidase 反义RNA 可抑制果实过熟

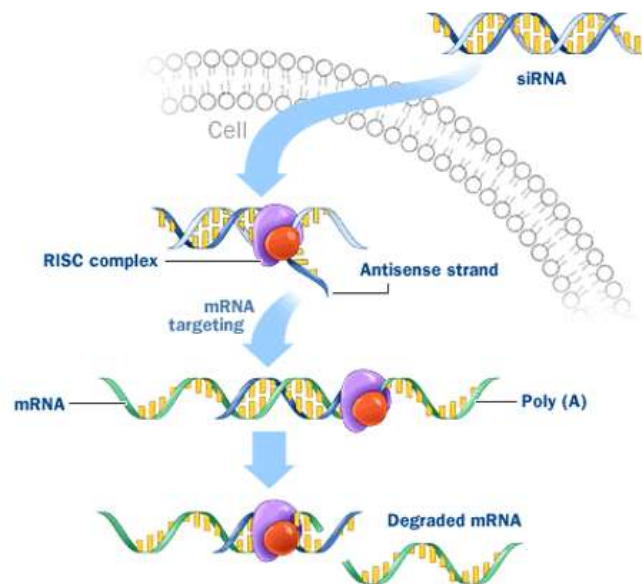


Wild Type
野生型

Antisense
ACC Oxidase

ACC $\xrightarrow{\text{X}}$ 乙烯

干扰RNA (iRNA)

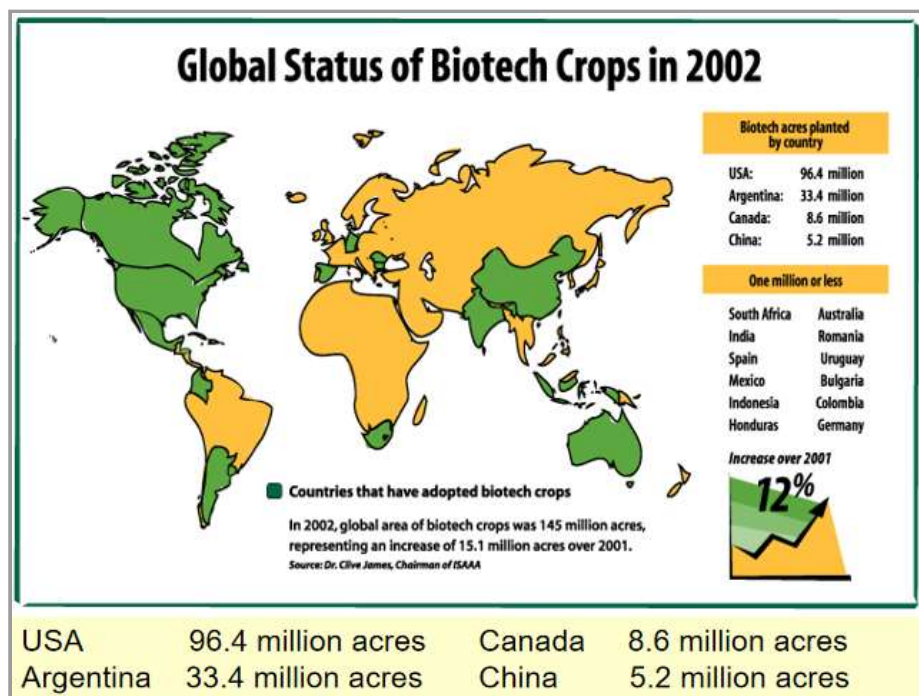


基因工程制药技术的研究热点

- 基因诊断
- 基因治疗
- 反义RNA与干扰RNA
- ➔ ● 转基因动植物

转基因动植物





转基因动植物生产药物

FDA批准世界首个转基因动物生产的药物ATryn®

2009-02-10 00:00 来源：丁香园 点击次数：408 关键词：ATryn 转基因 动物

美国食品和药物管理局刚刚批准首个转基因动物表达的药 ATryn，人类终于有了第一个转基因动物生产的药物上市用于临床。该药品是从经过基因修饰奶山羊分泌出的羊奶中提取纯化，它是用于治疗一种被称为遗传性抗凝血酶缺乏症的疾病。

美国FDA批准上市的转基因动植物生产的新药（截止2016年1月）

新药名	活性成分	转基因动植物	用途/适应症	公司	FDA批准年份
ATryn	重组人抗凝血酶III	转基因山羊	预防和控制遗传性抗凝血酶缺乏症患者手术中或分娩时可能出现的凝血状况	rEVO Biologics	2009
Rucnase	重组 C1 酯酶抑制剂	转基因兔	成人及青少年遗传性血管性水肿 (HAE) 患者急性发作	Pharming Group NV	2014
Kanuma	重组溶酶体酸性脂肪酶	转基因鸡	溶酶体酸性脂肪酶缺乏症 (LAL-D)	亚力兄/Alexion	2015
Elelyso	葡萄糖苷酶	转基因胡萝卜细胞	1型戈谢病	Protalix 辉瑞	2012