

高致病性禽流感病毒 H5N1 中和抗体的单链抗体构建与活性鉴定 Preparation and Identification of a Single-chain Antibody Fragment Against High Pathogenic H5N1 Avian Influenza Virus

方 钟¹, 罗文新¹, 王明桥¹, 陈瑛炜¹, 张 军¹, 陈鸿霖^{2,3}, 管 轶^{2,3}, 夏宁邵^{1*}

FANG Zhong¹, LUO Wen-Xin¹, WANG Ming-Qiao¹, CHEN Ying-Wei¹, ZHANG Jun¹, CHEN Hong-Lin^{2,3}, GUAN Yi^{2,3} and XIA Ning-Shao^{1*}

¹ 厦门大学 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室
生命科学学院, 厦门 361005

² 汕头大学医学院 汕港联合流感中心, 汕头 515031

³ 香港大学微生物系 新发传染病国家重点实验室 香港

¹ National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, Key Laboratory of Education Minister for Cell Biology and Tumor Cell Engineering of Xiamen University, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

² Joint Influenza Research Center (SUMC & HKU), Medical College of Shantou University, Shantou 515031, China

³ State Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Department of Microbiology, The University of Hong Kong, Pokfulam, Hong Kong SAR, China

摘 要 在本实验室研制出的多株针对 H5N1 血凝素的鼠单抗中, 10F7 对 34 株 H5N1 病毒株都有血凝抑制和中和活性, 具有特异性高、反应性强、识别谱广的特点。通过基因工程构建 10F7 单链抗体 (scFv) 表达重组质粒, 在大肠杆菌中表达并纯化 scFv, 经血凝抑制实验及中和实验检测其活性。结果在针对 3 株病毒的血凝抑制实验中, 10F7 scFv 蛋白对其中 2 株 H5N1 病毒均显示出结合活性, 而对 H9 毒株没有反应。在针对 7 株 H5N1 病毒的中和实验中, 10F7 scFv 对 5 株病毒具有较好的中和能力。H5N1 广谱中和抗体 10F7 的单链抗体构建, 为进一步研制针对 H5N1 禽流感病毒的治疗性抗体奠定了基础。

关键词 高致病性禽流感病毒, 单链抗体, 血凝抑制, 中和实验

中图分类号 Q945 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)02-0292-05

Abstract Previously, an mAb 10F7 was developed against H5N1 hemagglutinin, which was highly specific to 34 different H5N1 strains and showed good neutralizing activity. In the present study, the single-chain fragment of the antibody was cloned into a prokaryotic vector and then expressed in *E. coli*. The activity of the scFv was tested in hemagglutination inhibition and neutralization experiment. Two H5N1 virus strains were inhibited to bind erythrocyte cells by the scFv while the H9 virus was not. Also, five H5N1 virus strains were neutralized during infecting MDCK cells. These results showed an approachable method for developing therapeutic antibody to H5N1 virus.

Key words high pathogenic avian influenza virus, single-chain fragment, hemagglutination inhibition, neutralization test

Received: September 11, 2006; Accepted: November 6, 2006.

This work was supported by the grants from the National Special Projects on AIV Prevention and Therapy (No. 2004BA519A73), the National High Technology Research and Development Program (No. 2003AA2Z3539), the Key S&T Projects of Fujian Province (No. 2005Y020), the Key S&T Projects of Fujian Province (No. 2004YZ01-1), and the Science and Technology Projects of Xiamen (No. 3502Z20055002).

* Corresponding authors. Tel: +86-592-2184110; Fax: +86-592-2181258; E-mail: nsxia@xmu.edu.cn

国家禽流感防治专项(No.2004BA519A73) 国家自然科学基金(No.30640017) 福建省科技重点项目(No.2005Y020) 福建省科技重大专项(No.2004YZ01-1) 教育部跨世纪优秀人才培养计划 厦门市科技计划项目(No.3502Z20055002)

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

禽流感是由 A 型流感病毒(avian influenza viruses ,AIV)引起的一种禽类呼吸系统性疾病。根据表面抗原血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)的不同 ,A 型流感病毒通常又可以分为若干亚型。近年来 ,H5N1 亚型禽流感病毒世界范围内的广泛传播 ,造成了无数家禽和野生鸟类的死亡。1997 年 ,香港出现了首例 H5N1 禽流感病毒直接由鸡传播到人的事件^[1]。据世界卫生组织(WHO)统计从 2003 年到 2006 年 6 月 20 日 ,共 228 人感染了 H5N1 亚型禽流感病毒 ,其中 130 人死亡 ,死亡率达 57%。2006 年 6 月 24 日 ,WHO 宣布证实了在印度尼西亚的一起人传人禽流感事件。这是继 SARS 之后 ,传染病给全球公共卫生安全带来的一个巨大挑战。

HA 是一种病毒糖蛋白 ,以三聚体形式存在于病毒囊膜表面 ,在病毒吸附、穿膜及决定病毒的宿主特异性和致病力方面均起着相当关键的作用 ,是病毒最主要的表面抗原及有效的抗体中和位点^[2]。本实验室利用杂交瘤技术和血凝抑制试验法(hemagglutination inhibition ,HI)筛选多株针对 HA 的鼠单

抗^[3] ,其中 10F7 对 34 株 H5N1 病毒株都有血凝抑制和中和活性 ,具有特异性高、反应性强、识别谱广的特点。我们利用小分子抗体技术对 10F7 鼠单抗进行改造 ,得到了具有较好活性和特异性的单链抗体(scFv) ,为进一步研制针对 H5N1 禽流感病毒的治疗性抗体奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、单抗、细胞、质粒、病毒

大肠杆菌菌株 DH5 α 、ER2566 由本实验室保存。单抗及分泌 10F7 单抗的鼠杂交瘤细胞系由本实验室制备。pMD18-T 载体购自大连 TaKaRa 公司 ,表达载体 pTO-T7 由本实验自行构建^[4]。所有病毒株均由香港大学微生物系管轶教授惠赠。

1.2 试剂

Taq 聚合酶、各种限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶均购自大连 TaKaRa 公司。Trizol 购自 Roche 公司。PCR 回收试剂盒购自上海华舜公司。寡核苷酸引物由上海博亚生物技术有限公司合成(表 1)。

表 1 PCR 引物名称及序列
Table 1 Names and sequences of PCR primers

Primer	Sequence
MuIgVH5'-B1	5'-ATG(A/G)AATG(C/G)AC(C/G)CTGGG(C/T)(A/T)(C/T)CTCT-3'
MVHR	5'-CCAGGG(A/G)CCA(A/G)(G/T)GGATA(A/G)ACT(A/G)TGG-3'
MuIgkVL5'-F2	5'-CGACATGG(A/G)TCC(A/T)CA(C/G)CTCAGTTCCTTG-3'
MVKR	5'-ACTGGATGGTGGGAAGATGGA-3'
10F7VHF	5'-TTTGAATTCCAGGTCCAAGTCAGCAG-3'
10F7VHR	5'-GCTACCACCCCTCCAGATCCGCCACCTCCCGATGATACGGTGACCG-3'
10F7VKF	5'-ATCTGAGGGGGTGGTAGCGGTGGAGCGGGAGTGACATCTGATGACCCAA-3'
10F7VKR	5'-TTTCTCGAGCGGTTTGATTCCAGCTTG-3'

1.3 鼠单抗 10F7 轻重链可变区基因的克隆

收集半贴壁培养的 10⁷ 个 10F7 鼠源杂交瘤细胞 ,采用 Trizol 法提取总 RNA ,并以 Oligo(dT)₍₁₂₋₁₈₎ (Promega)为引物反转录成 cDNA。根据 Novagen 公司的 Ig-Prime 试剂盒的引物序列设计合成 33 条引物 ,根据 RT-PCR 法分离抗体可变区基因。用 MuIgVH5'-B1/MVHR 引物对 ,扩增出抗体重链可变区基因。用 MuIgkVL5'-F2/MVKR 引物对 ,扩增出抗体轻链可变区基因。回收扩增产物 ,克隆至 pMD18-T 载体中。

1.4 scFv 表达载体的构建

通过在重链反向引物和轻链正向引物 5' 端设计具有部分重叠的连接区域 ,进行轻链重链基因的融合^[5]。首先 ,分别利用引物 10F7VHF/10F7VHR、10F7VKF/10F7VKR 扩增出 VH、VL 片段 ,回收 ,再以这两个片段互为引物及模板 ,在新的 PCR 系统中进

行重叠延伸 ,得到少量完整的 scFv 基因片段。而后 以此完整基因为模板、10F7VHF/10F7VKR 为引物进行大量扩增。回收 750bp 左右扩增带 ,经限制性内切酶 *Eco*R I / *Xho* I 处理后 ,连接到用相同限制性内切酶处理过的 pTO-T7 载体上。

1.5 scFv 蛋白的表达与复性

将连接重组后的质粒转化大肠杆菌 ER2566 感受态细胞 ,涂板 ,培养过夜。挑取单克隆菌落接种至 LB 液体培养基 ,振荡培养至吸光度 OD₆₀₀ 为 0.8 ~ 1.0 ,加入 IPTG 诱导 4h。离心收集菌体 ,超声裂解 ,2% Triton 重悬沉淀 ,离心弃上清 ,重复 1 次。以 2、4、8mol/L 尿素依次重悬沉淀 ,离心收集上清 ,SDS-PAGE 电泳鉴定。对溶于尿素的 scFv 蛋白进行透析复性。设置梯度尿素浓度的 PBS 缓冲液 ,每次透析 4h 后 转至下一浓度较低缓冲液 ,直至不含尿素的 PBS 缓冲液^[6]。

1.6 血凝抑制(HI)滴度的测定

病毒调配、血凝抑制、细胞选择、细胞微孔板中和实验均按照 WHO 流感实验标准方法操作(<http://www.who.int/csr/resources/publications/csrpublications/en/index8.html>)。

首先测定病毒 HAU 值,调配 8AD 病毒,通过病毒与 0.5% 重悬于 PBS 的鸡红细胞血凝反应验证 8AD 病毒液。scFv 活性鉴定具体如下:血凝板中每孔加入 25 μ L PBS,在第一孔中加 25 μ L scFv 溶液(50 μ g/mL)并混匀,取 25 μ L 到第二孔,如此向后倍比稀释至最后一孔,弃 25 μ L。与等体积 AIV 室温孵育 30min,加入 0.5% 鸡红细胞 50 μ L,室温孵育 30min,观察是否出现红细胞凝集。

1.7 细胞微孔板中和实验鉴定 scFv 蛋白中和活性

用 MEM 细胞培养液对 scFv 蛋白(50 μ g/mL)进行倍比稀释,稀释后每一浓度体积为 40 μ L,与 40 μ L AIV 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h。前一天接种至 96 孔细胞培养板的 MDCK 细胞,以培养液洗涤 1 次,每孔加入 35 μ L 病毒与 scFv 混合物,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育 1 h,弃去上清,加入正常 MEM 培养液,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 72h。取上清,血凝抑制实验检测是否有病毒存在。

2 结果

2.1 VH、VL 序列的获得与 scFv 基因的构建

从 10F7 鼠源杂交瘤细胞中提取总 RNA,并反转录成 cDNA,以此 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增所得 DNA 片段连接至 pMD18-T 载体,送上海博亚生物技术有限公司测序,得到 369 bp 与 324 bp 的序列,通过 NCBI 序列比对确认为抗体 VH、VL 基因,抗体互补决定区(complementary determinant region, CDR)通过 IMGT/V-QUEST (<http://imgt.cines.fr/textes/vquest/>)进行确定(表 2)。而后,VH 与 VL 经过 PCR 扩增使得 VH 3'端与 VL 5'端通过引物上的 linker 序列连接成 scFv 基因。

表 2 10F7 抗体轻重链抗体互补决定簇区氨基酸序列		
Table 2 Amino acid sequence of 10F7 VH and VL CDRs		
CDRs of antibody		Amino acid sequence
VH	CDR1	GYTFTSYW
	CDR2	IDPSDSYT
	CDR3	ARGGTGDFHYAMDY
VL	CDR1	QGISSN
	CDR2	HGT
	CDR3	QYVQFPYT

2.2 scFv 的表达与纯化

将含重组质粒的 ER2566 菌接种至 LB 液,37 $^{\circ}$ C 培养和 IPTG 诱导后,进行 SDS-PAGE 电泳鉴定,同时设置未诱导菌做对照(图 1-1,1-2)。经 IPTG 诱导的菌株在 30kD 左右有一蛋白表达带,与预计大小相符,经凝胶扫描分析表达蛋白占细菌总蛋白的 50% 左右。重组蛋白主要以包涵体形式存在,且溶解于 8mol/L 尿素中(图 1-3)。经过透析复性重折叠后的蛋白纯度达 95% 以上(图 1-4),吸光度 OD₂₈₀ 处测定复性蛋白浓度为 500 μ g/mL,与 8mol/L 尿素中蛋白浓度相比较,确定复性效率达 20%。

复性后蛋白在没有 SDS 的环境中进行非变性 PAGE 电泳。溶于 8mol/L 尿素的蛋白没有形成一定的空间结构,电泳条带靠近凝胶顶端(图 2-1)。复性后的蛋白在凝胶中有多种条带,显示有多种构象存在,且其中一种条带蛋白含量大(图 2-2),表明该构象在总复性蛋白中占主导地位。

在复性过程中,通常利用氧化还原系统,如氧化/还原谷胱甘肽等,使得复性蛋白中的半胱氨酸能形成正确的二硫键。但抗体可变区中半胱氨酸含量很低,因此,在本实验中即使没有氧化还原体系,也能得到较好的复性效果。

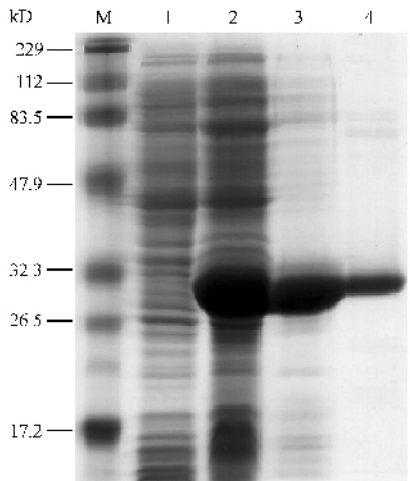


图 1 10F7 scFv 表达及纯化的 SDS-PAGE
Fig.1 12% SDS-PAGE of expression and purified sample of 10F7 scFv

M: molecular weight marker; 1: uninduced whole bacterial protein; 2: scFv expressed in whole bacterial protein; 3: scFv in 8mol/L urea; 4: refolded 10F7 scFv.

2.3 血凝抑制实验鉴定 10F7 scFv 活性

血凝抑制是目前国内外最通用的检测流感病毒及抗体的实验手段之一。我们利用该实验对 10F7 scFv 的活性进行了初步鉴定。设置 10F7 鼠单抗作

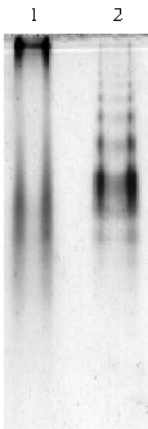


图 2 10F7 scFv 复性前后 PAGE

Fig.2 PAGE without SDS of scFv

1 : unfolded scFv in urea ; 2 : refolded scFv.

为阳性对照 ,不相关 scFv 与 PBS 作为阴性对照。鼠单抗与 scFv 均稀释至初始浓度约 50μg/mL。随机选择 H5N1 亚型毒株 DK/IDN/MS/04 及用于 10F7 鼠单抗制备的初始毒株 Ck/HK/Yu22/02 与一株 H9 亚型病毒 Ck/ST/4617/03 一起进行实验。结果如图 3 及表 3 所示 ,针对两株 H5N1 亚型病毒 ,10F7 鼠单抗的 HI 滴度分别为大于 256 和 128 倍(图 3-1、3-5) ,10F7 scFv 的 HI 滴度均为 32 倍(图 3-2、3-6)。而对于 H9 亚型毒株 ,鼠单抗与 scFv 均没有抑制活性(图 3-9、3-10) ,不相关 scFv 对三株病毒均没有显示抑制效果。实验表明 10F7 scFv 具有与原鼠单抗一致的、与 H5N1 亚型 AIV 特异结合的活性。

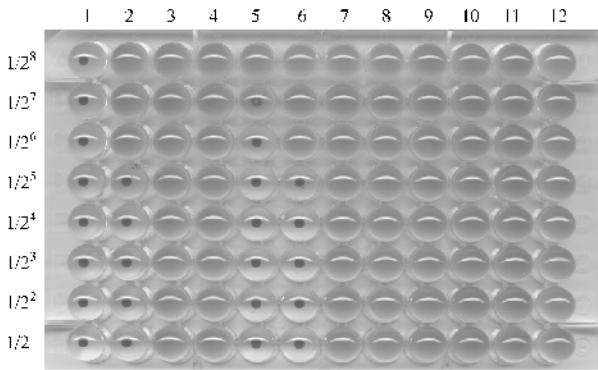


图 3 10F7 单链抗体与鼠单抗对三株病毒的血凝抑制实验

Fig.3 Hemagglutination inhibition of 3 virus strains

with 10F7 mAb and scFv

Virus strains : 1 to 4 : Ck/HK/Yu22/02 (H5) ; 5 to 8 : DK/IDN/MS/04 (H5) 9 to 12 : Ck/ST/4617/03 (H9). Antibodies : 1 , 5 , 9 : mAb of 10F7 ; 2 , 6 , 10 : scFv of 10F7. Control : 3 , 7 , 11 : unrelated scFv ; 4 , 8 , 12 : PBS.

表 3 10F7 单链抗体血凝抑制实验结果

Table 3 Hemagglutination Inhibition Result of 10F7 scFv				
Virus strain	scFv of 10F7	mAb of 10F7	unrelated scFv	PBS
Ck/HK/Yu22/02	32	> 256	< 1	< 1
DK/IDN/MS/04	32	128	< 1	< 1
Ck/ST/4617/03	< 1	< 1	< 1	< 1

2.4 10F7 scFv 中和活性测定

本实验室现有的 7 株病毒涵盖了 2002 年至 2006 年期间 ,在香港、印尼、青海等地 ,从鸡、鸭及数种野生鸟类中分离到的毒株 ,具有一定代表性。我们利用这 7 株病毒检测了 10F7 scFv 的中和活性。由表 4 的中和实验结果可知 ,10F7 scFv 对其中 5 株病毒都表现出了较好的中和活性。针对 Ck/HK/Yu22/02 毒株 ,scFv 经 64 倍稀释后仍然能够抑制病毒感染细胞。对于 CK/IDN/2A/04、DK/IDN/MS/04、BhGs/QH/15/05、CP Heron/HK/18/05 毒株 ,中和活性的稀释倍数分别可以达到 32、16、16、8 倍 ,中和识别谱具有一定的广泛性。

表 4 10F7 scFv 中和实验结果

Table 4 Neutralization test result of 10F7 scFv	
Virus strain	Dilution of 10F7 scFv
CK/HK/Yu22/02	64
DK/IDN/MS/04	16
CK/IDN/2A/04	32
BhGs/QH/15/05	16
CK/HK/213/03	< 1
CP Heron/HK/18/05	8
Oriental Magpie Robin/HK/366/2006	< 1

3 讨论

目前 ,关于禽流感的治疗研究主要集中在体外表达 HA 开发 AIV 疫苗。虽然原核表达是一种相对比较成熟的技术 ,也有不少相关实验取得了成功^[7] ,但由于 HA 是糖蛋白 ,而原核系统不能糖基化等缺陷 ,这些研究得到的 HA 原核表达蛋白仅适于开发诊断试剂^[7,8] ,并不能作为疫苗。流感病毒变异频繁 ,是研制灭活疫苗的难题 ,接种灭活疫苗可能无法保护个体免受变异后病毒的感染 ,且灭活疫苗存在一定安全隐患 ,因此 ,临床上还没有可利用的疫苗对抗新出现的人禽流感病毒的感染。国内外的另一个研究方向是重组病毒疫苗 ,将 HA 蛋白展示到低致病性或没有致病性的病毒表面 ,形成类病毒颗粒。因为展示在病毒表面的 HA 能够糖基化并形成正确的蛋白构象 ,这样的研究受到了大多数研究者的青睐。现在 ,常用的展示 HA 的病毒主要有杆状病毒^[9]、鸟痘病毒^[10,11]和新城疫病毒^[12] ,这些研究在保护禽类免受 AIV 感染的实验中取得了理想效果。

然而, AIV 具有高传染性, 各种家禽、野生鸟类、不同年龄不同性别的人都可能成为易感对象, 所以这些重组病毒疫苗就必须面对成本过高的问题。而且, 疫苗所能够起到的作用只是保护机体免受病毒侵犯, 而 AIV 具有高死亡率的特点, 一旦人类遭受感染, 生命安全将受到严重威胁。

抗体在保护机体免受 AIV 感染中扮演着重要的角色^[13]。到目前为止, 美国 FDA 共批准了 24 个用于疾病治疗的抗体药物上市。全球有超过 200 家公司正在研发治疗用抗体药物, 约有 335 个产品正在研发中, 其中 100 多个已进入临床研究。我国起步较晚, 目前仅 3 个自研的抗癌抗体 I 类新药的上市。scFv 是具有抗体的轻重链可变区的蛋白, 保留了完整抗体的特异性。相对于完整抗体而言, 小分子的 scFv 蛋白在血液内更容易被清除, 组织穿透力却更强^[14, 15]。抗体 Fc 段的缺失会降低可变区的亲和力^[16], 但是 Fc 段的缺失使得 scFv 在人或禽体内的免疫源性远远低于鼠单抗。

血凝素在病毒中变异速度非常快, 通过突变与抗体的结合区域的氨基酸, 或者改变表面糖链分子的分布, 会降低 HA 与抗体之间的反应^[17, 18], 成为相关研究的一大难题。本研究选择改造的鼠单抗 10F7, 是通过以同源性最保守的代表性 H5N1 病毒株 Ck/HK/YU22/02 作为免疫源得到的, 对 34 株 H5N1 病毒均具有中和活性。原核表达的 10F7 scFv 包涵体蛋白, 经透析复性形成正确的构象, 在 HI 和中和实验中均显示了较好的活性与特异性。虽然 scFv 表现出的与病毒的结合活性仍然比完整的鼠单抗弱, 但是我们可以直接将其进一步改造成嵌合抗体或人源化抗体, 得到完整的治疗性抗体^[15], 为高致病性 H5N1 禽流感疾病的治疗及禽流感大规模流行的控制奠定基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Subbarao K, Klimov A, Katz J, et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*, 1998, **279**: 393–396.
- [2] Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza. *Lancet*, 2003, **362**(9397): 1733–1745.
- [3] Chen YX(陈毅歆), Luo HF(罗海峰), Ge SX(葛胜祥), et al. Development and characterization of MAb against haemagglutinin of highly pathogenic H5 avian influenza virus. *Chinese Journal of Virology*(病毒学报), 2005, **21**(6): 421–427.
- [4] Luo WX(罗文新), Zhang J(张军), Yang HJ(杨海杰), et al. Construction and application of an *Escherichia coli* high effective expression vector with an enhancer. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2000, **16**(5): 578–581.
- [5] Horton RM, Hunt HD, Ho SN, et al. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, 1989, **77**: 61–68.
- [6] Philip H Tan, Brenda M Sandmaier, Patrick S Stayton. Contributions of a highly conserved VH/VL hydrogen bonding interaction to scFv folding stability and refolding efficiency. *Biophysical Journal Volume*, 1998, **75**: 1473–1482.
- [7] Zheng QS(郑其升), Zhang XY(张晓勇), Liu HL(刘华雷), et al. The prokaryotic expression and the establishment of the putative indirect ELISA assay for the HA gene for Avian influenza virus (AIV) H5N1 subtype. *Acta Microbiologica Sinica*(微生物学报), 2005, **45**(1): 58–61.
- [8] Yu ZX(喻正军), Jin ML(金梅林), Xu XX(徐晓娟), et al. A latex agglutination test for detection of hemagglutinin serum antibodies to H5 avian influenza virus in chicken. *Acta Microbiologica Sinica*(微生物学报), 2005, **45**(6): 942–946.
- [9] Yu C Hu, Yu L Luo, Wen T Ji, et al. Dual expression of the HA protein of H5N2 avian influenza virus in a baculovirus system. *Journal of Virological Methods*, 2006, **135**: 43–48.
- [10] Kemal Karaca, David E Swayne, Deborah Grosenbaugh, et al. Immunogenicity of fowlpox virus expressing the avian influenza virus H5 gene (TROVAC AIV-H5) in cats. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2005, **12**(11): 1340–1342.
- [11] Qiao CL, Yu KZ, Jiang YP, et al. Protection of chickens against highly lethal H5N1 and H7N1 avian influenza viruses with a recombinant fowlpox virus co-expressing H5 haemagglutinin and N1 neuraminidase genes. *Avian Pathology*, 2003, **32**: 25–31.
- [12] Park MS, John Steel, Adolfo GS, et al. Engineered viral vaccine constructs with dual specificity: Avian influenza and Newcastle disease. *PNAS*, 2006, **103**(21): 8203–8208.
- [13] Gerhard W. The role of the antibody response in influenza virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, **260**: 171–190.
- [14] Colcher D, Bird R, Roselli M, et al. In vivo tumor targeting of a recombinant singer-chain antigen-binding protein. *Natl Cancer Inst*, 1990, **82**: 1191–1197.
- [15] Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, et al. Rapid tumor penetration of a singer-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res*, 1992, **52**: 3402–3408.
- [16] Chowdhury PS, Pastan I. Improving antibody affinity by mimicking somatic hypermutation in vitro. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**: 568–572.
- [17] Tsuchiya E, Sugawara K, Hongo S, et al. Effect of addition of new oligosaccharide chains to the globular head of influenza A/H2N2 virus haemagglutinin on the intracellular transport and biological activities of the molecule. *J Gen Virol*, 2002, **83**: 1137–1146.
- [18] Fleury D, Wharton SA, Skehel JJ, et al. Antigen distortion allows influenza virus to escape neutralization. *Nat Struct Biol*, 1998, **5**: 119–123.