

生物新药研发应重视海外经验

目前,我国生物医药产业创新不足已是业内共识,其原因包括国内药企以仿制药为主、低价竞争、企业利润率低,研发投入不足等多方面原因。新药研发的高成本、高风险、低效率已成为新药创制的主要瓶颈。

同时,国内生物医药产业正面对着难得的发展机遇:重大疾病、耐药菌引发的疾病及传染性疾病的尚未得到有效遏制,从而带来了可观的市场需求;产学研联盟与产业园区建设初具规模,促进企业创新能力稳步提高。

在抓住机遇、突破创新瓶颈的过程中,本土药企应重视海外经验。

例如,从仿制到仿创再到创新,日本药企主要聚焦本土市场,国外市场和跨国药企共同开拓,通过仿创和整合诞生了两家全球前二十大制药企业。

而印度则走出了一条产业升级之路。仿制药从国内市场走向国际,产品从原料药向制剂升级,承接合同研发和合同生产,并逐步走向创新。目前,印度仅有世界中型药企,但已成为世界市场高质量、低成本仿制药领导者以及合同研发和生产的领先国家。

壳聚糖基自愈性水凝胶的临床梦

■本报记者 黄明明 实习生 蔚立早

在11月举办的“2012生命科学论坛”上,来自清华大学化学系教授危岩课题组的副教授陶磊的汇报吸引了参会医生们的目光:以壳聚糖(主要来自虾壳、蟹壳等)为主要原料,通过简单材料合成,制备出具有自愈能力的水凝胶。

以高分子材料为研究方向的危岩课题组看似与生命科学领域并无直接关系。而这一自愈性水凝胶原料价廉易得、制备方法简单、生物相容性好,恰有望在靶向给药、可控释放等方面发挥作用。

为何研究自愈性水凝胶

“科学研究要以人为本”,报告PPT的最后有这么一行字。这亦是危岩课题组多年的科研理念和梦想——组建强有力的团队,采用便宜的原材料,运用简单的制备方法,合成出有实际应用前景的高分子材料。

为何选择自愈性水凝胶作为研究课题呢?这要从传统给药方式所面临的问题说起。

目前,进行传统静脉药物注射时,药物进入人体血液循环系统后,需要经过心脏、肺、动脉等途径达到病灶,这一过程造成大量药物流失,给药效率较低。同时,高浓度注射药物时,药物的副作用不可忽视。此外,频繁给药也给病人增加了身体和经济上的负担。

危岩对《中国科学报》记者表示,课题组希望将自愈性水凝胶作为药物载体,注射到病灶部位,注射过程中破碎的水凝胶迅速实现自修复,将药物“固定”在预期部位,再缓慢释放,达到治疗目的,期望解决传统静脉给药方法上的不足。

“现有文献报道的自愈性水凝胶在实际应用时存在一些瓶颈问题:选择多肽、蛋白、DNA片段等作为凝胶元素,成本比较昂贵;有些胶不能在生理条件下实现自愈;生物安全性和生物相容性不太理想等。”陶磊介绍说。

课题组选择壳聚糖作为主要原料来制备自愈性水凝胶,是基于以下原因:壳聚糖的主要来源是虾壳、蟹壳等,来源广泛,价格低廉。另外,壳聚糖能被生物体内的多种酶降解成天然的代谢物,具有良好的生物安全性和生物相容性,作为生物医用材料使用时具有较大优势。

小材料大惊喜

时间回溯到2010年11月,一个遥远的设想此刻就真实地胶着在试管里。

博士生张亚玲做了一个简单的实验,在室温且无任何外加催化剂的条件下,将壳聚糖溶液和两端带有苯甲醛基的功能化聚乙二醇溶液在试管里混合,不到1分钟,试管内就形成了水凝胶。

课题组在分析其分子结构时,认为该水凝胶体系是由动态化学键构建的,猜想该水凝胶可能具有自愈性。为此,他们做了以下实验:将两块颜色不同的水凝胶粘在一起,中间打个9mm的孔。随着时间的推移,水凝胶上的“伤口”逐渐缩小且颜色相互渗透,2个小时后水凝胶完全愈合。

自愈性的壳聚糖水凝胶做出了!这种自愈性水凝胶能在生理条件下实现自愈吗?在生物刺激条件下具有响应性吗?否则它的临床应用只能是纸上谈兵。

为此,课题组将水、维生素B6、木瓜蛋白酶、溶菌酶等分别与其结合,试图找到壳聚糖水凝胶在不同生物刺激下的响应规律。

张亚玲把水溶性染料作为药物模型加入水凝胶中,记录染料在不同生物刺激下的释放速率。实验结果表明在加入维生素B6和木瓜蛋白酶的条件下,水凝胶内的药物释放速度明显快于加入水或溶菌酶的对照组。

课题组讨论认为,这一实验提供了两个信息:一是药物可以在生物刺激条件下的可控释放;二是溶菌酶在这个体系中对壳聚糖几乎没有降解作用。

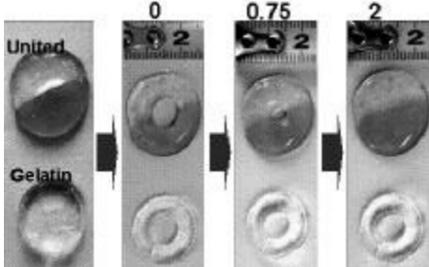
“溶菌酶是一种蛋白,所以我们想到可以将壳聚糖水凝胶作为一种蛋白药物的释放载体。”课题组成员介绍说。

在记录蛋白释放数据时,研究人员惊喜地发现溶菌酶不仅能够可控释放,而且释放前后酶的活性几乎不变,这证明了这种水凝胶不仅仅能作为小分子药物的释放载体,也能作为蛋白等生物大分子的释放载体。实验结果发表于2011年6月的Biomacromolecules(美国《生物大分子》杂志),并成为年度热读文章之一。

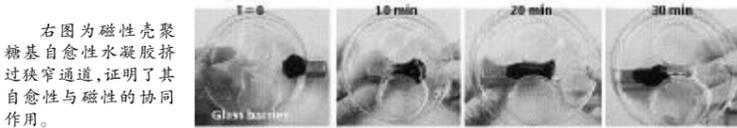
临床可行性

有了这一成果,课题组进而将目光转向细胞治疗。

依旧是壳聚糖的一个衍生物,加上功能化的聚乙二醇,这次他们把细胞也带上了。细



左图为自愈壳聚糖基水凝胶(上;中间打出的孔洞在2小时后自愈)与无自愈的明胶(下)对比实验。



右图为磁性壳聚糖基自愈性水凝胶挤过狭窄通道,证明了其自愈性与磁性的协同作用。

胞的生存条件更加苛刻,它能够在这种神奇的水凝胶中存活吗?

实验结果再次令研究人员兴奋不已。博士生杨斌在室温、pH值7.0的温和条件下把细胞、成胶元素相混合,不到1分钟,包含着细胞的水凝胶就迅速形成了。在激光共聚焦显微镜下观察3D水凝胶中的细胞存活情况,杨斌发现只有极少量的死亡细胞。实验开始后24小时和72小时的观察结果显示,细胞在水凝胶内存活良好,死亡细胞数量没有明显增加。实验结果表明这种水凝胶的生物相容性良好,有可能成为细胞治疗的凝胶载体。实验结果已发表于2012年Polymer Chemistry(英国《高分子化学》杂志)。

接着,还有个更有趣的实验——让水凝胶动起来!

他们为水凝胶加入了磁性,赋予了这种壳聚糖基自愈性水凝胶行为的可控性。

制备方法依旧非常简单:在壳聚糖溶液中加入生物相容性良好的四氧化三铁纳米颗粒,再加上功能化的聚乙二醇。

实验结果显示,这种磁性水凝胶宛如一只“软体章鱼”:在外部磁场的驱动下,它能够通过改变自身形状,移动通过狭窄的空隙。据了解,制备出同时具有磁性和自愈性的水凝胶尚属首例。

“这是否意味着它是一种潜在的智能药物载体呢?”危岩课题组正想着。

让梦发生

目前,危岩课题组正将这一研究方向继续延伸:一是将更多功能元素融入到水凝胶体系,制备出更多新材料;二是将他们的水凝胶材料作为药物载体,展开活体实验。

“我们希望做出来的东西简单、便宜而且有用,这种多功能水凝胶或许已经接近我们的梦想。”陶磊表示。

记者获悉,最近课题组在他们的水凝胶体系里添加了生物惰性的二氧化硅,获得了具有多级孔结构的有机-无机杂化材料,这一材料在进行血细胞吸附实验时表现良好,是一种潜在的止血材料。实验结果已发表于2012年Advanced Healthcare Materials(德国《高等健康医学材料》杂志),并已申报专利。

下一步,若想让这种自愈性水凝胶真正从实验室走向临床,或许还有很多未知因素和待解决的问题,课题组正在和临床医生开展交流与合作。

或许未来的某一天,这种壳聚糖基水凝胶真的能够带着细胞或药物被直接注射到病灶附近,再通过外部磁场的作用,像“章鱼”一样准确“游”到病灶部位,并将药物固定于此,根据材料配比和生物刺激环境可控释放出药物。

这听起来像天方夜谭,但课题组正用他们的努力,让梦发生。

本周看点

栏目主持:黄明明 邮箱:mmhuang@stimes.cn

新闻背景:据本报近日报道,中科院青岛生物能源与过程所研究员李福利等人在国际上首次发现了酿酒酵母葡萄糖水解酶,为进一步发展菊芋乙醇整合生物加工菌种提供了新思路。

以菊芋或菊芋工业废渣为原料生产乙醇,是发展燃料乙醇的重要方向之一。菊芋中可转化为乙醇的主要多糖成分是菊糖,通过整合生物加工工艺,将菊糖酶产生、菊糖水解和乙醇发酵整合为同一过程,可直接发酵菊芋生产燃料乙醇。

酿酒酵母是乙醇规模化生产的最佳菌种。该研究所的科研人员前期获得了一株温度耐受性菊糖代谢酿酒酵母菌株。

与目前应用最为广泛的克鲁维酵母的外切菊糖酶基因相比,新菊糖酶基因在酿酒酵母中表达后,工程菌株表现了更高的菊糖代谢能力。

点评

寻找菊糖水解脱酶 丰富生物乙醇原料



■黄鸿志

这是对拓展生物乙醇生产原料的一个有益尝试。随着人类对可持续燃料需求的不断增大以及乙醇生产技术的不断完善,包括非粮作物及农林废弃生物质在内的原料在工业上大规模用于乙醇的生产制造将指日可待。当一种价值低的物质找到某种价值高的应用时,其本身的价值也就随之升高。生物乙醇领域将来的竞争,必定在于原料获得上的竞争。

因此,开发多种具有商业应用价值的生物质原料,是目前生物乙醇研发的主要方向之一。目前,除几种主要的农业秸秆,如玉米秸秆、麦秸秆、水稻秸秆等,能源草、甜高粱茎秆、麻类植物等也进入了乙醇生产原料的考察范围。

菊芋,又名洋姜,鬼子姜,是一种菊科向日葵属多年生草本植物。原产于北美洲,20世纪初由日本人引进到中国。菊芋是一种在生态上与经济上都具有重大价值的植物。它具有耐寒、抗风沙、繁殖力强、不易感染病虫害等特点,适用于沙地的生态治理。同时菊芋的地下块茎还含有丰富的菊糖。

菊糖是以果糖为结构单元组成的多糖,可以食用,可以作为饲料。经过深加工还可以制成低聚果糖和高纯度果糖等具有经济价值的产品。目前利用菊芋生产燃料乙醇的工艺方法集中在添加复合酶制剂与酵母(如酿酒酵母、克鲁维酵母、粟酒裂殖酵母等)同步糖化发酵工艺或水解-发酵工艺上,其共同面临的问题包括添加复合酶制剂成本高,发酵时间长等。

本技术将菊糖水解脱进一步发酵成乙醇整合至同一微生物中进行,该策略与向酿酒酵母中整合糖化酶从而实现糖化及发酵于一体的思路相似。其中的关键是要找到合适的菊糖水解脱酶。

该研究小组从酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)中分离得到一种菊糖外切酶,并构建了高效的表达载体,然后重新将其克隆到酿酒酵母中,使其能够进行高效表达。该技术简化了工艺,无须外加菊糖外切酶。采用在酿酒酵母中过表达菊糖外切酶的办法,有望在底物水解速度及乙醇得率方面得到进一步提高。而且,当使用菊糖作为酿酒酵母的碳源,还可以诱导菊糖外切酶的表达。与使用蔗糖作为碳源相比,菊糖外切酶的酶活可以提高4.3倍。从而节约了碳源的消耗。

乙醇浓度是决定某一工艺是否具备经济性的主要指标之一,一般认为,乙醇重量百分比须在4%-5%以上,才能在蒸馏成本及乙醇收益之间达到平衡。本技术产酒效率还有提升空间。目前,采用国际先进技术进行淀粉加工时,乙醇浓度可达23%,国内先进技术也可达15%,远高于本技术所达到的6.5%。为获得与菊糖其他工业应用相比较的竞争优势,本技术的过程经济性有待进一步提高。

另外,作为一种大宗化工及燃料产品,乙醇的生产需要消耗大量的原料,如何确保菊芋原料的大规模持续供应,也将成为推动该技术产业化的关键因素之一。

(作者系诺维信中国研发中心生物质能源技术经理)

分子生物学或成红曲菌研究新契机

■本报实习生 罗甜甜

微生物虽小,却在人们的生活中扮演着重要角色,比如公众熟知的乳酸菌。

事实上,还有很多微生物等待着科学家去探索,并应用于生产实践。红曲菌便是其中一种。

“虽然红曲菌是我国特色的微生物资源,但缺乏系统研究。”华中农业大学食品生物技术与安全实验室教授陈福生对此不无惋惜。但他也指出,分子生物学正在为红曲菌研究带来新的契机。

应用历史悠久

红曲菌的发酵产物——红曲,在我国的应用已逾千年,最早是把它用作食品着色剂和中药配伍。

作为活血化瘀、健脾消食的传统中药,在《本草纲目》中,红曲得到了李时珍这样的评价:“此乃人窥造化之巧者也”,“奇药也”。

在我国传统酿酒工业中,增香红曲作为一种特殊的红曲品种,还能使酒的香味更加醇厚。

早在1979年,来自日本的远藤章曾经从红色红曲菌发酵产物中分离得到一种可抑制体内胆固醇合成的活性物质,命名为Monacolin K(莫哪呵嘛K)。据陈福生介绍,北京北大维信生物科技有限公司推出的“血脂康”,其主要成分就是含有Monacolin K的红曲,目前已占据我国降血脂药物市场约半壁江山。

近年来,红曲菌生产的相关产品在我国发展非常迅速。以红色色素为例,在《食品添加剂使用卫生标准》(GB2760-2007)的40多种天然食用色素中,仅有的2种来自微生物的着色剂——红曲米和红曲红,均为红曲菌的发酵产物。红色色素的销量还在逐年增加,2010年成为我国增长速度最快的食品着色剂品种,年产量达1万吨,年产值10多亿元人民币。

诸多问题待解

与红曲菌历史悠久应用相比,研究中需

要解决的问题依然很多。

“在红曲菌的研究中,分类争议一直存在。”陈福生对《中国科学报》记者说,“最早是日本人作的分类,认为有30多个种,中科院微生物研究所的李钟庆等中国科学家也作了一些分类研究,认为至少有10多个种。”

然而,1983年Hawksworth, D. L.和Pitt, J. I.在《澳大利亚植物学杂志》(Australian Journal of Botany)发表了红曲菌新的分类,认为红曲菌只有3个种。从那时起,国际上就采用这个分类体系。但是,中国学者往往同时采用两种分类方法,从而给研究造成一定麻烦,因为有些菌种在中国存在而在国外则可能不认可。

除此之外,安全性也成为红曲菌及其相关产品的一大问题。

1995年,法国Blanc等证实从红曲中分离到的Monascidin A,就是有毒物质桔霉素,从而引起了世界各国对红曲安全性的高度重视。陈福生说:“目前,在我国作为食品添加剂的红曲米(粉)和红曲红都没有规定桔霉素的允许含量。主要是因为对桔霉素的限量标准存在争议。”

红色色素的稳定性问题亦值得关注。“红色色素在应用中有个很大的问题就是稳定性,特别是放到阳光下一照就很容易褪色。”陈福生表示,目前这个问题还没有得到很好的解决。

此外,功能红曲还存在有效成分的问题。陈福生介绍说,降血脂功能红曲中的Monacolin K存在酸式与内酯式结构两种形式,其中内酯式的Monacolin K须在体内水解成相应的酸式才能发挥药效,由于这一过程需要消耗体内的羟基酯酶,所以长期使用会增加肝肾负担。因此,如何提供功能性红曲中Monacolin K酸式结构的含量是当前一个热点问题。

“目前研究认为,红曲菌还能产生很多其他功能性成分,比如可以产生具有降血压作用的γ-氨基丁酸。另外,关于红曲预防老年人骨质疏松的功能也正在研究之中。”陈福生说。



红曲菌产品 陈福生供图

分子生物学介入

针对上述问题,学界普遍认为红曲菌分子生物学研究有望推动其解决。

对于红曲菌分类的困惑,陈福生表示,依据一些分子标签进行的微生物分类相对比较客观。采用基于DNA特征的红曲菌分类结果,可以作为红曲菌形态分类的补充,从而更加客观、真实地反映红曲菌的系统发育关系。

红曲菌是具有“东方特色”的一类微生物,西方国家对其研究很少,而对其分子生物学的研究更是几乎为零。

对此,从上世纪末开始,华中农业大学食品生物技术与安全实验室等国内相关研究单位,为准备和积累红曲菌的遗传与分子研究材料起步进行了相关研究的探索,并取得了很好的进展。

陈福生介绍说:“我们实验室建立的红色红曲菌(Mruber)M-7的T-DNA插入突变文库为红曲菌相关代谢物基因簇的克隆与功能分析,以

及代谢网络调控等红曲菌分子生物学研究提供了材料,并大大促进了相关分子机制研究。”

据悉,到目前为止,红曲菌中桔霉素和Monacolin K等代谢产物相关基因簇已经克隆。

此外,陈福生表示,他们已经成功克隆并采用基因敲除证明了与红色色素生物合成相关的聚酮合酶(PKS)基因,其全长为8.1kb。并且,通过分析聚酮合酶基因相邻的红曲菌基因组序列,得到了一个全长为53kb与色素相关的基因簇。

2010年,华中农业大学食品生物技术与安全实验室完成了红色红曲菌M-7的全基因组序列的分析,发现该菌除了含有桔霉素、色素和Monacolin K等代谢产物的PKS基因外,还有6个其他的PKS基因,10多个NRS基因。这些基因及其相关基因簇的发现,表明红曲菌还可能分泌其他很多有益或者有害的物质,所以非常值得深入研究和挖掘。陈福生说。