

文章编号 1006-8147(2023)01-0078-05

论 著

胎盘生长因子串联 scFv 质粒构建表达及亲和力测定

闫若辰¹, 王文皓², 魏琳纳³, 袁玉华³

(1.天津医科大学总医院检验科, 天津 300052; 2. 中国医学科学院血液病医院临床检测中心, 天津 300020; 3.天津医科大学总医院空港医院检验科, 天津 300308)

摘要 目的: 构建并表达胎盘生长因子串联 scFv, 提升对胎盘生长因子的亲和力。方法: 设计不同长度的柔性连接子连接的串联 scFv, 构建串联 scFv 质粒, 并分别将串联 scFv 与亲本 scFv 于原核表达系统进行表达。通过间接 ELISA 分别测定串联 scFv 及对应亲本 scFv 亲和力, 分别对数据进行单因素 ANOVA 方差分析, 并使用 Dunnett-*t* 检验进行组间比较。结果: 柔性连接子长度的不同, 会对串联 scFv 亲和力造成差别。单因素 ANOVA 方差分析结果表明, 各组亲和常数间存在明显的统计学差异, Dunnett-*t* 检验组间比较结果可知, 当串联 scFv 间柔性连接子 (GGGS)*n* 长度 *n*=4 和 *n*=5 时, 亲和力较亲本提升不明显 ($P>0.05$); 但亲和力在 $n=6$ ($t_{335}=33.90, t_{7A10}=32.00$, 均 $P<0.0001$) 及 $n=7$ ($t_{335}=91.68, t_{7A10}=90.71$, 均 $P<0.0001$) 时较两亲本均有明显提升。结论: 串联 scFv 可以明显提高单体 scFv 亲和力。

关键词 胎盘生长因子; 串联 scFv; scFv; 亲和力

中图分类号 R392-33

文献标志码 A

Construction, expression and affinity determination of placental growth factor tandem scFv plasmid

YAN Ruo-chen¹, WANG Wen-hao², WEI Lin-na³, YUAN Yu-hua³

(1. Department of Clinical Laboratory, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300020, China; 3. Department of Clinical Laboratory, General Hospital Airport Site, Tianjin Medical University, Tianjin 300308, China)

Abstract Objective: To construct and express placental growth factor (PLGF) tandem scFv, and determine the affinity for PLGF.

Methods: Tandem scFvs connected by flexible linkers of different lengths were designed to construct the tandem scFv plasmid, and the tandem scFv and their parental scFv were expressed in the prokaryotic expression system respectively. The affinity of tandem scFvs and parental scFvs were measured by indirect ELISA. One-way ANOVA analysis was performed on the data and the Dunnett-*t* test was used to compare between groups. **Results:** The different lengths of the flexible linkers would cause differences in the affinity of the tandem scFv. The results of the one-way ANOVA analysis showed that there were statistically significant differences between the affinity constants of the groups. The Dunnett-*t* test for comparison between groups showed that when the length of the flexible linker (GGGS) *n* between the tandem scFv was *n*=4 and *n*=5, there was no significant increase in affinity over the parents ($P>0.05$). However, the affinity was significantly higher than that of both parents at $n=6$ ($t_{335}=33.90, t_{7A10}=32.00$, both $P<0.0001$) and $n=7$ ($t_{335}=91.68, t_{7A10}=90.71$, both $P<0.0001$).

Conclusion: Tandem scFv can considerably enhance monomeric scFv affinity.**Key words** placental growth factor; tandem scFv; scFv; affinity

胎盘生长因子 (PLGF) 是血管内皮生长因子 (VEGF) 家族成员之一, 为糖基化的同源二聚体蛋白, 参与血管生成^[1]。PLGF 在早期诊断孕产妇先兆子痫方面优于其他生物指标^[2]。目前在临床上, 血清 PLGF 的检测方法主要以免疫学为主^[3-4], 抗体的亲和力是检测灵敏度的重要决定因素^[5]。

单链抗体 (scFv) 是由抗体重链可变区 (VH) 和抗体轻链可变区 (VL) 通过一段氨基酸构成的柔性连接子 (linker) 连接而成。为维持 scFv 结构的灵活

性及抗原结合能力, scFv 单体间 linker 通常设计为由 4 个甘氨酸 (Gly) 和 1 个丝氨酸 (Ser) 重复构成的 (GGGS)*n*, *n*=3 或 *n*=4^[6-7]。由于 scFv 结构简单、分子量小、可以通过原核表达系统表达, 生产成本低, 且其抗原结合能力与全长抗体相当, 因此其在工业化生产中比全长抗体更具优势^[8-9]。近些年, 研究者将两个相同或不同的 scFv 通过 linker 连接, 并通过原核系统表达实现串联 scFv 的表达, 使其可以同时结合两种类型的抗原^[10], 或同时结合同种抗原的不同表位^[11], 可被用于体外检测与体内治疗领域。

在本研究中, 选择 PLGF 配对抗体 335 和 7A10, 将其分别以 scFv 的方式进行原核表达系统表达, 进

基金项目 国家重点研发计划 (2020YFC0843100)

作者简介 闫若辰 (1997-), 女, 硕士在读, 研究方向: 医学技术 (检验方向); 通信作者: 袁玉华, E-mail: yyhxx39@sina.com。

一步应用生物信息学方法设计串联 scFv 间不同长度的 linker,构建 4 种串联 scFv 并再次通过原核表达系统表达。

1 材料与方法

1.1 材料 PLGF 配对单克隆抗体 7A10、335 株由本实验室保存;质粒载体 pET22b(+)购自南京金斯瑞有限公司;大肠杆菌 Shuffle T7-B 菌株购于北京博迈德基因技术有限公司;HisCap 6FF 镍柱购于常州天地人和生物科技有限公司;PLGF 试剂由丹娜(天津)生物科技股份有限公司馈赠;His-tag 抗体(HRP 标记)购于南京金斯瑞有限公司;聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)相关试剂购自 Bio-Rad 公司;实验中其他生化试剂购于索莱宝生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 scFv 质粒的构建 通过测序确定 PLGF 配对单克隆抗体 7A10、335 株的 VH 和 VL 基因序列, VH 与 VL 间 linker 长度选择为(GGGGS)₃,并将构建好的序列克隆至 pET22b(+)质粒载体。交由南京金斯瑞生物有限公司合成基因并构建质粒。

1.2.2 设计串联 scFv 间 linker 长度 对 PLGF 二聚体建模后,使用多种算法初步预测抗原表位可能区域。使用 pymol 软件 measurement 方法选定不同表位间氨基酸,以测量不同表位间线性距离,确定两表位间可能的最大范围,以此设计 4 种串联 scFv 间 linker 的长度,并将序列克隆至 pET22b(+)质粒载体。交由南京金斯瑞生物有限公司合成基因并构建质粒。

1.2.3 scFv 融合蛋白的表达 将 2 种亲本 pET22b(+)/scFv 的质粒转入 shuffle T7B 感受态细胞中,平板划线获得单克隆菌落后分别接种于含氨苄青霉素(工作浓度 50 μg/mL)的 LB 培养基中,在 30℃下振荡培养至对数生长期后,加入 1 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷(Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)诱导细胞产生蛋白。30℃诱导 7 h 后,在 4℃、8 000 r/min 的条件下离心 10 min 收集菌体,重悬于 1×PBS,将收集到的菌液进行超声破碎,收集沉淀及上清,通过 Bio-Rad 电泳仪进行 SDS-PAGE 电泳,观察蛋白产量及可溶性表达情况,设置未加入 IPTG 诱导前菌体沉淀作为对照。依次加入 0.1% TritonX-100 及 500 mmol/L 氯化钠溶液洗涤包涵体,之后加入 8 mol/L 尿素溶解包涵体,经过 12 000 r/min 离心后取上清过滤,用 20 mmol/L 咪唑、50 mmol/L 磷酸二氢钠、300 mmol/L 氯化钠、8 mol/L 尿素作为洗涤缓冲液,用 250 mmol/L 咪唑、50 mmol/L 磷酸二氢钠、300 mmol/L 氯化钠、8 mol/L 尿素作为洗脱缓冲液。

非特异性结合蛋白用洗涤液洗涤。使用 GE AKTA 仪器 HisCap 6FF 镍柱纯化,并通过 SDS-PAGE 电泳验证。通过梯度降低尿素浓度(6、4、2、1、0 mol/L)的方式进行透析,最终使蛋白重新折叠复性,使用超滤浓缩管对蛋白进行浓缩^[3,12]。

1.2.4 串联 scFv 融合蛋白表达 通过上述方法表达 4 种 pET22b(+)/串联 scFv 质粒,收集沉淀及上清,通过 SDS-PAGE 电泳观察蛋白产量及可溶性表达情况。通过逐步洗涤包涵体,HisCap 6FF 镍柱进行纯化,洗脱后蛋白经 SDS-PAGE 电泳验证后,通过透析逐步降低尿素浓度,重新使蛋白复性,并进行超滤浓缩。

1.2.5 scFv 及串联 scFv 定量 采用 BCA 法测定 scFv 及串联 scFv 蛋白浓度。将标准品倍比稀释后,绘制标准曲线。根据说明书推荐,A:B= 50:1 制成 AB 混合液。空白孔调零后,每个样本两个复孔,每孔加 10 μL 蛋白和 200 μL AB 混合液。37℃避光显色 30 min 后,使用 synergy2 多模微板阅读器读取 562 nm 处的光密度值。根据标准曲线计算相应浓度,并将蛋白于-80℃储存。

1.2.6 scFv 及串联 scFv 亲和力测定 首先在 96 孔酶联测定板上分别包被 0.5 和 1 μg/mL PLGF 抗原各 100 μL,4℃孵育过夜,第二天用 PBST(0.05% Tween-20 的 1×PBS)洗液在自动洗板机上洗涤微孔板。向每孔中加入 250 μL 5%BSA 封闭缓冲液,37℃孵育 2 h 后,清洗酶标板。实验分为两组,实验组添加 4 种串联 scFv,对照组添加 335 和 7A10 scFv,最大浓度均为相同浓度(3.8×10^{-7} mol/L)并进行 11 个梯度的倍比稀释,每组均设置空白孔,孵育 2 h,再次清洗后分别加入 HRP 标记的 His 标签抗体,孵育 1 h 后彻底洗涤。每孔各加入 HRP 底物(TMB)37℃避光显色 30 min,使用 Perkin Elmer Victor nivo 多功能酶标仪读取 450 nm 处的光密度值。当连续几个稀释度的 OD450 读数不再增大时,视为与抗体 100%结合,按照下列公式计算 scFv 的亲合常数^[13]:

$$\text{亲和常数} = (n-1)/(n \times Ab' - Ab)。$$

其中 Ab 为包被高浓度抗原(Ag)时,OD450 值达最大值一半时的 scFv 浓度;Ab' 为包被低浓度抗原(Ag')时,OD450 nm 值达最大值一半时的 scFv 浓度; $n=Ag/Ag'$ 。

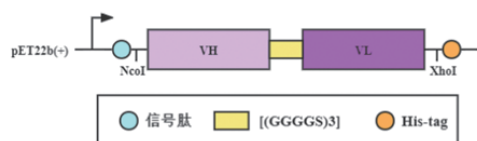
1.3 统计学处理 符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用医学统计软件 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析。Shapiro-Wilk 检验对统计结果进行正态分布、方差齐性检查。单因素 ANOVA 方差分析对多组数据进行比较,组间比较采用 Dunnett-t 检验。所

有实验至少重复3次。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 scFv 及串联 scFv 表达质粒的构建 图1为亲本 scFv 质粒构建的模式图。选择 pET22b(+)载体上 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切位点将目的序列插入,构成以信号肽-VH-linker(GGGGS)₃-VL-His-tag 为序列的目标片段。

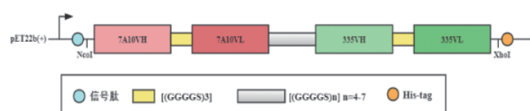
使用 pymol 软件的 measurement 方法选定氨基酸,对模型上所有可能的不重合表位间线性距离进行测量,得到两距离最远表位间最大直线距离约为 109Å,并综合 scFv 单体直径,进一步设计串联 scFv 间最大 linker 长度,即:linker 设计为(GGGGS)_n,当 $n=7$ 时可以完全覆盖最大的表位范围,并依次设计 $n=6, 5, 4$ 长度的 linker,串联 scFv 质粒构建模式图如图2所示。



注:VH:抗体重链可变区;VL:抗体轻链可变区;*Nco* I 和 *Xho* I:载体上酶切位点;(GGGGS)₃:scFv 单体 VH 与 VL 间 linker;His-tag:可翻译为6个组氨酸残基组成的序列,用于后续纯化时与镍柱整合

图1 scFv 质粒构建模式图

Fig 1 Model diagram of scFv plasmid construction

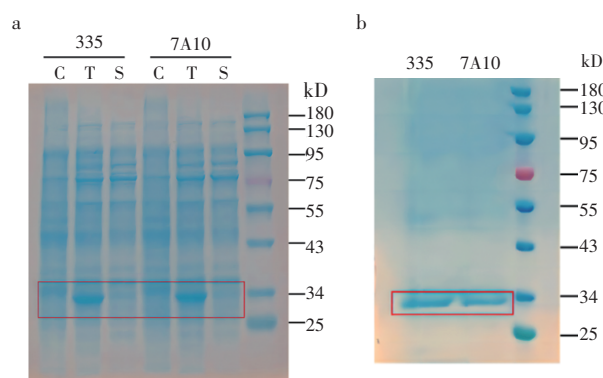


注:VH:抗体重链可变区;VL:抗体轻链可变区;*Nco* I 和 *Xho* I:载体上酶切位点;(GGGGS)₃:scFv 单体 VH 与 VL 间 linker 长度;(GGGGS)_n:两 scFv 单体构成的串联 scFv 间不同的 linker 长度;His-tag:可翻译为6个组氨酸残基组成的序列,用于后续纯化时与镍柱整合

图2 串联 scFv 质粒构建模式图

Fig 2 Model diagram of tandem scFv plasmid construction

2.2 scFv 融合蛋白表达 经原核系统表达后,结果如图3a所示,在红色方框内已标出相应目的大小的两种亲本 scFv 融合蛋白。观察发现,pET22b(+)/scFv 重组质粒成功在大肠杆菌 shuffle T7B 中表达目的蛋白。通过对比 SDS-PAGE 胶上蛋白条带深浅,观察蛋白在上清液及沉淀物中的相应含量,并与对照组相比,发现蛋白主要以包涵体的形式存在于菌体沉淀中。通过 GE AKTA 层析系统镍亲和层析纯化柱纯化后,如图3b所示,两种 scFv 对应泳道均为单一条带,得到大小分别为 56.1、56.4、56.7、57.0 kD 的串联 scFv 融合蛋白,对其逐渐降低尿素浓度梯度进行复性。通过超滤浓缩后,应用 BCA 测定浓度,335 和 7A10 scFv 浓度分别为 350、500 μg/mL。

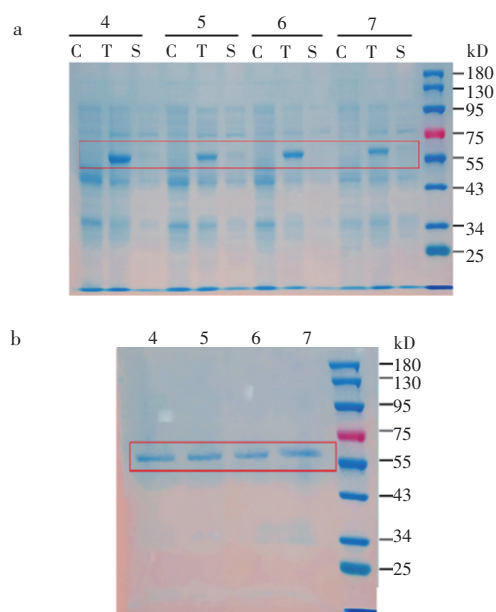


注:a:两种 scFv 融合蛋白表达;b:两种 scFv 融合蛋白纯化后结果;C:诱导前细菌沉淀;T:诱导后细菌沉淀;S:诱导后细菌上清;335:335 scFv 融合蛋白;7A10:7A10 scFv 融合蛋白

图3 两种 scFv 融合蛋白纯化前后的表达

Fig 3 Expression of two scFv fusion proteins before and after purification

2.3 串联 scFv 融合蛋白表达 pET22b(+)/串联 scFv 重组质粒成功在大肠杆菌 shuffle T7B 中表达目的蛋白。结果如图4a红色方框内所示,观察蛋白在上清液及沉淀物中的相应表达量,并与对照组相比,发现蛋白主要以包涵体的形式存在于菌体沉淀中。AKTA 层析系统镍亲和层析纯化柱纯化后,如图4b所示,4种串联 scFv 对应泳道均为单一条带,得到大小分别为 56.1、56.4、56.7、57.0 kD 的串联 scFv 融合蛋白,对其逐渐降低尿素浓度梯度进行复性。通过超滤浓缩后,BCA 测定浓度,4种串联 scFv 浓度分别为 280、300、250、340 μg/mL。



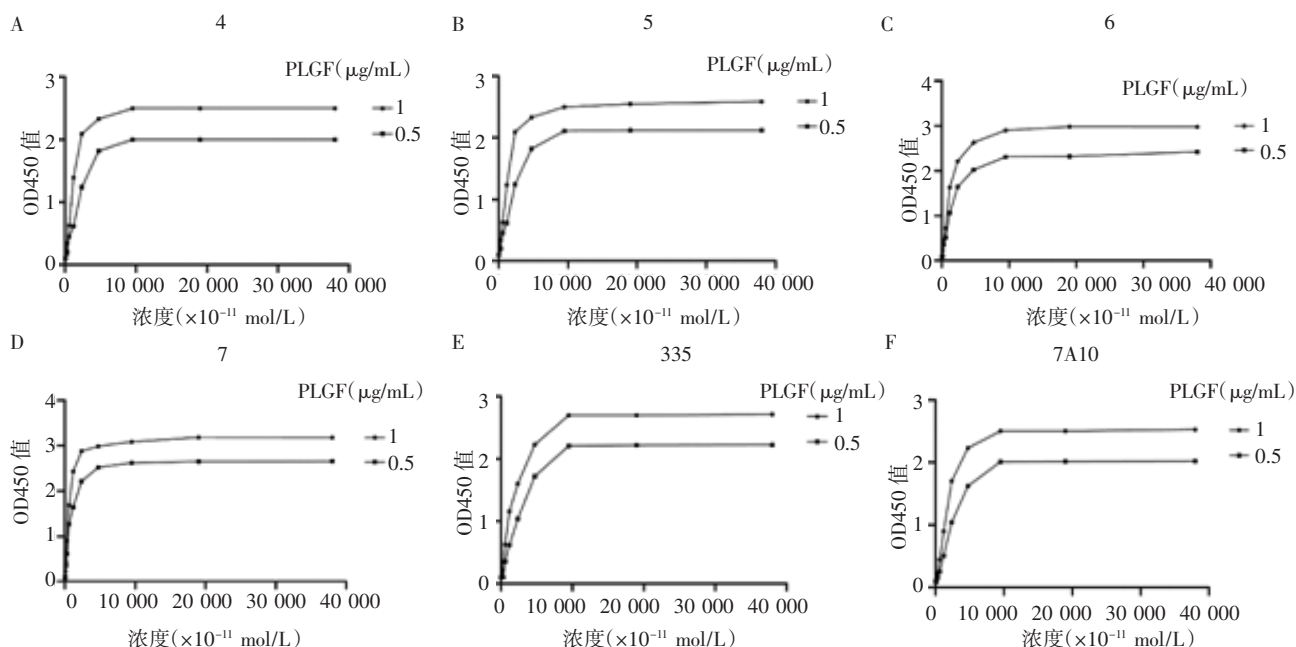
注:a:4种串联 scFv 融合蛋白表达;b:4种串联 scFv 融合蛋白纯化后结果;C:诱导前细菌沉淀;T:诱导后细菌沉淀;S:诱导后细菌上清;4、5、6、7:串联 scFv 间 linker(GGGGS)_n, $n=4, 5, 6, 7$ 时的串联 scFv 融合蛋白

图4 4种串联 scFv 融合蛋白纯化前后的表达

Fig 4 Expression of four tandem scFv fusion proteins before and after purification

2.4 scFv 及串联 scFv 亲和力测定 将各组间接 ELISA 测定结果绘图,如图 5A~F 所示。实验组为 4 种串联 scFv,对照组为两亲本抗体 335、7A10,各组空白孔 OD450 值均在 0.13 以下。将 3 次重复实验结果依次构建方程,代入公式计算得到 $\text{linker}(\text{GGGS})_n$, $n=4,5,6,7$ 时串联 scFv 亲和常数依次为: $(2.717 \pm 0.042) \times 10^7 \text{ L/mol}$ 、 $(2.747 \pm 0.055) \times 10^7 \text{ L/mol}$ 、 $(3.577 \pm 0.021) \times 10^7 \text{ L/mol}$ 、 $(5.247 \pm 0.021) \times 10^7 \text{ L/mol}$ 。335 和 7A10 scFv 的亲和常数分别为: $(2.597 \pm 0.025) \times 10^7 \text{ L/mol}$ 、 $(2.667 \pm 0.021) \times 10^7 \text{ L/mol}$ 。使用单因素

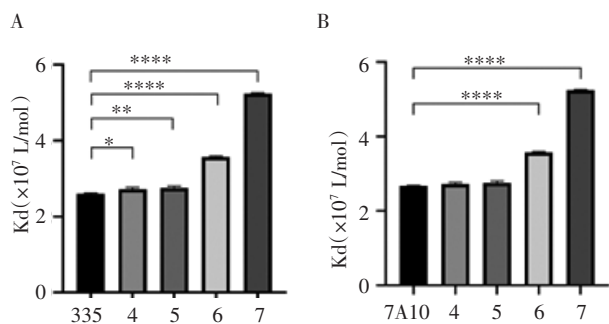
ANOVA 将 4 种串联 scFv 分别与 335、7A10 亲本间亲和常数进行比较,其相应的亲和常数较亲本均有不同程度提高 ($F=2\ 979, 3\ 012$, 均 $P<0.000\ 1$)。Dunnett- t 检验结果如图 6A、6B 所示,相较于亲本 335、7A10,当 linker 长度 $n=6$ 时,其对应亲和常数较亲本有明显升高 ($t_{335}=33.90, t_{7A10}=32.00$, 均 $P<0.000\ 1$); 并且当 linker 长度 $n=7$ 时,亲和常数的提升更为显著 ($t_{335}=91.68, t_{7A10}=90.71$, 均 $P<0.000\ 1$), 并且当 $n=7$ 时,串联 scFv 的亲和力分别是 7A10、335 亲本 scFv 的 1.97、2.02 倍。



注: A~D: 4 种串联 scFv 亲和力测定; E~F: 亲本 scFv335、7A10 亲和力测定; 4、5、6、7: 串联 scFv 间 linker(GGGS)_n, $n=4, 5, 6, 7$ 时的串联 scFv 融合蛋白亲和力测定; 335、7A10: 亲本 scFv 融合蛋白亲和力测定

图 5 4 种串联 scFv 和亲本 scFv335、7A10 亲和力测定

Fig 5 Assays of four tandem scFv affinity and scFv 335, 7A10 affinity



注: * $P<0.05$; ** $P<0.01$; **** $P<0.000\ 1$; 4、5、6、7: 串联 scFv 间 linker (GGGS)_n, $n=4, 5, 6, 7$ 时的串联 scFv 融合蛋白的亲和常数; 335、7A10: 亲本 scFv 融合蛋白的亲和常数

图 6 串联 scFv 与 335、7A10 scFv 亲和常数比较

Fig 6 Comparison of Tandem scFv and 335, 7A10 scFv affinity constant

3 讨论

由于 scFv 具有单克隆抗体的特异性, 同时兼顾分子量小、易于制备、易于改造的特性, 近些年被应用于体外检测与体内治疗领域。研究者通过 linker 分别连接两个不同 scFv 单体的 N 端与 C 端^[14], 构成了结合同抗原不同表位的串联 scFv。其 linker 的长度不仅需要保证两 scFv 单体间无空间位阻的影响, 还需满足两表位间距离的要求, 使 scFv 单体可以分别与对应的抗原表位结合, 并处于优势对接姿势。研究者发现, 当串联 scFv 与同一抗原上不同表位结合时, 其亲和力会优于 scFv 单体^[15], 如 Fleetwood 等^[16]设计的可以结合血管内皮生长因子受体双表位的串联 scFv, 其亲和力相较于亲本 scFv 有明显提升。目前, 针对已知较近距离的表位, 研究者通常会选

择将 linker 的长度设置为(GGGGS)₄^[17],以满足串联 scFv 的灵活性及表位距离需求。有研究者进一步研究发现,针对距离较近表位的串联 scFv,其 linker 长度设置为(GGGGS)₁的亲合力要优于(GGGGS)₈,这意味着串联 scFv 的 linker 长度需适宜,linker 长度过长也不利于串联 scFv 亲和力的提升^[11]。

研究通过预测两表位间最大可能的范围,设计串联 scFv 间不同长度的 linker。Linker 长度在满足距离的同时,其两端会分别连接 scFv 单体 7A10 VL 的 C 端与 335 VH 的 N 端,恰当的 linker 长度可以在 scFv 单体分别与相应抗原表位对接时,提高串联 scFv 的灵活性^[18],维持与抗原表位的结合能力^[17,19]。实验发现,串联 scFv 间 linker 长度 $n=4,5$ 时,其亲合力较亲本 scFv 提升不明显,但随着串联 scFv 间 linker 长度的增加, $n=6,7$ 时的亲合力较 $n=4,5$ 时出现了明显提升,表明 PLGF 上两个不同的抗原表位可能彼此距离相对较远,linker 长度不足可能会阻碍串联 scFv 中某一 scFv 可变区与其表位的结合;同时 $n=6$ 时亲合力较两 scFv 亲本单体出现了明显提升,意味着在 $n=6$ 时,串联 scFv 上相应的 scFv 单体已经可以和对应表位进行结合。进一步设计 linker 长度 $n=7$,通过使 linker 长度适当延长,可以进一步提升串联 scFv 的灵活性,从而使 scFv 单体与相应表位处于较好的对接构象,进一步提升串联 scFv 的亲合力。有研究证明,随着亲和力的提升,检测的灵敏度也会相应提升^[5],但由于特异性并不是本篇文章研究的重点,故本次研究尚未涉及。

本研究通过预测表位范围设计串联 scFv 间 linker 的长度,成功表达针对同一抗原的串联 scFv,相较于亲本 scFv 亲合力有明显提升,为串联 scFv 亲和力的提升提供了新的思路。

参考文献:

- [1] LIM S, LI W, KEMPER J, et al. Biomarkers and the prediction of adverse outcomes in preeclampsia: a systematic review and meta-analysis[J]. *Obstet Gynecol*, 2021, 137(1): 72–81.
- [2] GUBENSEK J, PONIKVAR R, PREMUR SRSEN T, et al. Treatment of preeclampsia at extremely preterm gestation with therapeutic plasma exchange[J]. *Clin Nephrol*, 2021, 96(1): 101–106.
- [3] SHAMS N, KHOSHINAT NIKKHOI S, GU Z, et al. Isolation and characterization of human anti-CD20 single-chain variable fragment (scFv) from a Naive human scFv library[J]. *Med Oncol*, 2022, 39(11): 177.
- [4] 陈佳, 郭静, 韩悦, 等. 联合检测妊娠早中期孕妇血清 PAPP-A、PLGF 及子宫动脉血流参数预测子痫前期的临床意义[J]. *解放军医药杂志*, 2021, 33(2): 60–64.
- [5] GORRIS H H, BADE S, ROCKENDORF N, et al. Pushing antibody-based labeling systems to higher sensitivity by linker-assisted affinity enhancement[J]. *Bioconjug Chem*, 2011, 22(8): 1619–1624.
- [6] BEMANI P, MOHAMMADI M, HAKAKIAN A. ScFv improvement approaches[J]. *Protein Pept Lett*, 2018, 25(3): 222–229.
- [7] LIU C, KOBASHIGAWA Y, YAMAUCHI S, et al. Preparation of single-chain Fv antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli* by simplified and systematic chaperone optimization[J]. *J Biochem*, 2019, 166(6): 455–462.
- [8] NAVABI P, GANJALIKHANY M R, JAFARI S, et al. Designing and generating a single-chain fragment variable (scFv) antibody against IL2R α (CD25): an *in silico* and *in vitro* study[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2021, 24(3): 360–368.
- [9] ARSLAN M, KARADAG M, ONAL E, et al. Effect of non-repetitive linker on *in vitro* and *in vivo* properties of an anti-VEGF scFv[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 5449.
- [10] YANG M, TANG X, ZHANG Z, et al. Tandem CAR-T cells targeting CD70 and B7-H3 exhibit potent preclinical activity against multiple solid tumors[J]. *Theranostics*, 2020, 10(17): 7622–7634.
- [11] FLEETWOOD F, GULER R, GORDON E, et al. Novel affinity binders for neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(8): 1671–1683.
- [12] DE AGUIAR R B, DA SILVA T A, COSTA B A, et al. Generation and functional characterization of a single-chain variable fragment (scFv) of the anti-FCF2 3F12E7 monoclonal antibody[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 1432.
- [13] LOOMANS E E, ROELEN A J, VAN DAMME H S, et al. Assessment of the functional affinity constant of monoclonal antibodies using an improved enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *J Immunol Methods*, 1995, 184(2): 207–217.
- [14] WU X, DEMAREST S J. Building blocks for bispecific and trispecific antibodies[J]. *Methods*, 2019, 154: 3–9.
- [15] ZHOU H X. Quantitative account of the enhanced affinity of two linked scFvs specific for different epitopes on the same antigen [J]. *J Mol Biol*, 2003, 329(1): 1–8.
- [16] FLEETWOOD F, KLINT S, HANZE M, et al. Simultaneous targeting of two ligand-binding sites on VEGFR2 using biparatopic affibody molecules results in dramatically improved affinity [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 7518.
- [17] WATANABE Y, TANABE A, HAMAKUBO T, et al. Development of biparatopic bispecific antibody possessing tetravalent scFv-Fe capable of binding to ROBO1 expressed in hepatocellular carcinoma cells [J]. *J Biochem*, 2021, 170(2): 307–315.
- [18] ASANO R, KUROKI Y, HONMA S, et al. Comprehensive study of domain rearrangements of single-chain bispecific antibodies to determine the best combination of configurations and microbial host cells[J]. *MAbs*, 2018, 10(6): 854–863.
- [19] KORN T, NETTELBECK D M, VOLKEL T, et al. Recombinant bispecific antibodies for the targeting of adenoviruses to CEA-expressing tumour cells: a comparative analysis of bacterially expressed single-chain diabody and tandem scFv[J]. *J Gene Med*, 2004, 6(6): 642–651.

(2022-07-18 收稿)