

鉴定单克隆抗体识别蛋白质抗原表位方法的建立

李栋

上海药明生物医药有限公司, 上海 200131

李栋. 鉴定单克隆抗体识别蛋白质抗原表位方法的建立. 生物工程学报, 2020, 36(11): 2443-2450.

Li D. Identifying protein epitopes recognized by monoclonal antibodies. Chin J Biotech, 2020, 36(11): 2443-2450.

摘要: 为了建立鉴定治疗性单克隆抗体识别蛋白质抗原表位的方法, 选择程序死亡受体-1 (PD-1) 作为目的蛋白。基于丙氨酸扫描策略, 建立了定点突变技术和哺乳动物细胞表达系统相结合的抗原突变体快速表达方法, 确定了真核表达元件扩增和细胞转染表达的条件。共表达了 150 个 PD-1 蛋白突变体, 鉴定了这些突变体与抗 PD-1 抗体帕博利珠单抗的结合能力。根据蛋白突变体与抗体的结合力并结合蛋白结构分析确定了帕博利珠单抗的抗原表位, 与已报道的基于晶体结构的抗原表位高度一致, 表明本方法操作简单、准确性高, 可用于治疗性单克隆抗体的抗原表位作图。

关键词: 单克隆抗体, 细胞程序死亡受体-1, 定点突变, 哺乳动物细胞, 表位作图

Identifying protein epitopes recognized by monoclonal antibodies

Dong Li

Shanghai Wuxi Biopharmaceuticals Co., Ltd., Shanghai 200131, China

Abstract: To establish a method for identifying protein epitopes recognized by therapeutic monoclonal antibodies, the programmed death receptor-1 (PD-1) was selected as the target protein. Based on the alanine scanning strategy, a rapid expression method of antigen mutants combining site-directed mutagenesis with mammalian cell expression system was established, the conditions for eukaryotic expression element amplification and cell transfection expression were established. 150 PD-1 protein mutants were co-expressed, and the binding ability of these mutants to anti-PD-1 antibody Pembrolizumab was identified. The epitopes of Pembrolizumab were determined based on the binding ability of protein mutants to antibodies and combined with protein structure analysis, which was highly consistent with the reported crystal structure-based epitopes, indicating that this method is simple and accurate and can be used for epitope mapping of therapeutic monoclonal antibodies.

Keywords: monoclonal antibody, programmed cell death receptor-1, site-directed mutagenesis, mammalian cell, epitope mapping

全球已有上百个治疗性单克隆抗体药物获批上市, 年销售额超千亿美元, 药物靶点主要集中在

细胞程序死亡受体-1及其配体-1 (PD-1/PD-L1)、白细胞分化抗原 20 (CD20)、人类

Received: March 20, 2020; **Accepted:** April 16, 2020

Supported by: Shanghai Rising-Star Program (No. 19QB1406000).

Corresponding author: Dong Li. Tel/Fax: +86-21-20664274; E-mail: li_dong_015713@wuxiapptec.com

上海市青年科技启明星计划 (No. 19QB1406000) 资助。

表皮生长因子受体-2 (HER2)、血管内皮生长因子 (VEGF) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等热门靶点^[1]。由于目前经临床验证有效的靶点相对有限, 针对这些靶点的治疗性单抗的数量要远远超过靶点的数量, 很容易出现多个抗体针对同一个靶点的现象^[2-3], 而同一靶点的抗原表位对于抗体的活性、功能、疗效和安全性均密切相关, 比如靶向 CD20 的利妥昔单抗、奥法木单抗、奥瑞珠单抗和阿妥珠单抗在抗原表位、功能或适应症上均有不同的表现^[4]。因此, 抗原表位的鉴定和选择对于治疗性单抗差异化研发从而满足生物学功能和临床需求尤为重要。本研究以 PD-1 为靶点, 基于丙氨酸扫描策略, 建立了定点突变技术和哺乳动物细胞表达系统相结合的抗原突变体快速表达方法。共表达了 150 个 PD-1 蛋白突变体, 鉴定了这些突变体与人源化抗 PD-1 单克隆抗体帕博利珠单抗 (Pembrolizumab, 商品名: 可瑞达) 的结合能力, 并结合 PD-1 蛋白结构进一步分析确定了抗原表位。与已报道的 PD-1 蛋白和帕博利珠单抗共结晶的晶体结构显示的抗原表位高度一致。这种快速鉴定抗体识别蛋白质抗原表位的方法, 为差异化治疗性单抗的筛选、鉴定和成药性评估提供了依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

快速定点突变试剂盒购自 Agilent Technologies 公司; Phusion 高保真 DNA 聚合酶购自 NEB 公司; PCR 清洁回收试剂盒购自 Axygen 公司; FreeStyle 293F 细胞和 293fectin 转染试剂均购自 Life Technologies 公司; His 标签 PD-1 蛋白购自 Sino Biological 公司; HRP 标记的抗 His 抗体购自 Rockland Immunochemical 公司; TMB 底物显色试剂盒购自 KPL 公司; 帕博利珠单抗购自默沙东公司。含有 His 标签的 PD-1 胞外区片段的 pcDNA 真核表达质粒由本单位构建; 引物合成和基因测序由 Life Technologies 公司或金唯智生

物公司完成。

1.2 真核表达元件的扩增

根据定点突变试剂盒的说明设计突变引物, 以含有 His 标签的 PD-1 胞外区片段 (UniProt 登录号: Q15116, 1-170 位氨基酸) 的真核表达质粒为模板进行第一轮 PCR 扩增, PCR 条件为: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 65 °C 4 min, 30 个循环; 最后 65 °C 延伸 10 min。PCR 扩增完成后加入 *Dpn* I 酶消化经甲基化修饰的模板质粒, 获得含有突变位点的环状单链。然后以此为模板, 使用真核表达载体 CMV 启动子前的上游引物和 poly (A) 尾巴后的下游引物, 加入 DNA 聚合酶等反应混合物进行第二轮 PCR 扩增, PCR 条件为: 98 °C 预变性 3 min; 98 °C 15 s, 54 °C-64 °C 45 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。使用 PCR 清洁回收试剂盒回收获得含有 CMV 启动子、Kozak 序列、信号肽、PD-1 胞外区或突变体片段、His 标签和 poly (A) 尾巴组成的真核表达元件片段^[5]。

1.3 哺乳动物细胞表达蛋白突变体

将 FreeStyle 293F 细胞按每孔 1×10^6 /mL 的密度接种到 24 孔板或 96 孔深孔板中, 然后用 Opti-MEM 培养基稀释 PCR 产物至终体积 50 μ L 并与终体积 50 μ L 转染试剂/Opti-MEM 培养基混合物 (含 2 μ L 293fectin) 混合静置 20 min 后加入准备好的细胞中, 于 37 °C 细胞培养摇床中 8% CO₂、220 r/min 培养 4-5 d 后, 收集细胞上清。

1.4 蛋白突变体的表达水平检测

分别使用 Dot blotting 法和 ELISA 法进行蛋白表达水平的定性和定量。Dot blotting 法的步骤为: 将 100 μ L 细胞上清按序点于硝酸纤维素膜上, 然后将膜置于 5% 脱脂奶粉封闭液中室温孵育 1 h, 洗涤后加入 HRP 标记的抗 His 标签的抗体室温孵育 1 h, 然后加入 5 mL 新鲜配置的荧光显色剂后曝光显影。竞争 ELISA 法的步骤为: 包被 250 ng/mL 含 His 标签的 PD-1 蛋白于 96 孔酶

标板上 4 °C 过夜, 然后加入 2% BSA 封闭液室温孵育 1 h, 再加入预先混合的已知浓度 (4 000 ng/mL 为起始浓度, 4 倍梯度稀释) 的含有 His 标签的 PD-1 蛋白与 1 : 5 000 稀释的 HRP 标记的抗 His 标签的抗体混合液, 室温孵育 1-2 h 后, 加入 TMB 底物显色液显色 10 min 后, 加入 2 mol/L 盐酸溶液终止反应后于酶标仪上读取 450 nm 波长吸光度值绘制标准曲线。PD-1 蛋白突变体上清液 5 倍稀释后与 1 : 5 000 稀释的 HRP 标记的抗 His 标签的抗体混合后, 加入已包被 His 标签的 PD-1 蛋白的 96 孔酶标板上, 经孵育、洗涤、显色、终止步骤后读取吸光度值, 然后根据标准曲线计算出 PD-1 蛋白突变体的表达量。

1.5 蛋白突变体与抗体结合能力检测

使用 ELISA 法进行 PD-1 突变体与抗 PD-1 抗体结合能力的检测。将 2 μg/mL 的帕博利珠单抗包被于 96 孔酶标板中, 加入 2% BSA 封闭液, 室温孵育 1 h, 然后加入含有 10 ng/mL 的 PD-1 蛋白或 PD-1 蛋白突变体上清液室温孵育 1-2 h, 洗涤后加入 HRP 标记的抗 His 标签的抗体室温孵育 1-2 h 后, 加入 TMB 底物显色试剂室温显色 10 min, 加入 2 mol/L 盐酸溶液终止反应, 于酶标仪上读取 450 nm 波长吸光度值, 将帕博利珠单抗和 PD-1 蛋白突变体结合后的吸光度值除以帕博利珠单抗和 PD-1 蛋白结合后的吸光度值, 计算出相对结合力。

1.6 抗原表位分析

使用 Pymol 软件在蛋白结构上进一步分析相对结合力较低的突变位点, 去除突变后会影响到 PD-1 蛋白结构稳定性的氨基酸位点, 从而确定帕博利珠单抗的抗原表位, 绘制空间结构表位图。

2 结果与分析

2.1 真核表达元件扩增方法的确立

为了确定最佳的扩增参数, 首先以含有 His 标签的 PD-1 胞外区片段的真核表达质粒为模板,

用第二轮 PCR 的 CMV 启动子前的上游引物和 poly(A) 尾巴后的下游引物在不同的退火温度条件 (54 °C-64 °C) 下扩增目的片段, 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示低退火温度扩增目的条带 (图 1 中黑色箭头所示) 的效率更高且杂带较少 (图 1), 最终选择 56.3 °C 作为第二轮 PCR 反应的退火温度。

为了减少第一轮 PCR 扩增完成后的琼脂糖凝胶回收或 PCR 产物清洁回收步骤, 将第 80 位的丙氨酸进行无义突变, 密码子由 GCC 突变为 GCA。第一轮 PCR 扩增后不进行 PCR 产物的回收, 摸索不同体积的 PCR 产物直接进行第二轮 PCR 扩增。结果显示第一轮 PCR 产物的体积越小, 扩增目的条带 (图 2A 中黑色箭头所示) 越特异杂带越少 (图 2A), PCR 产物测序结果显示突变成功 (图 2B)。最终选择 0.1 μL 作为第二轮 PCR 的模板用量。

2.2 真核表达蛋白突变体方法的确立

为了确定用于转染最合适的 PCR 产物量, 将不同体积的未纯化的第二轮 PCR 产物和纯化后第二轮 PCR 产物转染 293F 细胞, 细胞表达上清使用 Dot blotting 法进行检测 (图 3), 研究发现未纯化

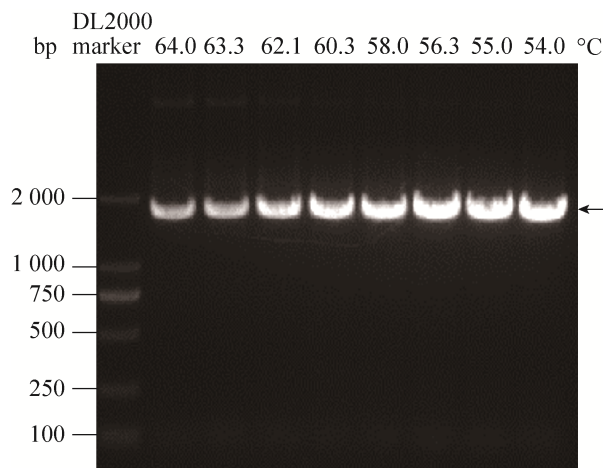


图 1 不同退火温度扩增目的片段的 1% 琼脂糖凝胶电泳
Fig. 1 1% agarose gel electrophoresis of target fragments amplified at different annealing temperatures.

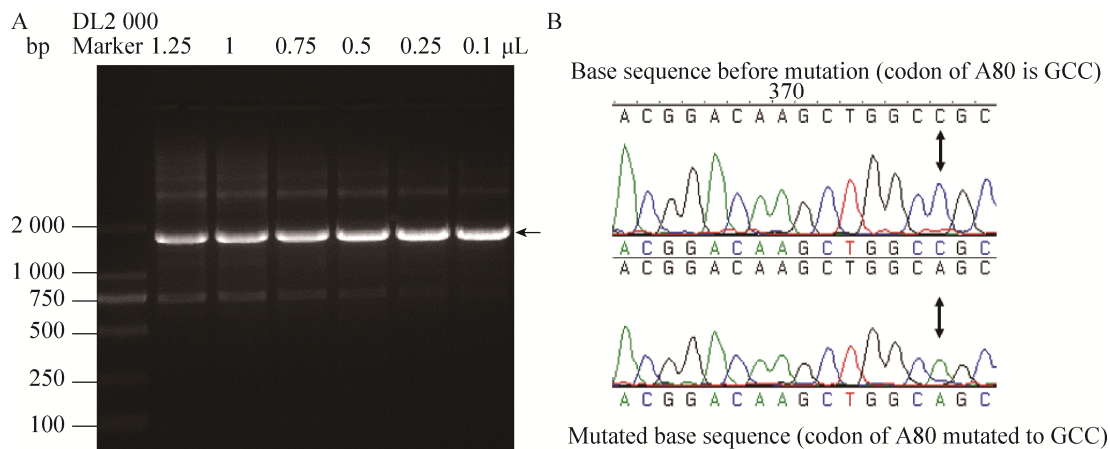


图2 PCR扩增目的片段的鉴定(A:不同模板量扩增目的片段的1%琼脂糖凝胶电泳;B:突变前后DNA测序结果比对)

Fig. 2 Identification of target fragment amplified by PCR. (A) 1% agarose gel electrophoresis of target fragments amplified with different template volume. (B) Comparison of DNA sequencing results before and after mutation.

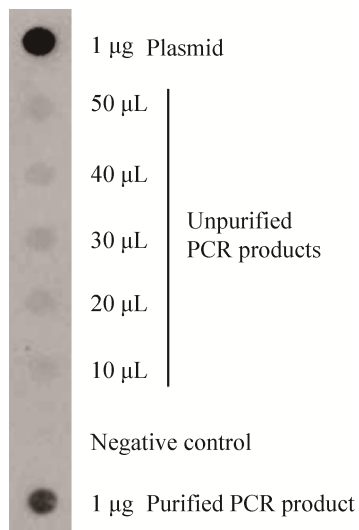


图3 不同PCR产物转染细胞上清Dot blotting图

Fig. 3 Dot blotting analysis of supernatant of cells transfected with different PCR products.

的PCR产物表达水平较低且转染后的细胞成活率很低,而纯化的PCR产物能够在细胞中表达,因此选择纯化PCR产物用于细胞转染。

由于Dot blotting仅能用于蛋白定性,本研究利用His标签PD-1蛋白和His标签蛋白突变体可以竞争结合抗His抗体的特性,建立了竞争ELISA的方法用于目的蛋白的定量。首先检测了不同稀

释比例(1:1250, 1:5000, 1:20000)的HRP标记的抗His标签的抗体与包被于酶标板上梯度稀释(4000 ng/mL为起点,4倍稀释)的His标签PD-1蛋白的结合能力,根据结果选择1:5000作为HRP标记的抗His标签的抗体的稀释比例,其 EC_{80} 值约为250 ng/mL。因此,在竞争ELISA中包被250 ng/mL的PD-1蛋白,随后将梯度稀释(4000 ng/mL为起点,4倍稀释)的His标签PD-1蛋白与1:5000稀释的HRP标记的抗His标签的抗体预先混合后加入包被PD-1蛋白的酶标板中。由于固定在酶标板上和游离在溶液中的His标签PD-1蛋白会竞争结合抗His标签抗体,游离的蛋白浓度越高,则与固定在酶标板上的PD-1蛋白结合的抗体越少,加入底物显色读数值越低,由此获得定量的标准曲线(图4A),用于His标签PD-1蛋白突变体的定量。将第80位氨基酸无义突变的PCR产物纯化后转染293F细胞后分别于2-5 d收集细胞上清进行定量,结果显示转染后第4-5天的表达水平相对较高(图4B),因此,选择转染后第4天收集细胞上清。

2.3 蛋白突变体与抗体结合力的检测

将PD-1胞外区(21-170位氨基酸)中的丙

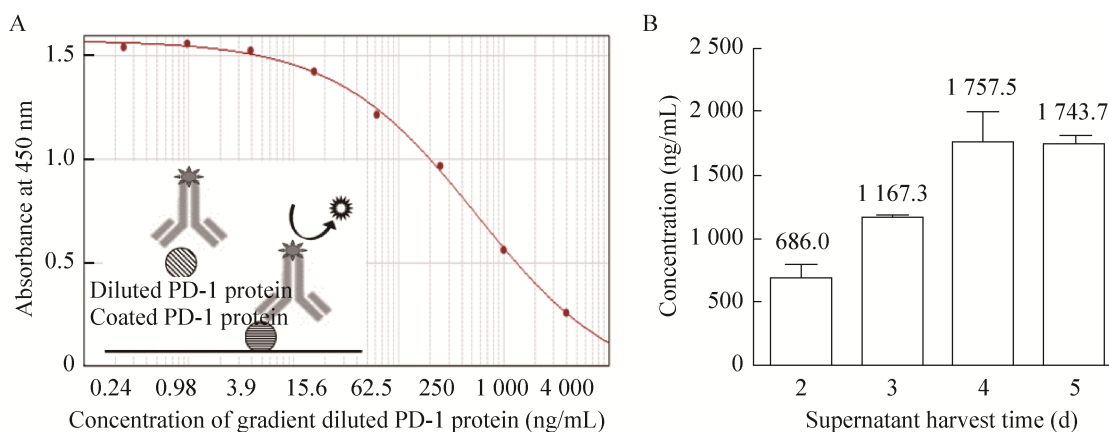


图4 细胞上清中目的蛋白定量方法的建立及定量

Fig. 4 Establishment and quantification of target protein in cell supernatant. (A) Standard curve of the quantification method by competitive ELISA. (B) Expression amount of the target protein in the cell supernatant on different days.

氨酸突变为甘氨酸，其余氨基酸用丙氨酸逐一替代，构建系列突变体。与传统质粒转染相比，本方法减少了大肠杆菌转化、挑克隆、质粒抽提鉴定等步骤，在通量上可实现数量级的提高，仅通过两轮 PCR 即可批量扩增获得真核表达元件片段。应用本方法共构建表达了 150 个蛋白理论分子量约为 17.6 kDa 单点突变的 PD-1 蛋白突变体，同时表达了 7 个含有丙氨酸密码子无义突变的 PD-1 蛋白用于系统评估和阳性对照。真核表达元件片段转染 293F 细胞 4 d 后收集上清液，根据竞争 ELISA 法定量标准曲线显示的线性区间和第 80 位氨基酸的定量结果 (图 4)，将上清液进行 5 倍稀释后进行定量。最终使每个蛋白突变体的吸光度值均位于线性区间中，从而保证同批次蛋白上清定量的准确性和可比性。使用 ELISA 法检测了 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗 PD-1 抗体帕博利珠单抗和 10 ng/mL 蛋白突变体的结合能力，根据 PD-1 蛋白突变体与 PD-1 蛋白分别和帕博利珠单抗结合后在 450 nm 波长的吸光度值的比值计算出 PD-1 蛋白突变体的相对结合力 (图 5)。数值越低说明特定位点的氨基酸对蛋白结构的稳定或与抗体结合的影响越大。结果显示有 25 个氨基酸位点的突变后与帕博利珠单抗的结合能力下降了 25% 以上，表明这些氨基酸位点可作用于维持蛋白结构的稳定或直接与抗体的结合相关。

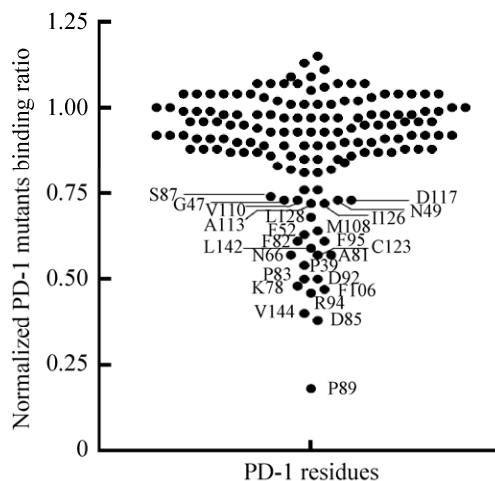


图5 PD-1 突变体与帕博利珠单抗的相对结合力

Fig. 5 Relative binding ability of PD-1 mutants to Pembrolizumab.

2.4 抗原表位作图与分析

为了鉴定帕博利珠单抗的抗原表位，在 PD-1 蛋白结构 (PDB 蛋白数据库: 4ZQK、5GGS) 上进一步分析了与抗体结合力下降的氨基酸位点，结合蛋白溶剂可及表面区域 (SASA) 分析^[6]，排除了维持蛋白结构稳定性的位点，如形成蛋白内二硫键的 C123，包埋在蛋白内部支撑蛋白空间结构的 F52、M108、V110、A113、D117、L142、V144 和支撑蛋白局部结构的 P39、D92 等氨基酸，最终鉴定帕博利珠单抗的抗原表位为 N66、K78、

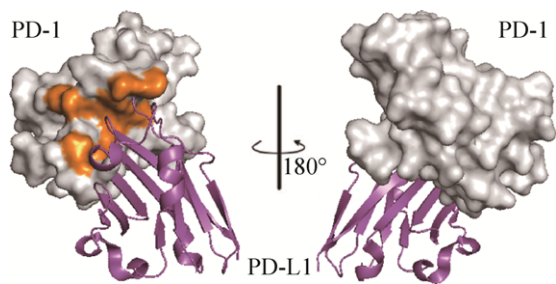


图6 帕博利珠单抗的抗原表位 (黄色标记氨基酸)
Fig. 6 Epitope (labeled on yellow) of Pembrolizumab.

A81、F82、P83、D85、S87、P89、I126 和 L128 (图6)。从结构上看,帕博利珠单抗与 PD-L1 竞争结合 PD-1,其亲和力主要依赖于与人 PD-1 的无结构 C'环的结合,而小鼠 PD-1 对应位置是 β -折叠,从而揭示了帕博利珠单抗可以与人 PD-1 结合,但与小鼠 PD-1 没有交叉反应的原因。

为了验证本研究抗原表位作图结果的准确性,在帕博利珠单抗和 PD-1 蛋白复合物晶体结构 (PDB 蛋白数据库: 5GGS) 上进一步分析了帕博利珠单抗与抗原表位氨基酸的相互作用 (图7),结果显示 PD-1 抗原表位 (黄色标记的氨基酸) 通过形成氢键和范德华力等方式与帕博利珠单抗重链可变区 CDR1 的 Y33、Y35, CDR2 的 N52、N55, CDR3 的 R99、Y101、R102、F103 以及轻链可变区 CDR1 的 S32、Y34、Y36, CDR2 的 Y53、Y57, CDR3 的 L98 相互作用,该结果完全涵盖在

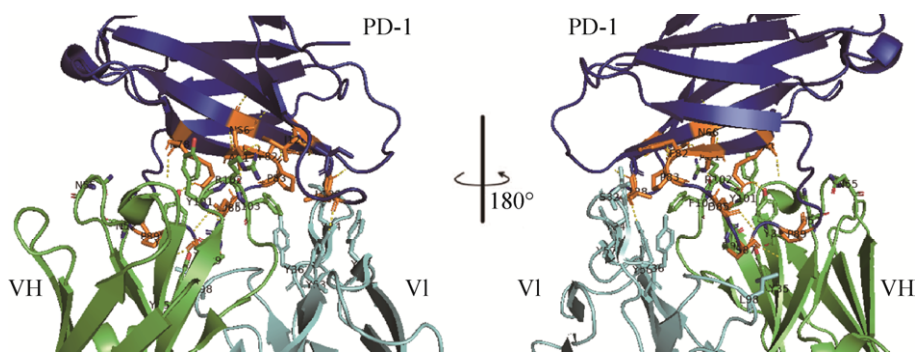


图7 帕博利珠单抗与 PD-1 抗原相互作用位点
Fig. 7 The interaction sites between Pembrolizumab and PD-1.

Lee 等^[7]报道的帕博利珠单抗和 PD-1 蛋白相互作用的氨基酸中。将本研究鉴定出的抗原表位与已经报道的基于晶体结构解析的抗原表位进行对比,发现不同机构对帕博利珠单抗和 PD-1 蛋白复合物结晶解析出的抗原表位^[7-11]略有差异,本研究鉴定出的抗原表位与已报道晶体结构解析的抗原表位高度一致 (表1)。

3 讨论

抗原表位作图主要包括 X-射线晶体衍射、肽段扫描、噬菌体肽库展示、丙氨酸扫描和生物信息学预测等方法^[12]。其中 X-射线晶体衍射可以根据解析的晶体结构分析得知抗体和抗原结合线性表位和构象表位,但是这种方法对于蛋白质量和实验技术要求均高,同时结晶晶体的质量和结构解析的结果也存在一定差异,如已报道的帕博利珠单抗与 PD-1 蛋白的晶体结构解析^[7-11]。肽扫描技术通过合成重叠短肽检测与抗体的结合,该方法合成肽的成本高,且对线性表位的识别更有效,存在会丢失构象表位的问题。噬菌体肽库展示技术能够从噬菌体递呈的肽库中筛选出能够和抗体结合的线性表位和构象型表位,但该方法需要对噬菌体短肽库进行筛选和富集,操作相对复杂且实验周期较长。丙氨酸扫描技术通过定点突变氨基酸以检测特定氨基酸与抗体结合能力的改变,

表 1 本研究鉴定帕博利珠单抗抗原表位与已报道的抗原表位对比

Table 1 Comparison of the epitopes of Pembrolizumab identified in this study with the epitopes reported

PD-1 residues	This study	Lee et al. ^[7]	Horita et al. ^[8]	Fessas et al. ^[9]	Na et al. ^[10]	Tan et al. ^[11]
S60			•	•		
E61			•			
S62		•		•		
F63		•				
V64		•	•	•	•	•
N66	•	•	•	•	•	•
Y68		•	•			•
Q75		•	•	•		•
T76		•	•	•	•	•
D77		•		•	•	
K78	•	•	•	•	•	•
A81	•	•		•		
F82	•	•		•		
P83	•	•	•	•	•	•
E84		•	•	•		•
D85	•	•	•	•	•	•
R86		•	•	•	•	•
S87	•	•	•	•	•	•
Q88		•	•	•	•	•
P89	•	•	•	•	•	•
G90		•	•	•		
R99		•	•			
I126	•	•		•		
L128	•	•	•	•		
A129		•		•		
P130			•			
K131		•	•	•		
A132		•	•	•		
I134		•		•		
E136			•			

通常去除氨基酸侧链上的活性基团, 将其置换成体积小且侧链上无其他功能团的丙氨酸, 该方法可以鉴定线性表位和构象表位, 但操作步骤较多, 在通量上受限。

晶体结构可以解析抗原与抗体接触界面所有的氨基酸残基, 但不能反应出每个氨基酸残基与抗体的结合能力, 而丙氨酸扫描可通过将特定氨基酸突变为丙氨酸并检查结合丢失, 可发现与抗体相互作用重要的氨基酸位点。然而有些非表面

区域的丙氨酸置换会导致抗原结构不稳定, 这也可能影响抗体的结合, 可以通过蛋白结构分析排除维持蛋白结构稳定性的氨基酸。本研究基于丙氨酸扫描策略, 建立了定点突变技术和哺乳动物细胞表达系统相结合的抗原突变体快速表达方法, 在操作上不同于传统定点突变将 PCR 产物转化大肠杆菌、挑克隆、摇菌和抽提质粒等步骤^[13], 仅通过两轮 PCR 扩增获得真核表达元件, 经 PCR 清洁回收后直接用于真核细胞转染, 可批量制备

上百个接近蛋白天然构象的突变体。本研究共表达了 150 个 PD-1 蛋白突变体,并利用竞争 ELISA 法的原理开发出细胞上清中目的蛋白定量的方法进行蛋白定量。然后检测了 PD-1 蛋白突变体与抗 PD-1 抗体帕博利珠单抗的结合能力,结合蛋白结构排除了维持蛋白结构稳定性的氨基酸,最终确定了抗原表位,与已报道的基于晶体结构解析出的高度一致,显示出本研究建立方法的准确性和可靠性,可进行抗体表位鉴定,用于差异化治疗性抗体的发现^[5,14]。

REFERENCES

- [1] Gao Q, Jiang H, Ye M, et al. Current status and trend of R&D of monoclonal antibodies. *China Biotechnol*, 2019, 39(3): 111–119 (in Chinese).
高倩, 江洪, 叶茂, 等. 全球单克隆抗体药物研发现状及发展趋势. *中国生物工程杂志*, 2019, 39(3): 111–119.
- [2] Eigenbrot C, Ultsch M, Dubnovitsky A, et al. Structural basis for high-affinity HER2 receptor binding by an engineered protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(34): 15039–15044.
- [3] Lee HT, Lee SH, Heo YS. Molecular interactions of antibody drugs targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4 in immuno-oncology. *Molecules*, 2019, 24(6): 1190.
- [4] Klein C, Lammens A, Schäfer W, et al. Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties. *mAbs*, 2013, 5(1): 22–33.
- [5] Li D, Xu JQ, Wang ZZ, et al. Epitope mapping reveals the binding mechanism of a functional antibody cross-reactive to both human and murine programmed death 1. *mAbs*, 2017, 9(4): 628–637.
- [6] Mitternacht S. FreeSASA: An open source C library for solvent accessible surface area calculations. *F1000Research*, 2016, 5: 189.
- [7] Lee JY, Lee HT, Shin W, et al. Structural basis of checkpoint blockade by monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. *Nat Commun*, 2016, 7: 13354.
- [8] Horita S, Nomura Y, Sato Y, et al. High-resolution crystal structure of the therapeutic antibody pembrolizumab bound to the human PD-1. *Sci Rep*, 2016, 6: 35297.
- [9] Fessas P, Lee H, Ikemizu S, et al. A molecular and preclinical comparison of the PD-1-targeted t-cell checkpoint inhibitors nivolumab and pembrolizumab. *Semin Oncol*, 2017, 44(2): 136–140.
- [10] Na ZK, Yeo SP, Bharath SR, et al. Structural basis for blocking PD-1-mediated immune suppression by therapeutic antibody pembrolizumab. *Cell Res*, 2017, 27(1): 147–150.
- [11] Tan SG, Chen DQ, Liu KF, et al. Crystal clear: Visualizing the intervention mechanism of the PD-1/PD-L1 interaction by two cancer therapeutic monoclonal antibodies. *Prot Cell*, 2016, 7(12): 866–877.
- [12] Zhao XR. Progress in research on technique for analysis of epitopes of monoclonal antibody. *Chin J Biol*, 2018, 31(5): 555–562 (in Chinese).
赵晓瑞. 单克隆抗体表位分析技术的研究进展. *中国生物制品学杂志*, 2018, 31(5): 555–562.
- [13] Jia RB, Chen JH, Wei YJ, et al. Construction and enzyme-activity assessment of *L*-Asparaginase mutants. *J China Pharmaceut Univ*, 2005, 36(5): 468–472.
- [14] Li D, Li J, Chu HY, et al. A functional antibody cross-reactive to both human and murine cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 via binding to an N-glycosylation epitope. *mAbs*, 2020, 12(1): 1725365.

(本文责编 郝丽芳)