



基于报告基因的抗 IFNR1 单抗生物学活性测定方法的建立^{*}

李萌, 于传飞, 王兰^{**}

(中国食品药品检定研究院, 卫生部生物技术产品检定及标准化重点实验室, 北京 100050)

摘要 **目的:** 建立抗 I 型干扰素受体亚基 1 单抗(抗 IFNR1 单抗)的生物学活性检测方法。**方法:** 利用 HEK293-ISRE-Luc 细胞系, 通过荧光素酶检测系统(ONE-Glo[®] Luciferase Assay System), 进行抗 IFNR1 单抗生物学活性检测, 并对该方法进行精密度、准确度、专属性的验证。**结果:** 抗 IFNR1 单抗在该方法中均存在量效关系, 利用四参数方程拟合成 4S 型曲线, 50%、75%、100%、125% 及 150% 的加标样品相对效价($n=3$) 分别为 $(49.58 \pm 2.90)\%$ ($RSD=5.8\%$)、 $(76.27 \pm 5.12)\%$ ($RSD=6.7\%$)、 $(99.84 \pm 4.21)\%$ ($RSD=4.2\%$)、 $(123.08 \pm 2.58)\%$ ($RSD=2.1\%$)、 $(158.69 \pm 4.72)\%$ ($RSD=3.0\%$), RSD 均小于 10%; 加样回收率分别为 $(99.16 \pm 5.81)\%$ 、 $(101.69 \pm 6.82)\%$ 、 $(99.84 \pm 4.21)\%$ 、 $(98.47 \pm 2.06)\%$ 和 $(105.80 \pm 3.14)\%$, RSD 均小于 10%; 专属性良好。**结论:** 建立的抗 IFNR1 单抗生物学活性检测方法, 可作为抗 IFNR1 单抗生物学活性的常规检测方法。

关键词: 报告基因; I 型干扰素受体亚基 1; 生物学活性; 单抗; 方法学验证; 信号通路

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2018)10-1748-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.10.12

Development of a novel reporter gene method for determination of potency of anti-IFNR1 monoclonal antibody^{*}

LI Meng, YU Chuan-fei, WANG Lan^{**}

(National Institutes for Food and Drug Control, Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Beijing 100050, China)

Abstract **Objective:** To establish a biological activity assay for anti-type I interferon receptor subunit 1 monoclonal antibody (anti-IFNR1 monoclonal antibody). **Methods:** The bioassay of anti-IFNR1 antibody was tested by cell line of HEK293-ISRE-Luc and ONE-Glo[®] Luciferase Assay System, and the precision, accuracy and specificity of the method were validated. **Results:** The anti-IFNR1 antibody has dose-effect relation which could be fitted by four-parameter curve. The relative potencies of 50%, 75%, 100%, 125% and 150% of sample concentration ($n=3$) were $(49.58 \pm 2.90)\%$, $(76.27 \pm 5.12)\%$, $(99.84 \pm 4.21)\%$, $(123.08 \pm 2.58)\%$,

^{*} 国家重点研发计划课题资助项目(2016YCF1200904)

^{**} 通信作者 Tel: (010) 53852159; E-mail: wanglan@nifdc.org.cn

第一作者 李萌 Tel: (010) 53852176; E-mail: lemon831115@163.com

于传飞 Tel: (010) 53852176; E-mail: yuchuanfei@126.com

(158.69 ± 4.72)%, and RSDs were 5.8%, 6.7%, 4.2%, 2.1%, 3.0%, respectively. The RSD was less than 10%. The recoveries ($n=3$) were (99.16 ± 5.81)%, (101.69 ± 6.82)%, (99.84 ± 4.21)%, (98.47 ± 2.06)% and (105.80 ± 3.14)%, respectively. RSDs were less than 10%. Specificity of the method was fine.

Conclusion: The bioassay method of anti-IFNR1 antibody has been established, which can be a common bioassay method of anti-IFNR1 monoclonal antibody.

Keywords: report gene; IFNR1; bioassay; Mabs; method validation; signaling pathway;

干扰素(interferon, IFN)根据其受体、染色体定位以及抗原性的不同^[1-2],可以分为三型,即I型、II型和III型IFN^[3-5]。I型IFN称为白细胞干扰素,在自身免疫和炎症性疾病例如系统性硬化病(SSc)、系统性红斑狼疮(SLE)和肌炎中起着重要作用。I型IFN的受体由2个亚单位组成,分别是I型干扰素受体亚单位1(IFNR1)和I型干扰素受体亚单位2(IFNR2)。I型IFN与其受体结合后,胞浆中的STAT(翻译中的信号传导和激活物)蛋白进行酪氨酸磷酸化,最终形成干扰素刺激基因因子(interferon-stimulated gene factor 3, ISGF₃)复合体,ISGF₃迅速易位于细胞核中,并与顺式-作用元件干扰素刺激反应元件(IFN-stimulated responsive element, ISRE,存在于干扰素诱导基因)结合,从而激发下游基因表达^[6],如图1所示。

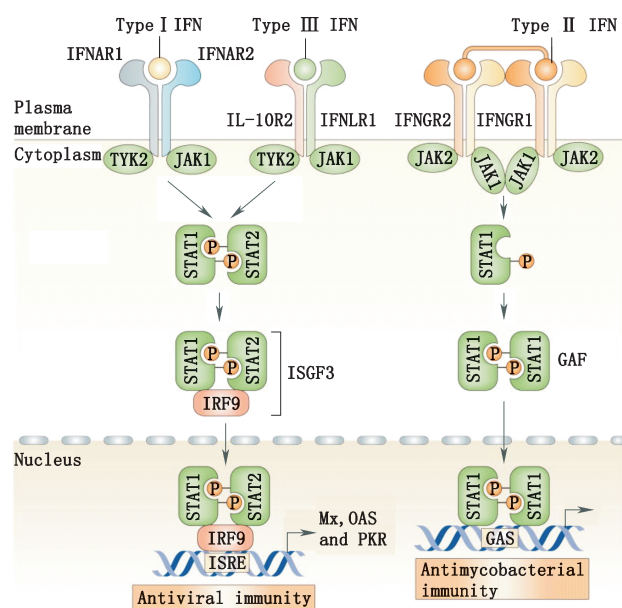


图1 IFN受体的信号通路^[7]

Fig. 1 IFN receptor signaling pathway^[7]

抗IFNR1单抗是一种直接作用于IFNR1的人源化免疫球蛋白G1 κ (IgG1 κ),由2条相同的轻链

和2条相同的重链组成,分子量约为148 kD,它能抑制I型IFN与I型IFNR1结合,诱导受体内化,从而抑制所有I型IFN的生物学活性。有关该抗体在自身免疫和炎症性疾病(如硬皮病)等方面治疗效果的研究正在进行。目前,国内外抗体研发企业正在进行此类抗体研制,并即将进入临床阶段。因此,建立评价该类抗体药物的生物学活性方法,具有重要意义。

本文以荧光素酶报告基因检测系统为平台,利用稳定转染ISRE启动子及荧光素酶报告基因的人胚肾细胞系(HEK293-ISRE-Luc细胞)作为靶细胞,通过IFN- α 2b与其受体结合,诱导荧光素酶报告基因表达,抗IFNR1单抗能抑制IFN- α 2b与IFNR1的作用,使ISRE启动的荧光素酶表达减低,进而降低底物反应后发出的荧光强度。本研究建立了灵敏、快速的抗IFNR1单抗的生物学活性检测方法,可以对此类靶点抗体药物进行科学、有效的质量控制。

1 材料

1.1 样品及细胞

人源化抗IFNR1单抗参比品和1批样品,由中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞表达,为单抗室留样。HEK293-ISRE-Luc细胞为单抗室保存。

1.2 主要仪器及试剂

多功能酶标仪SpectraMax® M5(Molecular Devices公司);ONE-Glo荧光素酶检测系统(Promega公司),IFN- α 2b(BD公司),含GlutaMax的DMEM(Gibico公司),FBS(Gibico公司),遗传毒素(Gibico公司),青霉素/链霉素(Gibico公司),TrypLE(Gibico公司),不含Ca²⁺和Mg²⁺的PBS(Gibico公司)。Waters 2695高效液相色谱(沃特世科技(上海)有限公司),色谱柱为TSK 3000SWXL(Tosoh Bioscience, 300 mm $\times$ 7.8 mm, 5 μ m)。

2 方法

2.1 抗 IFNR1 单抗生物学活性检定原理

本实验原理是用 IFN- α 2b 刺激转基因 HEK293-ISRE-Luc 细胞 (含有 ISRE 启动子控制的荧光素酶基因) 活化, 荧光素酶表达增加。加入抗 IFNR1 单抗抑制了 IFN- α 2b 与 IFNR1 的作用, ISRE 启动的荧光素酶表达减低, 进而降低底物反应后发出的荧光强度, 原理示意图见图 2。

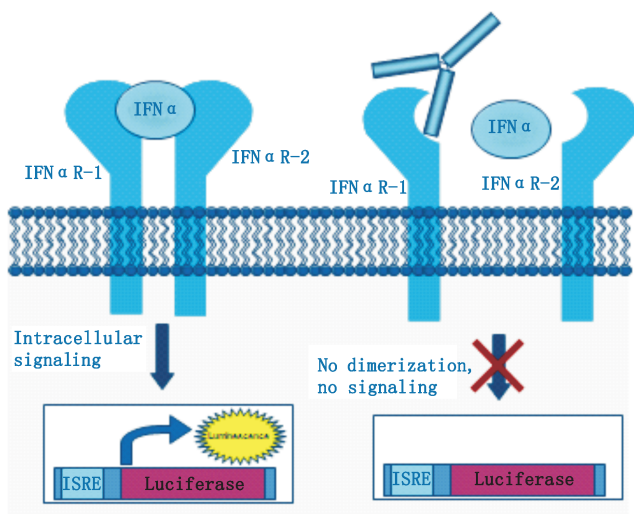


图 2 抗 IFNR1 单抗的生物学活性测定原理

Fig. 2 Mechanism of action of bioassay of anti-IFNR1 mabs

2.2 抗 IFNR1 单抗生物学活性测定

用不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 PBS 冲洗细胞, 用 TrypLE 消化 37 $^{\circ}\text{C}$, 3 min, 完全培养基 (870 mL 含 GlutaMax 的 DMEM, 100 mL 热灭活 FBS, 20 mL 遗传毒素 Geneticin, 10 mL 青霉素/链霉素) 中和, 计数, 制备浓度为 0.5×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 细胞悬液。每孔加入细胞悬液 50 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 h。抗 IFNR1 单抗用完全培养基预稀释至 $6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 添加 300 μL 完全培养基至所有行的第 3、4、10 和 11 列的孔中, 添加 150 μL 完全培养基至所有行的第 5~9 列的孔中; 所有行从第 2 孔起, 向第 3 孔转移 150 μL , 依次转移至第 11 孔。抗 IFNR1 单抗质量浓度依次为 6 000、2 000、666.7、333.33、166.67、83.33、41.67、20.03、6.94 和 2.31 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。将 IFN- α 2b 用完全培养基稀释为 750 IU $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。取第 2 块稀释板用于混合稀释后的样品和 IFN- α 2b: 先加入 750 IU $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IFN- α 2b 100 μL , 然后加入样品的梯度稀释液 100 μL 。每孔对应加入样品和 IFN- α 2b 混合液 100 μL 至细胞培养板, 培养 18 h。第 2 天每孔加入 ONE-Glo 荧光素酶底物 100

μL , 室温避光孵育 10 min。用酶标仪读数; 进行 4-参数拟合:

$$Y = \frac{A-D}{1+(X/C)^B} + D$$

其中: A = 上渐近线值, B = 斜率, C = EC_{50} 值, D = 下渐近线值

利用 SoftMax 软件分析试验数据, 以抗 IFNR1 单抗浓度对数为 X 轴, 对应的相对光单位 (relative light unit, RLU) 值为 Y 轴, 选用四参数分析法拟合抗 IFNR1 单抗的剂量效应曲线。抗 IFNR1 单抗参比品和供试品存在量效关系, 在四参数坐标纸上呈 S 型曲线分布, 相关系数大于 0.99, 见图 3。

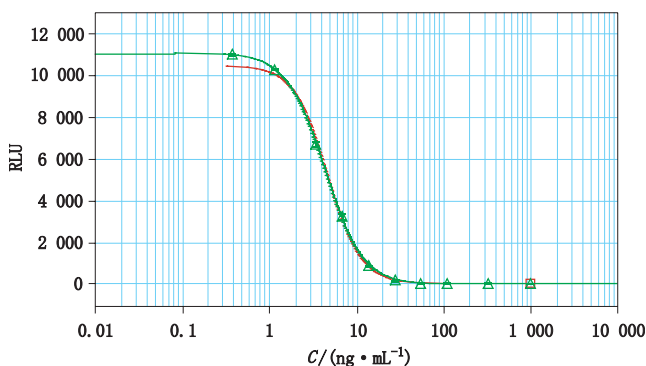


图 3 抗 IFNR1 单抗的剂量效应曲线 (Δ 为参比品, $\square$ 为成品)

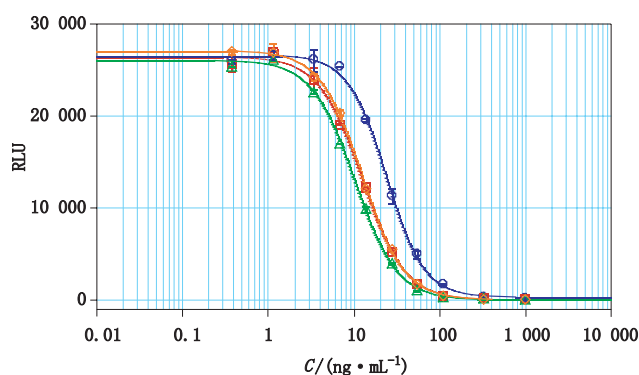
Fig. 3 Dose response curves of anti-IFNR1 mabs (Δ reference, $\square$ product)

2.3 方法学验证

2.3.1 精密度

用完全培养基制备抗 IFNR1 单抗 (原质量浓度为 $150 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的预稀释液 3 份, 质量浓度均为 $6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。然后用完全培养基稀释抗 IFNR1 单抗 ($150 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 得到质量浓度分别为预稀释液质量浓度的 50% ($3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、75% ($4.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、100% ($6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、125% ($7.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和 150% ($9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的溶液^[8], 测定各抗 IFNR1 单抗溶液的半数有效浓度 (EC_{50}), 以独立稀释的 $6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 样品作为参比品, 按照参比品 EC_{50} /样品 $\text{EC}_{50} \times 100\%$ 计算相对效价及其 RSD, 从而验证该方法的精密度。

结果如图 4 和图 5 所示, 与 100% 浓度的抗 IFNR1 单抗参比品相比, 抗 IFNR1 单抗相对效价分别为 (49.58 ± 2.90)%、(76.27 ± 5.12)%、(99.84 ± 4.21)%、(123.08 ± 2.58)% 和 (158.69 ± 4.72)%, RSD 均小于 10% (见表 1), 说明该方法具有较好的精密度。



4-P Fit: $y = (A-D) / (1 + (x/C)^B) + D$: A B C D R^2

◇ 50% (Group 01: Concentration vs 2.66e+04 1.96 24 237 0.999 Mean Value)

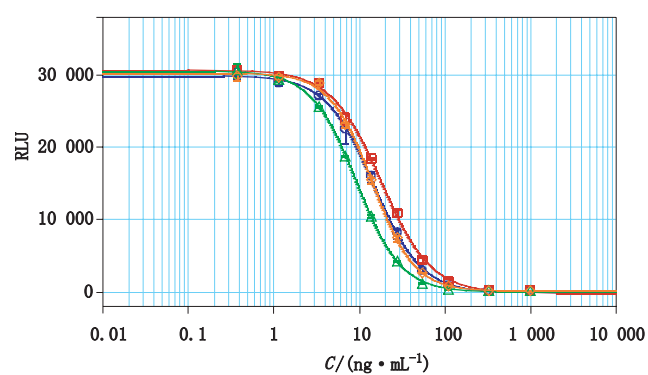
□ 100% (Group 02: Concentration vs 2.64e+04 1.73 12.5 -57.8 0.999 Mean Value)

△ 125% (Group 03: Concentration vs 2.6e+04 1.74 10.3 -69.8 0.999 Mean Value)

◇ STD (Group 04: Concentration vs 2.7e+04 1.77 12.6 -45.7 1 Mean Value)

图4 50%、100%和125%预稀释浓度的抗IFNR1单抗溶液生物学活性曲线

Fig. 4 Bioassay curves of 50%, 100% and 125% of predilution concentration of anti-IFNR1 mab solutions



4-P Fit: $y = (A-D) / (1 + (x/C)^B) + D$: A B C D R^2

◇ 75% (Group 01: Concentration vs 2.99e+04 1.55 14.8 -210 0.999 Mean Value)

□ 100% (Group 02: Concentration vs 3.07e+04 1.49 18.2 -232 0.999 Mean Value)

△ 150% (Group 03: Concentration vs 3.05e+04 1.65 9.31 -103 1 Mean Value)

◇ 100% (Group 04: Concentration vs 3.02e+04 1.76 14.3 22.2 0.999 Mean Value)

图5 75%、100%和150%预稀释浓度的抗IFNR1单抗溶液生物学活性曲线

Fig. 5 Bioassay curves of 75%, 100% and 150% of predilution concentration of anti-IFNR1 mab solutions

表1 抗IFNR1单抗生物学活性精密度和准确度试验结果 (n=3)

Tab. 1 Results of precision and accuracy of biological activity of anti IFNR1 mabs

溶液 (solution)	相对效价 (relative potency)		回收率 (recovery)	
	$\bar{x} \pm s/\%$	RSD/%	$\bar{x} \pm s/\%$	RSD/%
50%	49.58 ± 2.90	5.85	99.16 ± 5.81	5.86
75%	76.27 ± 5.12	6.71	101.69 ± 6.82	6.71
100%	99.84 ± 4.21	4.22	99.84 ± 4.21	4.22
125%	123.08 ± 2.58	2.10	98.47 ± 2.06	2.09
150%	158.69 ± 4.72	2.97	105.80 ± 3.14	2.97

2.3.2 准确度

按“2.3.1”项下方法,分别制备质量浓度为预稀释液质量浓度(6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的50%、75%、100%、125%和150%的溶液,测定各溶液的 EC_{50} 。按“2.3.1”项下的方法,计算相对效价,然后按相对效价测定值/相对效价理论值 $\times 100\%$ 计算回收率,从而验证该方法的准确度。

结果显示,50%、75%、100%、125%和150%溶液的回收率分别为(99.16 $\pm$ 5.81)%、(101.69 $\pm$ 6.82)%、(99.84 $\pm$ 4.21)%、(98.47 $\pm$ 2.06)%和(105.80 $\pm$ 3.14)%,RSD均小于10%,见表1,说明该方法具有

较好的准确度。

2.3.3 专属性

转基因细胞专属性:以普通空载HEK293细胞、PD-1转基因测活细胞(Jurkat-luc)代替293H-ISRE-Luc细胞进行检测。抗体专属性:以无关抗体抗TNF- α 单抗、天然人IgG1,经过70 $^{\circ}\text{C}$ 加热1、2、3 min的抗IFNR1单抗作为对照样品进行检测。

2.3.3.1 细胞专属性 结果显示,HEK293-ISRE-Luc细胞在IFN- $\alpha 2b$ 刺激下,抗IFNR1单抗浓度与荧光素酶表达存在量效关系,在四参数坐标纸上呈S型曲线分布,相关系数大于0.99,而普通空载HEK293

细胞和 PD-1 转基因测活细胞 (Jurkat-luc) 无反应性。见图 6。

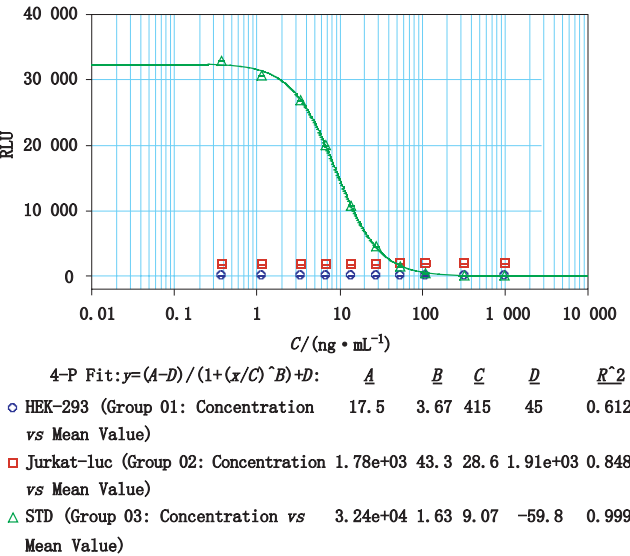


图 6 细胞专属性生物学活性曲线

Fig. 6 Bioassay curves of cell specificity of anti-IFNRI mabs

2.3.3.2 抗体专属性 结果显示,抗 TNF- α 单抗和天然人 IgG1 应用此方法无反应性,抗 IFNR1 单抗存在量效关系,在四参数坐标纸上呈 S 型曲线分布,相关系数大于 0.99,见图 7。

2.3.4 SEC-HPLC 纯度分析

参照 2015 年版《中华人民共和国药典》尼妥珠单抗相关附录 (四部通则 0512),确定了色谱条件:采用 Waters 2695 高效液相色谱,TSK 3000SWXL 色谱柱 (Tosoh Bioscience, 300 mm $\times$ 7.8 mm, 5 μ m),以

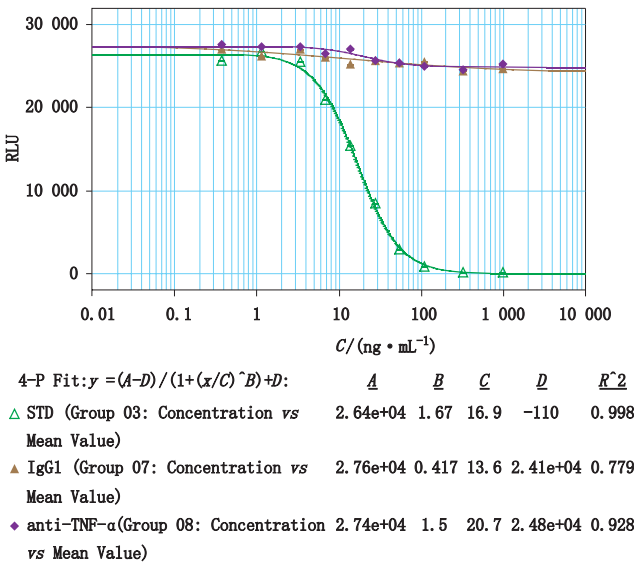


图 7 抗体专属性生物学活性曲线

Fig. 7 Bioassay curves of antibody specificity of anti-IFNRI mabs

25 mmol $\cdot$ L⁻¹ 磷酸钠和 350 mmol $\cdot$ L⁻¹ 氯化钠的溶液 (pH 6.8) 为流动相,流速 0.8 mL $\cdot$ min⁻¹,柱温 25 $^{\circ}$ C,进样量 10 μ L,进样器温度 4 $^{\circ}$ C。将经过 70 $^{\circ}$ C 加热 1、2、3 min 的抗 IFNR1 单抗用流动相稀释为 1.0 mg $\cdot$ mL⁻¹,按上述色谱条件进样测定,分别检测样品单体和多聚体含量。

SEC-HPLC 结果显示,经过 70 $^{\circ}$ C 加热 1、2、3 min 的抗 IFNR1 单抗,多聚体随加热时间延长呈现增加的趋势,结果见表 2。因此,抗 IFNR1 单抗随着加热时间延长,多聚体含量增加。

表 2 SEC-HPLC 检测加热处理的抗 IFNR1 单抗

Tab. 2 Results of heated anti-IFNRI mabs by SEC-HPLC

样本 (sample)	峰面积百分比 (percentage of peak area)			
	未加热 (non-heat treated)	加热 1 min (1 min heat treated)	加热 2 min (2 min heat treated)	加热 3 min (3 min heat treated)
单体 (monomer)	98.9	98.1	88.6	60.9
聚体 (aggregates)	1.0	1.8	11.3	38.4

经过 70 $^{\circ}$ C 加热 1、2、3 min 的抗 IFNR1 单抗,相对效价随加热时间延长呈现降低的趋势:70 $^{\circ}$ C 加热 1 min 时,相对效价为 107%;70 $^{\circ}$ C 加热 2 min 时,相对效价为 86%;70 $^{\circ}$ C 加热 3 min 时,相对效价为

63%。见图 8。

上述结果表明,抗 IFNR1 单抗随着加热时间延长,多聚体含量增加,生物学活性降低,表明该活性能够反映出抗体理化性质的改变,见图 9。

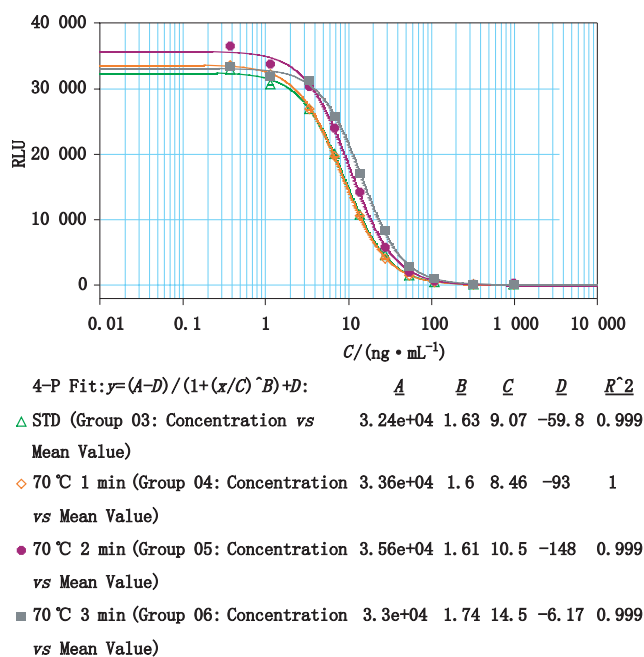
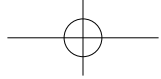


图8 加热不同时间破坏抗 IFNR1 单抗的生物学活性曲线

Fig. 8 Bioassay curves of anti-IFNR1 mabs which were heated for different periods of time

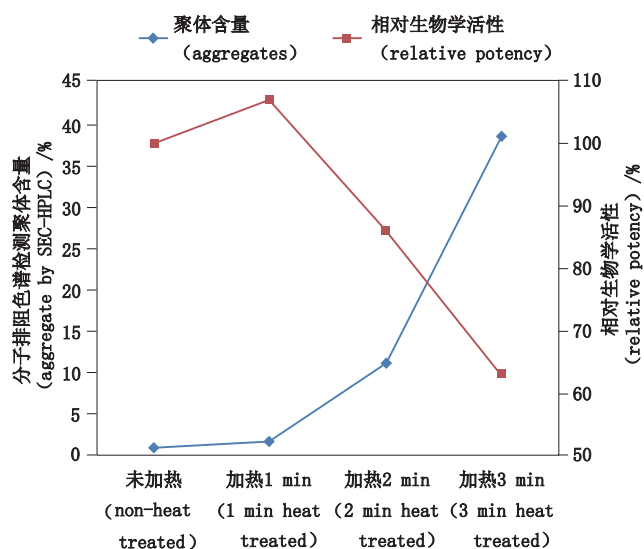


图9 相对生物学活性与 SEC-HPLC 多聚体的关系

Fig. 9 Relationship between relative biological activity and SEC-HPLC polymer

3 讨论

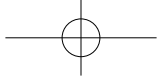
抗体类药物是指含有抗体基因片段的蛋白药物,在临床恶性肿瘤、自身免疫性疾病、感染、心血管疾病和器官移植排斥等重大疾病治疗中取得了快速发展^[9-10]。重组单抗类生物治疗药物近年来增长强劲,作为靶向药物,其作用机制明确,治疗效果比较理想,

因此成为国内外研发的热点^[11]。2016 年全球销售排名前 10 位的药品中,6 个为抗体类新型生物大分子药物,所以单抗药物也是生物医药产业最重要的增长点。

目前,国际上各大药品研发企业已开始进行针对 IFN 受体为靶点的抗体研发,抗 IFNR1 单抗是备受关注的新药之一。抗 IFNR1 单抗在自身免疫和炎症性疾病(如硬皮病)方面具有潜在的治疗效果。因此,面对国内外研发单位不断出现的抗 IFNR1 单抗药物,如何确保该类单抗药物的安全有效,是质量控制标准化研究面临的重要任务之一。为了控制产品质量,必须根据产品特征建立不同的质量控制方法。体外活性的检测是保证生物制品有效性的关键环节。生物学活性是生物技术药物有效性评价的关键质量属性(critical quality attribute, CQA)。本研究所建立的抗 IFNR1 单抗的生物学活性测定方法,是用 IFN- α 2b 刺激稳定转染 ISRE 启动子及荧光素酶报告基因的人胚肾细胞系(HEK293-ISRE-Luc 细胞)活化,荧光素酶表达增加。加入抗 IFNR1 单抗抑制了 IFN- α 2b 与 IFNR1 的作用,ISRE 启动的荧光素酶表达减低,进而降低底物反应后发出的荧光强度。实验数据显示,抗 IFNR1 抗体经倍比稀释后,可以得到较好的 S 型剂量效应曲线。方法学验证数据显示,该方法必须基于特异的转染 ISRE 启动子及荧光素酶报告基因的人胚肾细胞系的靶细胞和特异性的单抗。由于 EC₅₀ 值不仅取决于单抗的亲和力,还会受到作用时间、实验试剂等条件影响,导致不同实验条件下 EC₅₀ 值存在一定程度的变异,因此评价抗 IFNR1 抗体的方法利用相对效价更加合理可信,相对效价数值与生物学活性成正比^[12]。

热加速破坏试验使单抗发生物理因素的变性,是由于加热使氢键断裂,从而破坏其空间结构(二级结构和三级结构),因此引起分子间聚集,甚至沉淀。国内外普遍采用 SEC-HPLC 进行单体和多聚体的含量控制。多聚体由于空间结构破坏,原有的结合抗原表位的互补决定区(CDR)无法与抗原进行有效结合,无法激活下游通路,因此多聚体是无生物学活性的。实验证明本方法能够反映出抗体理化性质的改变。

本报告基因系统是基于 IFN 信号转导通路设计



的,其适用范围除了抗 IFNR1 单抗,将会随着相似机理的抗体类药物研发而进一步扩展,如抗 IFNR2 单抗、Fc 融合蛋白等。

本研究建立了灵敏、快速的抗 IFNR1 单抗的生物学活性检测方法,并对该方法进行了验证,该方法基于药物作用机制(MOA),操作简便易行,专属性强,精密度好,准确度高,可作为抗 IFNR1 单抗生物学活性的常规检查方法。

参考文献

- [1] PESTKA S, KRAUSE CD, WALTER MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors[J]. Immunol Rev, 2004, 202: 8
- [2] SAMUEL CE. Antiviral actions of interferon. Interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities[J]. Virology, 1991, 183(1): 1
- [3] 张永. 干扰素的分子生物学机制研究进展[J]. 海峡药学, 2007, 19(1): 7
- ZHANG Y. Research progress of molecular biological mechanisms of interferon[J]. Strait Pharm J, 2007, 19(1): 7
- [4] SAMUEL CE. Antiviral actions of interferons[J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14(4): 778
- [5] 邹炜, 黄仕和. 新型干扰素 λ 家族[J]. 生命的化学, 2003, 23(5): 346
- ZOU W, HUANG SH. Interferon λ family of new pattern[J]. Chem Life, 2003, 23(5): 346
- [6] SCHINDLER C, SHUAL K, PREZIOSO VR, *et al.* Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor[J]. Science, 1992, 257(5071): 809
- [7] SADLER AJ, WILLIAMS BRG. Interferon-inducible antiviral effectors[J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(7): 559
- [8] 刘春雨, 王兰, 高凯, 等. 基于报告基因的抗 CD20 单克隆抗体 ADCC 生物学活性测定方法的建立[J]. 药科学报, 2015, 50(1): 94
- LIU CY, WANG L, GAO K, *et al.* Development of a novel reporter gene method for determination of ADCC potency of anti-CD20 monoclonal antibody[J]. Acta Pharm Sin, 2015, 50(1): 94
- [9] GAO K, WANG J. The biopharmaceutical industry in China: history and future perspectives[J]. Front Med, 2012, 6(2): 101
- [10] SLIWKOWSKI MX, MELLMAN I. Antibody therapeutics in cancer[J]. Science, 2013, 341(6151): 1192
- [11] 郭玮, 王文波, 于传飞. TNF- α 单抗分子大小变异体与电荷变异体色谱行为的比较研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2014, 34(9): 723
- GUO W, WANG WB, YU CF. Comparative study of size and charge heterogeneities of anti TNF- α antibodies by high performance liquid chromatography[J]. Chin J Microbiol Immunol, 2014, 34(9): 723
- [12] 王兰, 饶春明, 李永红, 等. 血管内皮生长因子抑制剂生物学活性检测方法的建立[J]. 中国生物制品学杂志, 2009, 22(9): 895
- WANG L, RAO CM, LI YH, *et al.* Development of a method for determination of biological activity of vascular endothelial growth factor trap[J]. Chin J Biol, 2009, 22(9): 895

(本文于 2017 年 10 月 29 日收到)