

# 叶酸修饰的介孔氧化硅纳米粒制备及其负载雄黃研究

沈玲玲<sup>1</sup>, 陈金龙<sup>1,2</sup>, 苏梦翔<sup>1,2</sup>, 严方<sup>1,2</sup>, 李博<sup>1,2</sup>, 狄斌<sup>1,2\*</sup>

(中国药科大学<sup>1</sup>药物分析教研室; <sup>2</sup>教育部药物质量与安全预警重点实验室,南京 210009)

**摘要** 以正硅酸四乙酯(TEOS)为硅源,十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)为模板剂,乙醇为助溶剂,三乙醇胺为螯合剂在碱性条件下合成了介孔氧化硅纳米粒(MSN),然后在其表面通过后嫁接法键合氨基丙基,再修饰叶酸(FA),对其形貌和结构进行表征,利用原子荧光光谱仪测定其对雄黃的负载率。结果表明,MSN具有大的比表面积( $973 \text{ m}^2/\text{g}$ )和孔体积( $1.01 \text{ cm}^3/\text{g}$ )、孔径分布窄、粒径均匀(90 nm左右)且球形形貌分散,修饰FA后的介孔氧化硅纳米粒(MSN-NH-FA)在0.5 h对雄黃的负载率最大,达到2.52%。结果表明,制备的MSN-NH-FA具有较好的形貌结构,适合作为药物载体,具有良好的应用前景。

**关键词** 介孔氧化硅纳米粒; 雄黃; 叶酸; 制备

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2014)03-0314-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20140311

## Synthesis and characterization of folic acid modified mesoporous silica nanoparticles and its loading performance for realgar

SHEN Lingling<sup>1</sup>, CHEN Jinlong<sup>1,2</sup>, SU Mengxiang<sup>1,2</sup>, YAN Fang<sup>1,2</sup>, LI Bo<sup>1,2</sup>, DI Bin<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Analysis; <sup>2</sup>Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance (Ministry of Education), China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** Mesoporous silica nanoparticles (MSN) were synthesized under alkaline conditions using tetraethoxysilane (TEOS) as silica source, hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) as template agent, ethanol as co-solvent and triethanolamine as chelating agent. Ammonia propyl and folic acid (FA) were then modified on the surface of MSN in two consecutive steps. The morphology and structure were characterized, and the loading amount of realgar was determined by atomic fluorescence spectrometry. Results showed that the MSN had large specific surface area ( $973 \text{ m}^2/\text{g}$ ) and pore volume ( $1.01 \text{ cm}^3/\text{g}$ ), narrow pore size distribution, uniform particle size (about 90 nm) and well-dispersed spherical morphology. The assayed loading ratio of realgar in FA-modified MSN reached the maximum (2.52%) in 0.5 h. Hence, it was shown that the MSN-NH-FA has good morphology and favorable structure which is suitable as a drug carrier and hold potential in the application.

**Key words** mesoporous silica nanoparticles; realgar; folic acid; synthesis

This study was supported by the Natural Science Foundation of the Xinjiang Uygur Autonomous Region (No. 201233146-7)

矿物药雄黃(realgar)历史悠久,最早载于《神农本草经》,主要成分为四硫化四砷( $\text{As}_4\text{S}_4$ ),用于解毒杀虫、燥湿、去痰、截疟等<sup>[1]</sup>。20世纪50年代以来,国内许多学者将含雄黃的复方制剂或单味雄黃用于治疗血液系统的肿瘤及人体其他部位的肿瘤,取得了很好的疗效,由于其毒性低于砒霜注射

剂,雄黃被推荐为治疗急性早幼粒细胞白血病(APL)的二线化疗药<sup>[2]</sup>。目前研究证明,雄黃抗肿瘤作用的机制为诱导细胞凋亡、诱导细胞分化、抑制核酸合成、作为血管内皮细胞抑制剂和直接细胞毒作用等<sup>[1]</sup>。但是雄黃为硫化物类矿物,难溶于水及大部分有机溶剂,临床应用中存在口服剂量

大、潜在毒性大等问题。

目前通常采用气流<sup>[3]</sup>和球磨<sup>[4]</sup>等微粉化技术将雄黄粒径减小到纳米级水平,以提高其生物利用度,但这些方法也存在不少缺点,例如:粒径难以控制、稳定性差、水溶性差、易发生氧化和团聚等<sup>[5-6]</sup>。杨祥良等<sup>[5]</sup>以纳米雄黄为活性成分,以高分子聚合物为载体,添加抗氧化剂和表面活性剂,通过熔融法和溶剂挥发法制备了纳米雄黄固体分散体,解决了纳米雄黄的氧化与团聚问题。沈星灿等<sup>[6]</sup>采用化学法,以生物大分子为模板调控形貌与粒径制备不同形貌与粒径的纳米雄黄。然而上述方法制备的纳米雄黄在杀死肿瘤细胞的同时对正常细胞也有一定的毒性。

由于叶酸受体在大部分人体肿瘤细胞上都存在过度表达<sup>[7]</sup>,故在药物制剂设计中通常将叶酸作为主动靶向识别配体。介孔氧化硅纳米粒(mesoporous silica nanoparticles, MSN)表面具有较多活性位点,易于被叶酸修饰,同时该载体具有负载量高、形貌可控以及系统毒性低等优点<sup>[8]</sup>,并且使雄黄能在纳米水平均一分散于介孔腔,因此选择其作为雄黄靶向输送载体具有良好的可行性。本研究拟将雄黄溶于无水乙二胺形成簇溶液( $\text{As}_4\text{S}_4\text{-NH}_2\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}_2$ ),通过物理吸附负载于介孔氧化硅纳米粒的孔道中,同时在介孔氧化硅表面修饰叶酸,期望其静注后通过与肿瘤细胞表面的叶酸受体特异性结合,选择性地累积在肿瘤部位并被细胞吞噬,降低雄黄对正常细胞的毒性,实现有效的治疗作用。

## 1 材 料

### 1.1 试 剂

十六烷基三甲基溴化铵(CTAB, 东京化成工业株式会社);正硅酸四乙酯(TEOS, 国药集团化学试剂有限公司);3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES, 北京百灵威化学技术有限公司);叶酸(FA, 上海金穗生物科技有限公司);N-羟基丁二酰亚胺(NHS, 国药集团化学试剂有限公司);N,N-二环己基碳二亚胺(DCC, 国药集团化学试剂有限公司);砷标准贮备溶液(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 中国计量科学研究院);雄黄(美国 Sigma 公司);盐酸、硝酸和高氯酸为优级纯,其余试剂均为国产市售分析纯,实验用水为纯净水。

### 1.2 仪 器

BS21S 十万分之一分析天平(德国 Statorius 公司);AF-610D 环保型原子荧光光谱仪(北京瑞利分析仪器公司);FT-IR 傅里叶红外光谱仪(日本 JASCO 公司);FEI Tecnai F20 场发射透射电镜(TEM, 美国 FEI 公司);TRISTAR II3020 全自动比表面和孔隙分析仪(美国 Micromeritics 公司);小角 D8 X 线衍射仪(XRD, 德国 Bruker 公司);Vario EL III 元素分析仪(德国 Elementar 公司)。

## 2 方 法

### 2.1 MSN 的合成

称取模板剂 CTAB 约 0.69 g, 置 50 mL 圆底烧瓶, 加入纯净水 17.3 mL, 于 60  $^{\circ}\text{C}$  加热搅拌。溶解后依次加入无水乙醇 4.0 mL 和三乙醇胺 0.92 g, 搅拌均匀后逐滴加入正硅酸四乙酯 1.56 mL, 保持 60  $^{\circ}\text{C}$  继续搅拌 2 h, 将反应混合物离心, 用纯净水洗至中性, 再用无水乙醇洗涤 3 次后置 60  $^{\circ}\text{C}$  真空干燥过夜, 将产物标记为 MSN-T。采用溶剂萃取法除去模板剂, 称取 MSN-T 1.0 g 于酸性乙醇(含有 36% 浓盐酸 20 mL) 200 mL 中, 于 60  $^{\circ}\text{C}$  回流 12 h 后离心, 用无水乙醇洗涤 3 次后置 60  $^{\circ}\text{C}$  真空干燥过夜, 得到 MSN。

### 2.2 MSN 负载雄黄考察

用纯净水将砷标准贮备溶液稀释成每毫升含砷 1  $\mu\text{g}$  的标准使用液。分别移取 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  标准使用液 0, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 10.0, 15.0 mL 置 100 mL 量瓶中, 分别加入 10% 硫脲和 10% 抗坏血酸混合溶液 10 mL, 用 0.6 mol/L 盐酸稀释至刻度, 摆匀, 得到标准空白以及砷元素质量浓度为 10, 20, 40, 80, 100, 150  $\text{ng}/\text{mL}$  的标准系列溶液, 室温放置 30 min 后测定。以扣除标准空白后的峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标得到标准曲线  $A = 421.57c + 232.06$  ( $r = 0.9999$ )。

精密称取 MSN 15 份, 每份 20 mg, 置于 5 mL 塑料离心管中, 加入雄黄乙二胺溶液(雄黄质量浓度 5  $\text{mg}/\text{mL}$ , 乙二胺与纯净水体积比为 1:1) 2 mL, 室温下置于高速振荡器, 在 1 800  $\text{r}/\text{min}$  条件下分别振荡 0, 0.2, 0.5, 2, 4 h(每个时间点平行操作 3 份)。然后在 12 000  $\text{r}/\text{min}$  离心 10 min, 并用纯净水洗涤三次, 合并上清液转移至 50 mL 三角烧瓶中进行湿法消解, 用 0.6 mol/L 盐酸转移至 100 mL

量瓶中,再逐级稀释,分别加入10%硫脲和10%抗坏血酸混合溶液10 mL,室温放置30 min后用原子荧光光谱仪测定,根据标准曲线计算上清液中砷的浓度 $c_t$ ,根据负载前后样品浓度的变化,由方程 $Q_t = (c_0 - c_t) \times V_m \times 100\%$ ,计算出MSN的负载率 $Q$ 。

### 2.3 MSN-NH-FA的合成与负载雄黄试验

称取MSN约0.7 g于10 mL圆底烧瓶,加入无水乙醇2.5 mL搅拌分散,量取3-氨基丙基三乙氧基硅烷1.5 mL溶解于无水乙醇3 mL中,加入上述圆底烧瓶,室温搅拌48 h后离心,用无水乙醇洗涤3次后置60 °C真空干燥过夜,得到MSN-NH<sub>2</sub>。

称取叶酸约0.5 g,加入无水的二甲亚砜25 mL和三乙胺0.25 mL搅拌溶解,依次加入N-羟基丁二酰亚胺0.26 g和N,N-二环己基碳二亚胺0.47 g,

在室温下避光搅拌24 h,过滤除去副产物二环己脲,减压蒸馏除去二甲亚砜,沉降于乙醚中,用乙醚洗涤数次,将乙醚挥干后置30 °C真空干燥,得到FA-NHS。精密称取MSN-NH<sub>2</sub> 100 mg于25 mL圆底烧瓶,加入无水的二甲亚砜10 mL搅拌分散,精密称取FA-NHS 60 mg分散于3 mL无水的二甲亚砜,加入上述圆底烧瓶,室温下避光搅拌24 h后离心,将沉淀分散于二甲亚砜中超声5 min(重复3次,除去未反应部分),再用乙醇洗涤数次除去二甲亚砜,真空干燥,得到MSN-NH-FA。合成过程见图1。

将合成的MSN-NH-FA作为载体按照“2.2”项中考察的最优条件进行负载雄黄试验(平行操作3份)。

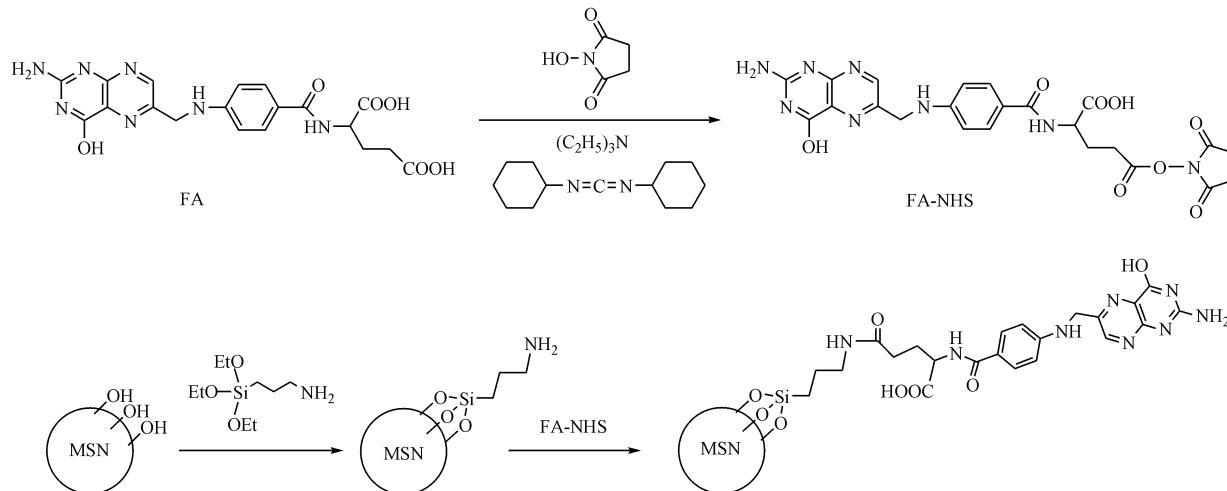


Figure 1 Synthesis of folic acid-functionalized mesoporous silica nanoparticles (MSN-NH-FA)

FA: folic acid-functionalized; MSN: mesoporous silica nanoparticles

## 3 结果

### 3.1 MSN的表征

利用红外光谱判断模板剂是否已除尽;利用TEM观测颗粒的形貌;利用小角XRD表征颗粒介孔结构有序度;利用全自动比表面积和孔隙分析仪测定颗粒的比表面积、孔径和孔容积,根据Brunauer-Emmett-Teller(BET)方法计算颗粒的比表面积,根据Barrett-Joyner-Halenda(BJH)模型由吸附曲线计算得到颗粒的孔径分布。

图2为脱除模板剂前后MSN的红外光谱对比图。由图可见,脱除模板剂后2924、2853 cm<sup>-1</sup>吸收

峰( $\nu_{C-H}$ ),1479 cm<sup>-1</sup>吸收峰( $\delta_{C-H}$ )消失或减弱,说明通过溶剂萃取法模板基本被脱除。除模板后,游离硅羟基特征吸收峰3397 cm<sup>-1</sup>( $\nu_{O-H}$ )和1640 cm<sup>-1</sup>( $\delta_{O-H}$ )显著增强,说明MSN表面游离的硅羟基增多。而MSN骨架的吸收峰1076 cm<sup>-1</sup>( $\nu_{asSi-O-Si}$ )、960 cm<sup>-1</sup>和796 cm<sup>-1</sup>( $\nu_{Si-O-Si}$ )、470 cm<sup>-1</sup>( $\delta_{Si-O-Si}$ )基本没有发生改变。

由MSN的透射电镜照片(图3)可见,MSN为具有蠕虫状孔道的球形颗粒,粒径分布均匀,约为90 nm,这个尺寸的纳米粒比较容易实现EPR效应(肿瘤组织的增强渗透和保留效应)和减弱被清除的概率,适合作为药物载体<sup>[9]</sup>。

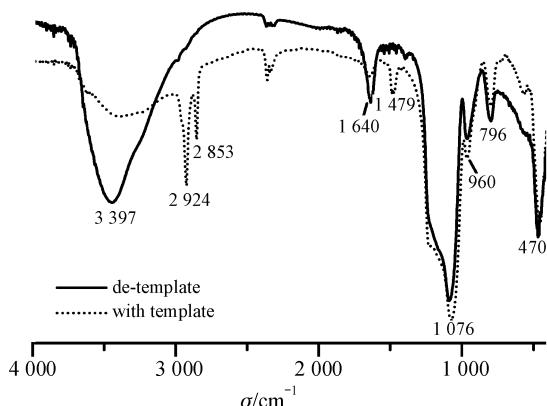


Figure 2 FT-IR spectra of MSN before and after extraction of template

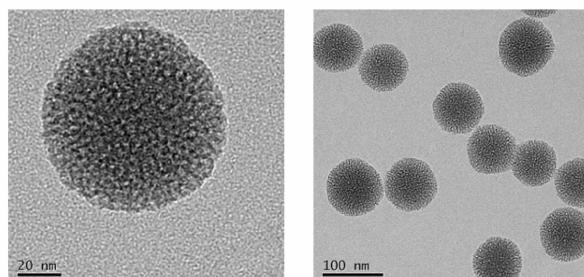


Figure 3 TEM images of monodispersed MSN

由小角 X 线衍射结果(图 4)可见,在  $2\theta = 1.91^\circ$  左右出现(100)晶面特征衍射峰,峰宽可能与蠕虫状的孔道排列有关<sup>[10]</sup>,结合图 3 的透射电镜表征结果,说明 MSN 具有有序的介孔结构。

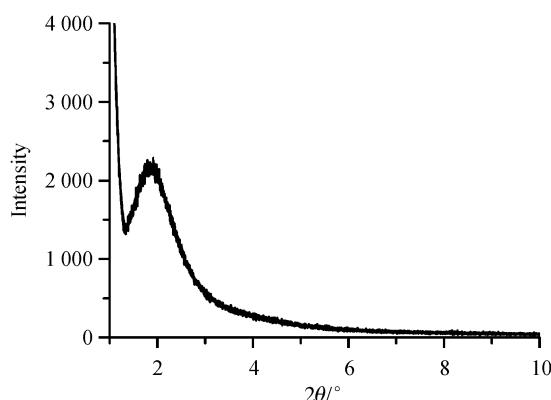


Figure 4 XRD patterns of MSN

图 5 和图 6 分别为 MSN 的  $N_2$  吸附-脱附等温线和 BJH 模型孔径分布曲线。由图可知,MSN 具有典型的Ⅳ型等温线,并且在  $p/p_0 = 0.9 \sim 1.0$  高压区间出现回滞环,这可能是由于纳米粒之间存在较大的堆积孔引起的。采用 BJH 模型得到的吸附孔径为 2.37 nm,说明样品内部的孔道属于介孔范围。采用 BET 和 BJH 公式分别计算出 MSN 的比

表面积和孔体积为  $973 \text{ m}^2/\text{g}$  和  $1.01 \text{ cm}^3/\text{g}$ 。进一步说明合成的 MSN 具有多活性吸附位点,用作药物载体具有高的负载量。

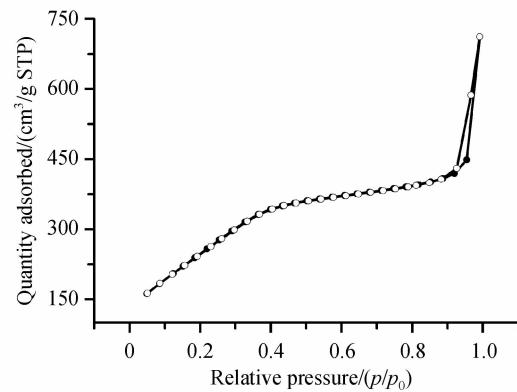


Figure 5  $N_2$  adsorption-desorption isotherms of MSN

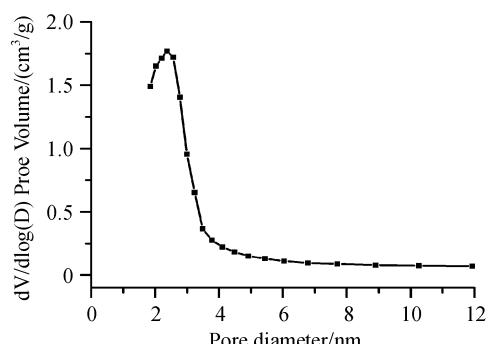


Figure 6 Pore size distribution curves from the desorption branch of MSN

### 3.2 MSN 负载雄黄性能考察

由于雄黄不溶于水,溶解于液氨或者无水胺,在室温下易溶于无水乙二胺并形成簇溶液( $\text{As}_4\text{S}_4\text{-NH}_2\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}_2$ )。乙二胺氮原子上的孤对电子作为 Lewis 碱贡献给二价砷的 d 轨道使氮原子和砷原子之间形成螯合键<sup>[11]</sup>。所以首先将雄黄溶解于无水乙二胺中,离心除去其他不溶性矿物成分,再用纯净水稀释,配制成质量浓度为 5 mg/mL 母液。

从图 7 可以看出 MSN 对雄黄的负载率与振荡时间的关系,0.5 h 达到负载最大值,负载率为雄黄总量的 2.70%,而随着振荡时间的增加,负载率逐渐降低。可能是由于乙二胺对 MSN 的孔道有一定的破坏作用,使得 MSN 的比表面积减小,负载率降低,所以将振荡时间确定为 0.5 h。图 8 是振荡 0.5 h 负载雄黄的 MSN 的透射电镜图,可以看到球形貌未有明显的改变。

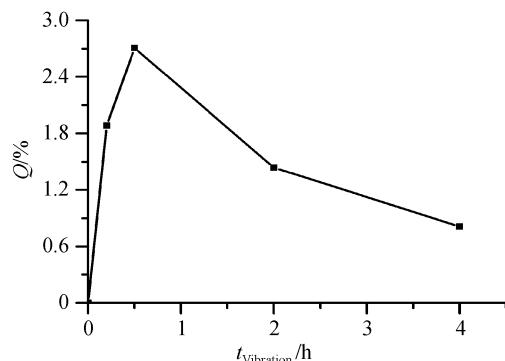


Figure 7 Realgar loading curves of MSN

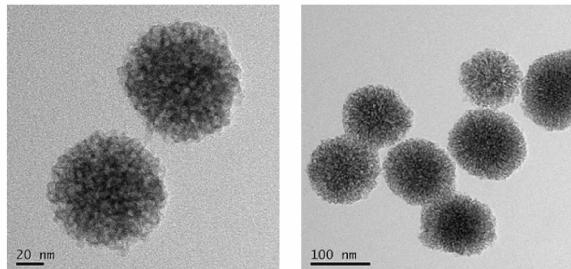


Figure 8 TEM images of MSN after loading realgar

### 3.3 MSN-NH-FA 的表征与负载雄黄试验

为进一步确证氨丙基官能团的存在,对 MSN-NH<sub>2</sub> 进行元素分析。元素分析结果显示:N, 2.47%; C, 10.70%; H, 3.04%,结果表明,和空白 MSN 相比,出现氮元素,结合图 9 中 MSN-NH<sub>2</sub> 的红外光谱结果,2 936 cm<sup>-1</sup> ( $\nu_{\text{C-H}}$ ) 和 1 473 cm<sup>-1</sup> ( $\delta_{\text{C-H}}$ ) 吸收峰证明了丙基的存在,从而说明通过后嫁接法成功引入了氨丙基。根据以下公式计算得知氨丙基负载量为 1.81  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ 。氨丙基负载量 = N 元素含量/(N 元素相对分子质量  $\times$  BET 比表面积)。

图 9 是 MSN-NH<sub>2</sub> 修饰叶酸前后的红外光谱对比图。由图可见,3 342 ~ 2 942 cm<sup>-1</sup> ( $\nu_{\text{N-H}}/\nu_{\text{O-H}}$ ) 的吸收峰明显变宽,在 1 650 cm<sup>-1</sup> ( $\nu_{\text{C=O}}$ )、1 404 cm<sup>-1</sup> ( $\nu_{\text{C-N}}$ ) 处分别新增加了酰胺基团的吸收峰;1 607 cm<sup>-1</sup> ( $\delta_{\text{N-H}}$ ) 吸收峰推测可能为叶酸中伯胺的吸收峰;介于 1 508 ~ 1 607 cm<sup>-1</sup> ( $\nu_{\text{C=C}}$ ) 的吸收峰为苯环的特征吸收峰,进一步说明叶酸被成功的偶联到 MSN-NH<sub>2</sub> 上。另外 MSN-NH-FA 对雄黄的负载率在振荡 0.5 h 时达到最大值 2.52%。

## 4 讨 论

本实验 MSN 的合成参考 Bein 研究组<sup>[10]</sup> 使用三乙醇胺来络合硅物种,该合成方法与稀溶液法<sup>[12]</sup>以

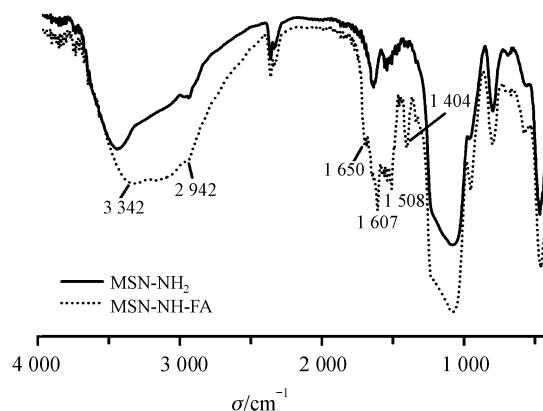


Figure 9 FT-IR spectra of MSN-NH<sub>2</sub> and MSN-NH-FA

及微乳法<sup>[13]</sup>相比,过程简单、产率高且后处理方便。表征后发现合成的 MSN 粒径约为 50 nm,而理想的纳米载体在 100 nm 左右。继续考察三乙醇胺以及乙醇的用量,实验发现:首先,粒径随着三乙醇胺的用量减小而增大;其次,增大乙醇的用量,粒径增大。最终将合成条件确定为 TEOS-CTAB-TEA-H<sub>2</sub>O-EtOH 的物质的量比为 1:0.27:0.88:137:9.8,此时合成的 MSN 的粒径约为 90 nm。

介孔氧化硅纳米粒作为药物载体是近十年来研究的研究热点,但负载矿物药雄黄的研究还未见文献报道。本文成功合成了叶酸修饰的介孔氧化硅纳米载体,并对其进行了初步负载雄黄试验,结果表明叶酸修饰的介孔氧化硅纳米粒对雄黄有一定的负载能力,且其形貌和结构未发生明显改变,但其靶向特性还需进一步经过体外细胞实验验证。在后续研究中将继续优化负载条件以提高雄黄负载量。另外,雄黄是否能够在体内具有缓释和靶向特性,以及随着机体的代谢和排泄使砷在体内维持较低的浓度水平,在发挥治疗作用的同时降低对正常细胞的毒性,值得进一步深入研究。

## 参 考 文 献

- [1] Liu R, Pu DM. The research progress of realgar [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2007, **18** (4): 982 - 984.
- [2] Wu JZ, Shao YB, Liu JL, et al. The medicinal use of realgar ( $\text{As}_4\text{S}_4$ ) and its recent development as an anticancer agent [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, **135** (3): 595 - 602.
- [3] Ping DZ. Study on the preparation and characteristics of the nanometer powder of Realgar, Margarita and Rhizoma coptidis(珍珠、雄黄和黄连纳米粉体的制备与特性研究) [D]. Beijing: Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2004.

- [4] Zhao WZ, Lu X, Yuan Y, et al. Effect of size and processing method on the cytotoxicity of realgar nanoparticles in cancer cell lines [J]. *Int J Nanomed*, 2011, **6**: 1 569 – 1 577.
- [5] Yang XL, Xu HB, Ye HQ, et al. Nanometer realgar solid dispersion and its preparation method: CN, 1478486 [P]. 2004-03-03.
- [6] Shen XC, Liang H, Chen Y, et al. Method for preparing nanometer realgar gel and nanometer realgar with biomacromolecule template to regulate shape and particle thereof: CN, 100374463 C [P]. 2008-03-12.
- [7] Morelli C, Maris P, Sisci D, et al. PEG-templated mesoporous silica nanoparticles exclusively target cancer cells [J]. *Nanoscale*, 2011, **3**(8): 3 198 – 3 207.
- [8] Tang FQ, Li LL, Chen D. Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, biocompatibility and drug delivery [J]. *Adv Mater*, 2012, **24**(12): 1 504 – 1 534.
- [9] Gullotti E, Yeo Y. Extracellularly activated nanocarriers: a new paradigm of tumor targeted drug delivery [J]. *Mol Pharmaceut*, 2009, **6**(4): 1 041 – 1 051.
- [10] Möller K, Kobler J, Bein T. Colloidal suspensions of nanometer-sized mesoporous silica [J]. *Adv Funct Mater*, 2007, **17**(4): 605 – 612.
- [11] Wang JZ, Lin M, Zhang TY, et al. Arsenic(II) sulfide quantum dots prepared by a wet process from its bulk [J]. *J Am Chem Soc*, 2008, **130**(35): 11 596 – 11 597.
- [12] Huang XL, Teng X, Chen D, et al. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function [J]. *Biomaterials*, 2010, **31**(3): 438 – 448.
- [13] Abarkan I, Doussineau T, Smaïhi M. Tailored macro/microstructural properties of colloidal silica nanoparticles via microemulsion preparation [J]. *Polyhedron*, 2006, **25**(8): 1 763 – 1 770.

## · 新动态 ·

### 2013 年全球 Top15 制药企业核心产品

2013 年全球 Top15 制药企业的原研处方药收入平均有 25% 都来自销售额最高的核心品种,其中 Teva 和 AbbVie 对核心产品的依赖度最为突出。尽管原研处方药在 Teva 销售份额还不到一半(47%),但是多发性硬化症药物 Copaxone 在 Teva 创新性处方药收入中的占比高达 78.6%。AbbVie 处方药对 Humira 的依存度则达到 56.7%,预计 2018 年 Humira 的销售额将占处方药收入的 59%。与 AbbVie 类似,赛诺菲、Amgen、强生和罗氏也都比较依赖商业寿命更长的生物制剂品种。勃林格殷格翰和 GSK 的产品重心在呼吸系统疾病领域,并努力推出新的呼吸疾病产品来巩固其主导地位,以弥补因专利到期而带来的损失。

公 司	创新药(原研药)收入/亿美元	核心产品	销售额/亿美元	占比/%
Teva	55.05	Copaxone(格拉替雷)	43.28	78.6
AbbVie	187.90	Humira(阿达木单抗)	106.59	56.7
勃林格殷格翰	148.21	Spiriva(噻托溴铵)	47.93	32.3
GSK	280.07	Advair(氟替卡松/沙美特罗)	82.53	29.5
赛诺菲	300.47	Lantus(甘精胰岛素)	75.91	25.3
Amgen	181.92	Enbrel(依那西普)	45.51	25.0
礼来	203.97	Cymbalta(度洛西汀)	50.84	24.9
强生	281.25	Remicade(英夫利昔单抗)	66.73	23.7
阿斯利康	254.66	Crestor(瑞舒伐他汀)	56.22	22.1
罗氏	391.88	Rituxan(利妥昔单抗)	75.03	19.1
诺华	322.14	Gleevec(伊马替尼)	46.93	19.1
BMS	163.85	Abilify(阿立哌唑)	22.89	13.9
默沙东	322.53	Januvia(西格列汀)	40.04	12.4
辉瑞	412.76	Lyrica(普瑞巴林)	45.94	11.1
Takeda	152.68	Blopress(坎地沙坦)	15.48	10.1

(生物谷,本刊有删改)