

沉默 CC 型趋化因子受体 5 对人乳腺癌细胞黏附及迁移的影响

林森森¹, 王从品², 万淑颖³, 孙立¹, 袁胜涛^{3*}, 张陆勇^{1**}

(¹中国药科大学新药筛选中心, 南京 210009; ²南京同仁医院药剂科, 南京 211100;

³中国药科大学江苏省药效学研究评价服务中心, 南京 210009)

摘要 构建 CC 型趋化因子受体 5 (CCR5) 基因 shRNA 的真核表达载体, 探讨沉默 CCR5 对乳腺癌细胞黏附与迁移能力的影响。在多种人乳腺癌细胞中检测 CCR5 的基因表达, 选择 CCR5 表达较高的 MDA-MB-231 细胞做为基因沉默的研究对象; 设计并合成 2 对靶向人 CCR5 基因的 RNA 沉默序列, 连入基因沉默载体 pSilencer 2.1-U6 中, 构建沉默质粒 shCCR5-1 和 shCCR5-2, 定量 PCR 和蛋白印迹法检测 CCR5 基因沉默的效率; 以细胞黏附实验和 Transwell 趋化小室实验分别检测沉默 CCR5 对 MDA-MB-231 细胞黏附和迁移能力的影响。结果表明, 沉默 CCR5 可以抑制 MDA-MB-231 细胞的黏附能力, 同时显著降低 MDA-MB-231 细胞的迁移和趋化。

关键词 CC 型趋化因子受体 5; CCR5; 基因沉默载体 pSilencer 2.1-U6; 乳腺癌; 黏附与迁移

中图分类号 R575 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2013)04-0362-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20130415

Effect of inhibiting CC chemokine receptor 5 on human breast cancer cell adhesion and migration

LIN Sensen¹, WANG Congpin², WAN Shuying³, SUN Li¹, YUAN Shengtao^{3*}, ZHANG Luyong^{1**}

¹New Drug Screening Center, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ²Department of Pharmacy, Nanjing Tongren Hospital, Nanjing 211100; ³Jiangsu Center for Pharmacodynamics Research and Evaluation, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract To construct shRNA eukaryotic expression vectors that targeting human CC chemokine receptor 5 (CCR5) and to investigate the biological function of CCR5 in breast cancer cell adhesion and migration, the gene expression of CCR5 in MDA-MB-231, MDA-MB-468, T47D human breast cancer cell lines was measured by quantitative PCR, and MDA-MB-231 cells highly expressing CCR5 were used in the next experiments. Secondly, to construct shRNA eukaryotic expression vectors that express shRNA targeting human CCR5, small fragments of siRNA were designed and cloned into the Ambion shRNA vector pSilencer 2.1-U6. The recombinant plasmids (shCCR5-1 and shCCR5-2) were then transiently transfected in MDA-MB-231 cells and CCR5 gene and protein expression were measured by quantitative PCR and Sestern blot. Thirdly, the effect of knockdown of CCR5 on MDA-MB-231 cell adhesion and migration was determined by adhesion assay and transwell chamber test, respectively. It was found that silencing of CCR5 greatly inhibited MDA-MB-231 cell adhesion and migration.

Key words CC chemokine receptor 5; CCR5; shRNA eukaryotic expression vector pSilencer 2.1-U6; breast cancer; adhesion and migration

This work was supported by China National Key High-Tech Innovation Project for the R&D of Novel Drugs (No. 2009ZX09302-002)

* 收稿日期 2013-01-24 通信作者 * Tel:025-83271043 E-mail: yuanst2@yahoo.com.cn

** Tel:025-83271023 E-mail: drugscreen@126.com

基金项目 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (No. 2009ZX09302-002)

趋化因子是一类具有化学趋化作用的分泌型细胞因子,趋化因子及其受体在免疫细胞归巢和定向趋化过程中具有关键作用^[1],能吸引免疫细胞到炎症局部,参与体内的免疫调节和炎症病理反应。除参与炎症反应外,趋化因子及其受体在血管生成、自身免疫性疾病、移植免疫排斥、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染等多种生理、病理过程中均发挥重要作用。除此之外,多种趋化因子受体还可能与肿瘤的生长、侵袭和转移相关^[2]。

CC型趋化因子受体5(CCR5)是3种 β 趋化因子RANTES(CCL5)、MIP-1 α 和MIP-1 β 的受体,主要表达于T淋巴细胞、单核细胞、未成熟的树突状细胞等的细胞膜表面。CCR5与T细胞、单核/巨噬细胞的活化、增殖与迁移密切相关,在免疫应答中发挥关键作用^[3]。已有报道表明,CCR5在多种肿瘤细胞中有表达,如乳腺癌、肺癌、淋巴瘤、前列腺癌等^[4-5]。由于实体肿瘤微环境中的低氧与肿瘤的发展、转移密切相关,前期研究中,构建了包含人CCR5基因核心启动子区域(1 040 bp)的荧光素酶基因报告载体(pGL3-CCR5 promoter),转染入肿瘤细胞中,双报告基因法检测缺氧下CCR5基因启动子的活性,结果表明,缺氧可以促进乳腺癌细胞中CCR5的基因表达^[6],这提示CCR5可能参与调节缺氧下肿瘤细胞的生物学功能。然而,目前有关CCR5的研究多集中于抗HIV病毒领域^[7],关于CCR5在肿瘤中的作用的报道还不多见。为进一步探讨CCR5与肿瘤细胞生物学功能之间的关系,本研究构建了CCR5基因沉默质粒pSilencer 2.1-CCR5(shCCR5-1和shCCR5-2),将其转染至人乳腺癌MDA-MB-231细胞中,观察沉默CCR5对肿瘤细胞黏附、侵袭能力的影响。

1 材料

1.1 细胞、菌株和质粒

人乳腺癌细胞MDA-MB-231、MDA-MB-468、T47D均购自中科院细胞所。MDA-MB-231与T47D细胞均培养于含10%胎牛血清(FBS)的RPMI 1640培养基中,MDA-MB-468细胞以L-15培养基传代培养(10% FBS)。人大肠杆菌DH 5 α 为本实验室所保存,沉默质粒pSilencer 2.1-U6购自美国Ambion公司。

1.2 酶和试剂

FBS、RPMI-1640、L-15(美国Gibco公司);胰酶(南京生兴生物技术有限公司)。总RNA提取试剂TRIzol、转染试剂Lipofectin 2000(美国Invitrogen公司);限制性内切酶Hind III、BamH I、T4 DNA连接酶以及逆转录试剂盒(美国Fermentas公司);胶回收和质粒提取试剂盒(Qiagen公司);寡核苷酸序列合成及测序由上海生工完成。定量PCR试剂盒PrimeScript RT Master Mix[宝生物工程(大连)有限公司];鼠抗人CCR5抗体(美国Santa Cruz公司);重组人趋化因子CCL5(CCR5的配体)(美国R&D公司);鼠抗人 β -actin单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠IgG、纤连蛋白(fibronectin,Fn)(美国Sigma公司);8 μ m Transwell小室(美国Millipore公司)。

1.3 引物

从GenBank检索出CCR5 cDNA序列设计引物。CCR5定量PCR上游引物:5'-ACGGCATT-GCTCCGTCTAAGTCAT-3',下游引物5'-ACCCTC-CTTTGGCCACAGAGTAAA-3';内参照18S上游引物:5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT-3',下游引物5'-CCATCCAATGGGTAGTAGCG-3'。相对基因表达根据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算。

2 方法

2.1 定量PCR检测CCR5在人乳腺癌细胞中的表达

采用TRIzol试剂,按照说明书的方法提取总RNA,琼脂糖电泳鉴定总RNA有无降解。取总RNA 1 μ g,以Oligo dT₁₈逆转录合成cDNA。PCR条件如下:94 $^{\circ}$ C变性1 min,60 $^{\circ}$ C退火1 min,72 $^{\circ}$ C延伸1 min,40个循环。溶解曲线条件:95 $^{\circ}$ C 1 min,55 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C至95 $^{\circ}$ C每隔0.2 $^{\circ}$ C检测1次。定量PCR反应完成后,进行一个循环的溶解曲线反应以检测产物的特异性。

2.2 siRNA靶序列的设计

从GenBank检索CCR5 mRNA序列,依据相关文献关于siRNA设计的方法,利用互联网上的设计程序寻找针对CCR5 mRNA(NM_000579.3)CDS区域的siRNA序列,BLAST比较设计的序列。设计并合成约60 bp的短发卡shRNA序列,包括Hind III与BamH I酶切位点、Sense、9 bp茎环结构

(TCTCTTGAA)、Antisense 和终止序列 TTTTT。CCR5 的基因沉默的目标序列如下:shCCR5-1, 5'-GAGCATGACTGACATCTAC-3' (目标位点:543); shCCR5-2, 5'-CTCTGCTTCGGTGTGCGAAA-3' (目标位点:1016)。同时设计作为阴性对照的无关序列:5'-TTGACATGACACTGCACGA-3' (阴性对照)。阴性对照序列经 BLAST 进行比对,与人类基因组序列无同源序列。

2.3 CCR5 shRNA 表达载体的构建与鉴定

用 TE (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA) 将合成的互补链分别溶解后混匀,按以下条件退火形成双链:90 °C 5 min, 37 °C 1 h;后经 T4 DNA 连接酶作用连入线性化的 pSilencer 2.1-U6 载体上 HindⅢ 与 BamH I 酶切位点之间。连接反应体系 20 μL 中分别加入 10 × 连接缓冲液 2 μL, 双链 DNA 10 μL, pSilencer 2.1-U6 载体 5 μL, T4 DNA 连接酶 2U, 16 °C 连接 16 h。连接产物转化大肠杆菌 DH 5α, 挑取琼脂平板上的菌落培养, 抽提质粒后送上海生工测序验证。经测序鉴定连接正确后, 大量培养以抽提高纯度沉默质粒用于细胞转染。

2.4 质粒转染

6 孔培养板上以每孔 8×10^5 个接种 MDA-MB-231 细胞, 总体积 2 mL, 37 °C 5% CO₂ 温箱培养约 24 h, 至 80% ~ 90% 融合时, 用无血清 RPMI 1640 培养基漂洗细胞 2 次, 按 Lipofectamine 2000 说明书转染细胞^[8-9]。

2.5 CCR5 基因沉默效率的验证

收获瞬时转染的细胞, TRIzol 试剂提取总 RNA, 取总 RNA 1 μg 逆转录, 按如上所述 PCR 条件作定量 PCR, 检测 CCR5 基因沉默的效率。

收获瞬时转染的细胞, 以 Western blot 检测 CCR5 基因沉默的效率。一抗浓度为 1:500, 4 °C 过夜; 二抗浓度为 1:6 000, 室温温育 1 h, 具体方法如前所述^[8-9]。

2.6 细胞黏附实验

以 PBS 配制质量浓度为 100 μg/mL 的纤连蛋白 Fn, 以每孔 100 μL 加入 96 孔板中。将 96 孔板置于 4 °C 冰箱过夜。第 2 天洗板后, 以 1% BSA 在 37 °C 封闭 1 h。收获瞬时转染 shCCR5-1 的细胞, 调整细胞密度为每毫升 1×10^5 , 分别将细胞悬液 100 μL 接种于包被的 96 孔板中, 3 复孔, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中放置 1 h。转染阴性对照的细胞

作为对照。1 h 后, 吸去孔内液体, PBS 洗涤 3 次; 每孔加入培养基 100 μL 以及 5 mg/mL MTT 20 μL, 置 CO₂ 培养箱中反应 4 h。弃上清液, 每孔加入 DMSO 150 μL, 平板摇床上振摇 5 min。酶联免疫检测仪于 A₅₇₀ 测定每孔的吸收度。

2.7 细胞迁移实验

Transwell 小室的上室内加入转入 shCCR5 沉默质粒的细胞悬液 (MDA-MB-231/shCCR5-1, 3×10^4) 200 μL, 下室加入含 2% FBS 或 100 ng/mL CCL5 因子的 RPMI 1640 培养液 1.3 mL, 具体方法如前所述^[8-9]。

2.8 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 统计软件进行数据分析。分析用 *t* 检验。P < 0.05 被认为具有统计学意义, P < 0.01 为极显著差异。

3 结果

3.1 CCR5 在人乳腺癌细胞中的表达

在 3 种人乳腺癌细胞上以定量 PCR 检测 CCR5 的基因表达, 结果如图 1 所示, MDA-MB-468、MDA-MB-231、T47D 3 种细胞中均有 CCR5 基因的表达, CCR5 在 MDA-MB-231 细胞中表达最高, 而在 MDA-MB-468 细胞中表达最低。因此, 在后续基因沉默实验中选用 CCR5 相对表达最高的 MDA-MB-231 细胞。

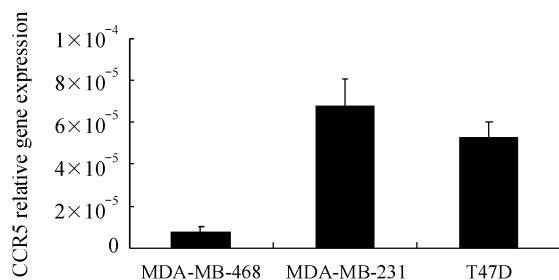


Figure 1 Relative gene expression of CCR5 in human breast cancer cell lines. Total RNA was tested for CCR5 mRNA by realtime PCR

3.2 CCR5 沉默质粒在 MDA-MB-231 细胞中的表达

分别在 MDA-MB-231 细胞瞬时转染沉默质粒 (shCCR5-1 和 shCCR5-2) 24、48 和 72 h 后, 用定量 PCR 方法检测 CCR5 的相对基因表达。如图 2A 和 2B 所示, MDA-MB-231 细胞转染质粒 shCCR5-1 或 shCCR5-2 后, CCR5 的相对表达显著低于未转染的

空白细胞或转染阴性对照的细胞,瞬时转染 shCCR5-1 和 shCCR5-2 质粒 24 和 48 h 后,CCR5 基因的沉默效率均在 80% 以上。

用 Western 印迹法检测转染 shCCR5-1 和 shCCR5-2 沉默质粒 24 h 后 CCR5 的蛋白表达,以验证定量 PCR 的结果。蛋白电泳(图 2C)表明,瞬

时转染 shCCR5-1 或 shCCR5-2 可以显著抑制 CCR5 的蛋白表达,且 shCCR5-1 的沉默效果略好于 shCCR5-2,这与定量 PCR 的结果是一致的。由于 shCCR5-1 的抑制效果略好于 shCCR5-2,因此使用 shCCR5-1 沉默质粒来进行后续的生物实验。

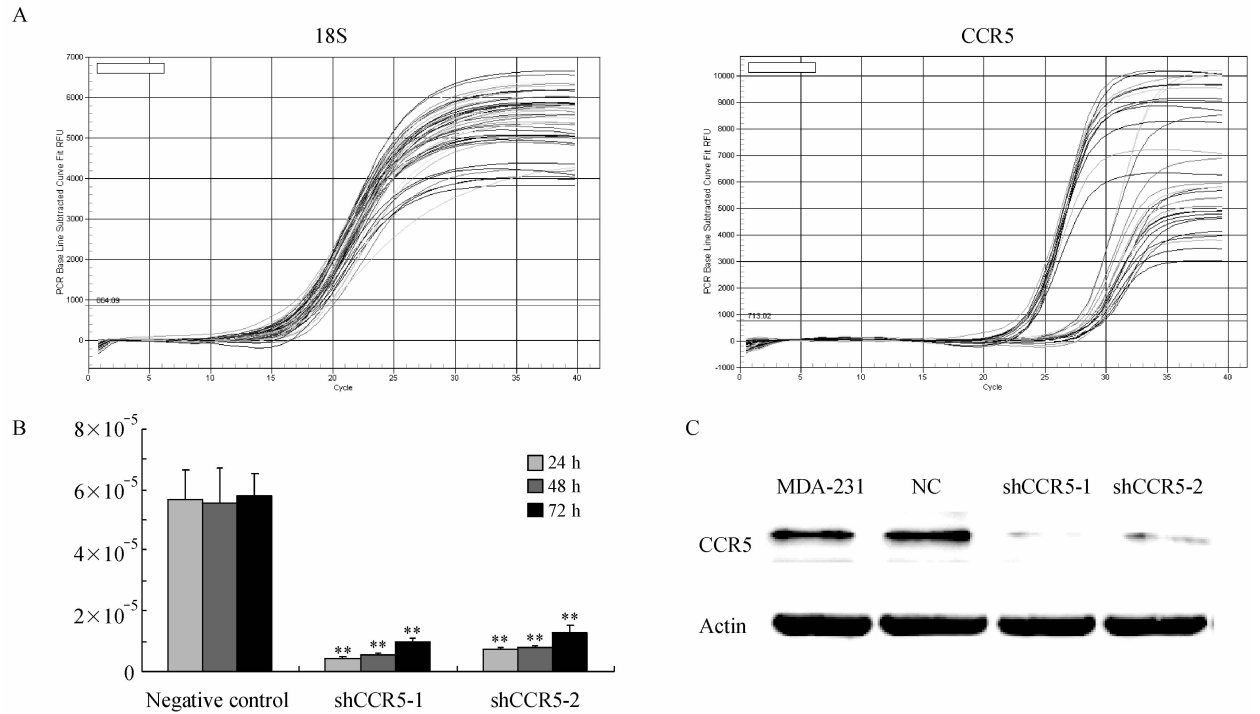


Figure 2 Knockdown of CCR5 by short hairpin RNA specifically designed against human CCR5
A; CCR5 mRNA in MDA-MB-231 cells transfected with two kinds of shCCR5s (shCCR5-1 and shCCR5-2). Relative gene expression was measured by quantitative PCR. Data shown were representative quantitative PCR charts. B, Statistical analyses of quantitative PCR results. C, CCR5 protein was detected by Western blotting in MDA-MB-231 cells transfected with shCCR5-1 or shCCR5-2 for 24 h. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs negative control group

3.3 沉默 CCR5 对 MDA-MB-231 细胞黏附能力的影响

纤连蛋白 fibronectin 是细胞外基质的主要成分之一,可和细胞外基质其他成分、纤维蛋白以及整联蛋白家族细胞表面受体结合,参与细胞黏附、分化、迁移等生理过程,在细胞黏附实验中,黏附于水化纤连蛋白层的细胞数目可以反映细胞黏附能力的大小。首先检测了沉默 CCR5 对细胞黏附能力的影响,结果表明,MDA-MB-231 细胞瞬时转染 shCCR5-1 后,细胞黏附能力有所降低,具有统计学差异(图 3, $P < 0.05$)。

3.4 沉默 CCR5 对 MDA-MB-231 细胞侵袭运动和趋化能力的影响

Matrigel 基质胶经重建后能在聚碳酸滤膜表面形成类似天然基底膜的结构,细胞侵袭穿过重

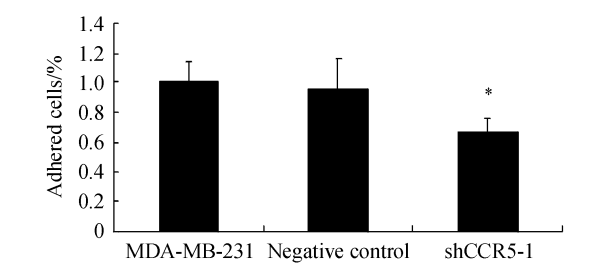


Figure 3 Knockdown of CCR5 reduced MDA-MB-231 cell adhesion. Cells were transiently transfected with shCCR5-1 or control plasmids, and subjected to adhesion assay. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs negative control group

建 matrigel 的能力反映细胞侵袭能力的大小。在 Transwell 趋化小室的下室分别加入 2% FBS 和 100 $\mu\text{g/L}$ CCL5 (RANTES) 来检测 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力和向 CCL5 因子的趋化能力。实验表明,沉默 CCR5 的表达可以显著抑制 MDA-

MB-231 细胞的侵袭能力(图 4A, $P < 0.05$); 当下室加入 CCR5 特异性的配体 CCL5 时, 沉默 CCR5 可以极大降低 MDA-MB-231 细胞向 CCL5 因子的

趋化能力(图 4B, $P < 0.05$)。各组随机抽取 6 个视野, 分别计数其迁移细胞数, 取其均值, 统计结果如图 5 所示。

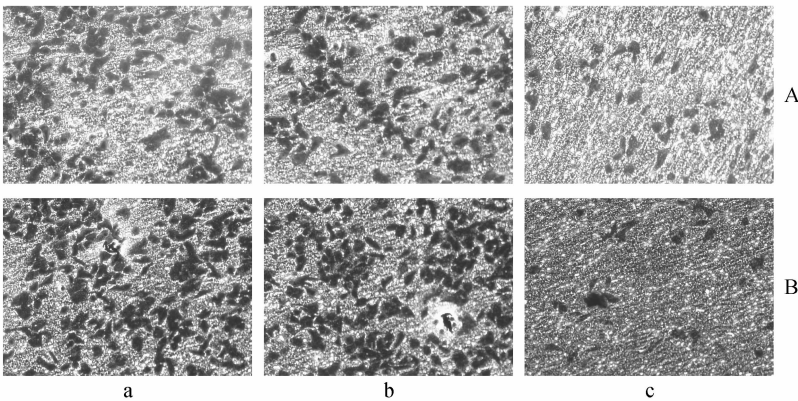


Figure 4 Blocking CCR5 expression with shRNA knockdown in MDA-MB-231 cells decreased cancer cell migration (A) and chemotactic responses to CCL5 (B). a:MDA-MB-231;b:Negative control;c:ShCCR5-1

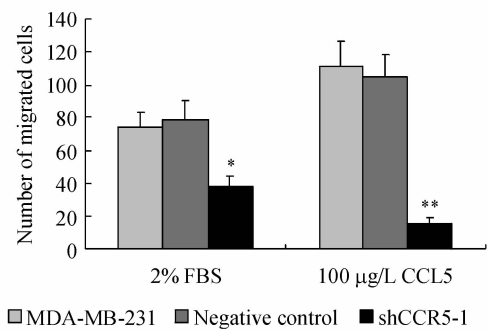


Figure 5 Statistical analyses of MDA-MB-231 cell migration after cells were transiently transfected with CCR5 shRNA knockdown vectors ($\bar{x} \pm s, n = 6$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs negative control group

4 讨 论

转移是恶性肿瘤的重要生物学特征,也是导致治疗失败的重要原因。肿瘤转移靶器官的特异性和趋化因子密切相关。肿瘤细胞膜上表达特定的趋化因子受体,肿瘤细胞可以循相应配体的浓度梯度,定向转移到趋化因子配体表达较多的组织和器官。趋化因子及其受体家族包括 50 多个趋化因子和 18 个趋化因子受体,然而,现已明确具有促进肿瘤转移作用的家族成员不多。CXC 型趋化因子受体 4 (CXCR4) 在肿瘤转移中的作用研究较为广泛^[10],阻断 CXCR4 及其配体 CXCL12 的作用可以显著抑制乳腺癌、肺癌、胃癌、结肠癌、前列腺癌等的转移。CC 型趋化因子受体 7 (CCR7) 在肿瘤的淋巴结转移中具有重要的作用^[11]。本课题组前期研究中也曾报道 CXC 型趋化因子受体 6 (CXCR6)

可以促进乳腺癌细胞的转移^[12]。其他曾经见诸报道的还有 CC 型趋化因子受体 10 (CCR10)、CXC 型趋化因子受体 5 (CXCR5) 等。

CCR5 属于 G 蛋白偶联受体超家族,具有 G 蛋白偶联受体所共有的 7 个跨膜螺旋。CCR5 与特异性配体结合后,通过与受体偶联的 G 蛋白的介导来调节胞内第二信使,具有调节 Ca^{2+} 的释放和 T 细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞的趋化性、增殖与免疫的功能。前期研究检测了缺氧对 CCR5 的影响,结果表明,CCR5 核心启动子序列中存在缺氧诱导 CCR5 基因转录的主要上调元件^[6]。已知缺氧可以显著促进肿瘤细胞的迁移运动,CCR5 是否也与肿瘤细胞的迁移运动相关? 为此,本研究设计并构建了 CCR5 shRNA 表达载体,并利用 Lipofectamine 将其成功转入高表达 CCR5 基因的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中,结果表明,两种 shCCR5 沉默质粒均可以有效抑制 CCR5 基因和蛋白的表达,沉默效率在 80% 以上。细胞黏附实验证实沉默 CCR5 可以抑制 MDA-MB-231 细胞对纤连蛋白 Fn 的黏附能力;而细胞迁移的研究表明,抑制 CCR5 的表达可以显著降低细胞的迁移运动能力,尤其是当正常 T 细胞分泌激活因子 (RANTES) 存在时,对诱导趋化的抑制更加明显。这些结果提示,沉默 CCR5 能够在一定程度上抑制肿瘤细胞的侵袭、黏附与迁移。已有报道,肿瘤微环境中的多种间质细胞,如间充质干细胞^[13]、内皮细胞^[14] 等均可以分泌 CCR5 的配体 (RANTES),从而促进了肿瘤细胞的

侵袭与转移。可以推测,如果抑制肿瘤细胞上 CCR5 的表达,将会有效降低肿瘤细胞向远处器官的转移能力。本研究也提示 CCR5 有望成为肿瘤治疗中的新靶点,靶向乳腺癌 CCR5 的基因治疗将会显示出潜在的疗效和良好的应用前景。

参 考 文 献

[1] Lazennec G,Richmond A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation [J]. *Trends Mol Med*,2010,**16**(3):133-144.

[2] Mantovani A,Savino B,Locati M,*et al.* The chemokine system in cancer biology and therapy [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010,**21**(1):27-39.

[3] Soria G,Ben-Baruch A. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer [J]. *Cancer Lett*, 2008,**267**(2):271-285.

[4] Borczuk AC,Papanikolaou N,Toonkel RL,*et al.* Lung adenocarcinoma invasion in TGFβRII-deficient cells is mediated by CCL5/RANTES[J]. *Oncogene*,2008,**27**(4):557-564.

[5] Aldinucci D,Lorenzon D,Cattaruzza L,*et al.* Expression of CCR5 receptors on Reed-Sternberg cells and Hodgkin lymphoma cell lines: involvement of CCL5/Rantes in tumor cell growth and microenvironmental interactions [J]. *Int J Cancer*, 2008, **122**(4):769-776.

[6] Wan SY,Zhang LY, Yuan ST. Analysis of hypoxic regulated CCR5 chemokine receptor promoter region expression[J]. *Nei Mongol J Tradit Chinese Med*(内蒙古中医药), 2009,**12**:32-34.

[7] Wilkin TJ,Gulick RM. CCR5 antagonism in HIV infection; current concepts and future opportunities[J]. *Annu Rev Med*,2012, **63**:81-93.

[8] Lin SS, Zhao RP, Wan SY, *et al.* Construction of eukaryotic expression vector of human chemokine CXC motif receptor 6 and characterization of its biological function [J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报),2008,**39**(6):570-574.

[9] Shi W,Sun L,Lin SS,*et al.* Construction of eukaryotic expression plasmid for human TF full-length,TF truncated and characterization of their biological function[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2009,**40**(5):465-470.

[10] Zlotnik A,Burkhardt AM, Homey B. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011,**11**(9):597-606.

[11] Pan MR,Hou MF, Chang HC, *et al.* Cyclooxygenase-2 up-regulates CCR7 via EP2/EP4 receptor signaling pathways to enhance lymphatic invasion of breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*,2008, **283**(17):11 155-11 163.

[12] Lin S,Sun L,Hu J,*et al.* Chemokine C-X-C motif receptor 6 contributes to cell migration during hypoxia[J]. *Cancer Lett*,2009, **279**(1):108-117.

[13] Karnoub AE,Dash AB, Vo AP, *et al.* Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis [J]. *Nature*,2007,**449**(7 162):557-563.

[14] Läubli H,Spanaus KS,Borsig L. Selectin-mediated activation of endothelial cells induces expression of CCL5 and promotes metastasis through recruitment of monocytes [J]. *Blood*, 2009, **114**(20):4 583-4 591.

· 新药研发 ·

强生公司未来研发的新药

强生公司近日宣布,到 2017 年公司将提交逾 10 种新药的上市申请,包括治疗丙型肝炎、免疫疾病和精神分裂症的药物以及用于流感、狂犬病和脊髓灰质炎的疫苗。在这期间,强生还计划改造现有的 25 种药物。

强生公司已经在癌症、心血管及代谢疾病、炎症、中枢神经系统、感染等 5 个领域成功研发出一系列新药,并且部分已经上市。其中治疗 2 型糖尿病的 invokana 目前已经在美国 FDA 获得批准,最近正在中国进行审批,预计 2015 年在中国上市。强生公司将研发重点放在市场规模较大但治疗方案不足的疾病领域,这一趋势在强生所发布的新药计划中有所体现。根据强生公司的计划,2017 年申请批准的药物包括丙肝药物 simeprebir,血癌药物 ibrutinib 和 daratumumab、治疗免疫系统药物 sirukumab 和 guselkumab 以及流感、狂犬病和小儿麻痹症疫苗等。

(华源医药网)