

[文章编号] 1007-385X(2002)04-0243-05

双靶向组织特异性 HSV-tk/GCV 抗瘤系统的构建及体外效应研究

王 骞¹, 曹利民², 周华荣¹, 朱慧芬¹, 张 悦¹, 邵静芳¹, 杨 敬¹, 沈关心¹(1. 华中科技大学同济医学院免疫学系, 武汉 430030; 2. 无锡市第三人民医院检验科, 江苏 无锡 214400)

[摘要] 目的: 构建高靶向性基因转移及表达系统, 并研究其介导 HSV-tk/GCV 自杀基因系统对肝癌细胞的体外杀伤作用。方法: 通过重组技术分别构建 anti-TfR ScFv-GAL4 融合蛋白表达载体 ScFv-GAL4-pET28a 及含 AFP 启动子、GAL4 特异性识别序列(GAL4rec)的 HSV-tk 真核表达载体 pEBAF/tk-GAL4rec。IPTG 诱导后, 利用受体介导内吞作用介导 pEBAF/tk-GAL4rec 质粒转染表面均高表达 TfR 的人肿瘤细胞株 HepG2, SMMC7721 及 A549。潮霉素筛选后, MTT 法检测 GCV 对它们的杀伤作用。结果: 双酶切鉴定、SDS-PAGE 电泳及测序分别证明 anti-TfR ScFv-GAL4 融合蛋白及重组 pEBAF/tk-GAL4rec 真核表达质粒构建成功。体外杀伤实验中, 高分泌 AFP(845 ng/ml)的 HepG2/tk 细胞对 GCV 很敏感, 且抑制率与 GCV 浓度及作用时间呈正相关; 而低分泌 AFP(2 ng/ml)的 SMMC7721/tk 细胞对 GCV 低度敏感; 不分泌 AFP 的 A549/tk 细胞则不敏感。结论: 双靶向组织特异性 HSV-tk/GCV 抗瘤系统构建成功, 并显示出很好的靶向性。

[关键词] HSV-tk 基因; 转铁蛋白受体; GAL4; 受体介导内吞

[中图分类号] R730.59-3

[文献标识码] A

The Construction and Biological Effects of Double Targeting Tissue-Specific HSV-tk/GCV Anti-Tumor System *in vitro*

WANG Qian¹, CAO Li-min², ZHOU Hua-rong¹, ZHU Hui-fen¹, ZHANG Yue¹, SHAO Jin-fang¹, YANG Jing¹, SHEN Guan-xin¹(1. Department of Immunology, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Clinical Lab, Wuxi No. 3 Hospital, Wuxi 214400, China)

[Abstract] **Objective:** To construct the potent targeting gene delivery and expression system, and to investigate the special killing effect of HSV-tk/GCV system on human liver cancer cells *in vitro* mediated by it. **Methods:** The anti-TfR ScFv-GAL4 fusion protein expression vector ScFv-GAL4-pET28a and the eukaryocyte expression plasmid pEBAF/tk-GAL4rec were constructed by recombinant DNA technology. After the induction by IPTG, we got the anti-TfR ScFv-GAL4 fusion protein as delivery vector to transfect pEBAF/tk-GAL4rec into the human liver cancer cells line HepG2, SMMC7721 and lung cancer cells line A549 which all over-express TfR via receptor-mediated endocytosis. The positive cell clones were selected by hygromycin and were named HepG2/tk, SMMC7721/tk and A549/tk respectively. Then MTT method was used to determine the killing effect of GCV on them. **Results:** The constructions of the ScFv-Gal4 fusion protein and the recombination expression plasmid pEBAF/tk-GAL4rec were confirmed by double enzyme digestion, SDS-PAGE and sequencing. In the experiment of cytotoxicity effect, the HepG2/tk cells that over-secrete AFP (845 ng/ml) were highly sensitive to the toxicity of GCV, whereas the SMMC7721/tk cells that under-secrete AFP (2 ng/ml) were slightly sensitive to GCV, and the A549/tk cells that don't secrete AFP were not. **Conclusions:** The double-targeting and tissue-specific HSV-tk/GCV anti-tumor system has been constructed successfully, and it displays a good targeting to tumor cells.

[Key words] HSV-tk gene; TfR; GAL4; receptor-mediated endocytosis

* 随着分子生物学和免疫学的飞速发展, 肿瘤生物治疗研究倍受重视。但到目前为止, 恶性肿瘤基因治疗的临床效果并不太令人满意, 其原因是多方面的, 其

* [基金项目] 国家自然科学基金(39970693)资助

[作者简介] 王骞(1976-), 男, 湖北人, 免疫学硕士, 主要从事肿瘤生物治疗研究。

[通讯作者] 沈关心, E-mail: myjsz@mails.tjmu.cn

中一个很重要的原因在于肿瘤基因治疗缺乏靶向特异性。本研究从提高目的基因转移靶向性和表达特异性入手,创造性地设计了双靶向介导组织特异性高效酶解前药抗瘤系统,分别利用特异性抗 Tfr ScFv (transferrin receptor, single chain variable fragment) 导向,并经甲胎蛋白(α -fetal protein, AFP)启动子特异性调控,使 HSV-tk/GCV 自杀基因系统特异性地对高表达 AFP 的肝癌细胞株发挥杀伤效应。

1 材料与方法

1.1 材料

pABgal4 质粒由美国贝勒医学院 Bert W. O'Malley 博士惠赠;pUC19-ScFv 质粒由本室构建保存;pEBAF/tk 质粒由我校附属同济医院外科孙晓毅博士惠赠;pET28a 空质粒载体由武汉生物制品所严家新教授惠赠;人肝癌细胞株 HepG2, SMMC7721 及人肺癌细胞株 A549 均由本室传代保存;各种限制性内切酶、T4 连接酶、Taq DNA 聚合酶及 DNA 回收试剂盒(DNA Extraction Kit)为 MBI 公司产品;质粒小量提取试剂盒(Wizard Plus Minipreps DNA Purification System)及 PCR 产物纯化试剂盒(Wizard PCR Preps DNA Purification System)为 Promega 公司产品;RPMI-1640 培养基及 DMEM 培养基为 Gibco 公司产品;GCV、氯喹及潮霉素为 Sigma 公司产品。

1.2 抗 Tfr ScFv-GAL4 融合蛋白原核表达载体构建

根据 anti-Tfr ScFv 和 GAL4 的基因序列,同时参照表达载体的阅读框架,分别合成一对引物,从 pUC19-ScFv 质粒和 pABgal4 质粒中 PCR 扩增得到 anti-Tfr ScFv 和 GAL4 基因片段。anti-Tfr ScFv 的 PCR 引物为:F 上 5'-CGGCCATGGCCCACGTTTCAGCTGCAG-CAGT -3', F 下 5'-GGCGGAATTCCTTTT(G)ATTTTCAGCTTT(G)GTC -3'; GAL4 的 PCR 引物为:F 上 5'-GGCGGAATTCCTGAAGCTACTGTCT-3', F 下 5'-GGCGCGCGCCGAATTGTTACGATACAGTCAACTG-3', 分别引入 Nco I / EcoR I 和 EcoR I / Not I 酶切位点(如引物中划线处所示)。PCR 条件采用 96℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min(30 个循环),最后 72℃ 延伸 10 min。2% 琼脂糖凝胶电泳分析。

分别利用 Nco I / EcoR I, EcoR I / Not I, Nco I / Not I 对 anti-Tfr ScFv 和 GAL4 PCR 产物及高表达载体 pET28a 双酶切,以合适比例连接形成融合基因表达载体,转化 BL21 宿主菌,挑取阳性菌落小量提取质粒行双酶切鉴定。

1.3 抗 Tfr ScFv-GAL4 融合蛋白诱导表达与纯化

分别取 IPTG 诱导 0, 3, 6 h 的重组质粒阳性菌菌体蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,并以诱导 6 h 的含 pET28a 空质粒的 BL21 菌作为对照。为判断 anti-Tfr ScFv-GAL4 融合蛋白在细菌中的表达位置,我们还分别取诱导 6 h 的重组质粒阳性菌的周质腔/胞浆蛋白和包涵体蛋白进行 SDS-PAGE 电泳。

在证明融和蛋白主要以包涵体形式存在后,大量获取 IPTG 诱导 6 h 后的菌体,经超声破菌、尿素缓冲液溶解、PBS 反复透析复性、PEG 浓缩及过滤等处理,获得初步纯化的 anti-Tfr ScFv-GAL4 融合蛋白,作为非病毒转运载体备用。

1.4 HSV-tk 重组真核表达载体构建

根据文献报道^[1], GAL4 的 DNA 结合域能够特异性识别 17 bp 的寡核苷酸序列(5'-CGGCCATACGTCT-TCCG-3'),由此设计 2 条各 41 bp 寡核苷酸单链,并引入 EcoR I 及 Xho I 酶切位点,在 PCR 仪中采用 96℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 1 min, 55℃ 复性 1 min 使其配对形成带 BamH I 酶切切口的寡核苷酸双链,如下:5'-GATCCCCGGCCATACGTCTTCCGCTCGAGAGTGAATTCA-GTG-3'; 3'-GGCCCGTATGCAGAAGGCGAGCTCTCAC TTAAGTCACCTAG-5'利用 BamH I 单酶切位点插入含 AFP 启动子及 HSV-tk 基因的 pEBAF/tk 真核表达质粒,转化 DH5 α 菌。重组载体分别采用菌落 PCR(引物:P 上 5'-GATGGATCCCCGGCCAT-3', P 下 5'-GCCAG-TAAGTCATCCG-3')及测序鉴定。

1.5 靶细胞转染及阳性细胞筛选

取重组蛋白浓缩液 100 μ l 与 pEBAF/tk-GAL4rec 质粒 2 μ g 混合于 100 μ l 连接缓冲液(50 mmol/L Hepes pH7.5, 0.1 mg/ml BSA, 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L MgCl₂, 100 μ mol/L ZnCl₂)中,室温下放置 15 min,使自然连接形成蛋白质-DNA 转染复合物^[2]。取对数生长期的 HepG2, SMMC7721 及 A549 细胞作为靶细胞,分别用含 10% FCS 的 DMEM 及 RPMI-1640 调细胞浓度至 4 \times 10⁴/ml,分别加入 12 孔培养板中,每孔 1 ml, 37℃ 培养过夜,换新鲜培养基继续培养 5 h,然后加入蛋白-DNA 转染复合物 50 μ l,并加入终浓度为 100 μ mol/L 的氯喹^[3],继续培养 48 h,换用含有浓度为 200 μ g/ml 潮霉素的培养液,每 48 小时换液 1 次,然后挑选阳性细胞克隆于不含潮霉素的培养液中扩大培养,分别命名为 HepG2/tk, SMMC7721/tk, A549/tk。

1.6 GCV 细胞毒实验

分别调上述 3 种细胞浓度为 1 \times 10⁵/ml,加入 96 孔培养板,每孔 100 μ l,每组设 5 个样品孔,分别加入终浓度为 0 mg/L, 0.1 mg/L, 1 mg/L, 10 mg/L, 100 mg/L 的 GCV,其中不加 GCV 处理(即 0 mg/L)的 3 孔分别

作为相应对照组,以上每份样品均设3个复孔,同样方法处理3块培养板,置于37℃ 5% CO₂培养箱培养,分别于24, 48, 72 h各取出1块培养板,1 000 r/min离心5 min,去上清,每孔加入MTT(5 mg/ml)10 μl,继续培养4 h,每孔加入100 μl二甲亚砷(DMSO)混匀,570 nm测OD值,根据下列公式计算细胞生长抑制率(GIR):

$$\text{GIR}(\%) = \frac{\text{对照组 OD 值} - \text{实验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \times 100\%$$

1.7 数据统计

数据均采用 mean ± SD 形式表示,利用 SAS 统计分析软件对各实验组的细胞生长抑制率与其对照组的差异显著性进行 *t* 检验分析。

2 结果

2.1 抗 Tfr ScFv-GAL4 融合蛋白原核表达载体构建

PCR 扩增分别获得 730 bp 和 460 bp 大小的 anti-Tfr ScFv 片段及 GAL4 片段,利用 DNA 重组技术将其以融合基因形式插入 pET28a 高表达载体,分别用 EcoR I /Not I, Nco I /EcoR I, Nco I /Not I 对其进行双酶切,酶切产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,分别得到约 460,730,1 200 bp 大小的 GAL4,ScFv 及 ScFv-GAL4 融合基因片段,证明重组质粒构建成功,命名为 ScFv-GAL4-pET28a(见图 1)。

图 1 ScFv-GAL4-pET 质粒双酶切鉴定

Fig. 1 Enzyme digestive map of ScFv-GAL4-pET

Lane 1:100 bp PCR marker; Lane 2:ScFv-GAL4-pET/Nco I + Not I; Lane 3:ScFv-GAL4-pET/Nco I + EcoR I; Lane 4:ScFv-GAL4-pET/EcoR I + Not I; Lane 5:pET28a/Not I

2.2 抗 Tfr ScFv-GAL4 融合蛋白诱导表达

ScFv-GAL4-pET 重组质粒的阳性转化菌培养过夜,用 IPTG 诱导 0,3,6 h 后分别取菌液 1 ml,裂解细菌作 SDS-PAGE,均可见一约 47 kD 的特异性蛋白条带,与融合蛋白的分子量相符,且随诱导时间延长蛋白表达量逐步增加,而 pET28a 空载体菌未见此蛋白条带,这表明抗 Tfr ScFv-GAL4 融合蛋白构建、表达成功;由 6,7 泳道可见融合蛋白主要以包涵体形式存在,而在细菌周质腔及细胞质中无明显表达(见图 2)。

图 2 抗 Tfr ScFv-GAL4 融合蛋白诱导表达 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of anti-Tfr ScFv-GAL4 fusion protein expression

Lane 1: Protein Marker; Lane 2: pET28a/BL21
Lane 3: ScFv-GAL4-pET28a /BL21, IPTG induced 0 h;
Lane 4: ScFv-GAL4-pET28a /BL21, IPTG induced 3 h;
Lane 5: ScFv-GAL4-pET28a /BL21, IPTG induced 6 h;
Lane 6: ScFv-GAL4-pET28a /BL21, IPTG induced 6 h, periplast and cytoplasm;
Lane 7: ScFv-GAL4-pET28a /BL21, IPTG induced 6 h, inclusion body

2.3 HSV-tk 重组真核表达载体构建及鉴定

将人工合成的 GAL4_{rec} 片段利用 BamH I 单酶切插入 pEBAF/tk 真核表达质粒,转化 DH5α 菌,随机挑选 8 个菌落以 P 上、P 下为引物对进行菌落 PCR 初筛,结果有 3 个菌落为明显阳性,如图 3 所示;挑选其中 2 号和 5 号菌落培养,以 P 下为测序引物进行测序鉴定,结果均测出 GAL4_{rec} 序列的存在,由此证明 HSV-tk 重组真核表达载体构建成功,命名为 pEBAF/tk-GAL4_{rec}。

2.4 GCV 细胞毒实验

对转染阳性的 HepG2/tk, SMMC7721/tk, A549/tk 细胞分别进行不同浓度(0.1 ~ 100 mg/L)GCV 的细胞毒实验,采用 MTT 法分别检测其在 24,48,72 h 时的细胞杀伤活性。结果显示,高分泌 AFP(845 ng/ml)的

HepG2/tk 细胞的生长受到明显的抑制,低浓度(1 mg/L)GCV 对其的抑制率在第3天达到了70.5%,且抑制率与GCV浓度及作用时间呈正相关(表1),*t*检验分析表明差异具明显统计学意义;而低分泌AFP(2 ng/ml)的SMMC7721/tk细胞对GCV不太敏感,高浓度(100 mg/L)GCV作用3 d,其生长抑制率为21.2%(表2);不分泌AFP的A549/tk细胞则对各种浓度GCV均不敏感(数据未列出),由此表明该杀伤系统具有很好的靶向特异性。

3 讨论

恶性肿瘤是严重危害人类生命健康的主要疾病,近年来基因治疗手法的出现和迅猛发展为肿瘤治疗带来了希望。目前肿瘤基因治疗研究虽已取得巨大进步,但肿瘤细胞杀伤缺乏特异性仍然是摆在我们面前

的一个难题。

表1 不同浓度GCV在不同作用时间对HepG2/tk细胞的生长抑制率(%)

Tab. 1 The growth inhibition effect of GCV on HepG2/tk(%)

Hours	Control	0.1 mg/L	1 mg/L	10 mg/L	100 mg/L
24	0	10.5 ± 5.4 [▲]	19.1 ± 6.7 [▲]	30.4 ± 6.3 [*]	37.8 ± 7.5 [*]
48	0	18.9 ± 4.5 [*]	36.7 ± 10.1 [*]	63.6 ± 11.7 [*]	73.4 ± 8.6 [*]
72	0	37.3 ± 8.5 [*]	70.5 ± 10.8 [*]	84.2 ± 9.2 [*]	88.1 ± 6.1 [*]

(*t* test, [▲]*P* < 0.05, ^{*} *P* < 0.01, *n* = 4 compared with control)

表2 不同浓度GCV在不同作用时间对SMMC7721/tk细胞的生长抑制率(%)

Tab. 2 The growth inhibition effect of GCV on SMMC7721/tk(%)

Hours	Control	0.1 mg/L	1 mg/L	10 mg/L	100 mg/L
24	0	4.1 ± 2.7 [▲]	4.5 ± 2.9 [▲]	5.2 ± 3.8 [▲]	8.1 ± 3.5 [*]
48	0	3.8 ± 2.4 [▲]	5.3 ± 3.1 [*]	8.9 ± 4.2 [*]	12.5 ± 5.1 [*]
72	0	4.6 ± 2.2 [*]	8.4 ± 3.6 [*]	16.6 ± 3.7 ^{**}	21.2 ± 4.9 ^{**}

(*t* test, [▲]*P* > 0.05, ^{*} *P* < 0.05, ^{**} *P* < 0.01, *n* = 4 compared with control)

自从Wu等^[4]首先成功地利用肝细胞特异的去唾液酸糖蛋白(ASGP)受体介导的内吞途径实现体内外肝脏靶向性基因转移以来,非病毒受体介导基因转移系统因其独具特色的基因转移细胞靶向性而倍受研究者青睐^[5-6]。只要选择合适的特异性受体和配体,就能实现组织、细胞靶向性的基因转移。近来研究表明^[7],CD71,即转铁蛋白受体(TfR)是与细胞增殖和肿瘤发生密切相关的抗原成分,在增殖细胞和多种培养的肿瘤细胞(如肝癌,肺癌,乳腺癌,淋巴细胞白血病,恶性淋巴瘤等)上表达显著增加,其表达密度较在

正常细胞高许多倍,而且TfR在肿瘤细胞表面的表达较其它肿瘤相关抗原稳定,很少被修饰、覆盖和丢失,因此,TfR可以作为一种较为理想的受体分子被用来介导基因转移。

另外一种基因提高基因特异性治疗的策略就是利用组织特异性转录顺式调控元件如启动子、增强子等来控制外源基因在特异性靶细胞中的表达。针对不同的肿瘤,可以通过选用不同的组织特异性启动子达到对多种肿瘤的特异性基因治疗^[8-10]。例如,将本研究所用针对原发性肝癌的AFP启动子换为肺癌特异性

图3 pEBAF/tk-GAL4rec重组质粒菌落PCR鉴定

Fig. 3 Bacterial clone PCR analysis of pEBAF/tk-GAL4rec

Lane M: 100 bp PCR marker;

Lane 1-8: Recombinant plasmid transfected clones

启动子,便可针对肺癌进行组织特异性基因治疗。

本研究以抗 TTR 的 ScFv 为靶向载体,构建 ScFv-GAL4 融合蛋白,利用 GAL4 的 DNA 结合能力,连接含自杀基因 HSV-tk 及 AFP 启动子的表达载体,形成 ScFv-GAL4-DNA 复合物,通过受体介导内吞作用,引导 tk 基因表达载体进入肿瘤细胞,并在 5.1 Kb 大小的 AFP 调控元件的调控下研究其经双重定位的特异性肝癌细胞杀伤作用。结果显示,细胞表面均高表达 TTR 但在 AFP 的表达上存在明显的差异的人肝癌细胞株 HepG2、SMMC7721 和人肺癌细胞株 A549 对 HSV-tk/GCV 系统杀伤的敏感性也表现出极明显差异。表明本实验所采用的双靶向介导策略较以往传统的单定位方法具有更好的靶向性,从而为靶向性基因转移提供了一条新的途径。

[参考文献]

[1] Liljestrom PL. The nucleotide sequence of the yeast MEL1 gene [J]. *Nucleic Acids Res*, 1985, 13(20): 7257-7268.

[2] Fominaya J, Uherek C, Wels W, *et al*. A chimeric fusion protein containing transforming growth factor- α mediates gene transfer via binding to the EGF receptor [J]. *Gene Ther*, 1998, 5(4): 521-530.

[3] Fritz JD, Herweijer H, Zhang G, *et al*. Gene transfer into mammalian cells using histone-condensed plasmid DNA [J]. *Hum*

Gene Ther, 1996, 7: 1395-1404.

[4] Wu GY, Wu CH. Receptor-mediated *in vitro* gene transformation by a soluble DNA carrier system [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262(10): 4429-4432.

[5] Foster BJ, Kern JA. HER2-targeted gene transfer [J]. *Hum Gene Ther*, 1997, 8(6): 719-727.

[6] Finke S, Trojaneck B, Lefterova P, *et al*. Increase of proliferation rate and enhancement of antitumor cytotoxicity of expanded human CD3⁺ CD56⁺ immunologic effector cells by receptor-mediated transfection with the interleukin 7 gene [J]. *Gene Ther*, 1998, 5(1): 31-39.

[7] Gatter KC, Brown G, Trowbridge IS, *et al*. Transferrin receptors in human tissues: Their distribution and possible clinical relevance [J]. *J Clin Pathol*, 1983, 36: 539-545.

[8] Kanai F, Shiratori Y, Shiratori Y, *et al*. *in vivo* gene therapy for alpha-fetoprotein-producing hepatocellular carcinoma by adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(3): 461-465.

[9] Vile RG, Miller N, Chernajivsky Y, *et al*. Tissue-specific gene expression from Mo-MLV retroviral vectors with hybrid LTRs containing the murine tyrosinase enhancer/promoter [J]. *Virology*, 1995, 214(1): 307-313.

[10] Tanaka T, Kanai F, Okabe S, *et al*. Adenovirus-mediated prodrug gene therapy for carcinoembryonic antigen-producing human gastric carcinoma cells *in vitro*. [J] *Cancer Res*, 1996, 56(6): 1341-1345.

[收稿日期] 2002 - 06 - 06

[修回日期] 2002 - 07 - 26

《生物技术药物研究开发和质量控制》书讯

《生物技术药物研究开发和质量控制》由中国药品生物制品检定所副所长王军志研究员主编,科学出版社出版,为我国第一本比较全面反映生物技术药物研究开发现状和质量研究的专著。

该书根据新世纪生物技术药物发展趋势,反映我国近十年来在生物技术药物质量研究的成果,总结了我国生物技术制药在国家“863”高技术计划项目支持下在质量标准方面研究所取得的成绩,所介绍的质量标准与 WHO 和美国 FDA 基本相一致。参加编著者大多为中国药品生物制品检定所从事各类生物技术药物、质量标准、检定方法、安全评价研究的第一线专家与科研人员,内容新颖、比较全面、实用性强,包括了新基因重组药物,抗体工程药物,基因工程疫苗,肿瘤疫苗,反义核酸药物,基因芯片,基因治疗,干细胞治疗等内容。

本书共分上下两篇,各 15 章,共 120 万字,上篇按新生物技术药物的一般研究开发程序,系统地介绍了上游研究、中试开发、非临床研究和注册申报的全过程以及贯穿于全过程的质量控制要点;下篇对 14 大类别 100 个品种的生物技术的理化特性和生物学特性进行了介绍,在此基础上比较详细介绍已进入申报临床研究产品的质量标准和质量方法。对规范质量研究,缩短开发研究周期,保证产品安全有效质量可控,早日实现产业化具有重要的参考价值。

本书适用于生物制药相关领域(包括企业、科研院所和研发机构)的生产工艺部门技术人员、质量保证和质量检定人员,从事生物技术药物安全评价研究人员、药品注册管理的技术人员以及新药审评技术人员,新生物技术药物注册申报人员及各地方药检所从事生物技术药物质量检定人员。也可作为大学从事生物工程开发研究的教师、研究生等的参考书。

本书制作精良,适于长期使用与保存,每本定价 149 元,订购地址:北京天坛西里 2 号,邮编:100050 中国药品生物制品检定所档案室,联系人:耿长秋,电话:010-65113987,010-67017755 转 324,可办理邮购(邮资费需另加书款的 10%)。全国各大新华书店也有售。