

aprK 基因敲除的氨甲酰妥布霉素工程菌的构建

李 辉, 温淑平, 洪文荣*

(福州大学生物科学与工程学院, 福州 350108)

摘 要 以温敏型穿梭质粒 pKC1139 为基础, 克隆安普霉素辛二糖合成酶基因 *aprK* 上下游序列作为同源交换臂, 构建用于敲除 *aprK* 的重组质粒 pBK5。pBK5 转化 *E. coli* ET12567 后经接合转移导入黑暗链霉菌 Tt-49, 得到单交换菌株 ST315。ST315 经松弛传代后通过影印培养与 PCR 筛选得到 *aprK* 阻断突变株 ST316。ST316 发酵效价约 1 500 ug/mL, 发酵产物经 TLC 分析, 发现安普霉素的生物合成被阻断, 得到了一株主要产氨甲酰妥布霉素的工程菌。

关键词 黑暗链霉菌; 安普霉素; 氨甲酰妥布霉素; 基因工程

中图分类号 Q784 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2013)04-0368-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20130416

Construction of carbamoyltobramycin-producing engineering *S. tenebrarius* by disruption of *aprK* gene

LI Hui, WEN Shuping, HONG Wenrong*

College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China

Abstract To construct a genetic engineering *S. tenebrarius* for production of carbamoyltobramycin. Recombinant plasmid pBK5 derived from pKC1139 was constructed for disrupting gene *aprK*. pBK5 was introduced into *S. tenebrarius*Tt-49 by conjugation. The single crossover mutant ST315 was obtained and cultivated for several rounds of sporulation in the absence of erythromycin. A desired double crossover mutant ST316 was achieved by PCR. TLC analysis indicated that ST316 produced high-yield carbamoyltobramycin, in which apramycin biosynthesis was blocked and the yield of carbamoyltobramycin was about 1 500 ug/mL.

Key words *Streptomyces tenebrarius*; apramycin; carbamoyltobramycin; genetic engineering

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 31070093) and China National Key High-Tech Innovation Project for the R&D of Novel Drugs (No. 2012ZX09201101-008)

黑暗链霉菌是一株重要的氨基糖苷类抗生素产生菌, 其发酵产物总称为尼拉霉素复合物, 主要组分为安普霉素、氨甲酰妥布霉素和少量氨甲酰卡那霉素 B^[1]。安普霉素是一种结构非常独特的氨基糖苷类抗生素, 其分子中含有一个稀有的双环辛二糖结构, 不易被氨基糖苷类抗生素钝化酶钝化^[2], 在畜禽养殖领域得到广泛应用。妥布霉素则是一种在临床上广泛使用的氨基糖苷类抗生素, 主要应用于革兰阴性菌引起的严重感染, 是治疗由绿脓杆菌引起的败血症的首选药物。此外, 妥布霉素还具有抑制基因表达过程中 mRNA 翻译过早终

止的作用^[3], 而翻译过早终止是引起囊性纤维化等分子遗传病的根本原因, 妥布霉素有望为这类遗传疾病的治疗提供新的思路与方法。

目前, 国内外报道的妥布霉素生产方法均是先从尼拉霉素复合物中分离得到氨甲酰妥布霉素, 再经高温水解去掉氨甲酰基后得到妥布霉素。但尼拉霉素复合物组分多样, 化学结构相近, 理化性质类似, 生物合成途径交织复杂^[4-5]。因此利用黑暗链霉菌生产氨甲酰妥布霉素时, 其他组分的合成, 特别是安普霉素的合成, 不仅会降低氨甲酰妥布霉素的产量, 还会给下游提取工艺带来麻烦^[5], 导致

* 收稿日期 2013-03-05 * 通信作者 Tel:13705046451 E-mail:hongwr56@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 31070093); 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(No. 2012ZX09201101-008)

氨甲酰妥布霉素的提取精制操作繁琐、生产周期过长、成本居高不下。因此,以尼拉霉素复合物生物合成途径为基础,利用基因工程对黑暗链霉菌进行菌种改良,获得单组份、高产量的氨甲酰妥布霉素生产菌株,具有重要的现实意义^[6]。

近年来,黑暗链霉菌中抗生素生物合成基因及生物合成途径的研究取得了一定进展,安普霉素与妥布霉素生物合成基因簇相继被克隆出来^[7-10],部分基因的功能也逐步阐明^[11-15],这为利用基因工程对黑暗链霉菌进行遗传改造,使之定向合成所需要的抗生素奠定了基础。本研究拟采用分子遗传学技术,阻断安普霉素生物合成基因簇中的辛二糖合成酶基因 *aprK*,探究 *aprK* 缺失后对安普霉素生物合成以及黑暗链霉菌次级代谢的影响,探索获得主要产氨甲酰妥布霉素的工程菌,从而简化从尼拉霉素复合物中提取氨甲酰妥布霉素的繁琐过程,降低生产成本,提高经济效益。

1 材 料

1.1 试 剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、小牛肠碱性磷酸酶(CIAP)、DNA 凝胶回收试剂盒(日本 TaKaRa 公司);溶菌酶、RNase A、蛋白酶 K、PCR 反应引物(上海生工生物工程技术有限公司);其他化学试剂均为国产分析纯或色谱纯。

1.2 菌株与质粒

E. coli DH5 为质粒克隆宿主菌,*E. coli* ET12567(pUZ8002)为大肠杆菌/链霉菌属间结合转移供体菌^[16],黑暗链霉菌 Tt-49(*S. tenebrarius*Tt-49)^[19]为本研究出发菌株,主要产安普霉素和氨甲酰妥布霉素。以上菌种均为本实验室保藏。温敏型穿梭质粒 pKC1139^[17]为本实验室保存,质粒 pAGe(含红霉素抗性基因 *ermE*)由上海医药工业研究院邵雷博士惠赠。

1.3 培养基与抗生素

LB 培养基用于 *E. coli* 培养,YEME 培养基用于链霉菌菌丝体生长,MS 培养基用于接合转移^[18]。*S. tenebrarius*Tt-49 斜面培养基、种子培养基、发酵培养基见参考文献[19]。各培养基中根据需要添加相应的抗生素,本研究使用的各种抗生素及作用质量浓度分别为:氨苄青霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,安普霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,氯霉素 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,卡那霉

素 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,红霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,萘啶酸 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,以上抗生素均为德国默克公司产品。

2 方 法

2.1 DNA 操作

大肠杆菌感受态细胞的制备和转化及质粒提取、酶切、酶连、PCR 等常规 DNA 操作参照文献[19]进行;链霉菌染色体 DNA 提取以及大肠杆菌与链霉菌属间接合转移参照文献[17]进行,DNA 的序列测定由日本 TaKaRa 公司完成。

2.2 引物设计

以 GenBank 中公布的安普霉素基因簇(登记号:AJ629123)为模板,选择基因 *aprK* 上下游序列作为同源交换臂,设计两对引物 P1(5'-CCGGAAT-TCCA ACCAGGTCCCCGTCTACC-3', *EcoR* I),P2(5'-CTAGTCTAGAAGGAGGTCGAG GCGGTCAAC-3', *Xba* I)和 P3(5'-CTAGTCTAGACTTCGTGG-GAGCTGACACT GG-3', *Xba* I),P4(5'-CCCAAGCTT ACCGAGTTCCTCAGGACGCT-3', *Hind* III),P1/P2,P3/P4 分别用于上游交换臂 BK1 和下游交换臂 BK2 的克隆。同时根据同源重组原理,设计 3 对用于 *aprK* 阻断突变株筛选与鉴定的引物 P5(5'-CCTGGTCGACGAGTCGAAGA-3')/P6(5'-GTCTACCAACCGATGTGCGG-3'),P7(5'-AGC AACGAGATCGACGCGGA-3')/P8(5'-TGGCTG-GAGGAGAACTACGG-3')和 P9(5'-GTGGTACT-GCTCGACGCTGATC-3')/P10(5'-GCTGATGTTCCGCGGTATCC-3')。同源重组模型及引物 P5/P6,P7/P8,P9/P10 在染色体上的位置见图 3。

2.3 发酵液处理与组分检测

*S. tenebrarius*Tt-49 与工程菌发酵培养与发酵液处理文献参照文献[19]进行,生物效价测定参考中国药典妥布霉素生物检定法^[21],发酵产物处理后采用薄层色谱(TLC)进行组分测定,展开剂为甲醇-25%浓氨水-氯仿(3:2:1)。

3 结果与讨论

3.1 重组质粒 pBK5 的构建

首先以 *S. tenebrarius*Tt-49 染色体 DNA 为模板,利用引物 P1/P2 扩增 1 984 bp 的上游交换臂 BK1,该片段包括 *aprK* 部分序列及其上游片段,PCR 产物用 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切,连接到经相

同酶酶切的 pKC1139 载体上,得到中间质粒 pBK3。然后以 Tt-49 染色体 DNA 为模板,利用引物 P3/P4 扩增 2 050 bp 的下游交换臂 BK2,该片段包括 *aprK* 部分序列及其下游片段,PCR 产物经 *Xba* I 和 *Hind* III 酶切后连接到经相同酶酶切的 pBK3 上,得到中间质粒 pBK4。最后 *Eco*R I 酶切含红霉素抗性基因的质粒 pAGe,回收 1 746 bp 的片段连接到经 *Eco*R I 酶切并去磷酸化处理的 pBK4 上,得到重组质粒 pBK5。以上质粒的构建均在 *E. coli* DH5 α 中进行。

为验证 pBK5 构建的成功与否,对其进行酶切验证:pBK5 经 *Eco*R I 酶切后得到 1 740 bp 和 10 465 bp 的两条带,经 *Xba* I 酶切后得到 2 001 bp 和 10 204 bp 的两条带,经 *Kpn* I 酶切后得到 1 665 bp,3 347 bp 和 7 193 bp 的 3 条带,以上酶切结果均与理论值吻合,证明重组质粒 pBK5 构建正确。质粒 pBK5 的物理图谱与酶切验证结果分别见图 1 和图 2。

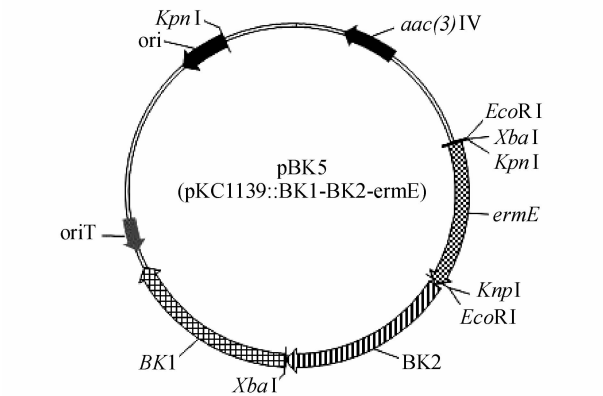


Figure 1 Restriction map of recombinant plasmid pBK5

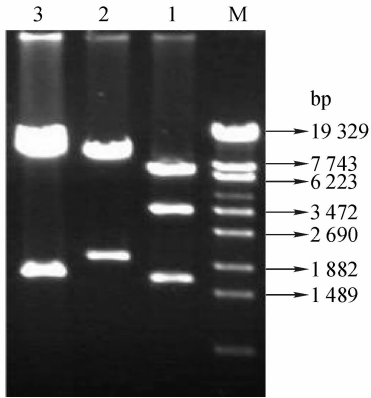


Figure 2 Restriction analysis of pBK5
M: λ -EcoT14 I digest DNA Marker; 1: pBK5/*Kpn* I; 2: pBK5/*Xba* I; 3: pBK5/*Eco*R I

3.2 *aprK* 阻断突变株的筛选与验证

将 pBK5 转化 *E. coli* ET12567 (pUZ8002),得到含重组质粒的供体菌 *E. coli* ET12567 (pUZ8002, pBK5),然后通过接合转移的方式转化 *S. tenebrarius* Tt-49,37 $^{\circ}$ C 培养 16 h 后用含红霉素和萘啶酸的水溶液覆盖,继续培养 3~4 d,待接合子长出。由于重组质粒 pBK5 携带有温度敏感型链霉菌复制子,当培养温度高于 34 $^{\circ}$ C 时,该质粒在链霉菌中不能自主复制。因此在红霉素筛选条件下,含游离质粒的 *S. tenebrarius* Tt-49 在 37 $^{\circ}$ C 无法生长,只有重组质粒 pBK5 通过其所携带的交换臂 BK1 或 BK2 与染色体上的同源区段发生重组而整合到染色体上的菌株才能生长。因此 MS 平板上长出的接合子即是单交换菌株。

单交换菌株具有遗传不稳定性,在没有施加筛选压力的条件下,会继续发生第二次同源重组,形成目的基因缺失的阻断突变株菌或重组质粒从染色体上全部切除的回复突变株,利用这一原理筛选 *aprK* 阻断突变株。将单交换突变菌株转接到斜面培养基,松弛培养 5 代后分离单菌落,影印到添加红霉素的抗性平板和不添加抗生素的普通平板上,培养后筛选到 7 株在普通平板上生长而在抗性平板上不生长的红霉素敏感型 (*Ery*^S) 菌株。这些 *Ery*^S 菌株可能为 *aprK* 阻断突变株,也可能是回复突变株,为最终筛选到 *aprK* 阻断突变株,通过 PCR 方法进行筛选验证。

随机挑取 3 株 *Ery*^S 菌株,分别编号为 K1、K2、K3。提取染色体 DNA,利用引物 P5/P6 进行 PCR 鉴定,PCR 产物电泳结果如图 4 所示。根据同源重组模型,*aprK* 阻断突变株可扩增得到约 1 022 bp 的片段(图 3,C),回复突变株可扩增得到约 1 415 bp 的片段(图 3,B)。从电泳结果可知,K1、K2(图 4,泳道 1,泳道 2)为回复突变株,K3(图 4,泳道 3)则为阻断突变株。

为了进一步确认 K3 就是 *aprK* 被成功阻断的双交换突变株,利用 P7/P8 和 P9/P10 进行 PCR 验证分析,其中 P7/P8 覆盖 BK1 上游基因组序列、BK1 全部序列和 BK2 部分序列,P9/P10 覆盖 BK2 下游基因组序列、BK2 全部序列和 BK1 部分序列(图 3,D)。理论上,P7/P8 可扩增到 2 335 bp 的目标条带,P9/P10 则可扩增到 2 446 bp 的目标条带。电泳结果显示,K3 基因组 DNA 经 P7/P8(图 4,泳

道 4) 与 P9/P10(图 4,泳道 5) 扩增后均得到了与预期值大小一致的产物,回收 PCR 产物并进行测序验证,测序结果与预测一致。因此 K3 即为 aprK 被成功阻断的双交换突变株,将其命名为 *S. tenebrarius* 316(ST316)。

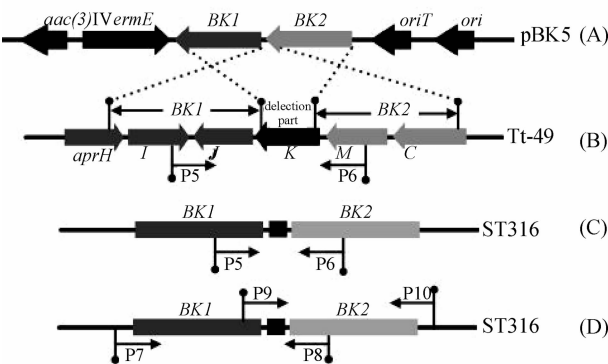


Figure 3 Sketch map of homologous recombination

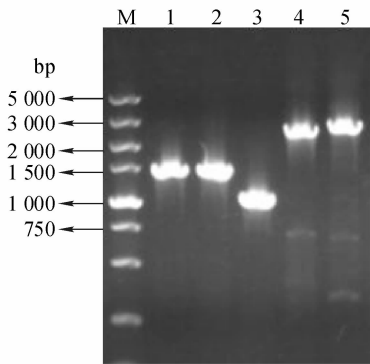


Figure 4 PCR verification of double crossover strain
M; DL5000 marker; 1; K1/P5/P6; 2; K2/P5/P6; 3; K3/P5/P6; 4; K3/P7/P8; 5; K3/P9/P10

3.3 工程菌发酵与产物分析

将 *aprK* 阻断突变株 ST316 在斜面培养基上连续转接 5 代,发现基因敲除后虽然在遗传水平上发生了改变,但对其菌丝生长与形态、孢子形成、色泽等形态特征并未产生影响(见图 5)。每次培养过程中挖取成熟丰满的斜面孢子接种至种子培养基,培养 16 ~ 18 h 后转接发酵培养基进行摇瓶发酵,同时以出发菌株 Tt-49 为对照。每次发酵完毕后对发酵液进行处理并测算发酵单位,结果如图 6 所示。ST316 在 5 次发酵过程中抗生素生产能力未发生显著变化,平均单位 1 500 ug/mL,约为出发菌株的 70%。

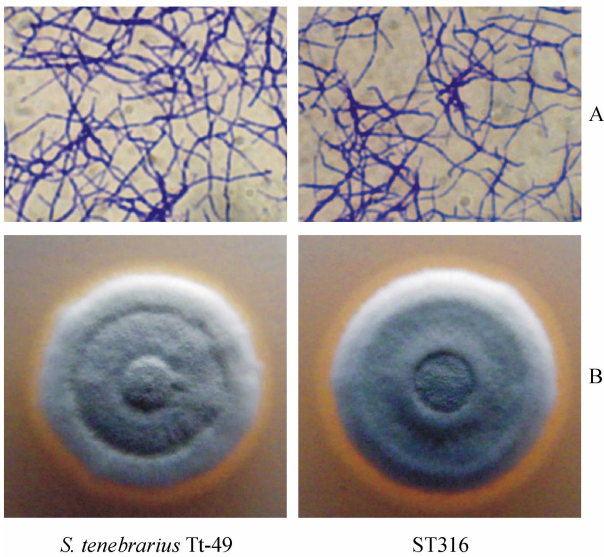


Figure 5 Comparison of *S. tenebrarius* Tt-49 and ST316 by mycelium morphology (A) and spore morphology (B)

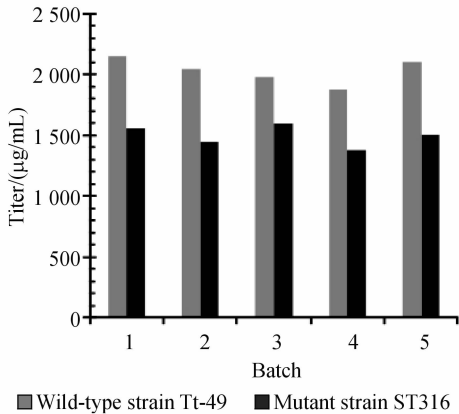


Figure 6 Comparison of fermentation titer between mutant strain ST316 and wild-type strain *S. tenebrarius* Tt-49

将处理后发酵样品进行 TLC 检测,分析结果见图 7。结果显示 ST316 发酵液中检测不到安普霉素,主要组分为氨甲酰妥布霉素,表明 *aprK* 被敲除后,安普霉素的生物合成途径被彻底阻断,与预期结果完全吻合。此外,由于出发菌株 Tt-49 主要产生安普霉素和氨甲酰妥布霉素,但安普霉素产量明显高于氨甲酰妥布霉素产量^[19](其中安普霉素约 1 400 ug/mL,氨甲酰妥布霉素约 600 ug/mL)。因此基因 *aprK* 阻断后,虽然抗生素总产量较出发菌株 Tt-49 有所下降,但氨甲酰妥布霉素的产量较 Tt-49 有明显提升。

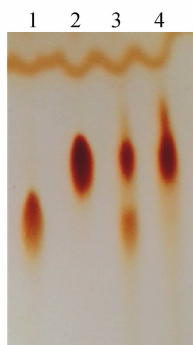


Figure 7 TLC analysis of fermentation components from ST316

1: Authentic standard apramycin; 2: Authentic standard carbamoyltobramycin; 3: Wild-type strain *S. tenebrarius* Tt-49 fermentation production; 4: Mutant strain ST316 fermentation production

4 讨论

安普霉素与氨甲酰妥布霉素均属于2-脱氧链霉胺(2-DOS)类抗生素,在安普霉素与氨甲酰妥布霉素的生物合成过程中,先共享一条2-DOS生物合成途径,形成2-DOS母核,然后再形成两条分支途径,一条合成安普霉素,另一条则合成氨甲酰妥布霉素^[22-23]。本研究通过对安普霉素生物合成基因簇中参与安普霉素辛二糖结构形成的关键基因*aprK*进行框内敲除,阻断了安普霉素的生物合成,获得了主要产氨甲酰妥布霉素的工程菌。该菌株抗生素总产量较出发菌株 Tt-49 虽然有所下降,但氨甲酰妥布霉素产量与 Tt-49 相比明显提升,高达1 500 ug/mL。这是由于*aprK*被阻断后,作为安普霉素与氨甲酰妥布霉素生物合成的共同关键中间体——2-DOS无法继续参与安普霉素的生物合成,2-DOS集中流向氨甲酰妥布霉素的生物合成,从而使氨甲酰妥布霉素的产量得到提高。

本研究对基因*aprK*进行敲除是通过同源重组完成的,不会发生进一步基因重组,因此工程菌在遗传上具有稳定性。同时在构建重组质粒过程中未引入外源抗性基因作为双交换筛选标记,这有利于阻断突变株在工业生产中的应用。故可对该工程菌的培养基与发酵条件进行优化设计,进一步提高氨甲酰妥布霉素产量,以用于大规模工业化生产。

参考文献

[1] Park JW, Park SR, Han AR, *et al.* The nebramycin aminoglycoside profiles of *Streptomyces tenebrarius* and their characterization

using an integrated liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometric analysis[J]. *Anal Chim Acta*, 2010, **661**(1): 76–84.

- [2] Xu M, Zhu Y, Jin Z, *et al.* Glycine origin of the methyl substituent on C7'-N of octadiose for the biosynthesis of apramycin[J]. *Sci China Ser C*, 2006, **49**(4): 362–369.
- [3] Altamura N, Castaldo R, Finotti A, *et al.* Tobramycin is a suppressor of premature termination codons[J]. *J Cyst Yst Fibros*, 2013 Mar 26. doi:pii:S1569-1993(13)00035-0. 10. 1016/j. jcf. 2013. 02. 007.
- [4] Stark WM, Hoehn MM, Knox NG. Nebramycin, a new broad-spectrum antibiotic complex. I. Detection and biosynthesis[J]. *Antimicrob Agents Chemother* (Bethesda), 1967, **7**: 314–23.
- [5] Borodina I, Schöller C, Eliasson A, *et al.* Metabolic network analysis of *Streptomyces tenebrarius*, a *Streptomyces* species with an active Entner-Doudoroff pathway[J]. *AEM*, 2005, **71**(5): 2 294–2 302.
- [6] Carlos O, Felipe L, Carmen M, *et al.* Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering[J]. *Metab Eng*, 2008, **10**(5): 281–292.
- [7] Kharel MK, Subba B, Lee HC, *et al.* An approach for cloning biosynthetic genes of 2-deoxystreptamine-containing aminocyclitol antibiotics; isolation of a biosynthetic gene cluster of tobramycin from *Streptomyces tenebrarius*[J]. *Biotechnol Lett*, 2003, **25**(24): 2 041–2 047.
- [8] Kharel MK, Basnet DB, Lee HC, *et al.* Isolation and characterization of the tobramycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces tenebrarius*[J]. *Fems Microbiol Lett*, 2004, **230**(2): 185–190.
- [9] Flatt PM, Mahmud T. Biosynthesis of aminocyclitol-aminoglycoside antibiotics and related compounds[J]. *Nat Prod Rep*, 2007, **24**(2): 358–392.
- [10] Kudo F, Eguchi T. Biosynthetic genes for aminoglycoside antibiotics[J]. *J Antibiot*, 2009, **62**(9): 471–481.
- [11] Kharel MK, Subba B, Lee HC, *et al.* Characterization of l-glutamine: 2-deoxyscyllinosose aminotransferase from *Streptomyces tenebrarius*[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, **15**(1): 89–92.
- [12] Yu Y, Hou X, Ni X, *et al.* Biosynthesis of 3'-deoxy-carbamoylkanamycin C in a *Streptomyces tenebrarius* mutant strain by *tacB* gene disruption[J]. *J Antibiotic*, 2008, **61**(2): 63–69.
- [13] Parthier C, Görlich S, Jaenecke F, *et al.* The O-carbamoyltransferase TobZ catalyzes an ancient enzymatic reaction[J]. *Angew Chem Int Edit*, 2012, **51**(17): 4 046–4 052.
- [14] Ni XP, Li D, Yang L, *et al.* Construction of kanamycin B overproducing strain by genetic engineering of *Streptomyces tenebrarius*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, **89**(3): 723–731.
- [15] Lin YS, Hong WR. Construction of *Streptomyces tenebrarius* mutant with knock-out of *tobS1-C* genes[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2012, **43**(1): 92–96.
- [16] Paranthaman S, Dharmalingam K. Intergeneric conjugation in *Streptomyces peucetius* and *Streptomyces* sp. strain C5: chromo-

somal integration and expression of recombinant plasmids carrying the *chiC* gene[J]. *AEM*, 2003, **69**(1): 84–91.

- [17] Flett F, Mersinias V, Smith C P. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting *streptomyces* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, **155**(2): 223–229.
- [18] Kieser T, Bibb MJ, Mark J, et al. *Practical streptomyces genetics* [M]. Norwich, England: The John Innes Foundation, 2000: 249–250.
- [19] Hong WR, Yan S D. Engineering *Streptomyces tenebrarius* to synthesize single component of carbamoyltobramycin [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2012, **55**(1): 33–39.
- [20] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a labora-*

tory manual [M]. 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 27–99, 387–396, 644–618.

- [21] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia*, Part 2 (中华人民共和国药典: 二部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2010: Appendix 59–61.
- [22] Llewellyn NM, Spencer JB. Biosynthesis of 2-deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics [J]. *Nat Prod Rep*, 2006, **23**(6): 864–874.
- [23] Huang F, Li Y, Yu J, et al. Biosynthesis of aminoglycoside antibiotics: cloning, expression and characterisation of an aminotransferase involved in the pathway to 2-deoxystreptamine [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2002(23): 2 860–2 861.

· 新药研发 ·

2013 年全球新药研发概况(3)

治疗领域分析 从治疗领域来看,全球在研药物市场变化不大。可将在研药物按 16 种主要的治疗领域进行分析。从统计数据来看,抗肿瘤药物的增长速度仍然远高于行业的平均增长速度,2013 年其增速相对比值接近于 10,即:抗肿瘤药物增速为 2.47%,而行业平均增速仅为 0.26%。而抗肿瘤药物的市场占比,也已从 2012 年的 29.5% 增长到了 2013 年的 30.1%。与 2012 年数据相比,2013 年神经疾病类药物和抗感染类药物数量几乎持平,而激素类和呼吸系统类等小领域则呈现出较大幅度的增长,这与 2012 年出现的全线增长态势形成了较为鲜明的对比。此外,生物技术类药物从 2012 年的 26.7% 下降到了 26.2%,但是在 2012 年之前该类药物一直保持着较大的增长态势。生物技术类药物可分为某些类别。例如单克隆抗体在过去 5 年中在生物技术类研发药物中的占比已从 29.9% 缓慢攀升至 32.2%。类似的,在神经疾病类药物中,其亚型精神疾病类药物是值得关注的。数据显示,这类药物的数量自 2008 年以来基本维持不变,尽管一些大型制药公司已从情感性精神障碍疾病的研究中退出。然而,在 2008–2013 年间,神经疾病类治疗药物所占比例大幅下滑(26.2% 下降至 22.1%)。两个最大的抗肿瘤药物类别仍排在治疗类别排名的前两位,2013 年仍表现出明显的增长态势。预防性疫苗攀升至第 3 位。镇痛药和治疗药物分列第 4 和第 5 位,在研项目数量有所下降。在 Top 10 中,治疗阿尔茨海默氏病类药物的研发数量出现了反弹,这一领域市场潜力非常大。

抗病毒类药物数量显示出了下滑,而基因治疗药物则重返进入 TOP 25。基因治疗药物曾在 2001 和 2002 年位列排名第 3 位,之后排名持续下滑,去年更是完全退出了 TOP 25。令人振奋的是,尽管该类别药物中获批品种数量非常有限,但是制药行业却并没有放弃对该类产品的希望。事实上,西方国家批准的首个基因治疗药物 Glybera,已由 EC 于 2012 年 11 月批准,用于脂蛋白脂酶缺乏遗传病的治疗。

对 1164 种疾病或适应证进行分类统计,归纳出 TOP 25。从在研产品的适应证统计情况来看,仍是目前最应注意的疾病,结直肠癌取代前列腺癌成为排名第 2 位的疾病。其他在研产品数量较多的适应证包括胰腺癌、卵巢癌和肾癌等疾病。HIV/AIDS 感染是目前在研产品数量降幅最大的疾病类别,而去年排名第 2 的 2 型糖尿病,排名已下滑至第 4 位。此外,先前提到的阿尔茨海默氏病药物的增长也在此处得到了显现,而帕金森病排名也有提升。2013 年唯一新进入 TOP 25 的适应证为流行性感冒。

从在研药物的作用机制来看,居前 5 位的是免疫刺激剂、血管生成抑制剂、细胞周期抑制剂、免疫抑制剂和刺激剂。

((MedSci, 本刊有删节))