

## 弱化抗性标记筛选高表达 CHO 细胞株的方法建立

刘 苏, 田 宏, 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<sup>®</sup> 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<sup>™</sup> 2 000(美国 Invitrogen 公司); Hitrap<sup>™</sup> 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有限公司); 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<sup>®</sup> 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'-CGCCTTCTTGGCGAGTTCTTCTGAGCGGGACTC-TGGGGTT-3'; 反向扩增引物序列: 5'-AA-GAACTCGCCAAGAAGCGCATAGAAGCGCATGCG-CTGCG-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  $^{\circ}$ 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<sup>™</sup> 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  $^{\circ}$ 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℃、5% CO<sub>2</sub>培养24 h后分别加入G418终质量浓度为100,200,400,600,800,1 000 μg/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'-TACCGGTGAATTCGATGCTGAGCAAGGCGAGGAGCTGTTCA-3';反向扩增引物序列:5'-TCACCATCGAATTCACCGGTAGCGCTAGCGGATCTGACGGTT-3'。突变Nhe I酶切位点引物序列如下:正向扩增引物序列:5'-GTACTCAGCTAGCGAGCTCAAGCTTCGAATTCTGCAGTCGAC-3';反向扩增引物序列:5'-GCTTGAGCTCGCTAGCTGAGTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-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℃连接过夜,连接子转入E. coli DH5α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1×10<sup>6</sup>个细胞(500 μL)。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℃5% CO<sub>2</sub>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℃5% CO<sub>2</sub>条件下培养24 h后加入终质量浓度为400 μg/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 μg/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℃条件下操作,0.45 μm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 μL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 μL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℃条件下操作,0.45 μm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℃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

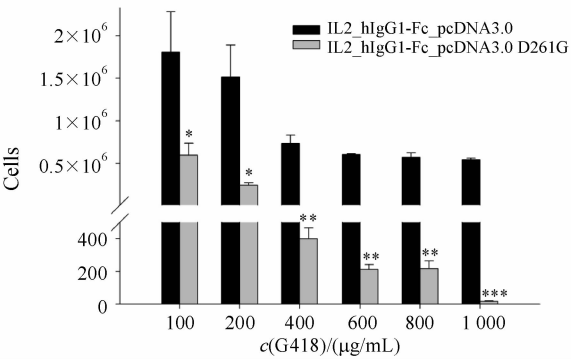
3.1 G418 对转染含野生型 NPT 和转染含突变型 NPT 表达载体的细胞杀伤作用的比较

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。

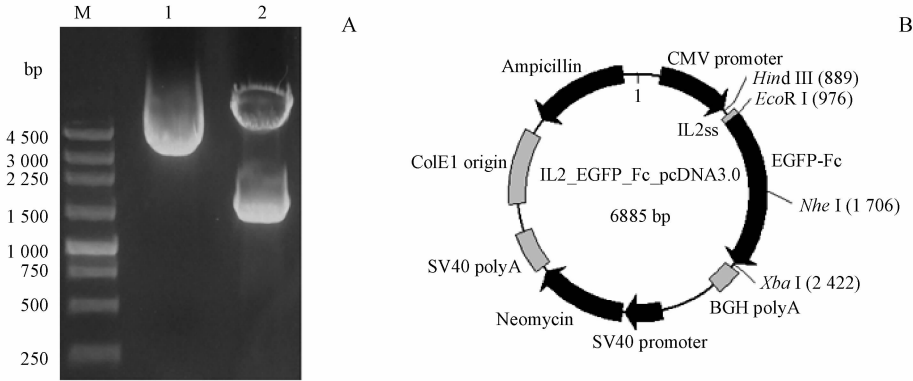
3.2 重组真核表达载体的鉴定

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。

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



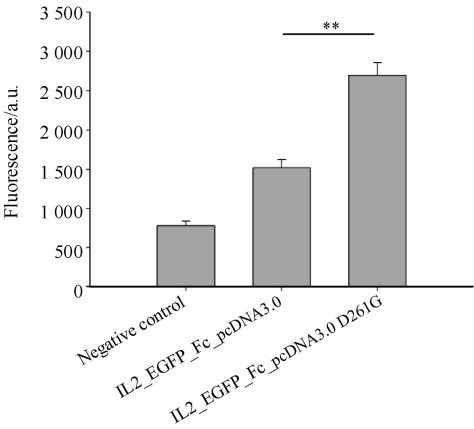
**Figure 2** Identification (A) and construction(B) of IL2\_EGFP\_Fc\_pcDNA3.0 plasmid vector  
Line 1:IL2\_EGFP\_Fc\_pcDNA3.0;Line 2:IL2\_EGFP\_Fc\_pcDNA3.0 digested by *Hind* III and *Xba* I

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)。



**Figure 3** Comparing fluorescence assay of enhanced green fluorescent protein (EGFP) intensity of different vectors in stable transfections after selection with G418( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
\*\*  $P < 0.01$

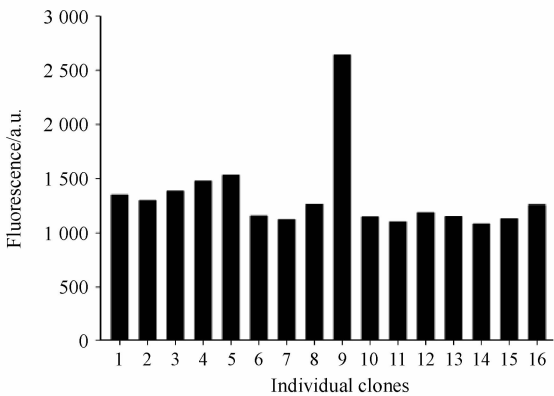


Figure 4 Fluorescence assay of EGFP intensity in monoclonal cell culture supernatant

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。

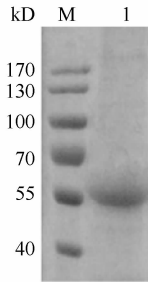


Figure 5 SDS-PAGE analysis of EGFP-Fc fusion protein expression after purification  
Line 1: Expression of CHO-A4

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  $\mu\text{g/mL}$  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(Rolapitan)

2015年09月01日,美国FDA批准了Tesaro公司的新分子实体药物Varubi(Rolapitan)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酶代谢的药物如疏利达嗪一起使用,以免产生严重的不良反应。

#### 2 治疗遗传性乳酸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酸酸尿症的治疗。Xuriden(尿苷三乙酸酯)为尿苷替代物,尿苷可以促进体内乳酸转变成为尿苷酸,从而避免血液和尿液中大量出现乳酸。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,推测可能通过激动多巴胺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聚体,从而发挥超长效(>24 h)作用。

(新康界,本刊有删改)