

人源抗 EB 病毒潜伏膜蛋白 1 特异性基因工程抗体 Fab 的筛选与特性

毛 圆¹, 张大为², 曹 清², 唐小军³, 林 红⁴, 陈仁杰^{2*}, 徐凜峰^{5*}, 冯振卿³

(¹江苏省省级机关医院耳鼻喉-头颈外科, 江苏 南京 210009; ²南京医科大学第二附属医院耳鼻喉-头颈外科, 江苏 南京 210011; ³南京医科大学卫生部抗体技术重点实验室, 江苏 南京 210029; ⁴江苏省血液中心, 江苏 南京 210042; ⁵南京医科大学第二附属医院普外科, 江苏 南京 210011)

[摘要] **目的:**应用噬菌体展示技术制备抗 EB 病毒编码的潜伏膜蛋白 1(latent membrane protein 1, LMP1)特异性、高亲和力的全人抗体 Fab 片段。**方法:**利用稳定转染表达 LMP1 的 SUNE-1 细胞及原核表达的 LMP1 胞外区蛋白作为抗原对大容量人源 Fab 抗体库进行差减筛选及固相筛选, 经过 5 轮细胞筛选和 3 轮固相筛选, 随机挑选 30 个克隆经酶联免疫吸附法鉴定, 阳性克隆进行可溶性表达, 用 LMP1 阳性表达的人鼻咽癌细胞株 HNE2/LMP1 鉴定抗 LMP1 抗体 Fab 的结合活性。**结果:**Western blot、免疫荧光结果显示, 从大容量人源 Fab 抗体库中筛选出 1 株抗 LMP1 抗体 Fab, 细胞 ELISA、荧光激活细胞分类术、免疫荧光分析、免疫组化检测结果显示 Fab 与人鼻咽癌细胞表面 LMP1 分子有较好的结合活性。**结论:**从人源 Fab 抗体库中筛选的 Fab 抗体能够与鼻咽癌细胞表面 LMP1 分子特异性结合, 为研制用于 EBV 相关肿瘤如鼻咽癌生物治疗的靶向药物, 提供了候选分子。

[关键词] 噬菌体抗体库; EB 病毒; 潜伏膜蛋白 1; 抗原结合片段; 靶向治疗

[中图分类号] Q781

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)12-1646-06

Selection and characterization of anti-EBV-LMP1 humanized genetic engineering antibody Fab

MAO Yuan¹, ZHANG Da-wei², CAO Qing², TANG Xiao-jun³, LIN Hong⁴, CHEN Ren-jie^{2*}, XU Lin-feng^{5*}, FENG Zhen-qing³

(¹Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Jiangsu Province Official Hospital, Nanjing 210009; ²Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011; ³Key Laboratory of Antibody Technique of Ministry of Health, NJMU, Nanjing 210029; ⁴Jiangsu Province Blood Center, Nanjing 210042; ⁵Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011, China)

[Abstract] **Objective:** To screen anti-EBV-LMP1 Fab of high specificity and affinity from a phage antibody library and identify its binding activity. **Methods:** Subtractive screening method by alternating SUNE-1/LMP1 cells and solid-phase from a large capacity Fab phage library. After eight rounds screening, 30 positive clones were identified by ELISA test. The positive clones were selected by Western blot for Fab soluble expression in *TOP 10F'* and the binding activities of Fab with LMP were analyzed in HNE2/LMP1 cell lines. **Results:** A Fab fragment with fine activity to LMP1 was selected, purified and expressed. The anti-LMP1 Fab binding specificity was confirmed by cell ELISA, FACS, immunofluorescence and immunohistochemistry. **Conclusion:** The anti-LMP1 Fab binding to nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells provides a promising candidate for the biotherapy of EBV-related carcinoma.

[Key words] phage antibody library; EBV; LMP1; Fab; targeted therapy

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(12): 1646-1651]

[基金项目] 江苏省科技厅社会发展支撑计划项目(BE2009152), 南京医科大学青年基金资助项目(QN201004)

* 通讯作者, E-mail: renjiechen@yahoo.com.cn.; xulinfeng@medmail.com.cn

EB 病毒(epstein-barr virus, EBV)属疱疹病毒 γ 家族, 是第一个被公认的人类肿瘤病毒, 其潜伏感染与人类多种肿瘤密切相关, 包括鼻咽癌(nasopha-

ryngeal carcinoma, NPC)、获得性免疫缺陷综合征(acquired immunt deficiency syndrome, AIDS)、伯基特淋巴瘤(Burkitt lymphoma, BL)、霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma, HD)、移植后淋巴组织增生性疾病(post-transplant lymphoprdiferative disorders, PTLD)等^[1]。潜伏膜蛋白 1(latert membrare protern1 LMP1)是由 EBV 编码的一种跨膜潜伏蛋白。大量研究表明, LMP1 是 EBV 编码的最重要的致癌基因, 在上皮细胞的转化和癌变过程中的作用倍受关注, 是目前公认的病毒癌蛋白, 它以其独特的分子结构参与多种 EBV 相关肿瘤发生、发展、转移的全过程^[2-3], 这使得它成为理想的肿瘤靶向治疗标志物。

针对 LMP1 的 Fab 抗体片段, 较传统大分子抗体更容易转化成完整的 IgG 且更易穿透体内一些天然屏障如血-脑屏障、血-睾屏障, 适合于特殊部位疾病的治疗如鼻咽癌^[4]。本研究利用差减筛选和固相筛选的方法从大容量人源天然抗体库中筛选出抗 LMP1 抗体 Fab, 并对 Fab 与人鼻咽癌细胞的结合活性进行了鉴定, 为研制用于 EBV 相关肿瘤的生物靶向治疗提供候选分子。

1 材料和方法

1.1 材料

全人源天然噬菌体 Fab 抗体库及稳定转染 LMP1 的鼻咽癌 SUNE-1 细胞系由本实验室构建并保存, 鼻咽癌 SUNE-1 细胞系由中山医科大学肿瘤研究所惠赠。高表达 LMP1 的鼻咽癌 HNE2/LMP1 细胞系及克隆 LMP1 空载转染的鼻咽癌 HNE2 细胞系购自中南大学湘雅医学院。Ecoli.XL1-Blue (Invitrogen 公司, 美国), Ecoli.TOP10 F' (Stratagene 公司, 美国)。细胞培养液为 DMEM (Gibco 公司, 美国) 加入 10%FBS, 培养条件为 37℃、5%CO₂。

LMP1 胞外区蛋白为本实验室制备^[5], GST 蛋白及 HRP 标记的抗 M13 抗体(GE 公司, 美国), HRP 标记的羊抗人 Fab 抗体、FITC 标记的抗人 Fab 和 FITC 标记的抗羊 IgG 标抗体 (Jackson Immunoresearch 公司, 美国), 其他常规试剂均为美国 Invitrogen 和美国 Sigma 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 抗 LMP1 抗体 Fab 的筛选

利用细胞表面抗原筛选抗 LMP1 的克隆 以转染稳定表达 LMP1 的 SUNE-1 细胞(SUNE-1/LMP1) 为靶标筛选抗体库, 以 SUNE-1 细胞作为对照筛选细胞, 具体方法参见文献^[6]。将新鲜制备的约 1×10^{12}

噬菌体抗体库首先与 SUNE-1 细胞相混合并孵育, 孵育后上清再与 SUNE-1/LMP1 共孵育。用甘氨酸缓冲液(pH2.8)洗脱结合细胞的噬菌体, 中和后感染大肠杆菌 XL1-blue, 进行下一轮的扩增和筛选。共筛选 5 轮。

原核表达的 LMP1 蛋白筛选噬菌体抗体 将经过 SUNE-1 及 SUNE-1/LMP1 鼻咽癌细胞 5 轮细胞筛选并富集的噬菌体次级抗体库, 用固相包被的 LMP1 抗原筛选。加入经细胞筛选的次级噬菌体抗体库于 LMP1 抗原包被的免疫板中孵育, 37℃ 1 h。用不同的洗涤试剂如 PBST, 去除未结合或者亲和力比较弱的噬菌体, 胰酶消化结合在抗原上的噬菌体, 感染 Ecoli.XL1-Blue。共筛选 3 轮, 进行下一步分析。

1.2.2 Phage ELISA 检测

从数轮筛选后得到的细菌集落中随机挑取 30 个克隆, 用噬菌体酶联免疫吸附实验方法鉴定。以 LMP1 胞外区抗原包板, 噬菌体单克隆上清作为一抗, 辣根过氧化物酶标记抗 M13 抗体作为第二抗体, 鉴定阳性克隆; 以 GST 蛋白包板, 噬菌体阳性单克隆上清作为一抗, 辣根过氧化物酶标记抗 M13 抗体作为第二抗体, 确定阴性克隆。酶标仪测 $D(450 \text{ nm})$ 。以空白对照组调零, 阳性标准为 P/N 值 > 2.0, 阴性标准为 P/N 值 < 0.5。

1.2.3 Fab 的表达、纯化及 SDS-PAGE 分析

筛选出的阳性噬菌体克隆转染 Ecoli TOP10F', 挑取单菌落过夜培养, 接种培养后加入蔗糖和异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 0.1 mmol/L, 加入蔗糖浓缩液至终浓度为 4%。表达上清液经 AKTA-FPLC 与 Protein L 亲和层析柱纯化, 获得的抗体用 PBS 透析后过滤, 取 20 μl 1:3 000 稀释的 HRP 标记的羊抗人 IgG (Fab)' 加入 20 μl 上样缓冲液, 电泳后 Western blot 检测。

1.2.4 Fab 的特性分析

1.2.4.1 ELISA 分析

胞外抗原 ELISA 检测: 分为两组包被抗原, 第一组每孔中 GST 600 ng, 第二组 LMP1 每孔 600 ng 包被抗原; 向每孔中加入 50 μl 梯度稀释的纯化 Fab 于常温下孵育 1 h; 洗涤后加入 1:2 000 稀释的 HRP 标记的羊抗人 Fab 二抗, 室温 1 h; 洗涤后加入底物显色 30 min 后中止显色, 酶标仪读数。

细胞 ELISA 检测: 用胰蛋白酶消化细胞, 重悬细胞浓度, 分成 3 组, 第 1 组鼻咽癌细胞株 HNE2/LMP1 细胞; 第 2 组对照组肝癌细株 SMMC7721 细

胞;第3组克隆 LMP1 空载转染的鼻咽癌细胞株 HNE2;滴加细胞至培养板中,37°C过夜;每孔加 50 μ l 梯度稀释的 Fab 后孵育;加 50 μ l HRP 酶标抗人 IgG(Fab)后孵育显色,后终止显色;酶标仪读数。

1.2.4.2 流式细胞术分析

分别培养 HNE2 与 HNE2/LMP1 细胞至约 1×10^6 个;洗涤后加入 cell dissociation buffer,收集离心弃上清后再次重悬离心,反复 3 次;4°C 封闭 30 min;将每种细胞分为 2 份,一份用含 50 μ g/ml Fab 的 PBS 1 ml 重悬,另一份用不含 Fab 的 PBS 重悬,4°C 孵育离心 3 次,反复 3 次;1 ml 1:200 稀释的 FITC 标记的羊抗人 Fab 重悬细胞,4°C 孵育,本步骤中使用铝箔包裹试管避光;离心弃上清;洗涤 3 次,重悬后于流式细胞仪分析光强度,其中未加 Fab 反应者作为阴性对照。

1.2.4.3 免疫荧光检测

将 HNE2 与 HNE2/LMP1 细胞分别接种,室温下固定;5% 脱脂奶粉 37°C 封闭 1 h;HNE2 阴性对照组细胞继续用封闭液处理,HNE2/LMP1 实验组细胞中加入 20 μ g/ml Fab,37°C 孵育 1 h,洗涤后加入 1:200 稀释的 FITC 标记的羊抗人 Fab,室温孵育 30 min,显微镜下观察,FITC 激发波长 494 nm。

1.2.5 鼻咽癌组织的免疫组化检测

鼻咽癌石蜡切片及鼻咽正常组织石蜡切片由南京医科大学第二附属医院病理科惠赠,采用直接二步法免疫组化:鼻咽癌组织切片及正常组织切片经脱蜡后梯度酒精水化;过氧化氢处理后水洗;抗原修复;非免疫羊血清封闭,37°C,20 min;滴加抗 LMP1 的 Fab 抗体(1:250),4°C 过夜;滴加 HRP 标记的羊抗人 IgG(Fab)',孵育洗涤 3 次;DAB 显色;终止显色后苏木素复染,盐酸分化,自来水返蓝,梯度酒精脱水后中性树胶封片。免疫组化结果判读:以光镜下细胞浆或细胞膜呈棕黄色为 LMP1 阳性细胞,采用半定量积分法判断结果。

免疫组化评分采用 IHS (immunohistochemical scores)^[7]: 分别计数阳性细胞百分比(无阳性细胞=0,阳性细胞占 1%~10%=1,11%~50%=2,51%~80%=3,81%~100%=4),评判阳性细胞染色强度(阴性=0,弱阳性=1,中阳性=2,强阳性=3),两者的乘积为该切片的 IHS。定义:IHS \leq 4 分为低表达,IHS>4 分为高表达。

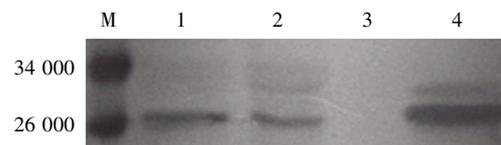
2 结果

2.1 阳性噬菌体抗体克隆的筛选

经过 5 轮 SUNE-1 及 SUNE-1/LMP1 细胞筛选和 3 轮 LMP1 抗原的固相筛选,随机挑取 30 个克隆制备噬菌体,以 phage ELISA 进行鉴定,其中 26 个为阳性克隆,阳性率为 86.7%。选取 Phage ELISA 检测结果较高的阳性克隆,过夜培养后提取质粒并测序。核酸序列分析证实,有 2 种基因序列正确的 Fab,选择 ELISA 较高的一株进行后续的研究。

2.2 抗 LMP1 抗体 Fab 的表达及纯化

SDS-PAGE 与 Western-blot 分析 Fab 正常表达。在变性条件下,Fab 抗体分子的异二聚体分解为 Fd 与 Kappa 链;Protein L 纯化后的抗体经 SDS-PAGE 检验进一步证实了其结构和分子量与 Fab 相符,经诱导 Fab 在细菌中分泌表达(图 1)。经纯化后,Fab 基本与其他蛋白分离,SDS-PAGE 证实其纯度(图 2)。



M:蛋白 Marker;1:超声上清;2:培养液上清;3:TOP10F'空菌;4:Fab 克隆超声沉淀。

图 1 Fab 在 *E.Coli. TOP10F'* 表达情况

Figure 1 Expression of Fab in *E.Coli. TOP10F'*

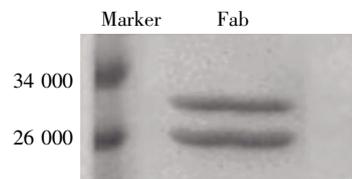


图 2 纯化的 Fab 阳性克隆表达产物

Figure 2 Purified expression product of positive clone of Fab

2.3 抗 LMP1 抗体 Fab 免疫学特性分析

2.3.1 ELISA 检测

通过 ELISA 初步评判纯化后 Fab 与 LMP1 胞外区抗原的结合能力鉴定。在 10.00~0.15 μ g/ml 时,LMP1 组的平均 $D(450 \text{ nm})$ 值均 > 1 ,而 GST 组 $D(450 \text{ nm})$ 值在 0.2 左右,结果提示纯化的 Fab 仍具有结合 LMP1 的功能,与 GST 蛋白结合表现不明显。但抗体浓度降低至(0.2 μ g/ml)后,其 $D(450 \text{ nm})$ 值显著减少,提示抗 LMP1 胞外区抗体的亲和力有待提高(图 3)。

细胞 ELISA 检测纯化后的 Fab 与展示于噬菌体表面的抗体一样,能较强地与高表达 LMP1 的 HNE2/LMP1 鼻咽癌细胞结合(图 4)。

2.3.2 流式细胞术检测

LMP1 为跨膜分子,分为胞外区、跨膜区与胞内区,实现靶向治疗有赖于与胞外区结合的抗体,因此

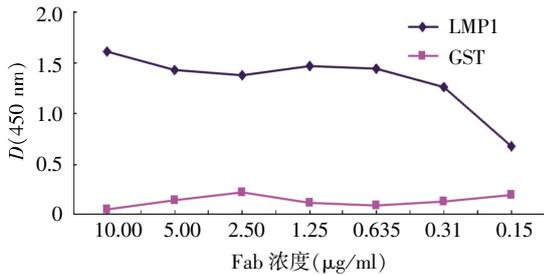


图 3 纯化的 Fab 与 LMP1 胞外区抗原的结合能力鉴定

Figure 3 Binding capacity of purified Fab with extracellular antigen

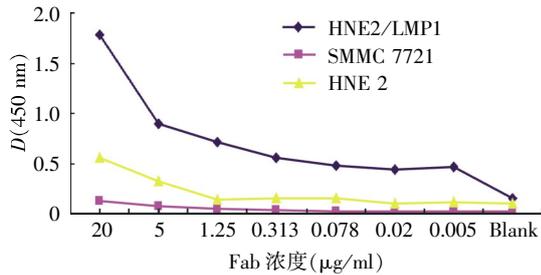


图 4 纯化的 Fab 与鼻咽癌细胞表面 LMP1 的结合能力鉴定

Figure 4 Binding capacity of purified Fab with LMP1 of nasopharyngeal carcinoma cell

通过流式细胞术检测 Fab 与鼻咽癌细胞表面 LMP1 结合的能力,并以 HNE2 作为阴性对照。结果显示 Fab 能够与高表达 LMP1 的 HNE2/LMP1 鼻咽癌细胞结合的特异性,而不与不表达 LMP1 的 HNE2 鼻咽癌细胞结合(图 5)。

2.3.3 免疫荧光检测

FACS 证实了本株 Fab 与鼻咽癌细胞株 HNE2/LMP1 的结合能力,但并没有提供结合部位的信息,因此本研究试图通过免疫荧光提供直接、可视的形态学证据来观察 Fab 与鼻咽癌细胞株 HNE2/LMP1 的结合部位。结果提示 Fab 主要与鼻咽癌 HNE2/LMP1 细胞的细胞膜与胞浆中的 LMP1 结合(图 6)。

2.4 免疫组化检测

结果显示所制备的 Fab 能够明确检测到鼻咽癌及鼻咽正常组织切片中 LMP1 的表达(图 7),其中鼻咽癌组织中 LMP1 高表达(IHS=6.4),鼻咽正常组织中 LMP1 低表达(IHS=2.8)。

3 讨论

EBV 是人疱疹病毒科 γ 亚科中惟一能引起人类感染的淋巴滤泡病毒。EBV 感染人群后通常在人体内终身潜伏存在,亦可导致感染的宿主细胞不断发生恶性转化导致肿瘤形成。目前已证实 EBV 潜伏感染与鼻咽癌、多种淋巴瘤、肺癌的发生密切相关。

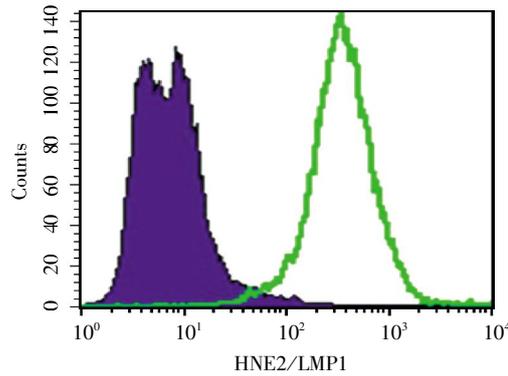
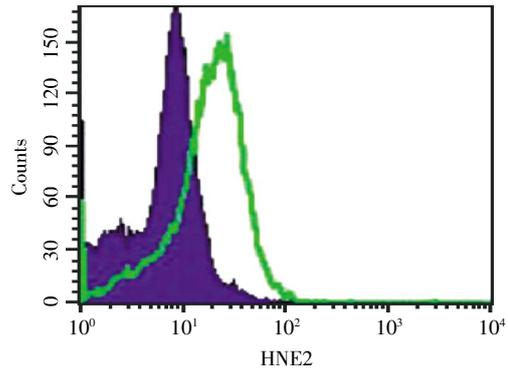


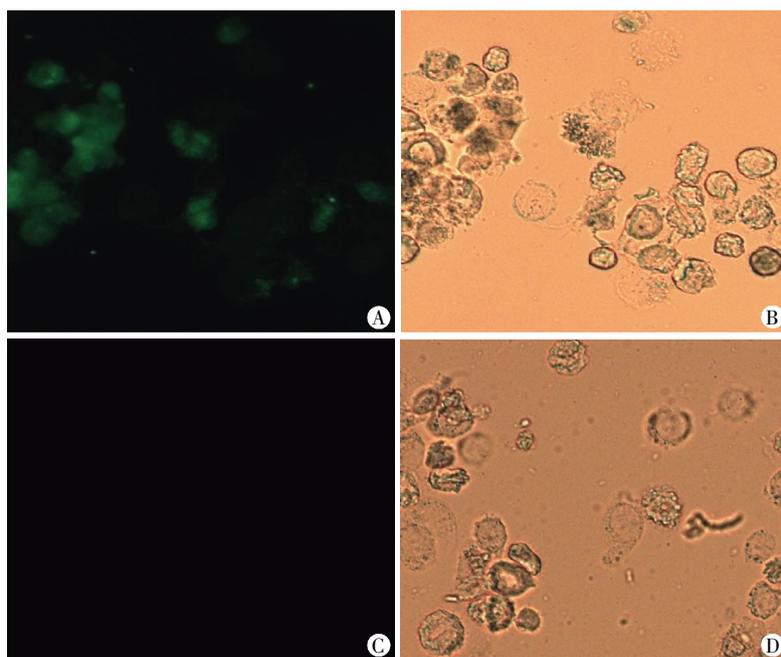
图 5 流式细胞术检测 Fab 与 HNE2/LMP1 细胞的结合能力

Figure 5 Flow cytometry analysis detected the binding specificity of the Fab a against HNE2/LMP1 cells

随着对 EBV 研究的不断深入,人们发现 EBV 还与肝癌、胃癌、乳腺癌等上皮源性肿瘤关系密切^[8]。

近年来有关 EBV 编码的 LMP1 在上皮源性肿瘤发生、发展及转移中的作用及机制研究受到众多学者的关注。LMP1 可诱导 NF- κ B 和 iNOS 表达增加,介导肿瘤细胞形态转变,增加肿瘤进展、侵袭及转移几率^[9];LMP1 可下调 BLIMP1 α ,阻碍浆细胞分化,诱导 EB 病毒裂解周期^[10];LMP1 可诱导甲基转移酶的表达及活性,下调 E2 钙黏素的表达,使肿瘤细胞黏附性下降,易于肿瘤扩散转移,促进 NPC 细胞的侵袭性^[11]。在 EBV 永生化的 B 淋巴细胞中,LMP1 可与其他某些潜伏蛋白活化整合素启动子,引起整合素高表达,而在上皮细胞的迁徙性、细胞生长、侵袭和转移力方面起着关键的作用^[12]。因此,LMP1 理论上可称为 EBV 相关肿瘤分子靶向治疗的理想靶标。

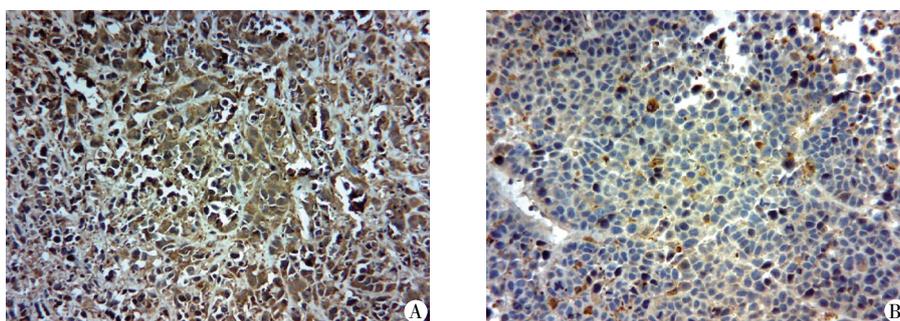
随诊基因工程抗体技术的发展,构建全人源单克隆抗体,既可精确攻击靶细胞,又可降低鼠源性抗体引起的人抗鼠抗体反应(human anti-mouse antibody, HAMA)。人源基因工程抗体如 Fab、scFv 等,具有抗原性低,分子量小,穿透性强,可与毒素、抗肿



A: 鼻咽癌 HNE2/LMP1 细胞经 Fab 孵育; B: 鼻咽癌 HNE2/LMP1 细胞普通显微镜检视; C: 鼻咽癌 HNE2 细胞经 Fab 孵育; D: 鼻咽癌 HNE2 细胞普通显微镜检视。

图 6 免疫荧光显示 Fab 与的鼻咽癌细胞的结合情况($\times 200$)

Figure 6 Binding capacity of Fab with NPC cell by fluorescence microscope analysis($\times 200$)



使用自行制备 Fab 作为抗体进行的免疫组化可明确显示鼻咽癌及鼻咽正常组织切片中 LMP1 表达。A: 鼻咽癌组织中 LMP1 高表达(IHS=6.4); B: 鼻咽正常组织中 LMP1 低表达(IHS=2.8)。

图 7 LMP1 免疫组化表达情况($\times 200$)

Figure 7 LMP1 expression in NPC tissue and normal tissue of nasopharynx($\times 200$)

瘤药物和放射性核素等结合,更适宜用于肿瘤的临床诊断、放射显影和靶向治疗^[13-15]。

本课题组从人源 Fab 抗体库中成功筛选出了一株人源抗 LMP1 抗体 Fab, 并采用细胞 ELISA、流式细胞术、免疫荧光、免疫组化等多种方法证实它与人鼻咽癌细胞表面 LMP1 分子有较好的结合活性。细胞 ELISA、流式细胞术结果显示 Fab 能与 HNE2/LMP1 鼻咽癌细胞表面的 LMP1 结合;免疫荧光结果表明 Fab 结合于人鼻咽癌 HNE2/LMP1 细胞的细胞膜上。同时免疫组化结果显示该 Fab 可较好显示出鼻咽癌组织切片中 LMP1 的表达情况。

综上所述,本研究制备的抗 LMP1 抗体 Fab,可与人鼻咽癌细胞表面 LMP1 蛋白结合,具有较好的结合活性,还需进一步研究其对 EBV 相关肿瘤细胞生长的抑制作用,或耦联化学药物、放射性核素、免疫毒素等,促进肿瘤细胞的凋亡、抑制细胞的增殖,减少肿瘤的侵袭和转移,为 EBV 相关肿瘤的生物治疗提供新的靶向分子。

[参考文献]

- [1] Tsao SW, Tsang CM, Pang PS, et al. The biology of EBV infection in human epithelial cells[J]. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22(2): 137-143
- [2] Li HP, Chang YS. Epstein-Barr virus latent membrane

- protein 1:structure and functions[J]. *J Biomed Sci*, 2003,10(5):490-504
- [3] Eliopoulos AG,Young LS. LMP1 structure and signal transduction [J]. *Semin Cancer Biol*,2001,11 (6):435-444
- [4] Hudson PJ. Recombinant antibody fragments[J]. *Curr Opin Biotechnol*,1998,9(4):395-402
- [5] 张大为,朱 进,陈仁杰,等. EB 病毒膜潜伏蛋白 1 胞外区融合蛋白的表达及纯化[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2008,28(4):420-423
- [6] Brabas DE,Burton DR,ScoR JK,et al. Phage display:a laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor, 2001:101-121
- [7] Mao Y,Zhang DW,Wen J,et al. A novel LMP1 antibody synergizes with mitomycin C to inhibit nasopharyngeal carcinoma growth in vivo through inducing apoptosis and downregulating vascular endothelial growth factor[J]. *Int J Mol Sci*,2012,13(2):2208-2218
- [8] Pattle SB,Farrell PJ. The role of Epstein-Barr virus in cancer [J]. *Expert Opin Biol Ther*,2006,6(11):1193-1205
- [9] Smirnova KV,Diduk SV,Gurtsevich V. Functional analysis of Epstein-Barr virus latent membrane proteins (LMP1) in patients with lymphoproliferative disorders[J]. *Biomed Khim*,2011,57(1):114-126
- [10] Vrzalikova K,Vockerodt M,Leonard S,et al. Down-regulation of BLIMP1 α by the EBV oncogene,LMP-1,disrupts the plasma cell differentiation program and prevents viral replication in B cells;implications for the pathogenesis of EBV-associated B-cell lymphomas [J]. *Blood*, 2011,117(22):5907-5917
- [11] Huang S,Stupack D,Liu A,et al. Cell growth and matrix invasion of EBV-immortalized human B lymphocytes is regulated by expression of alpha (v) integrins[J]. *Oncogene*,2000,19(15):1915-1923
- [12] Tsai CN,Tsai CL,Tse KP,et al. The Epstein-Barr virus oncogene product,latent membrane protein 1,induces the downregulation of E-cadherin gene expression via activation of DNA methyltransferases[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2002,99(15):10084-10089
- [13] Vander Heiden MG. Targeting cancer metabolism;a therapeutic window opens[J]. *Nat Rev Drug Discov*,2011,10(9):671-684
- [14] Mathew J,Perez EA. Trastuzumab emtansine in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: a review[J]. *Curr Opin Oncol*,2011,23(6):594-600
- [15] 林 红,梁 洁,张慧林,等. 人源抗滋养层细胞表面抗原 2 基因工程抗体 Fab 的制备及特性分析[J]. *生物化学与生物物理进展*,2010,37(10):1101-1107

[收稿日期] 2012-05-12