doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.15.007

应用 CE-SDS 测定抗 CD52 人源化单克隆抗体参比品单体纯度 及非糖化重链比例 *

王建锋 乔玉玲 秦海燕 崔保峰 南建军 毛晓燕山

(兰州生物制品研究所有限责任公司;甘肃省大分子蛋白生物药工程研究中心;甘肃省疫苗工程技术研究中心 甘肃 兰州 730046)

摘要 目的:测定抗 CD52 人源单克隆抗体参比品单体纯度及非糖基化重链比例。方法:采用 PA800 plus 毛细管电泳系统,非还原 十二烷基苯硫酸钠 - 毛细管电泳(CE-SDS)测定抗 CD52 人源单克隆抗体单体纯度,以及用还原 CE-SDS 电泳测定非糖化重链比 例。结果: 非还原 CE-SDS 三次测定单体纯度平均值为 93.57%, 主峰的迁移时间及修正峰面积百分比 RSD 分别为 0.16%和 0.19%;还原 CE-SDS 电泳重链修正峰面积百分比平均值为 66.89%,修正峰面积百分比及迁移时间 RSD 分别为 0.09%和 0%;轻 链修正峰面积百分比平均值为 32.30%;轻链修正峰面积及迁移时间 RSD 分别为 0.%和 0%;非糖基化重链修正峰面积百分比平均 值为 0.87%,修正峰面积百分比及迁移时间 RSD 分别为 6.66%和 0.27%。结论:CE-SDS 测定抗 CD52 人源单抗单体纯度及非糖化 重链比例实验结果偏差较小,表明结果准确可靠。

关键词:十二烷基苯硫酸钠 - 毛细管电泳;抗 CD52 人源单抗;单体纯度;非糖化重链比例 中图分类号:R-33;Q503;Q78 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2018)15-2836-05

CE-SDS were Applied to Determine Monomer Purity and Proportion of Non-glycosylated Heavy Chain in Reference Products of anti-CD52 Humanized Monoclonal Antibody*

WANG Jian-feng, QIAO Yu-ling, QIN Hai-yan, CUI Bao-feng, NAN Jian-jun, MAO Xiao-yan[△]

(Lanzhou institute of biological products co, Engineering Research Center of macromolecules biological drugs of Gansu province; Vaccine engineering technology research center of Gansu, Lanzhou, Gansu, 730046, China)

ABSTRACT Objective: To determine the monomer purity and proportion of non-glycosylated heavy chain in reference productsanti-CD52 humanized monoclonal antibody. **Methods:** Using PA800 plus capillary electrophoresis system, Non-reduced CE-SDS were applied to determine monomer purity and reduced CE-SDS were applied to determine non-glycosylated heavy chain in anti-CD52 humanized monoclonal antibody. **Results:** Average value of monomer purity is 93.57% by Non-reduced CE-SDS in three times, RSD of migration time of main peak and corrected area percent were 0.16% and 0.19% respectively. Average value of heavy chain corrected area percent is 66.89% by reduced CE-SDS in three times, RSD of migration time and corrected area percent of main peak were 0.09% and 0% respectively. Average value of light chain corrected area percent is 32.30% by reduced CE-SDS in three times, RSD of corrected area percent and migration time of main peak were 0% and 0% respectively. Average value of non-glycosylated heavy chain corrected area percent is 0.87% by reduced CE-SDS in three times, RSD of corrected area percent and migration time of main peak were 6.66% and 0.27% respectively. **Conclusion:** The data of using CE-SDS determine the monomer purity and proportion of non-glycosylated heavy chain in anti-CD52 humanized monoclonal antibody displayed a much small RSD, and manifested the result were accurate and reliable.

Key words: CE-SDS; Anti-CD52 humanized monoclonal antibody; Monomer purity; Non-glycosylated heavy chain proportion

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q503; Q78 Document code: A Article ID: 1673-6273(2018)15-2836-05

前言

阿伦单抗(Campath 1H)是人源化的 IgG1 单克隆抗体,它的作用靶点为人 CD52 抗原^[14]。2001年,阿伦单抗在美国和欧盟批准上市,主要用作 B-细胞慢性淋巴细胞白血病患者的治疗^[5],2012年8月 Campath 1H 从美国和欧洲市场退出,主要原

因是阻止该单抗在 MS(多发性硬化症)超适应症用药,并为该 单抗在 MS 适应症的重新上市和提高价格做准备。2014 年 11 月 FDA 首次批准制药巨头赛诺菲公司开发的抗 CD52 人源化 单抗,用于治疗多发性硬化症药物 Lemtrada 上市^[67]。目前,国 内抗 CD52 单抗产品还尚未见到,本研究检测所用抗 CD52 单 抗药物是上市产品的仿制品,用于治疗慢性 B-淋巴细胞白血病。

△ 通讯作者: 毛晓燕, 研究员, 从事人源单抗研究, E-mail: maoxiaoyan2002@163.com, 电话: 0931-8316230

^{*}基金项目:甘肃省科技厅重大专项(1502FKDA008)

作者介绍:王建锋,博士,主要从事人源单克隆抗体研究,E-mail: jfwang2003@163.com

⁽收稿日期:2017-12-28 接受日期:2018-01-23)

由于治疗性单克隆抗体药物结构和生产过程的复杂性,产 品是由多种成份构成的复合物,准确快速确定纯度及不同成份 的比例是建立单抗类产品质量控制体系的关键^[8-10]。目前, CE-SDS 快速、准确、灵敏的特点而被广泛用于单抗类药物纯度 及变异体的检测^[11-13]。本研究采用本实验室已从专属性、准确 性、精密度、检测限及耐用性全面验证的 CE-SDS 方法测定抗 CD52 人源单抗参比品纯度及分子变异体的比例,为抗 CD52 抗体的质量控制体系建立及注册奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

PA 800 plus 毛细管电泳仪 (Beckman Coulter); PDA 检测器 (Beckman Coulter); 金属加热装置 (grant 公司), 型号: QBD2; 小型离心机 (Sigma 公司), 型号:1-14; PA 800 plus SDS-MW Analysis Kit (Beckman Coulter)货号:390953; PA 800 plus Uncoated Capillary (67 cm total length, 50 μm I.D.); 2- 巯基乙醇 (Sigma-Aldrich) 货号:60-24-2; 碘代乙酰胺(Sigma-Aldrich)货号:144-48-9; Ref (Anti-CD52 Mab)浓度:30 mg/mL; 批号:201508004。

1.2 试验方法

1.2.1 毛细管预处理 每次运行前必须对毛细管进行预处理: 用 0.1 N 氢氧化钠溶液 20 psi 压力 10 min 冲洗毛细管内壁;0.1 N 盐酸溶液在 20 psi 压力下冲洗 2 min; 纯水在 20 psi 压力下 冲洗 2 min; SDS Gel 在 70 psi 漂洗毛细管 10 min; 15.0 KV 电 压平衡 SDS Gel 10 min。

1.2.2 **样品处理** 抗 CD52 抗体参比浓度 30 mg/mL, CE-SDS 分析的工作浓度为 1 mg/mL, 样品用 PA 800 plus SDS-MW Analysis Kit 中的 loading sample buffer(上样缓冲液)稀释。稀释 方法如下:取 10 mL Ref 于 1mL 的 EP 管中, 加入 90 μL load-

ing sample buffer, 涡旋混匀作为第一次稀释; 取 80 μL 第一次 稀释液加入 1 mL EP 管中, 加入 160 μL loading sample buffer, 涡旋混匀, 即终浓度为 1 mg/mL。

非还原 CE-SDS 电泳样品溶液制备: 取样品溶液(1 mg/mL)95 μ L, 加入 0.8 M 碘乙酰胺水溶液 5 μ L, 5 μ L 内参, 涡旋混匀。取空白对照 95 μ L, 加入 0.8 M 碘乙酰胺水溶液 5 μ L, 5 μ L 内参,涡旋混匀,为非还原空白对照。70 °C,金属浴加 热 5 min,冷却至室温,6000 rpm 离心 1 min。

还原样品溶液制备:取样品溶液(1 mg/mL)95 μL,加入 2-巯基乙醇溶液 5 μL,5 μL 内参,涡旋混匀。取空白试剂 95 μL, 加入 2- 巯基乙醇溶液 5 μL,涡旋混匀,为还原空白对照。70 ℃,金属浴加热 15 min,冷却至室温,6000 rpm 离心 1 min。

1.2.3 **样品分析** 取 75 μL 的样品加入测试管中,将测试管放入测试杯中,测试杯小心插入进样盘,盖上盖子,设定好程序,还原样品进样时间为 30 s;非还原样品进样时间为 40 s;毛细管温度为 20 ℃,样品室温度为 20 ℃;聚焦电压为 15 KV,聚焦时间 40 min。用 PDA 检测器 214 nm 波长采集数据。聚焦结束,设定 "Shutdown Method" 程序,用 NaOH 和 HCI 冲洗毛细管。本次试验参比品重复三针,在试验开始和结束各加一针作为系统适应性。

1.2.4 系统适应性 在测试过程中,目视确认参比品的电泳图 谱与示例文件图谱的一致性;积分所有的蛋白峰,不包括试剂 空白出现的峰;由于毛细管和仪器的差异可能引起蛋白峰峰形 与示例文件中的轻微差异,样品与空白的系统峰之间可能存在 差异,这是可以接受的;两针标准品主峰的迁移时间差≤ 1.0 min。

1.2.5 峰的积分及数据分析 (1)峰的积分:使用 Karat 软件 进行峰的积分。确保软件设置正确,比如禁止 "Caesar "积分 项。如果出现以下情况中的变异等,可对积分参数进行调整。包 括手动积分和基线调整。本次积分选用的积分参数如图 1 所示。

S)5 M	1W-PDA (Offline) Method: SDS MW Separ	ation - PA 800 plu	is-nonreductive.n	net Data: Anti-O	CD52 Mab Rep3 11-14-2015 5-01-50 AM.dat	Project: SDS MW
E	e	Edit Yew Method Data Sequence And	alysis <u>⊂</u> ontrol <u>R</u>	eports <u>W</u> indow	Help		
🛅 + 🖄 + 📓 + 2: PDA - 214nm 🔹 🖌 🍋 🛅 📂 🖾 🖧 🞢 🖾 🐯 🔛 🛣 🖓 🖓 🖉 🚳 🖉 🖉 🖓 🖉 👘							
#		Event	Start Time	Stop Time	Value		
1	V	Width	0.000	0.000	0.4		
2	Ľ	Threshold	0.000	0.000	400		
3	V	Valley to Valley	0.000	0.000	1000		
4	V	Integration Off	0.000	17.000	0		
5	Ľ						

图 1 Karat 软件积分参数

Fig.1 Integration parameters of Karat software

(2)数据分析:采用以上选定的积分参数,按工具菜单的"分析"按钮,系统会自动显示积分结果,选择"峰编号","迁移时间","校正峰面积","校正峰面积百分比",用 Excel 软件计算主峰迁移时间的 RSD 及校正峰面积百分比 RSD。

2 结果

2.1 非还原 CE-SDS 结果

2.1.1 **非还原 CE-SDS 电泳制剂空白与样品峰叠加结果** 制剂对照组与参比品图谱叠加比较,发现在 15.5 min 左右制剂空白出现一个峰,如图 2 中的 Peak1、Peak2、Peak3、Peak4 和

Peak5 在空白制剂中没有出现,而在参比品中出现,表明 Peak2、Peak3、Peak4 和 Peak5 是与参比品相关的峰,在积分过 程中对 Peak1 去积分,积分 Peak2、Peak3、Peak4 和 Peak5 峰。 2.1.2 **非还原** CE-SDS **重复三次测定参比品结果** 非还原 CE-SDS 电泳三次重复抗体单体修正峰面积比(纯度)及迁移时 间分别为 93.4%、93.7%、93.6%和 31.0、31.1、31.1。RSD 分别为 0.16%和 0.19%,如图 3,图 4,图 5 和图 6 所示。

2.2 还原 CE-SDS 结果

2.2.1 还原 CE-SDS 电泳制剂空白与样品峰叠加结果 制剂 对照组与参比品图谱叠加比较,发现在 15.6 min 左右制剂空白 出现一个峰,如图 7 中的 Peak1、Peak2、Peak3、Peak4、Peak5 在 空白制剂中没有出现,而在参比品中出现,表明 Peak2、Peak3、

Peak4 是与参比品相关的峰,在积分过程中对 Peak1 去积分,积 分 Peak2、Peak3、Peak4 峰。



2.2.2 还原 CE-SDS 重复三次测定参比品结果 还原 CE-SDS 电泳测定抗 CD52 单克隆抗体重链修正峰面积百分比 及迁移时间分别为 66.8%、66.9%、66.8%和 21.5、21.5、21.5;
RSD 分别为 0.09%和 0%,轻链修正峰面积百分比及迁移时间

分别为 32.3%、32.3%、32.3%和 17.3、17.3、17.3;RSD 分别为 0%和 0%;非糖化重链修正峰面积百分比及迁移时间分别为 0.9%、0.9%、0.8%和 21.0、21.0、21.1;RSD 分别为 6.66%和 0.27%,如图 8,图 9,图 10 和图 11 所示。



图 6 参比品非还原 CE-SDS 三次重复叠加图谱

Fig.6 Three repeated overlapping profiles of reference products in non- reduced CE-SDS



Fig.7 Overlapped comparison of the peak between the blank sample and the sample in the reduced CE-SDS





Fig.8 The first repeated mapping of reference products in reduced CE-SDS



图 9 参比品还原 CE-SDS 二次重复









Fig.11 Three repeated overlapping profiles of reference products in reduced CE-SDS

3 讨论

单克隆抗体类生物治疗药物作为靶向药物,由于其作用机制明确,治疗效果比较理想,因此成为国内外研发的热点^[1417],同时,随着众多抗体等生物大分子药物专利到期,国内外都掀起生物类似药研发热潮^[1821]。单克隆抗体为一种结构功能复杂的蛋白质药物,它由两个重链和两个轻链通过二硫键连接而成。单克隆抗体的生产是一个复杂的过程,重组质粒在宿主细胞通过转录和翻译后修饰组装形成完整的 IgG 分子而发挥其生物学活性。在这个过程中重链和轻链往往会错配形成抗体片段和没有糖基化修饰的 IgG 分子,这些抗体片段和非糖基化修饰的抗体分子不仅影响抗体纯度,而且影响抗体临床用药的安全性和有效性。

毛细管电泳作为一种高效的分析手段,已广泛应用于多个 领域的分析中。它因具有快速、高分离度、高灵敏度、分离模式 多样性以及相对简便的操作等特点而应用在单克隆抗体单体 纯度及非糖化重链比例的分析 10%。本次试验我们采用非还原 CE-SDS 及还原 CE-SDS 测定抗 CD52 单克隆抗体单体纯度及 非糖基化重链比例,每个样品重复进样三针,确保系统适应性 良好的状态下分析数据,以目标峰迁移时间 RSD 及校正峰面 积百分比 RSD 判定实验结果的准确性和重复性。非还原 CE-SDS 测定抗 CD52 单抗纯度三次重复平均值为 93.57%,主 峰的迁移时间及修正峰面积百分比 RSD 分别为 0.16% 和 0.19%,均<1%,表明设备性能稳定,样品制备合理,试验结果 可靠。还原 CE-SDS 电泳重链修正峰面积百分比平均值为 66.89%,修正峰面积百分比及迁移时间 RSD 分别为 0.09%和 0%;轻链修正峰面积百分比平均值为 32.30%;轻链修正峰面积 及迁移时间 RSD 分别为 0%和 0%; 非糖基化重链修正峰面积 百分比平均值为 0.87%, 修正峰面积百分比及迁移时间 RSD 分别为 6.66%和 0.27%。还原电泳中重链和轻链迁移时间及修 正峰面积百分比 RSD 均<2%,所以结果可靠,非糖化重链修 正峰面积百分比 RSD 为 6.66%,大于 2%,而迁移时间 RSD 为 0.27%,小于2%表明系统是稳定的,重链没有糖基化修饰的 IgG 分子占整个抗体分子的比例较小,每针上样的偏差可能是 引起非糖化重链修正峰面积百分比 RSD 偏大的主要原因。

参考文献(References)

 Pangalis GA, Dimopoulou MN, Angelopoulou MK, et al. Campath-1H (anti-CD52) monoclonal antibody Therapy inlymphoproliferative disorders[J]. Med Oncol, 2001, 18(2): 99-107

- [2] Nabhan C. The emerging role of alemtuzumab in chronic lymphocytic leukemia[J]. Clin Lymphoma Myeloma, 2005, 6(2): 115-121
- [3] Robak T. Alemtuzumab in the treatment of chronic lymphocytic leukemia[J]. BioDrugs, 2005, 19(1): 9-22
- [4] Robak T. Therapy of chronic lymphocytic leukemia with purine analogs and monoclonal antibodies [J]. Transfus Apher Sci, 2005, 32 (1): 33-44
- [5] Alinari L, Lapalombella R, Andritsos L, et al. Alemtuzumab (Campath-1H) in the treatment of chronic lymphocytic leukemia[J]. Oncogene, 2007, 26(25): 3644-3653
- [6] Jones JL, Coles AJ. Campath-1H treatment of multiple sclerosis [J]. Neurodegener Dis, 2008, 5(1): 27-31
- [7] P S Rommer, A Dudesek, O Stüve, et al. Monoclonal antibodies in treatment of multiple sclerosis [J]. Clin Exp Immunol, 2014, 175(3): 373-384
- [8] 张峰,孟淑芳.治疗性单克隆抗体类制品质量控制标准的思考[J].中 国执业药师, 2013, 10(1): 25-30 Zhang Feng, Meng Shu-fang. The Quality Control of Therapeutic Monoclonal Antibody Products[J]. China Licensed Pharmacist, 2013, 10(1): 25-30
- [9] 林楠,徐葛林.高效毛细管电泳技术在生物制品质量控制中的应用 [J].中国生物制品学杂志, 2016, 29(4): 438-442 Lin Nan, Xu Ge-lin. Application of high performance capillary electrophoresis in quality control of biological products[J]. Chin J Biologicals, 2016, 29(4): 438-442
- [10] 于传飞,王兰,张峰,等.重组人源化抗 DR5 单克隆抗体质控方法的 建立[J].中国生物制品学杂志, 2014, 27(9): 1168-1172
 Yu Chuan-fei, Wang Lan, Zhang Feng, et al. Development of a method for quality control of recombinant humanized anti-DR5 monoclonal antibody[J]. Chin J Biologicals, 2014, 27(9): 1168-1172
- [11] 吴有盛,陈志南,边惠洁,高效毛细管电泳法分析肝癌单克隆抗体的 纯度[J].细胞与分子免疫学杂志, 1999, 15(4): 319
 Wu You-sheng, Chen Zhi-nan, Bian Hui-jie. Analysis of the purity of monoclonal antibodies against hepatocellular carcinoma by high performance capillary electrophoresis [J]. J Cell Mol Immuno, 1999, 15 (4): 319
- [12] 王晓闻,刘培培,吕锋华,等.抗 HER2 人源化单克隆抗体药物关键 质量属性评价[J].中国药学杂志, 2015, 50(12): 1054-1061 Wang Xiao-wen, Liu Pei-pei, Lv Feng-hua, et al. Evaluation of Critical Quality Attributes of an Anti-IER2 Humanized Monoclonal Antibody Drug[J]. Chin Pharm J, 2015, 50(12): 1054-1061

[7] 金淑清, 浦予飞, 裘莹. Hox 基因的研究进展 [J]. 癌症进展, 2011, 9 (2): 154-158

Jin Shu-qing, Pu Shu-feng, Qiu Ying. The study advances of HOX gene[J].Oncology Progress, 2011, 9(2): 154-158

- [8] 朱长保,徐福意,晁天柱,等.qPCR array 检测高糖对胆固醇合成基因 表达的影响[J].现代生物医学进展, 2014, 14(33): 6420-6424 Zhu Chang-bao, Xu Fu-yi, Chao Tian-zhu, et al. Effect of High Glucose on the Expression of Cholesterol Biosynthesis Gene by qPCR Array[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2014, 14(33): 6420-6424
- [9] Jensen KK, Previs SF, Zhu L, et al. Demonstration of diet-induced decoupling of fatty acid and cholesterol synthesis by combining gene expression array and 2H₂O quantification[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012, 302(2): 209-217
- [10] Eugeniu Nacu, Elena Gromberg, Catarina R. Oliveira, et al. FGF8 and SHH substitute for anterior-posterior tissue interactions to induce limb regeneration[J]. Nature, 2016, 533: 407-422
- [11] Candace Rapchak, Neeraj Patel, John Hudson, et al. Conservation of Pitx1 expression during amphibian limb morphogenesis[J]. Biochemistry and Cell Biology, 2015, 93(4): 396-404
- [12] Marco Osterwalder, Dario Speziale, Malak Shoukry, et al. HAND2 Targets Define a Network of Transcriptional Regulators that Compartmentalize the Early Limb Bud Mesenchyme [J]. Developmental Cell, 2014, 31(3): 345-357
- [13] Kyriel M. Pineault, Deneen M. Wellik. Hox Genes and Limb Musculoskeletal Development [J]. Current Osteoporosis Reports, 2014, 12 (4): 420-427
- [14] Yo-ichi Yamamoto-Shiraishi, Atsushi Kuroiwa. Wnt and BMP signaling cooperate with Hox in the control of Six2 expression in limb

(上接第 2840 页)

- [13] 于传飞,王文波,李萌,等.人源化抗 VEGF 单克隆抗体制品的大小 异质性分析[J].中华微生物学和免疫学杂志, 2014, 9(13): 718-722 Yu Chuan-fei, Wang Wen-bo, Li Meng, et al. Size heterogeneity analysis of monoclonal antibody products [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2014, 9(13): 718-722
- [14] 王文波,王兰,于传飞,等.重组抗埃博拉病毒单克隆抗体质控方法的建立[J].中国药学杂志, 2016, 51(1): 46-51

Wang Wen-bo, Wang Lan, Yu Chuan-fei, et al. Development of Quality Control Methods of Recombinant Anti-EBOV Antibodies[J]. Chin Pharm J, 2016, 51(1): 46-51

- [15] Rabah Gahoual, Michaël Biacchi, Johana Chicher, et al. Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachophoresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry [J]. MAbs, 2014, 6(6): 1464-1473
- [16] Sliwkowski MX, Mellman I. Antibody therapeutics in Cancer[J]. Science, 2013, 341(6151): 1192-1198
- [17] Gao K, Wang J. The biopharmaceutical industry in China: history and future Perspectives[J]. Front Med, 2012, 6(2): 101-111
- [18] 王文波,王兰,王馨,等.抗 CD20 人鼠嵌合单抗 N 糖的毛细管电泳 分析[J].中国新药杂志, 2015, 24(20): 2312-2316

tendon precursor[J]. Developmental Biology, 2013, 377(2): 363-374

- [15] Masaru Tamura, Masaki Hosoya, Motoi Fujita, et al. Overdosage of Hand2 causes limb and heart defects in the human chromosomal disorder partial trisomy distal 4q [J]. Human Molecular Genetics, 2013, 22(12): 2471-2481
- [16] Malte Spielmann, Naseebullah Kakar, Naeimeh Tayebi, et al. Exome sequencing and CRISPR/Cas genome editing identify mutations of ZAK as a cause of limb defects in humans and mice [J]. Genome Research, 2016, 26(2): 183-191
- [17] V.Duboc, MP Logan. Regulation of limb bud initiation and limb-type morphology[J]. Developmental dynamics, 2011, 240(5): 1017-1027
- [18] 杨媛媛. 小鼠胚胎发育形态观察及 CRB3 在胚胎和成体中的表达 [D].陕西: 西北农林科技大学, 2011 Yang Yuan-yuan. Morphological observation on mouse embryo development and expression of CRB3 in mouse embryo and adult body [D]. Shanxi: Northwest A&F University, 2011
- [19] N Wanek, K Muneoka, G Holler-Dinsmore, et al. A Staging System for Mouse Limb Development[J]. The Journal of Experimental Zoology, 1989, 249: 41-49
- [20] Rulang Jiang, Yu Lan, Harry D. Chapman, et al. Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice [J]. Genes & Development, 1998, 12: 1046-1057
- [21] Franck Rapapport, Raya Khanin, Yupu Liang, et al. Comprehensive evaluation of differential gene expression analysis methods for RNA-seq data[J]. Genome Biololgy, 2013, 14: 3158-3170
- [22] Guillaume Andrey, Denis Duboule. SnapShot: Hox Gene Regulation [J]. Cell, 2014, 156: 856

Wang Wen-bo, Wang Lan, Wang Xin, et al. Analysis of N-linked glycan profile of human/murine chimeric antiCD20 antibodies by capillary electrophoresis [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2015, 24(20): 2312-2316

- [19] 郭玮,王兰,王文波,等.尼妥珠单抗毛细管区带电泳鉴别方法的建 立与验证[J].中国新药杂志, 2014, 23(20): 2366-2381
 Guo Wei, Wang Lan, Wang Wen-bo, et al. Establishment and validation of nimotuzumab identification method with capillary zone electrophoresis [J]. Chinese Journal of New Drubs, 2014, 23 (20): 2366-2381
- [20] 白玉,王海学,谢松梅,等.生物类似药药学研究的挑战[J].中国药学杂志, 2015, 50(6): 477-479
 Bai Yu, Wang Hai-xue, Xie Song-hai, et al. Challenges of Pharma-ceutical Evaluation of Biosimilars [J]. Chin Pharm J, 2015, 50(6):

477-479

[21] 聂静苑,刘煜.人源单克隆抗体药物质量控制与分析[J].中国生化药 物杂志, 2012, 33(2): 2010-2017
Nie Jing-yuan, Liu Li. Quality control and analysis of monoclonal antibody [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2012, 33 (2): 2010-2017