

# 弱化抗性标记筛选高表达 CHO 细胞株的方法建立

刘 苏, 田 淞, 王 驰, 姚文兵\*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

**摘要** 为了优化中国仓鼠卵巢细胞(CHO)表达体系, 建立高表达 CHO 细胞株筛选方法, 将外源基因表达载体上抗性筛选基因表达的新霉素磷酸转移酶(NPT)的 261 位氨基酸天冬氨酸突变成甘氨酸。经 G418 筛选, 转染含突变型 NPT 表达载体的细胞存活率显著低于转染含野生型 NPT 表达载体的细胞存活率。以绿色荧光蛋白-抗体 IgG1 Fc 结构域融合蛋白为报告基因, 验证了突变后新霉素磷酸转移酶对抗生素 G418 抗性减弱。经 G418 持续加压培养 3 周后, 转染含突变型 NPT 表达载体的细胞中 EGFP 的表达量显著高于转染含野生型 NPT 表达载体的细胞, 表明其具有筛选出高表达单克隆细胞株的潜力。

**关键词** 中国仓鼠卵巢细胞; 新霉素磷酸转移酶; 增强型绿色荧光蛋白; 高表达系统

**中图分类号** Q819   **文献标志码** A   **文章编号** 1000-5048(2015)05-0617-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150517

## Weakening resistance marker for establishing a process of screening high-producing CHO cell lines

LIU Su, TIAN Hong, WANG Chi, YAO Wenbing\*

School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** To optimize Chinese hamster ovary (CHO) expression system and establish a process of screening CHO cell lines with high productivity, neomycin-phosphotransferase (NPT) expressed by the resistance marker gene on the expression vector was mutated with amino acid D at 261 changed to G. After selection by culturing with G418, the survival rate of CHO cells bearing mutant-NPT was significantly lower than that of the cells bearing wide type NPT. An enhanced green fluorescent protein (EGFP) was genetically linked to the N terminus of the IgG1 Fc fragment part to generate an EGFP-Fc fusion protein regarded as a report gene, which verified that the resistance of mutant-NPT to G418 was weakened. By comparing fluorescence assay of EGFP intensity in stable transfections after selection with the same concentration of G418 for 3 weeks, mutant-selected pools expressed more exogenous protein than the WT-selected pools. Therefore, the ratio of high producers in a transfected cell population greatly increased.

**Key words** Chinese hamster ovary cell; neomycin-phosphotransferase; enhanced green fluorescent protein; high expression system

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81430082)

中国仓鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary cell, CHO cell)是目前表达外源基因的最佳真核宿主之一, 也是工业化程度最高的细胞之一。近年来, 治疗性抗体药物及糖蛋白类药物飞速发展, 研究表明这类药物主要依靠真核表达系统并且一般

需要较高的剂量才能达到治疗效果, 因此, 对高表达 CHO 工程细胞株的需求极为迫切。外源基因只有整合进入 CHO 细胞基因组转录热点或(和)具有高拷贝数才可以高水平表达外源蛋白。新霉素磷酸转移酶(neomycin-phosphotransferase, NPT)是

真核表达系统中常用的筛选标记之一。抗生素 G418 可以结合真核细胞 80S 核糖体复合物从而抑制真核细胞中蛋白的合成<sup>[1]</sup>。NPT 可以将 ATP 上的  $\gamma$ -磷酸基团转移到 G418 上的 3'-羟基上使抗生素失活<sup>[2]</sup>, 从而使 G418 失去抑制作用。Sautter 等<sup>[2]</sup>对 NPT 进行氨基酸突变来检测突变型 NPT 的酶活力, 发现 NPT 氨基酸突变导致 NPT 酶活力不同程度的降低甚至丧失, 其中将 NPT 上 261 位氨基酸天冬氨酸突变成甘氨酸, 其酶活力仅为野生型 NPT 的 3%。Steven 等<sup>[3]</sup>也对 NPT 表达基因进行了突变, 这导致 NPT 酶活力的降低。通过对 NPT 的表达基因进行突变使其弱化表达, 使 NPT 酶活力降低, 大量外源基因整合在低表达位点或(和)拷贝数低的细胞因 NPT 表达量不足而在选择培养过程中死亡, 只有那些外源基因整合在转录热点或(和)拷贝数高的少量细胞因表达足够的 NPT 而存活下来, 从而有可能获得高表达的 CHO 细胞株。

本研究将 NPT 上 261 位氨基酸天冬氨酸突变成甘氨酸, 突变后的 NPT 的酶活力仅为野生型 NPT 酶活力的 3%, 更易于获得高表达 CHO 细胞株。增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 的发光强度是 GFP 的 35 倍<sup>[4]</sup>。EGFP 具有荧光稳定、易于检测、对活细胞基本无毒性作用等优点, 在生物学的诸多领域被广泛应用<sup>[5-6]</sup>。与 EGFP 融合表达的蛋白不会影响 EGFP 的荧光, 也不会破坏该蛋白的基本功能<sup>[7]</sup>。本实验将 EGFP 作为报告基因, 与抗体 IgG1 的 Fc 结构域融合表达, 利用 EGFP 易于检测的特点, 比较在相同质量浓度 G418 加压筛选后由于 NPT 氨基酸的突变导致外源蛋白表达量的差异, 同时筛选出高表达的 CHO 单克隆细胞株, 利用 ProteinA 将 Fc 融合蛋白分离纯化后, 采用 SDS-PAGE 对融合蛋白进行鉴定。

## 1 材 料

### 1.1 试 剂

质粒小提试剂盒及琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(北京天根生化科技有限公司);分子克隆工具酶及 T4 DNA 连接酶(大连 TaKaRa 生物科技有限公司);Mut Express® II 快速突变试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司);无内毒素质粒小

提试剂盒(北京康为世纪生物有限公司);D-MEM/F-12 培养基、Opti-MEM 培养基、无血清培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(德国 Merck Millipore 公司);胰蛋白酶、G418 重硫酸盐(美国 Sigma 公司);Lipofectamine™ 2 000(美国 Invitrogen 公司);Hitrap™ ProteinA HP 预装柱(英国 GE Healthcare 公司)。

### 1.2 仪 器

Thermal Cycle PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司);Infinite M200 PRO 多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司);半干式碳板转印仪槽(北京六一仪器厂)。

### 1.3 质粒、菌株及细胞

质粒 IL2\_hIgG1-Fc\_pcDNA3.0(南京思普金生物科技公司);质粒 pEGFP-C3、宿主菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、细胞株 CHO-K1 均为本实验室保藏。

## 2 方 法

### 2.1 NPT 表达基因的突变

设计引物,利用 Mut Express® II 快速突变试剂盒对 IL2\_hIgG1-Fc\_pcDNA3.0 质粒中 NPT 表达基因进行突变。引物序列如下:正向扩增引物序列: 5'-CGCCTTCTTGGCGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTT-3';反向扩增引物序列: 5'-AA-GAACTCGCCAAGAACGGCGATAGAACGGCGATGCCGCTGCG-3'。其中下划线标出的序列 GGC 为编码 NPT 的 261 位天冬氨酸的三联密码子 GAC 突变后序列。突变后,通过南京金斯瑞生物科技有限公司测序筛选出含有重组质粒 IL2\_hIgG1-Fc\_pcDNA3.0 D261G 的阳性单克隆菌落。

### 2.2 G418 对转染含野生型 NPT 和转染含突变型 NPT 表达载体的细胞杀伤作用的检测

用含 10% 胎牛血清的 D-MEM/F-12 培养基, 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 CHO-K1 细胞。转染前 24 h, 6 孔板中每孔加入  $4 \times 10^6$  个细胞(2 mL)。转染前 1 h 将 6 孔板中培养基更换成含 10% 胎牛血清的 D-MEM/F-12 培养基。利用脂质体介导法转染细胞 CHO-K1。转染试剂为阳离子脂质体 Lipofectamine™ 2000,按照产品说明书进行。分别转染无内毒素质粒 IL2\_hIgG1-Fc\_pcDNA3.0 或 IL2\_hIgG1-Fc\_pcDNA3.0 D261G。37 °C 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 6 h 后, 将 6 孔板中培养基更换成含

10% 胎牛血清的 D-MEM/F-12 培养基,继续培养 18 h。分别将转染的细胞用 0.25% 胰酶消化后,按 1:6 比例全部转入另一 6 孔板中,每孔 2 mL 培养基。 $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养 24 h 后分别加入 G418 终质量浓度为 100, 200, 400, 600, 800, 1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 D-MEM/F-12 选择培养基加压筛选。每隔 48 h, 6 孔板中细胞分别更换 D-MEM/F-12 选择培养基,继续加压筛选。筛选 2 周,分别对 6 孔板中细胞进行计数,比较不同质量浓度 G418 对转染野生型和突变型质粒的细胞的杀伤作用。

### 2.3 EGFP-Fc 真核表达载体的构建

质粒 IL2\_hIgG1-Fc\_pcDNA3.0 的 hIL2 信号肽与 hIgG1-Fc 基因中间存在 *EcoR* I 和 *Nhe* I 酶切位点,在 hIL2 信号肽前面有 *Hind* III 酶切位点,hIgG1-Fc 基因后面有 *Xba* I 酶切位点。分别设计引物,利用快速突变试剂盒将质粒 pEGFP-C3 上 EGFP 基因两端分别突变成 *EcoR* I 和 *Nhe* I 酶切位点。突变 *EcoR* I 酶切位点引物序列如下:正向扩增引物序列: 5'-TACCGGTGAATTCGATGGT-GAGCAAGGCCGAGGAGCTGTTCA-3'; 反向扩增引物序列: 5'-TCACCATCGAATTACCGG-TAGCGCTAGCGGATCTGACGGTT-3'。突变 *Nhe* I 酶切位点引物序列如下: 正向扩增引物序列: 5'-GTACTCAGCTAGCGAGCTCAAGCTTCGAATTCTGC-CAGTCGAC-3'; 反向扩增引物序列: 5'-GCTT-GAGCTCGCTAGCTGAGTACTTGTACAGCTCGTCCA TGC-3'。其中下划线标出的序列GAATTC 是 *EcoR* I 酶切位点, GCTAGC 是 *Nhe* I 酶切位点。利用 *EcoR* I 和 *Nhe* I 限制性内切酶分别对突变后的 pEGFP-C3 质粒和 IL2\_hIgG1-Fc\_pcDNA3.0 质粒同时进行双酶切,琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化 EGFP 基因片段和 IL2\_hIgG1-Fc\_pcDNA3.0 载体,T4 DNA 连接酶  $16^{\circ}\text{C}$  连接过夜,连接子转入 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,筛选出含有重组质粒 IL2\_EGFP\_Fc\_pcDNA3.0 的阳性单克隆菌落。提取质粒 IL2\_EGFP\_Fc\_pcDNA3.0 经限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切鉴定。鉴定成功的质粒 IL2\_EGFP\_Fc\_pcDNA3.0 利用快速突变试剂盒对质粒中 NPT 表达基因进行突变,突变步骤同“2.1”项。通过南京金斯瑞生物科技有限公司测序筛选出含有重组质粒 IL2\_EGFP\_Fc\_pcDNA3.0 D261G 的阳性单克隆菌落。

### 2.4 转染含野生型 NPT 和含突变型 NPT 表达载体的细胞 EGFP 表达量的检测

转染前 24 h,24 孔板中每孔加入  $1 \times 10^6$  个细胞(500  $\mu\text{L}$ )。利用脂质体介导法分别转染无内毒素质粒 IL2\_EGFP\_Fc\_pcDNA3.0 或 IL2\_EGFP\_Fc\_pcDNA3.0 D261G。转染后于  $37^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 6 h 后,将 24 孔板中培养基更换成含 10% 胎牛血清的 D-MEM/F-12 培养基,继续培养 18 h。

将 24 孔板中转染细胞分别全部转入 6 孔板, $37^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 24 h 后加入终质量浓度为 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 G418 加压筛选抗性克隆。每隔 48 h,6 孔板中细胞分别更换培养基,加入终质量浓度为 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 G418。持续加压培养 3 周后,转染无内毒素质粒 IL2\_EGFP\_Fc\_pcDNA3.0 或 IL2\_EGFP\_Fc\_pcDNA3.0 D261G 的多克隆细胞与细胞 CHO-K1 分别移至 10 cm 平皿中扩大培养,培养至细胞汇合度达到 80% 时,更换无血清培养基,继续培养 4 d 后,分别收集细胞培养上清液,10 000 r/min 离心 20 min,4  $^{\circ}\text{C}$  条件下操作,0.45  $\mu\text{m}$  滤器过滤后,用超滤离心管(10 kD)进行蛋白浓缩,按照产品说明书进行。分别取浓缩液 100  $\mu\text{L}$  移至黑色荧光酶标板进行 EGFP 荧光强度检测(激发波长 488 nm,发射波长 530 nm<sup>[8]</sup>)。

### 2.5 单克隆细胞株筛选及 EGFP-Fc 融合蛋白的鉴定

转染无内毒素质粒 IL2\_EGFP\_Fc\_pcDNA3.0 D261G 的多克隆细胞持续加压培养 3 周后通过稀释法移至 96 孔板中进行单克隆细胞株的筛选。筛选出的单克隆细胞株扩大培养后,分别取单克隆细胞培养上清液 100  $\mu\text{L}$  移至黑色荧光酶标板进行 EGFP 荧光强度检测(激发波长 488 nm,发射波长 530 nm)。

筛选出的单克隆细胞移至 10 cm 平皿中扩大培养,培养至细胞汇合度达到 80% 时,更换无血清培养基,继续培养 4 d 后,收集细胞培养上清液,10 000 r/min 离心 20 min,4  $^{\circ}\text{C}$  条件下操作,0.45  $\mu\text{m}$  滤器过滤后,利用 Protein A 预装柱进行 Fc 融合蛋白的分离纯化,按照产品说明书进行。

经纯化后得到的 Fc 融合蛋白,加入 5 × 还原性 SDS PAGE 上样缓冲液,于 100  $^{\circ}\text{C}$  沸水中煮沸 5 min,进行 10% SDS-PAGE 电泳,恒流 30 mA 电泳 1.5 h。

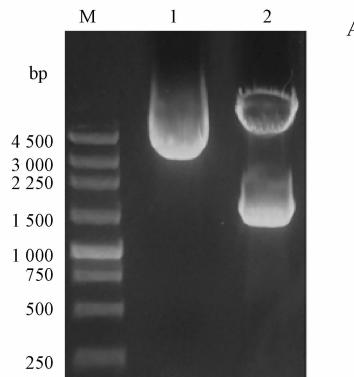
### 3 结 果

#### 3.1 G418 对转染含野生型 NPT 和转染含突变型 NPT 表达载体的细胞杀伤作用的比较

转染无内毒素质粒 IL2\_hIgG1-Fc\_pcDNA3.0 或 IL2\_hIgG1-Fc\_pcDNA3.0 D261G 的细胞经不同质量浓度 G418 加压筛选后, 分别进行细胞计数(图 1), 结果显示, 表达载体上 NPT 氨基酸突变后, 其酶活力显著减弱, 相同质量浓度的 G418 对转染含突变型 NPT 表达载体的细胞的杀伤作用增强, 导致细胞存活数下降。

#### 3.2 重组真核表达载体的鉴定

将质粒 pEGFP-C3 上 EGFP 基因两端分别突变成 *EcoR* I 和 *Nhe* I 酶切位点, 双酶切后的 EGFP 基因片段经纯化后, 连接于同样经 *EcoR* I 和 *Nhe* I 双酶切的 IL2\_hIgG1-Fc\_pcDNA3.0 的质粒中, 获得重组质粒 IL2\_EGFP\_Fc\_pcDNA3.0。



**Figure 2** Identification (A) and construction (B) of IL2\_EGFP\_Fc\_pcDNA3.0 plasmid vector  
Line 1: IL2\_EGFP\_Fc\_pcDNA3.0; Line 2: IL2\_EGFP\_Fc\_pcDNA3.0 digested by *Hind* III and *Xba* I

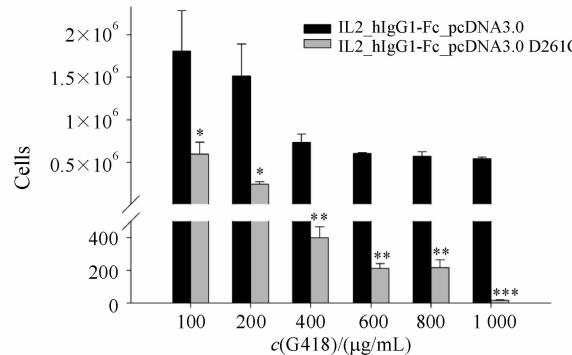
#### 3.3 转染含野生型 NPT 和转染含突变型 NPT 表达载体的细胞 EGFP 表达量的比较

NPT 氨基酸的突变对细胞蛋白表达量的影响见图 3。结果显示, 转染含突变型 NPT 表达载体的细胞中 EGFP 的表达量显著高于转染含野生型 NPT 表达载体的细胞, 这表明其具有筛选出高表达单克隆细胞株的潜力。

#### 3.4 单克隆细胞株的筛选及融合蛋白的鉴定

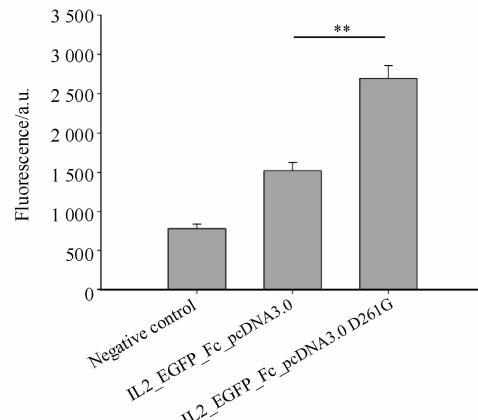
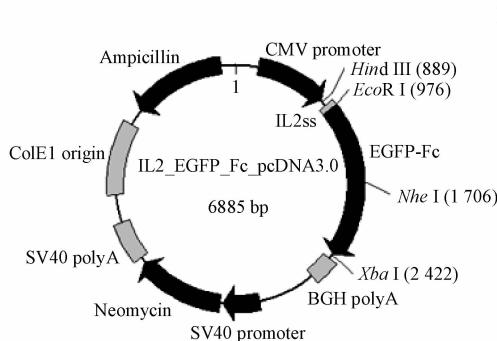
转染无内毒素质粒 IL2\_EGFP\_Fc\_pcDNA3.0 D261G 的多克隆细胞进行筛选, 共获得 16 株单克隆细胞, 经扩大培养后, 获得 1 株 EGFP 荧光强度高于其他细胞的细胞株, 命名为 CHO-A4(图 4)。

CaCl<sub>2</sub> 法转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑取单菌落扩大培养, 提取质粒 IL2\_EGFP\_Fc\_pcDNA3.0 经限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切鉴定, 产生的条带大小与预期相符(图 2), 证明 EGFP 片段已经成功插入 IL2\_hIgG1-Fc\_pcDNA3.0 载体中。



**Figure 1** Impact of neomycin-phosphotransferase (NPT)-mutation on the selection of stably transfected cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs IL2\_hIgG1-Fc\_pcDNA3.0 group



**Figure 3** Comparing fluorescence assay of enhanced green fluorescent protein (EGFP) intensity of different vectors in stable transfections after selection with G418 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

\* \*  $P < 0.01$

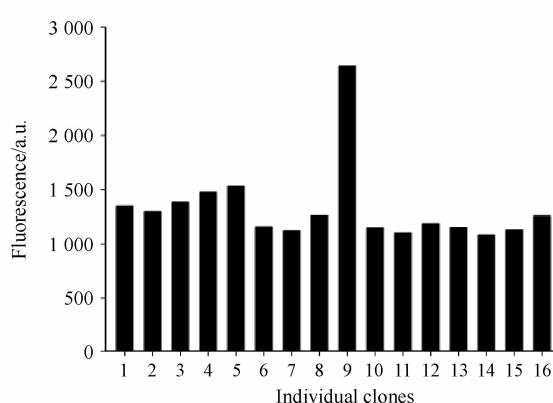


Figure 4 Fluorescence assay of EGFP intensity in monoclonal cell culture supernatant

筛选出的单克隆细胞株 CHO-A4 扩大培养更换无血清培养基后, 收取细胞培养上清液, 利用 Protein A 预装柱进行 Fc 融合蛋白的纯化, 得到的融合蛋白经还原后利用 10% SDS-PAGE 电泳鉴定, 结果显示, 在相对分子质量为 55 kD 处有明显的条带(图 5), 产生的条带大小与预期相符。

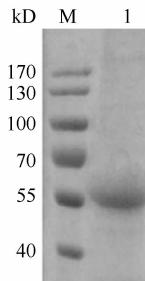


Figure 5 SDS-PAGE analysis of EGFP-Fc fusion protein expression after purification

Line 1: Expression of CHO-A4

#### 4 讨 论

CHO 细胞是应用最广泛的哺乳动物细胞表达系统, 目前大约 70% 的重组药物由 CHO 细胞表达产生<sup>[9]</sup>。CHO 细胞被证实是最安全的表达宿主, 可以保障重组蛋白质的生物活性, 由 CHO 表达产生的重组蛋白更容易被批准上市<sup>[10]</sup>。2011 年对 CHO 细胞的基因组测序已经全部完成<sup>[11]</sup>, 这将会成为对 CHO 表达系统研究中的有利工具。但是市场对重组药物蛋白的高需求以及 CHO 工程细胞株存在研发周期长、投入成本高、获得高表达细胞株的概率低、长时间培养条件下稳定性不高、易污染等弊端<sup>[12]</sup>, 因此对 CHO 表达系统的不断优化依旧是生物药物发展的关键之一。

本课题将外源基因克隆到 pcDNA3.0 真核表达载体上, 利用通用型 hIL2 信号肽引导外源蛋白的分泌表达。将 EGFP 与 Fc 结构域融合表达, 一方面利用 EGFP 易于检测的特点, 另一方面利用 Protein A 预装柱对 Fc 融合蛋白进行分离纯化。将表达载体上的抗性筛选基因中编码 261 位天冬氨酸的三联密码子 GAC 突变成 GGC, 使用终质量浓度为 400 μg/mL 的 G418 进行加压筛选, 转染含突变型 NPT 表达载体的细胞克隆形成率比转染含野生型 NPT 表达载体的细胞克隆形成率显著减少。这表明将 NPT 氨基酸突变后, 大大减弱 NPT 酶活力, 只有很少量的能表达足够 NPT 的细胞才能存活下来。通过酶标仪对多克隆细胞浓缩培养上清液的 EGFP 荧光强度进行检测, 结果发现尽管转染含突变型 NPT 表达载体的细胞克隆率降低, 但 EGFP 的表达量高于转染含野生型 NPT 表达载体的细胞, 这表明其具有筛选出高表达单克隆细胞株的潜力。进一步对此多克隆细胞进行单克隆化筛选, 获得的 16 株单克隆细胞中筛选出 1 株 EGFP 表达量较高的细胞株。将该单克隆细胞株扩大培养更换无血清培养基后, 利用 Protein A 预装柱将 Fc 融合蛋白分离纯化, SDS-PAGE 对融合蛋白进行鉴定。EGFP-Fc 融合蛋白的理论相对分子质量为 53 456.5, 采用 SDS-PAGE 检测的融合蛋白的实际相对分子质量大于理论相对分子质量, 其原因可能是 CHO 细胞具有翻译后修饰功能, 使融合蛋白进行糖基化修饰导致相对分子质量增加。

本研究证明了通过弱化抗性筛选标记获得高表达 CHO 细胞株的方法是切实可行的, 是提高真核药物蛋白表达量的一条有效途径, 为建立高表达 CHO 细胞株提供了新的思路。

#### 参 考 文 献

- [1] Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, **43**(4):727–737.
- [2] Sautter K, Enenkel B. Selection of high-producing CHO cells using NPT selection marker with reduced enzyme activity [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2005, **89**(5):530–538.
- [3] Ho SC, Bardor M, Feng H, et al. IRES-mediated tricistronic vectors for enhancing generation of high monoclonal antibody expressing CHO cell lines [J]. *J Biotechnol*, 2012, **157**(1):130–139.
- [4] Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. FACS-optimized mutants of

- the green fluorescent protein (GFP) [J]. *Gene*, 1996, **173**(1): 33–38.
- [5] Zhang C, Xing X. Fluorescent proteins as a visible molecular signal for rapid quantification of bioprocesses: potential and challenges[J]. *Chin J Chem Eng*, 2010, **18**(5): 863–869.
- [6] Telford WG, Hawley T, Subach F, et al. Flow cytometry of fluorescent proteins[J]. *Methods*, 2012, **57**(3): 318–330.
- [7] Wang Z, Chen Y, Li S, et al. Successful construction and stable expression of an anti-CD45RA scFv-EGFP fusion protein in Chinese hamster ovary cells[J]. *Protein Expr Purif*, 2014, **94**(2): 1–6.
- [8] Johnson DB, Xu J, Shen Z, et al. RF1 knockout allows ribosomal incorporation of unnatural amino acids at multiple sites[J]. *Nat Chem Biol*, 2011, **7**(11): 779–786.
- [9] De Jesus M, Wurm FM. Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2011, **78**(2): 184–188.
- [10] Kim JY, Kim YG, Lee GM. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, **93**(3): 917–930.
- [11] Xu X, Nagarajan H, Lewis NE, et al. The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line[J]. *Nat Biotechnol*, 2011, **29**(8): 735–741.
- [12] Cacciatore JJ, Chasin LA, Leonard EF. Gene amplification and vector engineering to achieve rapid and high-level therapeutic protein production using the Dhfr-based CHO cell selection system[J]. *Biotechnol Adv*, 2010, **28**(6): 673–681.

## ·新进展·

### 2015年9月FDA审批新药盘点(2)

#### 1 治疗化疗所致呕吐新分子实体药物 Varubi(Rolapitant)

2015年09月01日,美国FDA批准了Tesar公司的新分子实体药物Varubi(Rolapitant)上市。Varubi(Rolapitan)可与其他抗呕吐药物联合使用,用于防治癌症化疗引发的恶心呕吐的初始发作和反复发作。Varubi(Rolapitan)是神经激肽(NK-1)受体拮抗剂,NK-1受体的活化在化疗引起的恶心呕吐的过程中扮演着重要的角色,尤其是在延长期中。Varubi(Rolapitan)为片剂,每片含90 mg Rolapitan,患者在化疗前1~2 h服用180 mg。由于患者服用单剂量的Varubi(Rolapitan)后,可在7 d或者更长的时间内抑制药物代谢酶CYP2D6酶的作用。因此Varubi(Rolapitan)不能与经CYP2D6酶代谢的药物如硫利达嗪一起使用,以免产生严重的不良反应。

#### 2 治疗遗传性乳清酸尿症新分子实体药物 Xuriden

2015年09月04日,美国FDA通过优先审批途径批准了Wellstat公司的新分子实体药物Xuriden(尿苷三乙酸酯)上市,用于罕见病遗传性乳清酸尿症的治疗。Xuriden(尿苷三乙酸酯)为尿苷替代物,尿苷可以促进体内乳清酸转变为尿苷酸,从而避免血液和尿液中大量出现乳清酸。Xuriden(尿苷三乙酸酯)为口服颗粒剂,患者开始服用时的剂量为每天60 mg/kg,当效果不佳时剂量可增加至每天120 mg/kg,但总量不能超过每天8 g。

#### 3 治疗精神分裂和双相I型情感障碍新分子实体药物 Vraylar(Cariprazine)

2015年09月17日,美国FDA批准了Forest Laboratories的新分子实体药物Vraylar(Cariprazine)上市,用于精神分裂和双相I型情感障碍的治疗。Vraylar(Cariprazine)具体的作用机理尚不明确,推测可能通激动多巴胺D2受体、五羟色胺5-HT1A受体,抑制五羟色胺5-HT2A受体而发挥作用。Vraylar(Cariprazine)为胶囊剂,共有1.5,3,4.5和6 mg 4种规格。治疗精神分裂的推荐剂量为每天1.5~6 mg,治疗双相I型情感障碍的推荐剂量为每天3~6 mg。

#### 4 治疗结直肠癌新分子实体复方药物 Lonsurf

2015年09月22日,美国FDA批准日本Taiho Oncology的新分子实体复方药物Lonsurf上市,用于对其他疗法(化疗及生物疗法)不再响应的难治性转移结直肠癌患者的治疗。Lonsurf由抗肿瘤核苷类似物Trifluridine(三氟胸苷)和胸苷磷酸化酶抑制剂Tipiracil组成。Lonsurf为片剂,含2种规格,分别为Trifluridine/Tipiracil(15 mg/6.14 mg)和(20 mg/8.19 mg)。

#### 5 治疗糖尿病新分子实体药物 Tresiba(德谷胰岛素)

2015年09月25日,美国FDA批准日本T诺和诺德公司的新分子实体药物Tresiba上市,用于糖尿病的治疗。Tresiba为新一代基础胰岛素类似物,通过经皮下注射后形成多六聚体,从而发挥超长效(>24 h)作用。