

# 寡肽阳离子脂质体作为基因载体的体外研究

崔 烨, 王 璐, 孙 琼, 张 灿\*

(中国药科大学新药研究中心, 南京 210009)

**摘要** 采用阳离子寡肽脂质材料赖氨酰化谷氨酸双十四醇酯( $T_2$ GL)制备阳离子脂质体(CL),与增强型绿色荧光蛋白质粒(pEGFP)静电结合形成复合物(CL/pDNA),CL/pDNA粒径和表面电位分别为( $132.3 \pm 1.0$ ) nm和+( $31.35 \pm 2.99$ ) mV。考察CL/pDNA对肝素及脱氧核糖核酸酶I(DNase I)的稳定性,结果表明,CL/pDNA可被适宜浓度的肝素竞争性解组装释放pDNA,其对DNase I的稳定性明显优于市售制剂Lipofectamine 2000。研究CL与pDNA的比例(N/P)及质粒用量对转染效率的影响,结果显示当N/P为3,质粒用量4  $\mu$ g时,CL/pDNA的转染效率最佳。采用CL/pDNA对3种不同的细胞进行转染,发现CL/pDNA在人源非小细胞肺癌A549细胞中转染效果最好,与Lipofectamine 2000相比,转染效率相当但细胞毒性更低,因此为进一步研究其体内行为提供了良好的基础。

**关键词** 寡肽; 阳离子脂质体; 质粒; 体外稳定性; 转染效率; 细胞毒性

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2013)04-0328-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20130408

## *In vitro* evaluation of cationic liposomes prepared with oligopeptide-based lipids for plasmid DNA delivery

CUI Ye, WANG Lu, SUN Qiong, ZHANG Can\*

Center of Drug Discovery, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** Cationic liposomes(CL) were prepared using ditetradecyl *N*-lysyl-*L*-glutamate( $T_2$ GL) as cationic lipid and soybean lecithin as helper lipid. Lipoplexes(CL/pDNA) were formed between the CL and plasmid EGFP due to electrostatic interaction. The particle size of CL/pDNA was assayed to be ( $132.3 \pm 1.0$ ) nm while Zeta potential was +( $31.35 \pm 2.99$ ) mV. Both CL and CL/pDNA were unilamellar vesicles in terms of morphology. The release of pDNA from CL/pDNA occurred when incubated with the appropriate concentration of heparin. When incubated with DNase I, there was no change to CL/pDNA but there existed degradation of pDNA, either naked or bound with Lipofectamine 2000. CL/pDNA was found to possess the highest transfection efficiency(TE) at N/P ratio of 3 and pDNA weight of 4  $\mu$ g. TE of CL/pDNA was evaluated using 3 kinds of cell lines. In A549 cells, CL/pDNA yielded almost equal TE but much lower cell toxicity if compared with Lipofectamine 2000 reagent. Therefore, it suggested that CL/pDNA be a promising genetic vehicle worth of *in vivo* evaluation.

**Key words** oligopeptide; cationic liposomes; plasmid; *in vitro* stability; transfection efficiency; cytotoxicity

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81072589; No. 81273468)

在肿瘤的治疗中,基因治疗已成为一种重要的策略,通过载体将目的基因运送至靶部位,达到治疗效果<sup>[1]</sup>。基因载体主要分两大类:病毒类载体及非病毒类载体。病毒类载体转染效率高,但制备困难,易引发感染及免疫刺激反应,限制了其在临床上的

广泛运用<sup>[2-3]</sup>。非病毒类载体制备简单,不易产生免疫原性,主要包括阳离子聚合物(如聚乙烯亚胺、多聚赖氨酸)<sup>[4-5]</sup>及阳离子脂质体。阳离子聚合物因其强正电性而具有很大的细胞毒性,而由两亲性脂质材料制成的阳离子脂质体毒性较低<sup>[6-7]</sup>。两亲

性脂质材料通常由阳离子头部及疏水烷基长链组成。研究发现,以寡肽作为材料的阳离子头部,双长链烷基作为疏水部分,可达到较高的转染效率及较低的毒性<sup>[8-10]</sup>。然而基因载体通常具有一定的细胞选择性,若能在人源肿瘤细胞中实现高效转染,对于肿瘤治疗领域则有着积极的意义。

本研究以实验室自制的赖氨酰化谷氨酸双十四醇酯作为阳离子寡肽脂质材料,混合大豆磷脂S100制备得到了基于寡肽的阳离子脂质体,与增强型绿色荧光蛋白质粒(plasmid enhanced green fluorescent protein, pEGFP)复合后对A549、MDA-MB-231及HepG2 3种人源肿瘤细胞株进行转染,考察该载体的转染效率,并对其基因包埋效率、理化性质、体外稳定性、细胞毒等方面进行了研究。

## 1 材 料

### 1.1 药品与试剂

质粒小提试剂盒(北京天根生化科技有限公司);大豆磷脂S100(PC,上海东尚实业有限公司);赖氨酰化谷氨酸双十四醇酯(ditetradecyl N-lysyl-L-glutamate, T<sub>2</sub>GL,实验室自制);胆固醇(Chol,上海惠兴生化试剂有限公司);pEGFP(实验室提取扩增);Lipofectamine 2000(美国Invitrogen公司);DNase I(碧云天生物技术研究所);甲醇(色谱纯,山东禹王实业有限公司);其余试剂为市售分析纯。

### 1.2 仪 器

ZetaPlus粒径电位测定仪(美国Brookhaven Instruments公司);JY92-II N超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);酶联免疫测定仪(美国赛默飞世尔公司);倒置荧光显微镜(日本奥林巴斯公司);DYY-8B稳流稳压电泳仪(南达生物技术开发公司)。

### 1.3 细胞株

人源非小细胞肺癌A549细胞株、人源乳腺癌MDA-MB-231细胞株和人源肝癌HepG2细胞株由中国药科大学生命科学院馈赠。

## 2 方法与结果

### 2.1 质粒的扩增与纯化

pEGFP质粒在DH5 $\alpha$ 大肠杆菌中进行扩增,采用质粒小提试剂盒对其进行提取纯化<sup>[11]</sup>。紫外

分光光度法测定 $A_{260}/A_{280}$ 以确定pDNA纯度。

提取的质粒DNA经凝胶阻滞电泳显示,其位置与对照质粒pEGFP条带位置一致;紫外分光光法定量检测表明,其 $A_{260}/A_{280}$ 为1.87(纯DNA $A_{260}/A_{280}$ 约为1.8),满足纯度检测要求。

### 2.2 阳离子脂质体及脂质体/质粒复合物的制备

采用薄膜分散法制备阳离子脂质体(cationic liposomes, CL)<sup>[12]</sup>。精密称取T<sub>2</sub>GL 20 mg、PC 20 mg及Chol 4 mg,加甲醇4 mL溶解,置于茄形瓶中40℃减压蒸发成膜,真空过夜;加入纯水5 mL,37℃水浴30 min,冰浴探头超声15 min,依次过0.45 μm及0.22 μm微孔滤膜即得CL,置4℃下保存备用。

固定质粒量为1 μg,按照不同的CL与pDNA间电荷比(N/P)将CL加入到质粒溶液中,纯水定容至50 μL,涡旋混匀15 s,室温静置20 min,即得阳离子脂质体与质粒静电结合的复合物CL/pDNA。

取质粒1 μg及Lipofectamine 2000 2.5 μL,分别用纯水定容至25 μL,室温静置5 min后,将两者混合均匀,室温静置20 min,即得复合物Lipofectamine 2000/pDNA。

### 2.3 粒径分布及电位测定

取CL及CL/pDNA溶液各50 μL,纯水稀释至3 mL,测定其粒径及Zeta电位。本研究制备的CL粒径为(70.5 ± 1.4) nm,表面电位为+(42.75 ± 3.40)mV。按照不同N/P与质粒复合后,粒径和表面电位变化如图1所示。当N/P在0.5~3之间时,CL/pDNA粒径较大,且粒子分散不均匀;随着N/P的增大,粒径显著减小,最终稳定在130 nm左右。CL/pDNA的电位则随着N/P的增大而由负电逐渐变为正电,且最终稳定在+30 mV左右。

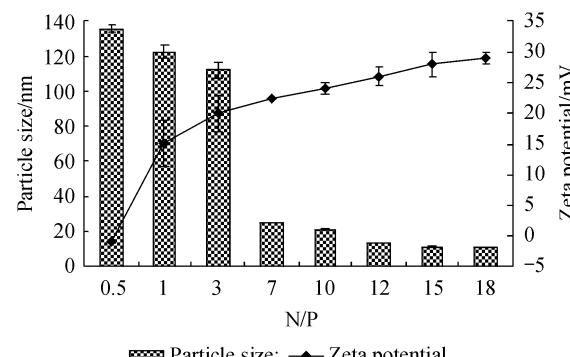


Figure 1 Particle size and Zeta potential of CL/pDNA at various N/P ratio ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ). CL: Cationic liposomes

## 2.4 透射电镜观察 CL 及 CL/pDNA 形态

取 CL 及 CL/pDNA 溶液, 滴至铺有碳膜的铜网上, 干燥后以 2% 磷钨酸溶液负染 1 min, 干燥过夜, 于透射电镜下观察并拍照, 结果如图 2 所示。CL 及 N/P = 7 的 CL/pDNA 均呈单层囊泡状, 粒子大小分别在 100 及 200 nm 左右, 与激光粒度仪测定的结果基本一致。

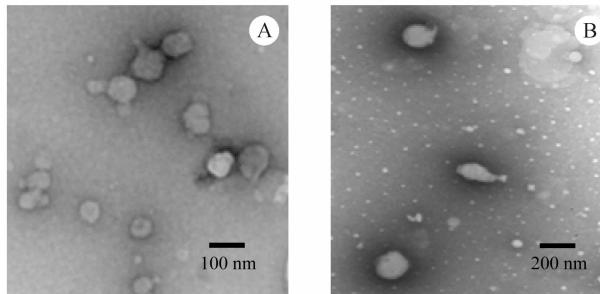


Figure 2 TEM images of CL (A) and CL/pDNA (B)

## 2.5 凝胶阻滞电泳

称取琼脂糖 0.6 g, 溶于电泳缓冲液 60 mL 中, 加热溶解, 稍冷却后加入 Goldview 染色剂 4.5  $\mu$ L, 混匀制胶。制备不同 N/P 的 CL/pDNA, 各吸取 20  $\mu$ L 与溴酚兰缓冲液 4  $\mu$ L 混匀, 加至上样孔中。电场电压 90 V, 电泳时间 80 min, 于紫外灯下观察拍照。

CL 对质粒的包埋效果如图 3 所示: 随着 N/P 的增大, 质粒逐渐被 CL 包埋, 游离的 DNA 条带亮度逐渐减弱, 当 N/P 达到 0.5 时, 质粒被完全包埋, 沸道中 DNA 条带消失。

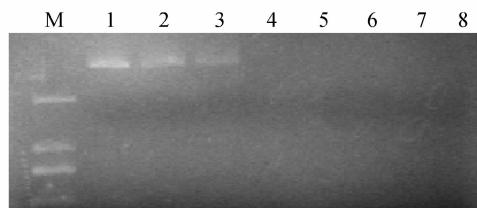


Figure 3 Gel retardation of CL/pDNA under various N/P ratios  
M: Marker; Lane 1-8: N/P ratios of 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 3, 5, 7, respectively

## 2.6 稳定性

2.6.1 肝素置换稳定性 配制 N/P = 3 及 N/P = 7 的 CL/pDNA, 分别加入不同浓度的肝素钠溶液, 使终浓度分别为 0, 20, 50, 80, 100  $\mu$ g/mL, 涡旋 30 s, 37 °C 水浴静置 1 h, 进行琼脂糖凝胶电泳。结果如图 4 所示: 在低浓度肝素溶液中, 没有游离的

DNA 条带出现, 说明复合物此时保持稳定状态; 当肝素浓度升高到 80  $\mu$ g/mL (N/P = 3) 及 100  $\mu$ g/mL (N/P = 7) 时, DNA 便从复合物中置换出来, 且高 N/P 的复合物需要更高浓度的阴离子才能实现在细胞内解组装而释放 DNA。

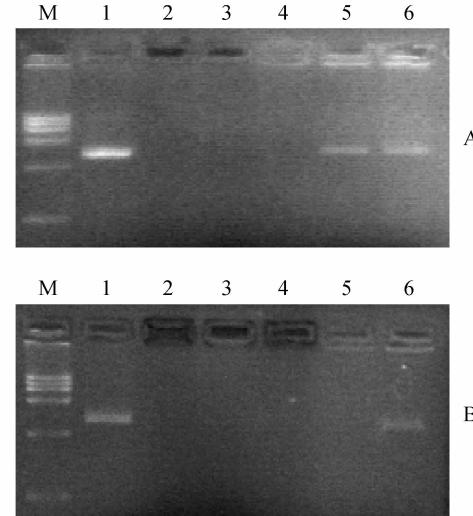


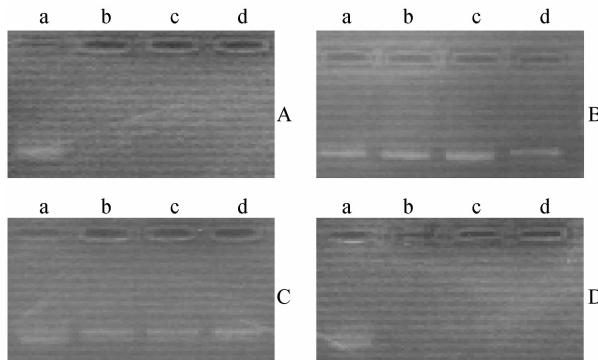
Figure 4 Disaggregation effects of heparin sodium (A: N/P = 3; B: N/P = 7) on CL/pDNA  
M: Marker; Lane 1: Naked pDNA; Lane 2-6: Concentrations of heparin sodium are 0, 20, 50, 80 and 100  $\mu$ g/mL, respectively

2.6.2 核酸酶稳定性 配制 N/P = 3 及 N/P = 7 的 CL/pDNA (含 4  $\mu$ g 质粒), 分别用纯水定容至 100  $\mu$ L, 加入反应缓冲液 (10  $\times$ ) 12  $\mu$ L 及 DNase I (1 U/ $\mu$ L) 12  $\mu$ L, 于 37 °C 水浴下分别孵育 0.5, 1, 2 h, 取溶液 40  $\mu$ L, 加入 EDTA (25 mmol/L) 5  $\mu$ L, 于 65 °C 水浴下静置 10 min 后, 加入等体积质粒抽提液 [Tris 平衡酚-氯仿-异戊醇 (25: 24: 1)], 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液进行琼脂糖凝胶电泳。裸 pDNA 及其与 Lipofectamine 2000 形成的复合物 (Lipofectamine 2000/pDNA) 分别作为阴性对照和阳性对照。实验结果如图 5 所示: 裸质粒组与 Lipofectamine 2000/pDNA 组在与 DNase I 孵育 0.5 h 后, 沸道内 DNA 条带消失, 说明 DNA 被 DNase I 降解; 而 N/P = 3 及 N/P = 7 的两组 CL/pDNA 在与 DNase I 孵育 2 h 后, 沸道内仍有清晰 DNA 条带, 且亮度与对照质粒相当, 说明 CL/pDNA 可保护 DNA 不被 DNase I 降解, 具有很好的核酸酶稳定性。

## 2.7 细胞转染

取对数生长期的 A549 细胞, 以每毫升 1  $\times$

10<sup>5</sup>个细胞的密度接种于12孔板,置37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,至细胞融合率达60%~70%。用无血清无双抗的1640培养基孵育细胞,每孔加入CL/pDNA 100 μL,于培养箱中培养4 h。更换有血清无双抗的1640培养基,继续培养48 h,于倒置荧光显微镜下观察细胞中绿色荧光蛋白的表达。



A: Naked pDNA; B: CL/pDNA (N/P = 3); C: CL/pDNA (N/P = 7); D: Lipofectamine 2000/pDNA

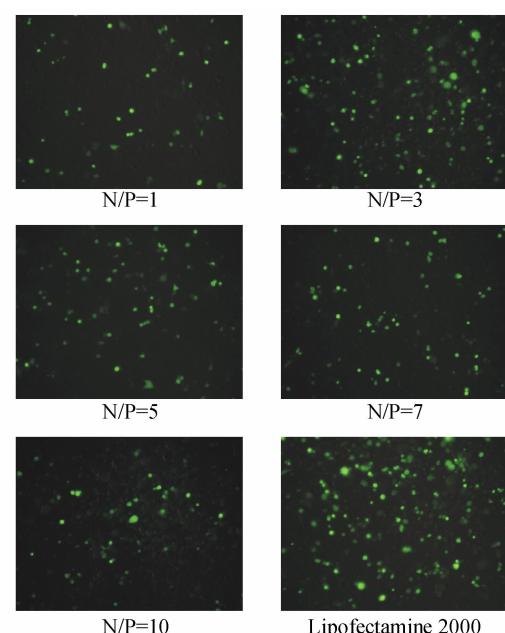
**Figure 5** Stability of CL/pDNA against DNase I

a,b,c,d refer to 0,0.5,1,2 h, respectively

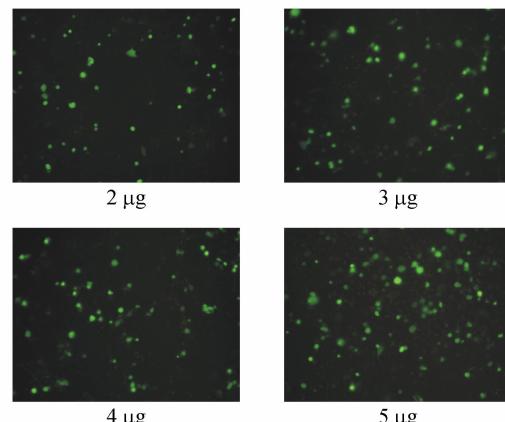
**2.7.1 N/P对CL/pDNA转染效率的影响** N/P是影响载体转染效率的一个重要因素,只有在一定范围内才可实现有效的基因转染。如图6所示,当N/P=3时,绿色荧光蛋白表达量较高,基本达到市售制剂Lipofectamine 2000的转染水平;而随着N/P的继续增大,绿色荧光蛋白的表达量逐渐降低。

**2.7.2 质粒用量对CL/pDNA转染效率的影响** 本研究考察了不同质粒用量时CL/pDNA的转染能力。如图7所示,当DNA用量从2 μg增加到5 μg时,绿色荧光蛋白表达量逐渐增加,但DNA用量为5 μg时,细胞形态发生了萎缩,且出现细胞碎片,可能是此时因为载体用量的相应增加,对细胞造成一定的毒性,从后续的细胞毒性实验中亦可发现,此剂量时细胞的存活率低于80%,毒性较大。因此确定质粒最佳用量为4 μg。

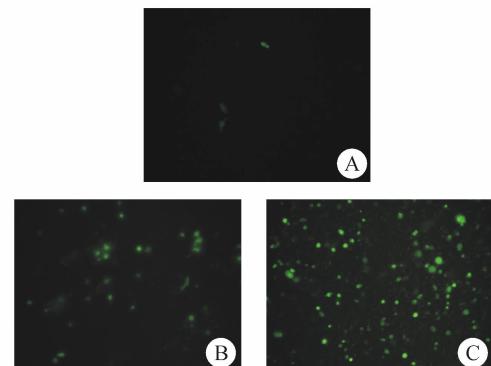
**2.7.3 细胞种类对CL/pDNA转染效率的影响** CL/pDNA在不同细胞中的转染效率如图8所示,在3种细胞中CL/pDNA均有转染,但在A549细胞中的转染效率明显高于MDA-MB-231细胞及HepG2细胞,说明CL/pDNA对A549细胞具有较好的选择性。



**Figure 6** Enhanced green fluorescent protein (EGFP) expression in A549 cells at 48 h post-transfection with CL/pDNA at N/P = 1,3,5,7, 10 detected by fluorescence microscopy taking Lipofectamine 2000 as control



**Figure 7** EGFP expression in A549 cells at 48 h post-transfection with CL/pDNA using different amount of pDNA detected by fluorescence microscopy



**Figure 8** EGFP expression in MDA-MB-231 (A), HepG2 (B), A549 (C) cells at 48 h post-transfection with CL/pDNA detected by fluorescence microscopy

## 2.8 细胞毒性

MTT 法考察制剂对细胞存活率的影响<sup>[13]</sup>。将对数生长期的 A549 细胞以每孔  $1 \times 10^4$  个细胞的密度接种于 96 孔板, 每孔 200  $\mu\text{L}$ , 设 6 个复孔, 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养过夜至细胞融合至 50% ~ 60%。将孔内更换成不含血清的 1640 培养基, 加入不同浓度的 CL/pDNA 溶液, 继续培养 24 h。每孔加入噻唑蓝 (MTT, 5 mg/mL) 20  $\mu\text{L}$ , 培养 4 h 后弃去上清液, 每孔加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$ , 振摇使结晶完全溶解, 于酶联免疫测定仪 570 nm 波长处测定吸收度。细胞存活率 (%) =  $(A - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}) \times 100$ , 其中  $A$  代表实验组细胞平均吸收度;  $A_{\text{control}}$  代表对照组细胞平均吸收度;  $A_{\text{blank}}$  代表调零孔平均吸收度。

实验结果如图 9 所示, 脂质浓度较低时 ( $\leq 10 \mu\text{g/mL}$ ), 两种制剂的细胞存活率均达到 80% 以上, 毒性较低; 当脂质质量浓度增大至 100  $\mu\text{g/mL}$  时, Lipofectamine 2000/pDNA 组细胞大量死亡, 细胞存活率低于 5%, 而 CL/pDNA 组的细胞存活率仍接近 60%, 毒性远低于 Lipofectamine 2000/pDNA。

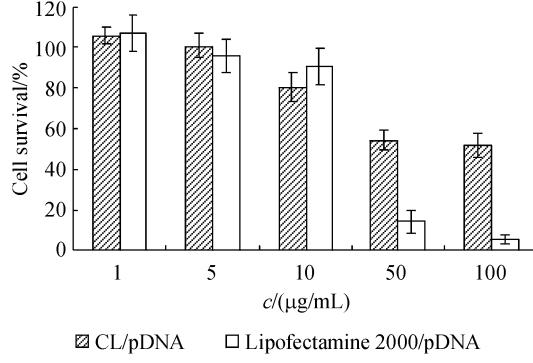


Figure 9 Toxicity of A549 cells transfected with CL/pDNA compared with Lipofectamine 2000/pDNA ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

## 3 讨 论

DNase I 作为存在于血浆和细胞液的主要核酸酶, 可特异性地水解 pDNA 从而降低转染效率; CL/pDNA 进入细胞后, pDNA 需在胞质多种低浓度阴离子物质的竞争性作用下, 从 CL/pDNA 中解组装以便到达细胞核进行转录、翻译。本研究中, CL/pDNA 能有效保护 pDNA 不受核酸酶降解; 选择负电性肝素作为阴离子模型, 考察 CL/pDNA 在不同肝素浓度下的解组装<sup>[14~15]</sup>, 发现复合物 N/P

越高, 其解组装所需肝素浓度也越高, 从不同 N/P 对转染效率的影响中可得出, 超越某一临界值 (如 N/P = 3) 后, N/P 的继续增大将导致转染效率降低, 说明此时复合物虽被细胞摄取, 但由于过高 N/P 的复合物在细胞内解组装释放游离 pDNA 较困难, 从而导致绿色荧光蛋白表达量的降低。

细胞毒性是基因载体设计中一个重要方面, 本实验中 CL/pDNA 的细胞毒性远低于 Lipofectamine 2000/pDNA, 原因可能如下: Lipofectamine 2000 转染试剂中含有三氟乙酸二甲基-2,3-二油烯氨基丙基-2-(2-精胺甲酰氨基)乙基铵 (DOSPA), 当在细胞内与质粒解组装后, DOSPA 可能会与细胞器发生聚集, 从而导致细胞死亡; 而基于寡肽的阳离子脂质材料在与质粒解组装后易被降解, 因此细胞毒性较低<sup>[16]</sup>。

基因载体通常具有一定的细胞选择性, CL/pDNA 在 A549 细胞中的转染效率明显高于 MDA-MB-231 细胞及 HepG2 细胞, 这可能与材料本身结构及细胞表面受体的表达有关, 其具体机制还需进一步研究验证。

## 4 结 论

本研究将本课题组自行合成的阳离子寡肽脂质材料制备成阳离子脂质体并用于质粒的传递。阳离子脂质体能有效包裹质粒, 保护质粒不被降解, 且入胞后复合物发生解组装, 使质粒进入细胞核从而实现转染。与市售转染试剂 Lipofectamine 2000 相比, 阳离子脂质体在 A549 细胞中的转染效率与其相当, 但毒性远低于市售制剂。综上所述, 该阳离子脂质体是一种有效的非病毒类基因载体, 为进一步研究其体内行为提供了良好基础。

## 参 考 文 献

- [1] Mao S, Sun W, Kissel T. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, **62** (1): 12~27.
- [2] Raper SE, Yudkoff M, Chirmule N, et al. A pilot study of *in vivo* liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency [J]. *Hum Gene Ther*, 2002, **13** (1): 163~175.
- [3] Stanton MG, Colletti SL. Medicinal chemistry of siRNA delivery [J]. *J Med Chem*, 2010, **53** (22): 7 887~7 901.
- [4] Itaka K, Yamauchi K, Harada A, et al. Polyion complex micelles from plasmid DNA and poly (ethylene glycol)-poly (L-lysine)

block copolymer as serum-tolerable polyplex system: physico-chemical properties of micelles relevant to gene transfection efficiency [J]. *Biomaterials*, 2003, **24**(24): 4 495 – 4 506.

[5] Okuda T, Kidoaki S, Ohsaki M, et al. Time-dependent complex formation of dendritic poly(L-lysine) with plasmid DNA and correlation with *in vitro* transfection efficiencies [J]. *Org Biomol Chem*, 2003, **1**(8): 1 270 – 1 273.

[6] Seow Y, Wood MJ. Biological gene delivery vehicles: beyond viral vectors [J]. *Mol Ther*, 2009, **17**(5): 767 – 777.

[7] Xu L, Anchordoquy T. Drug delivery trends in clinical trials and translational medicine: challenges and opportunities in the delivery of nucleic acid-based therapeutics [J]. *J Pharm Sci*, 2011, **100**(1): 38 – 52.

[8] Kim HS, Moon J, Kim KS, et al. Genetransferring efficiencies of novel diamino cationic lipids with varied hydrocarbon chain [J]. *Bioconjug Chem*, 2004, **15**(5): 1 095 – 1 101.

[9] Kim HS, Song IH, Kim JC, et al. *In vitro* and *in vivo* gene-transferring characteristics of novel cationic lipids, DMKD (*O*, *O*'-dimyristyl-*N*-lysyl aspartate) and DMKE (*O*, *O*'-dimyristyl-*N*-lysyl glutamate) [J]. *J Control Release*, 2006, **115**(2): 234 – 241.

[10] Obata Y, Suzuki D, Takeoka S. Evaluation of cationic assemblies constructed with amino acid based lipids for plasmid DNA delivery [J]. *Bioconjug Chem*, 2008, **19**(5): 1 055 – 1 063.

[11] Sun XD, Han LM, Wang Z, et al. Comparison between plasmid DNA extraction and purification methods [J]. *J Shaanxi Institute Edu* (陕西教育学院学报), 2009, **25**(2): 86 – 88.

[12] Duarte S, Faneca H, Lima MC. Folate-associated lipoplexes mediate efficient gene delivery and potent antitumoral activity *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Pharm*, 2012, **423**(2): 365 – 377.

[13] Suh MS, Shim G, Lee HY, et al. Anionic amino acid-derived cationic lipid for siRNA delivery [J]. *J Control Release*, 2009, **140**(3): 268 – 276.

[14] Mao S, Neu M, Germershaus O, et al. Influence of polyethylene glycol chain length on the physico-chemical and biological properties of poly(ethylene imine)-graft-poly(ethylene glycol) block copolymer/siRNA polyplexes [J]. *Bioconjug Chem*, 2006, **17**(5): 1 209 – 1 218.

[15] Kwok A, Hart SL. Comparative structural and functional studies of nanoparticle formulations for DNA and siRNA delivery [J]. *Nanomedicine*, 2011, **7**(2): 210 – 219.

[16] Leventis R, Silvius JR. Interactions of mammalian cells with lipid dispersion containing metabolizable cationic amphiphiles [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1990, **1023**(1): 124 – 132.

• 新药研发 •

## 2013 年全球新药研发概况(2)

企业呈现多元变化 2013 年数据显示, GSK 公司继续排名第一, 其在研产品数量与去年相比有所增加, 并且远远超过了其他竞争对手。辉瑞制药的在研产品数量排名位居第 5 位, 公司正在进一步优化产品线。罗氏公司数量变化也是 TOP 25 中增幅最大的。从排名情况来看, 除了排序上稍微有些变动外, 排名 TOP 10 的企业基本未变。排名 11 ~ 20 位的企业变化也不大, 反映出在大型制药公司中出现的大型并购活动较少。在 2013 年 1 月 2 日, 雅培对其业务进行了拆分整合, 将其已上市处方药并入一家新的公司——艾伯维( AbbVie ), 数据显示, 该新公司拥有 110 个在研项目, 而一些产品的最终归属仍未确定下来。日本住友制药是今年排行榜 TOP 25 中新入围者, 该公司取代了日本三菱田边株式会社, 在 TOP 25 中, 日本制药企业就占据了 7 个席位。尽管主导企业出现微小变化, 但是与这些公司相关的一些指标还是可以帮助我们了解行业变化趋向。其中一个重要的指标就是 TOP10 制药企业中原研药品占在研药品总量的比例。

与此相对应的是一些小型公司(指仅有 1 种或 2 种在研药物的公司)的数量再次出现了增长, 这种情况表明: 大型制药公司在新药研发方面越来越谨慎, 而小型制药公司或利基公司的参与也在逐渐增多。统计数据也表明, 从制药研发领域退出的企业也在增加。尽管自 2012 年 5 月到现在已有 308 家新企业进入制药研发领域, 增长势头强劲, 但是研发企业的总量却并没有增加那么多。目前制药研发公司的总数达到了 2745 家, 与 2012 年相比仅增加了 40 家。即使将本次考察时间缩短的因素考虑在内, 从数据来看企业数量的增速也是放缓了。2011-2012 年, 该数据增加了 13.3%, 但在过去 8 个月中, 增幅仅为 1.5%。

(MedSci, 本刊有删节)