

# ActR II B-Fc融合蛋白生物学活性测定方法的建立

刘春雨<sup>1</sup>, 于传飞<sup>1</sup>, 李欣<sup>2</sup>, 崔永霏<sup>1</sup>, 武刚<sup>1</sup>, 王兰<sup>1\*</sup> (1. 中国食品药品检定研究院单克隆抗体产品室, 国家卫生健康委员会生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室/国家药品监督管理局生物制品质量研究与评价重点实验室, 北京 102629; 2. 广州市药品检验所, 广州 510160)

**摘要** 目的: 建立ActR II B-Fc融合蛋白的生物学活性检测方法。方法: 利用A204-CAGA12-LUC细胞系, 通过荧光素酶检测系统进行ActR II B-Fc融合蛋白的生物学活性检测, 根据四参数拟合分析计算样品相对效价, 并对该方法的专属性、精密性和准确性进行验证。结果: ActR II B-Fc融合蛋白在该方法中存在量效关系, 且符合4-参数方程:  $y = (A-D) / [1 + (x/C)^B] + D$ 。该方法具有良好的专属性; 6批ActR II B-Fc融合蛋白样品经3次测定, 相对效价平均值在  $(86.74 \pm 6.44)\% \sim (108.81 \pm 15.07)\%$ , RSD均小于15%; 2批回收率样品经3次测定, 回收率分别为  $(114.99 \pm 12.42)\%$  和  $(81.19 \pm 7.35)\%$ ; 8次独立测定重复性较好。结论: 研究建立的ActR II B-Fc融合蛋白生物学活性检测方法专属性强, 准确性高, 精密度好, 可作为ActR II B-Fc融合蛋白生物学活性的常规检测方法。

**关键词:** ActR II B; 融合蛋白; 生物学活性; 报告基因

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)03-0293-08

doi:10.16153/j.1002-7777.2022.03.009

## Method for Determination of the Biological Activity of ActR II B-Fc Fusion Protein

Liu Chunyu<sup>1</sup>, Yu Chuanfei<sup>1</sup>, Li Xin<sup>2</sup>, Cui Yongfei<sup>1</sup>, Wu Gang<sup>1</sup>, Wang Lan<sup>1\*</sup> (1. Monoclonal Anti-body Product Office of National Institutes for Food and Drug Control, NHC Key Laboratory of Research on Determination Method and Standardization of Biotech Products, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Biological Products, Beijing 102629, China; 2. Guangzhou Insititue for Drug Control, Guangzhou 510160, China)

**Abstract Objective:** To establish a method to detect the biological activity of ActR II B-Fc fusion protein.

**Methods:** The biological activity of ActR II B-Fc fusion protein was determined by ONE-Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay System with the use of A204-CAGA12-LUC cell line, and the relative potency of the samples was calculated by four-parameter fitting analysis. The developed method was validated in specification, precision and accuracy.

**Results:** ActR II B-Fc fusion protein shows a dose-effect relationship in this method and it was in accordance with the four-parameter equation:  $y = (A-D) / [1 + (x/C)^B] + D$ . The method has good specificity. Six batches of samples of the ActR II B-Fc fusion protein were tested for 3 times, and the average relative potencies ranged from  $(86.74 \pm 6.44)\%$  to  $(108.81 \pm 15.07)\%$  with relative standard deviation less than 15%. Two batches of recovery samples were detected for 3 times, the recoveries of which were  $(114.99 \pm 12.42)\%$  and  $(81.19 \pm 7.35)\%$

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(编号2018ZX09736008-006); 中山市重大科技专项(编号210204163866513)

作者简介: 刘春雨 Tel: (010) 53852176; E-mail: foxfoxive@163.com

通信作者: 王兰 Tel: (010) 53852159; E-mail: wanglan@nifdc.org.cn

respectively. The results of 8 independent determinations showed good reproducibility. **Conclusion:** A method for detecting biological activity of ActR II B-Fc fusion protein has been successfully developed, which shows good specification, precision and accuracy and can be used as a routine method for biological activity detection of ActR II B-Fc fusion protein.

**Keywords:** ActR II B; fusion protein; biological activity; reporter gene

转化生长因子 $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )及其同源细胞因子,包括骨形成蛋白(Bone Morphogenic Proteins, BMPs)、激活素(Activin)和生长分化因子(Growth Differentiation Factor, GDF)等共同组成了细胞因子超家族,控制多种细胞过程,包括细胞增殖、分化、凋亡、血管生成和类固醇合成等<sup>[1-3]</sup>。TGF超家族成员可与其I/II型受体共价或非共价结合,受体结构包括胞外配体结合域、跨膜区以及胞质丝氨酸/苏氨酸激酶结构域,其中激活素II型受体B(Activin Receptor Type B, ActR II B)能与多种TGF超家族成员结合,如激活素A、BMP-2、BMP-7、GDF-8、GDF-11、TGF- $\beta$ 等。激活素和BMP的激活信号通路不同,激活素配体受体结合可激活Smad2/3途径,BMP配体受体结合则激活Smad1/5/8途径<sup>[4-5]</sup>。Smad2/3途径的信号对红细胞成熟具有抑制作用,该信号转

导在骨髓增生异常和红细胞生成无效疾病模型的骨髓细胞中组成性增加。GDF-11和激活素B与细胞表面的ActR II B结合会诱导转录调节因子Smad2和Smad3磷酸化,从而抑制晚期红细胞生成<sup>[6-8]</sup>。

重组表达的ActR II B-Fc融合蛋白,是由受体的胞外区结构域与抗体IgG1的Fc结构域融合而成,通过与TGF超家族特定内源性配体如GDF-11、激活素B竞争性特异结合,覆盖其与细胞ActR II B结合的表位,反向拮抗Smad2/3的抑制信号转导作用,促使骨髓中晚期红系前体(正常母细胞)的分化,从而促进红细胞的成熟(见图1)。因此,ActR II B-Fc融合蛋白可作为红细胞成熟剂,在 $\beta$ -地中海贫血( $\beta$ -Thalassemia)<sup>[9-12]</sup>、自身免疫性溶血性贫血(Autoimmune Hemolytic Anemia)<sup>[13]</sup>、原发性骨髓纤维化(Primary Myelofibrosis)<sup>[14-15]</sup>、骨髓增生异常综合征(Myelodysplastic Syndromes)<sup>[16-17]</sup>等血液疾病治疗中发挥作用。

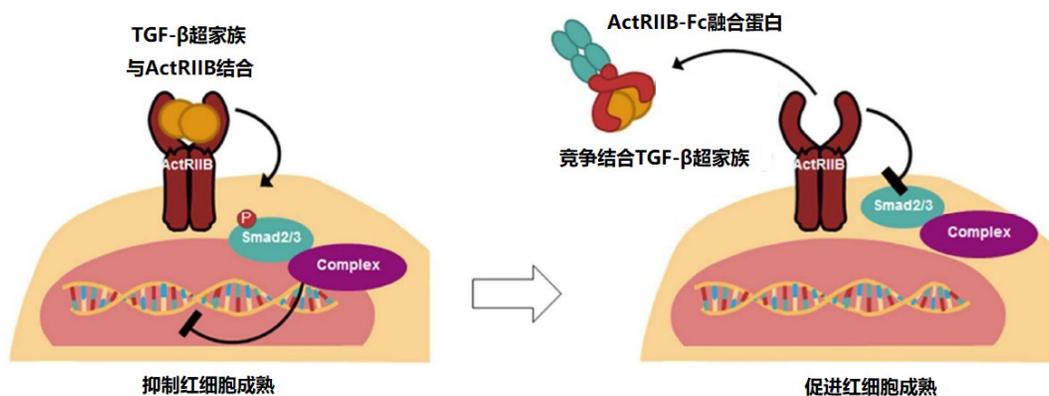


图1 ActR II B-Fc融合蛋白的药物作用机制

目前, ActR II B-Fc融合蛋白类药物具有良好的治疗前景,为了对该类药物进行质量控制,亟需建立准确可靠的生物学活性检测方法。本文利用稳定转染了CAGA12启动子和荧光素酶报告基因的A204-CAGA12-LUC人横纹肌肉瘤细胞系作为靶细胞,建立ActR II B-Fc融合蛋白生物学活性快速检测方法。该方法操作简单,耗时短,且准确性高,

重复性好,同时专属性强,准确性、精密性好,可作为ActR II B-Fc融合蛋白生物学活性的检测方法,对产品进行质量控制和质量监测。

## 1 仪器与材料

### 1.1 药品与试剂

MDA-175细胞系(ATCC<sup>®</sup> HTB-25), A204-CAGA12-LUC细胞系(本室留存); ActR II B-

Fc融合蛋白样品(批号分别为AP7-20-102-001,  $75.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; AP7-20-102-002,  $77.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; AP7-20-102-003,  $74.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; CPAB123E,  $50.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; CPAB123F,  $50.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 1913438,  $50.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )及其参比品(批号677417ARS,  $75.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、抗PD-1单抗(批号AA1745,  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、抗CD20单抗(批号H0260,  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )均为本室留样;重组人生长分化因子(Human Recombinant Transforming Growth Factor 11, rhGDF-11) ( $10 \mu\text{g}$ , RD公司);牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA) (Sigma公司), ONE-Glo<sup>®</sup> Luminescent (Promega公司); 96孔白板(Corning公司); McCoy's 5A培养基、磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS)、胰酶、胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)、遗传霉素(G418)均由GIBCO公司提供。

## 1.2 主要仪器

EnVision多功能酶标仪(PE公司); SoftMax Pro 5.4软件(MD公司); PLA2.0软件(Stegmann公司)。

## 2 检测方法

### 2.1 ActR II B-Fc融合蛋白的生物学活性测定方法

#### 2.1.1 原理

本研究建立的生物学活性测定方法是基于报告基因法的原理。A204-CAGA12-LUC靶细胞系,是在人横纹肌肉瘤A204细胞系中稳定转染了Smad2/3反应启动子CAGA12基因和荧光素酶报告基因,可在CAGA12的控制下表达ActR II B。当试验体系中加入rhGDF-11,则可结合于靶细胞表面的ActR II B从而激活荧光素酶表达,而ActR II B-Fc融合蛋白可与ActR II B竞争结合rhGDF-11分子,从而抑制荧光素酶表达(见图2)。因此,试验体系中ActR II B-Fc融合蛋白的剂量与荧光信号表达呈反比。

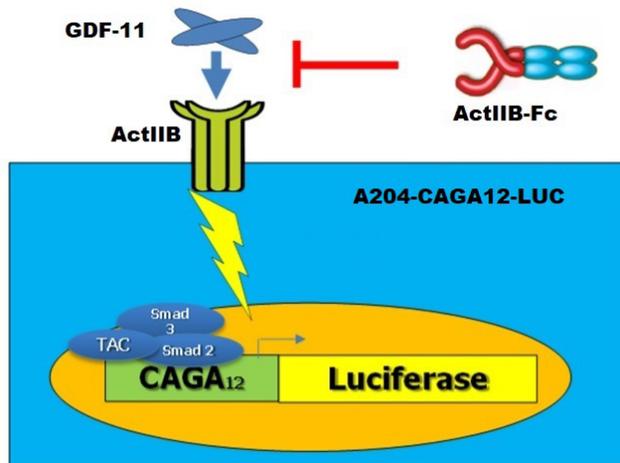


图2 ActR II B-Fc融合蛋白生物学活性测定原理

#### 2.1.2 测定方法的建立

##### 2.1.2.1 抗体处理

以稀释液(称取10 g BSA溶于100 mL McCoy's 5A培养基后稀释rhGDF-11至 $110 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )对ActR II B-Fc融合蛋白样品及其参比品进行稀释,根据剂量-效应曲线上、下平台以及线性部分,选取起始浓度点为 $16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,再继续按照1:2进行倍比系列稀释,共设置12个浓度梯度,每个浓度设置2个复孔,将ActR II B-Fc融合蛋白样品及其参比品转入96孔白板,每孔50  $\mu\text{L}$ ;加样后的96孔白板放置37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱孵育0.5~1 h。

##### 2.1.2.2 细胞处理

A204-CAGA12-LUC细胞培养至对数生长期,加入5 mL含0.25% EDTA的胰酶,37  $^{\circ}\text{C}$ 消化3~5 min,加入10 mL完全培养基(将100 mL FBS与900 mL McCoy's 5A培养基混匀后稀释G418至 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )终止消化,以200 g离心5 min后再以完全培养基将细胞悬起,以每孔 $4 \times 10^4$ 个接种于96孔白板(每孔加入细胞悬液50  $\mu\text{L}$ )。

##### 2.1.2.3 结果检测

96孔白板放置37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中继续孵育6 h后取出,室温下平衡15 min,每孔加入

100  $\mu$ L ONE-Glo<sup>®</sup> Luminescent底物溶液后用酶标仪读板。

#### 2.1.2.4 数据分析

利用SoftMax软件分析试验数据,以ActR II B-Fc融合蛋白浓度为x轴,对应的相对光单位(Relative Light Unit, RLU)为y轴,选用4-参数方程回归模型,拟合剂量效应曲线。按照参比品 $EC_{50}$ /样品 $EC_{50} \times 100\%$ 计算相对效价(Relative Potency)。半数有效剂量(50% of Maximal Effect,  $EC_{50}$ )以4-参数方程的参数C值表示。

### 2.2 方法学验证

#### 2.2.1 专属性试验

靶位专属性验证:分别以抗PD-1单抗、抗CD20单抗和稀释液替代ActR II B-Fc融合蛋白,按“2.1.2”节方法测定;细胞专属性验证:分别以ActR II B(-)的MDA-175细胞和完全培养基替代A204-CAGA12-LUC细胞,按“2.1.2”节方法测定。

#### 2.2.2 精密性试验

按照“2.1.2”节方法分别测定6批样品(编号为S1~S6)的生物学活性,每批重复测定3次,计算相对效价及其均值、SD和RSD。

#### 2.2.3 准确性试验

选取2批样品(编号为S2、S4),分别预稀释至起始浓度后,再将样品与参比品按照1:1等体积

混合,制成2批回收率样品,按照“2.1.2”节方法测定,计算相对效价,该2批回收率样品每批重复测定3次,按照(回收率样品的相对效价 $\times 2$ -样品的相对效价)/参比品的相对效价 $\times 100\%$ <sup>[18-19]</sup>计算回收率,验证该方法的准确性。将参比品分别预稀释至起始浓度的40%、60%、100%、130%及170%以制备各组回收率样品,再以另一独立制备的100%样品(预稀释至起始浓度)为参比,计算各组相对效价并拟合回归直线。

#### 2.2.4 重复性试验

按照“2.1.2”节方法对ActR II B-Fc参比品分别进行独立的8次测定,计算 $EC_{50}$ 的均值、SD和RSD,所得数据以PLA2.0软件进行平行线分析<sup>[20]</sup>。

## 3 结果

### 3.1 剂量效应曲线

以ActR II B-Fc融合蛋白浓度为x轴,对应的RLU值为y轴,利用SoftMax软件,选择4-参数方程模型拟合剂量效应曲线。结果显示,ActR II B-Fc融合蛋白样品及其参比品均存在量效关系,符合4-参数模型量效方程: $y = (A - D) / [1 + (x/C)^B] + D$ ,呈现典型的反S型半对数曲线,ActR II B-Fc融合蛋白样品及参比品 $EC_{50}$ 分别为 $45.8 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $45.6 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , $R^2$ 分别为0.992和0.995(见图3)。

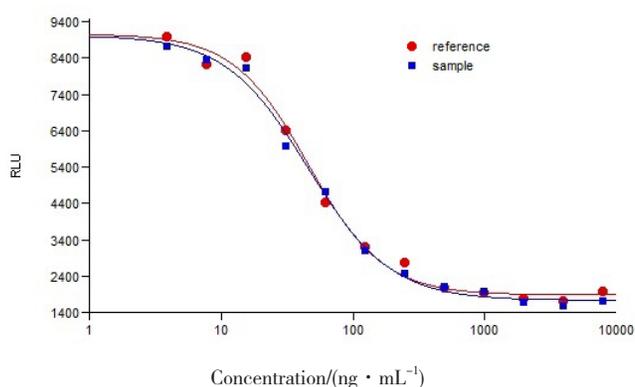


图3 ActR II B-Fc融合蛋白生物学活性的剂量效应曲线

### 3.2 方法学验证结果

#### 3.2.1 专属性

靶位专属性和细胞专属性验证结果显示,无论是以抗PD-1单抗、抗CD20单抗或者稀释液替代ActR II B-Fc融合蛋白,还是以MDA175细胞(不

表达ActR II B分子)或者完全培养基替代A204-CAGA12-LUC细胞进行检测,均无法重现良好的剂量效应曲线,只有当试验体系中同时存在专属靶位的样品和专属的细胞时,才能获得相应的曲线(见图4),证明该方法专属性良好。

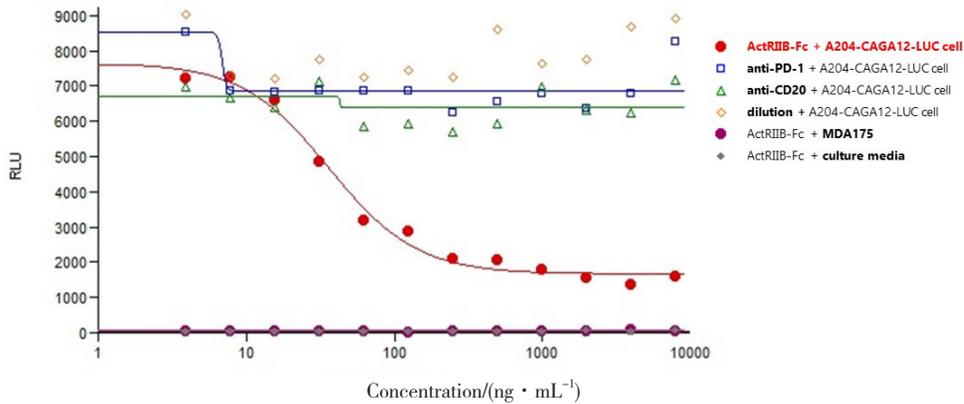


图4 ActR B-Fc融合蛋白生物学活性方法的专属性验证结果

3.2.2 精密性 均值在  $(86.74 \pm 6.44)\%$  ~  $(108.81 \pm 15.07)\%$ , RSD 精密性验证结果显示, 该6批样品的相对效价平 均小于15%, 证明该方法精密性良好 (见表1)。

表1 ActR B-Fc融合蛋白生物学活性精密性试验结果 ( $n = 3$ )

样品编号	相对效价 /%			统计学参数 /% ( $n=3$ )	
	1	2	3	$\bar{x} \pm S$ /%	RSD /%
S1	81.01	104.76	105.81	$97.19 \pm 14.03$	14.43
S2	100.72	99.52	126.20	$108.81 \pm 15.07$	13.85
S3	102.74	97.47	113.66	$104.62 \pm 8.26$	7.90
S4	93.75	81.09	85.39	$86.74 \pm 6.44$	7.42
S5	96.26	115.60	109.45	$107.10 \pm 9.88$	9.23
S6	106.93	85.39	104.54	$98.95 \pm 11.81$	11.93

3.2.3 准确性 40%、60%、100%、130%及170%回收率样品相对效价的理论值为x轴, 相应的实测值为y轴, 拟合回归直线, 其 $R^2 = 0.9998$ , 证明该方法准确性及线性拟合良好, 测定范围为40%~170% (见图5)。  
准确性验证结果显示, 回收率样品S2和S4的回收率分别为  $(114.99 \pm 12.42)\%$  和  $(81.19 \pm 7.35)\%$ , RSD均小于11% (见表2); 以

表2 ActR B-Fc融合蛋白生物学活性准确性试验结果 ( $n = 3$ )

回收率样品编号	次数	相对效价 /%		统计学结果 /%		
		回收率样品	样品	回收率	$\bar{x} \pm S$	RSD
S2	1	105.59		102.38		
	2	118.01	108.81	127.21	$114.99 \pm 12.42$	10.80
	3	112.10		115.40		
S4	1	88.21		89.67		
	2	81.80	86.74	76.86	$81.19 \pm 7.35$	9.05
	3	81.89		77.04		

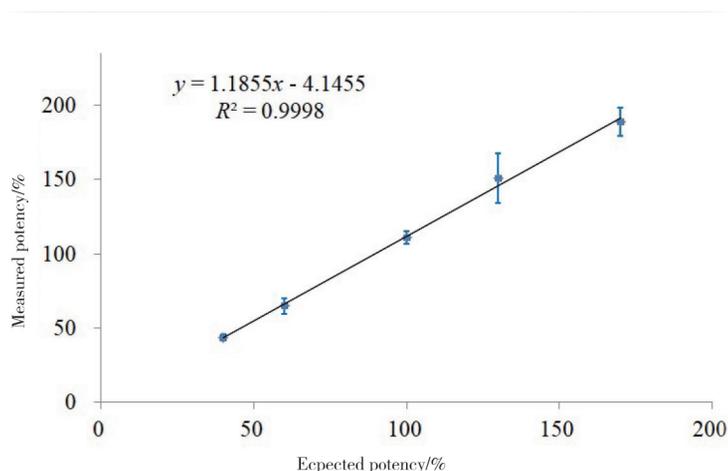


图5 ActR B-Fc融合蛋白生物学活性方法相对效价理论值与实测值的线性回归分析

### 3.2.4 重复性

重复性验证结果显示, 8次独立检测所得生物学活性量效曲线一致性较好(见图6),  $EC_{50}$ 平均值为  $(60.43 \pm 8.77) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , RSD为14.51%。以

其中1次试验A结果做参比, 用PLA2.0软件对数据进行平行线分析, 结果显示8条曲线的回归分析、线性及平行性均通过统计学检验, 证明该方法重复性良好(见表3)。

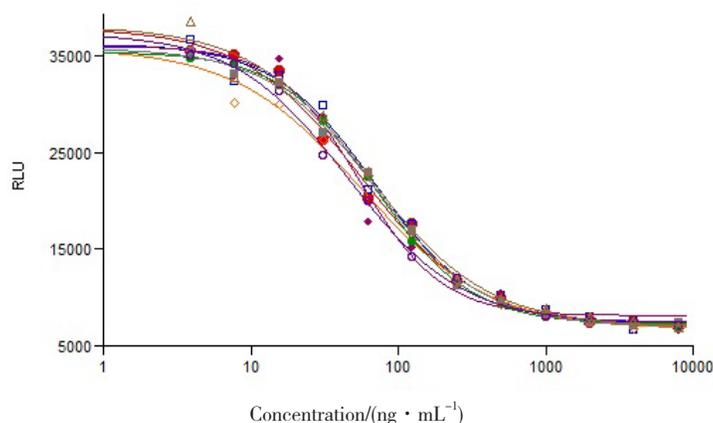


图6 ActR B-Fc融合蛋白生物学活性方法的重复性验证结果

表3 ActR B-Fc融合蛋白生物学活性重复性试验 PLA 分析结果 ( $n = 8$ )

试验	回归分析		线性		平行性		统计学检验
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	
A	/	/	/	/	/	/	参比
B	309.875	< 0.05	0.380	> 0.05	0.561	> 0.05	通过
C	396.069	< 0.05	0.737	> 0.05	1.010	> 0.05	通过
D	282.471	< 0.05	0.287	> 0.05	1.140	> 0.05	通过
E	374.451	< 0.05	0.164	> 0.05	1.053	> 0.05	通过
F	311.074	< 0.05	0.447	> 0.05	1.677	> 0.05	通过
G	434.943	< 0.05	0.236	> 0.05	0.082	> 0.05	通过
H	259.950	< 0.05	0.281	> 0.05	0.148	> 0.05	通过

## 4 讨论

2019年11月, ActR II B-Fc融合蛋白类治疗药物Luspatercept在美国批准上市, ActR II B-Fc融合蛋白由于其在贫血、骨髓纤维化、骨髓增生异常综合征等血液疾病中的治疗作用, 也逐渐成为近年值得关注的新药之一。生物学活性是药物作用的关键质量属性(Critical Quality Attributes, CQA)之一, 是生物技术药物有效性的主要评价指标。因此, 质控实验室也亟需建立ActR II B-Fc融合蛋白的生物学活性评价方法, 完善药物质量控制。

A204-CAGA12-LUC细胞系是稳定转染了CAGA12启动子及荧光素酶报告基因的人横纹肌肉瘤系, CAGA12为Smad2/3反应启动子, 可以激活并表达ActR II B分子。ActR II B-Fc融合蛋白经过梯度稀释与rhGDF-11及靶细胞共同孵育, ActR II B-Fc融合蛋白可与靶细胞上的ActR II B竞争结合rhGDF-11, 抑制rhGDF-11对靶细胞下游荧光素酶信号的表达, 荧光表达强度与ActR II B-Fc融合蛋白呈剂量依赖性的反比关系。

本研究建立的生物学活性测定方法, 参照ICH-Q2(R1)指导原则<sup>[21]</sup>, 对其专属性、精密性、准确性及重复性进行验证。试验证明, 当试验体系中的抗原靶位或者靶细胞发生改变则不能获得良好的剂量效应曲线, 以其他靶位单抗(抗PD-1单抗和抗CD20单抗)或者稀释液替代ActR II B-Fc融合蛋白进行试验时, 因其无法与靶细胞表面的ActR II B分子结合而导致试验体系中加入的重组人rhGDF-11竞争性结合于靶细胞从而激活其表达荧光信号, 得到的荧光值均位于曲线上平台; 而以MDA175细胞(不表达ActR II B分子)或者完全培养基替代A204-CAGA12-LUC细胞进行检测时, 则无法检测到荧光信号, 因此该方法具有良好的专属性。对6批ActR II B-Fc融合蛋白样品经3次测定, 其平均相对效价值在86%~109%, RSD小于1%, 回收率在81%~115%, 8次独立检测的量效曲线一致性较好, 回归分析、线性及平行性均通过统计学检验,  $EC_{50}$ 在 $(60.43 \pm 8.77) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , RSD小于15%, 证明本研究建立的方法具有较好的精密性、准确性和重复性。

本研究建立了基于报告基因的ActR II B-Fc融合蛋白生物学活性测定方法。该方法具有操作简单、耗时短的优点, 且准确性高, 重复性好、专

性强, 可作为ActR II B-Fc融合蛋白生物学活性的检测方法, 同时也可作为产品质量控制和稳定性评价提供借鉴。

## 参考文献:

- [1] Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF- $\beta$  Signaling from Cell Membrane to the Nucleus[J]. Cell, 2003, 113(6): 685-700.
- [2] Lee SJ, Reed LA, Davies MV, et al. Regulation of Muscle Growth by Multiple Ligands Signaling Through Activin Type II Receptors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(50): 18117-18122.
- [3] Watabe T, Miyazono K. Roles of TGF- $\beta$  Family Signaling in Stem Cell Renewal and Differentiation[J]. Cell Res, 2009, 19(1): 103-115.
- [4] Chen YG, Hata A, Lo RS, et al. Determinants of Specificity in TGF- $\beta$  Signal Transduction[J]. Genes Dev, 1998, 12(14): 2144-2152.
- [5] Blank U, Karlsson S. The Role of Smad Signaling in Hematopoiesis and Translational Hematology[J]. Leukemia, 2011, 25(9): 1379-1388.
- [6] Zhou L, Nguyen A N, Sohal D, et al. Inhibition of the TGF- $\beta$  Receptor I Kinase Promotes Hematopoiesis in MDS[J]. Blood, 2008, 112(8): 3434-3443.
- [7] Bataller A, Montalban-Bravo G, Soltysiak KA, et al. The Role of TGF  $\beta$  in Hematopoiesis and Myeloid Disorders[J]. Leukemia, 2019, 33(5): 1076-1089.
- [8] Suragani RN, Cawley SM, Li R, et al. Modified Activin Receptor IIB Ligand Trap Mitigates Ineffective Erythropoiesis and Disease Complications in Murine B-Thalassemia[J]. Blood, 2014(123): 3864-3872.
- [9] Hamed EM, Meabed MH, Aly UF, et al. Recent Progress in Gene Therapy and Other Targeted Therapeutic Approaches for Beta Thalassemia[J]. Curr Drug Targets, 2019, 20(16): 1603-1623.
- [10] Pilo F, Angelucci E. Luspatercept to Treat Beta-Thalassemia[J]. Drugs Today (Barc), 2020, 56(7): 447-458.
- [11] Piga A, Perrotta S, Gamberini MR, et al. Luspatercept Improves Hemoglobin Levels and Blood Transfusion Requirements in a Study of Patients with Beta-Thalassemia[J]. Blood, 2019, 133(12): 1279-1289.

- [12] Cappellini MD, Viprakasit V, Taher AT, et al. A Phase 3 Trial of Luspatercept in Patients with Transfusion-Dependent  $\beta$ -Thalassemia[J]. *N Engl J Med*, 2020, 382 ( 13 ) : 1219-1231.
- [13] Barcellini W, Fattizzo B, Zaninoni A. Current and Emerging Treatment Options for Autoimmune Hemolytic Anemia[J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2018, 14 ( 10 ) : 857-872.
- [14] Fenaux P, Kiladjian JJ, Platzbecker U. Luspatercept for the Treatment of Anemia in Myelodysplastic Syndromes and Primary Myelofibrosis[J]. *Blood*, 2019, 133 ( 8 ) : 790-794.
- [15] Bose P, Verstovsek S. Management of Myelofibrosis-Related Cytopenias[J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2018, 13 ( 3 ) : 164-172.
- [16] Germing U, Schroeder T, Kaivers J, et al. Novel Therapies in Low- and High-Risk Myelodysplastic Syndrome[J]. *Expert Rev Hematol*, 2019, 12 ( 10 ) : 893-908.
- [17] Mies A, Hermine O, Platzbecker U. Activin Receptor II Ligand Traps and Their Therapeutic Potential in Myelodysplastic Syndromes with Ring Sideroblasts[J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2016, 11 ( 6 ) : 416-424.
- [18] 王军志. 生物技术药物研究开发和质量控制[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 129-152.
- [19] Tao L, Rao C, Wang L. Development of a Method for Quality Control of Humanized Monoclonal Antibody Against Epithelial Growth Factor Receptor[J]. *Chin J Biologicals*, 2013, 26 ( 1 ) : 72-75.
- [20] Liu CY, Wang L, Guo W. Development of a Novel Reporter Gene Method for Determination of ADCC Potency of Anti-CD20 Monoclonal Antibody[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2015, 50 ( 1 ) : 94-98.
- [21] ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology [EB/OL]. ( 2005-11 ) [2021-11-10]. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>.

( 收稿日期 2021年11月10日 编辑 郑丽娥 )