

# 抗人 CD19 单链抗体基因的构建、表达及功能测定 Construction and Expression of Single Chain Variable Fragments ( ScFv ) Against Human CD19 Antigen

陈 森 , 饶 青 , 王 建 祥 , 王 敏 \*

CHEN Sen , RAO Qing , WANG Jian-Xiang and WANG Min \*

中国医学科学院 中国协和医科大学 血液学研究所血液病医院 , 天津 300020

Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital , Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College , Tianjin 300020 , China

**摘 要** 采用 RT-PCR 方法从分泌抗人类白细胞表面分化抗原 CD19 单克隆抗体的杂交瘤细胞中克隆出  $V_H$  和  $V_L$  可变区基因 , 再通过重叠延伸拼接 (splice-overlap extension) PCR 方法在  $V_H$  和  $V_L$  可变区基因之间引入连接肽 (Gly4Ser)<sub>3</sub> , 体外构建抗人 CD19 单链抗体 (抗 CD19-ScFv) 基因。将其克隆至表达载体 PET28a 并在大肠杆菌中表达。SDS-PAGE 和 Western-blot 分析结果表明 , 抗 CD19-ScFv 在 BL21 (DE3) 菌中获得表达 , 重组蛋白的相对分子量为 27kD , 表达产物以不溶性包涵体形式存在 , 经过溶解包涵体 , 镍柱亲和层析纯化和体外复性过程 , 获得了高纯度的单链抗体片段。流式细胞分析结果证实抗 CD19-ScFv 可与人类白细胞表面的分化抗原 CD19 结合 , 保留了鼠源性单抗与 CD19 结合活性。抗人 CD19-ScFv 的构建与表达 , 为下一步针对 B 淋巴系统恶性肿瘤的靶向治疗奠定了基础。

**关键词** CD19 , 单链抗体 (ScFv) , 原核表达

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)05-0686-06

**Abstract** The genes encoding for the light and heavy chain variable regions were cloned by RT-PCR from a murine monoclonal hybridoma cell line , which could produce monoclonal antibody to recognize CD19 antigen on human B lymphocyte. Then fused the light and heavy chain variable regions together by a short peptide linker containing 15 amino acid (Gly4Ser)<sub>3</sub> using splice-overlap extensive PCR. The recombinant anti-CD19-ScFv was subcloned into the expression vector pET28a and induced to be expressed by IPTG in *E. coli* BL21. SDS-PAGE and Western blot analysis showed that the recombinant anti-CD19-ScFv gene was expressed in *E. coli* BL21. ScFv expression was in the form of an inclusion bodies and the purified fusion protein was obtained after a series of purification steps including cell break , inclusion body solubilization , Ni<sup>2+</sup> metal affinity chromatography and protein refolding. Flow cytometry analysis showed that the ScFv can react with human CD19 antigen. In conclusion , recombinant anti-CD19-ScFv gene has been successful constructed and expressed in *E. coli* BL21 , which could provide a basic study for the future target therapy to the B lymphoid leukemia and B lymphoma.

**Key words** CD19 , ScFv , prokaryotic expression

应用基因工程抗体进行肿瘤免疫治疗是当前生物治疗的研究热点之一。CD19 分子是 B 淋巴细胞

表面的一种分化抗原<sup>[1]</sup> , 在 B 淋巴系统恶性肿瘤如急性淋巴细胞白血病、非何杰金氏淋巴瘤中广泛表

Received : April 25 , 2005 ; Accepted : July 2 , 2005 .

This work was supported by the grants from Tianjin (No.033801311) and Tianjin Natural Science Fund Key Tackle Project (No.05YFSZSF02400) .

\* Corresponding author. Tel 86-22-27307938 ~ 3169 ; E-mail : wangjxm@hotmail.com

天津市应用基础研究重点项目 (No.033801311) , 天津市科技发展计划项目 (No.05YFSZSF02400) © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

达<sup>[2]</sup>。而在造血干细胞、浆细胞、T 细胞及其他组织中则没有表达。上述特点使其成为一种理想的靶向治疗的靶点<sup>[3,4,5]</sup>。但由于鼠源性单抗具有较高的免疫原性,多次用药易产生人抗鼠抗体反应,限制了其在临床的应用。而单链抗体(ScFv)因其具有分子量小、穿透力强、能较好的保持抗原亲和性及特异性同时降低免疫原性等特点,已成为当前肿瘤免疫治疗中的一种重要手段。为此我们将鼠源性单克隆抗体经基因工程方法改造成单链抗体,并成功地在大肠杆菌中进行了功能性表达。抗 CD19 单链抗体的构建为下一步针对 B 淋巴系统恶性肿瘤的靶向治疗奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞与菌株:**抗人 CD19 单克隆抗体的杂交瘤细胞株 HI19a,由中国医学科学院血液学研究所自行研制。原核表达载体 pET28a(+ )和大肠杆菌 BL21(DE3)购自 Novagen 公司,pMD-18T 载体、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  购自大连 TaKaRa 公司。

**1.1.2 试剂:**限制酶、MMLV 逆转录酶及高保真 pyrobest 聚合酶购自大连 TaKaRa 公司;Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司;胶回收试剂盒为上海华舜生物工程公司产品;纯化镍柱购自 Novagen 公司;尿素、盐酸胍、精氨酸盐酸购自上海生工生物工程有限公司。鼠抗 His-tag 抗体为 Novagen 公司产品;PE 标记的兔抗鼠 IgG 为协和干细胞公司产品。

**1.1.3 PCR 引物:**为扩增抗体轻重链可变区基因通用兼并引物,引物均由上海生工公司合成,画线部分为酶切位点。

表 1 PCR 扩增所用的引物及其序列

Table 1 Primer sequences used for the PCR amplification

Number	Primer sequence
1)	5'-GAC ATT GTG CTC ACC CAG WCT SMH-3'
2)	5'-CCG TTA GAT CTC CAR BTT KGT SCS - 3'
3)	5'-CAG GTS MAR CTG CAG SAG TCW GG-3'
4)	5'-TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CC-3'
5)	5'-CCG <u>GAA TTC</u> GAC ATT GTG CTC ACC CAG TCT CCA-3'
6)	5'-GGA GCC GCC GCC AGA ACC ACC ACC ACC CCG TTT TAT TTC CAG CTT GGT CCC-3'
7)	5'-GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT TCT CAG GTC CAG CTG CAG CAG TCT-3'
8)	5'-CCC <u>AAG CTT</u> GTG AGG AGA CTG TGA GAG TGG TGC C-3'

### 1.2 方法

**1.2.1 抗人 CD19 单抗轻、重链可变区基因的克隆:**取生长良好、能持续分泌抗 CD19 单克隆抗体的杂交瘤细胞,用 Trizol 试剂盒提取总 RNA,应用 oligodT 为引物逆转录为 cDNA。用设计的通用兼并引物 1 和 2、3 和 4 分别扩增抗 CD19 抗体的轻、重链可变区基因。将轻、重链可变区基因 PCR 产物回收,与 pMD-18T 载体连接,连接反应按试剂盒要求进行。取连接产物 5 $\mu$ L 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态,以蓝/白斑方法挑选阳性克隆。

**1.2.2 序列及分析:**应用菌落 PCR 方法进一步鉴定阳性克隆,随机各挑取 10 个阳性克隆采用 Sanger 双脱氧链末端终止法测序,并参照基因序列分析库中抗体特征对氨基酸序列进行分析,以区分抗体轻链、重链框架区(FR)和抗体互补决定区(CDR)。

**1.2.3 抗 CD19 单链抗体表达载体的构建:**根据轻、重链可变区基因的酶切图谱及表达载体 pET28a 的酶切位点,设计并合成了用于 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 基因拼接的引物。首先用引物 5 和 6、7 和 8 分别扩增轻、重链可变区基因,再用引物 5 和 8 经重叠延伸拼接 PCR 方法将抗体重链、轻链可变区基因拼接成 5' VL-Linker-VH 3' 片段,最后使用扩增全长 ScFv 基因并在 5' 端和 3' 端分别引入 EcoR I 和 Hind III 限制性酶切位点,通过酶切后将全长的抗 CD19-ScFv 基因组装到 pET28a 表达载体,构建抗 CD19-ScFv 表达载体。

**1.2.4 目的基因的诱导表达:**将表达载体 pET28a-抗 CD19-ScFv 转化 BL21 菌,挑取单菌落接种于含氨苄青霉素(100mg/mL)的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C,220 r/min 剧烈振荡至 OD = 0.6 ~ 0.8,加入 IPTG 至终浓度为 100mmol/L,37 $^{\circ}$ C 继续振荡诱导培养 5h 后,4 $^{\circ}$ C 离心收集菌体。

**1.2.5 包涵体蛋白的变性、纯化和复性:**将表达的菌体沉淀重悬于预冷的 50mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L NaCl、1mmol/L EDTA (pH7.0) 中溶解,超声破碎细菌,4 $^{\circ}$ C,30000g 离心 30min。沉淀用 3mol/L 尿素和 50mmol/L Tris-HCl (pH7.0) 洗涤,30000g,4 $^{\circ}$ C 离心 30min 收集包涵体。6mol/L 盐酸胍和 0.1mol/L Tris-HCl (pH7.0),于 4 $^{\circ}$ C 摇动过夜溶解包涵体。4 $^{\circ}$ C,30000g 离心 30min 去除沉淀,用 0.45 $\mu$ m 的滤膜过滤,上清用于纯化。上样于镍金属亲和层析柱,用 6mol/L 尿素、50mmol/L Tris-HCl 和 50mmol/L 咪唑 (pH7.0) 洗柱,用含有 250 mmol/L 咪唑、6mol/L 尿素和 50mmol/L Tris-HCl 洗脱结合在镍柱上的 ScFv。将洗脱液加到透析袋中,用 TEA 缓冲液充分复性 24h

后继续用 PBS 透析 24h。超滤浓缩样品至适当体积, BCA 法测定蛋白含量,  $-20^{\circ}\text{C}$  分装保存。

**1.2.6 SDS-PAGE 电泳和 Western-blot 检测:**取纯化产物  $5\mu\text{L}$ , 10% SDS-PAGE 电泳, 将其转移至醋酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶  $4^{\circ}\text{C}$  封闭过夜, 基于表达产物末端的  $6\times\text{His-tag}$  短肽, 用鼠抗 His-tag 抗体室温孵育 2h, PBS 充分洗涤 3 次后, 加入稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 多抗, 室温孵育 1h, PBS-Tween 洗涤 3 次, 每次 10min, 再用二氨基联苯胺 (DBA) 显色。

**1.2.7 抗 CD19-ScFv 抗原结合活性测定:**取 CD19 表达阳性的人类白血病 Nalm6 细胞系,  $5\times 10^5$  细胞/孔。阴性对照组加  $100\mu\text{L}$  人 AB 血清,  $4^{\circ}\text{C}$  孵育 1h, PBS 洗细胞 2 次, 加鼠源性 IgG  $20\mu\text{L}$  (1 mg/mL); 阳性对照组于人 AB 血清封闭 1h 后加入抗 CD19 单克隆抗体 HI19a 工作液  $20\mu\text{L}$ ; 试验组加入 AB 血清封闭后先加  $100\mu\text{L}$  抗 CD19-ScFv,  $4^{\circ}\text{C}$  孵育 1h, PBS 洗细胞 2 次, 再加抗 CD19 单克隆抗体 HI19a  $20\mu\text{L}$  (1 mg/mL),  $4^{\circ}\text{C}$  孵育 1h, PBS 洗细胞 2 次。三组细胞分别重悬于 PBS 中, 加入  $20\mu\text{L}$  羊抗鼠 IgG-FITC 二抗,  $4^{\circ}\text{C}$  孵育 45 min, PBS 洗去未结合的荧光抗体, 流式细胞仪检测单克隆抗体 HI19a 与 Nalm6 细胞系结合的阳性率。

**1.2.8 抗 CD19 ScFv 解离常数的测定:**在 96 孔酶标板中加入  $100\mu\text{L}$  Nalm6 细胞裂解液,  $37^{\circ}\text{C}$  包被 2h, 甩去包被液, 以 PBS (含 0.05% Tween-20) 洗 3 次, 加入封闭液 (PBS 含 3% 牛血清白蛋白, 10% 羊血清) 封闭 2h 后甩去封闭液, PBS 洗涤 3 次。一式二孔加入  $100\mu\text{L}$  1:4 倍比稀释的抗 CD19-ScFv, 以 3% 的牛血清白蛋白溶液作对照,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 2h。除去反应液后以 PBS 洗涤 3 次, 加入抗 his-tag 单抗  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 2h, 甩去第一抗体溶液, PBS 洗 3 次后加入辣根过氧化物酶偶联羊抗鼠 IgG,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 2h。甩去反应液, PBS 洗 3 次后, 加显色液 (OPD,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 反应约 10min, 用酶标仪 (Vamed Engineering, Austria) 测定各孔  $OD_{492\text{nm}}$  吸光值。

## 2 结果

### 2.1 抗 CD19-ScFv 轻、重链可变区基因的克隆

从杂交瘤细胞中提取总 RNA, 经 RT-PCR 扩增后, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 见清晰的  $V_H$  和  $V_L$  扩增条带, 片段大小分别约为 360bp 和 320bp。扩增的  $V_H$  和  $V_L$  基因分别插入到

pUMD-18T 载体, 得到含抗体重链、轻链可变区基因的重组质粒。PCR 扩增结果见图 1, 分别转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑取克隆测序。

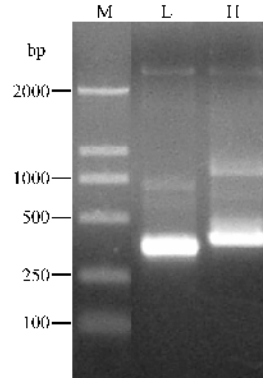


图 1 PCR 扩增  $V_H$  和  $V_L$  基因产物 琼脂糖凝胶电泳  
Fig. 1 Amplifications of  $V_H$  and  $V_L$  gene from hybridoma HI19a

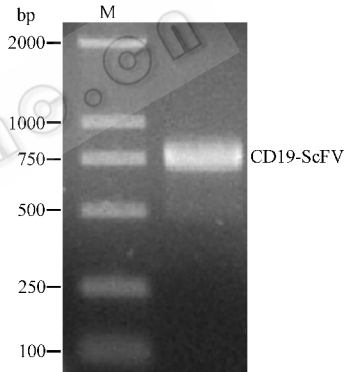


图 2 扩增的抗 CD19-ScFv 基因片段琼脂糖凝胶电泳  
Fig. 2 Amplification of anti-CD19 ScFv gene

### 2.2 序列测定及分析

对构建的抗体轻、重链可变区基因克隆载体进行测序, 结果显示挑取的 10 个克隆的轻、重链可变区基因序列均一致。其中  $V_H$  基因全长 366bp, 编码 122 个氨基酸,  $V_L$  基因全长 324bp, 编码 108 个氨基酸。序列分析显示该基因符合蛋白质数据库中小鼠抗体基因所具有的特点, 该序列为小鼠抗体基因序列。

### 2.3 抗 CD19-ScFv 表达载体 pET28a-CD19 ScFv 的构建

采用重叠延伸拼接 PCR 方法将抗体轻、重链可变区基因用编码 (Gly4Ser) $_3$  短肽的 DNA 片段拼接成 5' VL-Linker-VL 3' 片段, PCR 扩增该片段, 并在 5' 端和 3' 端分别引入 EcoRI 和 HindIII 限制性酶切位点, 通过酶切, 将全长 ScFv 基因组装到 pET28a 表达载体, 构建抗 CD19-ScFv 表达载体 pET28a-抗 CD19-

ScFv(见图3)质粒转化 *E. coli* BL21 感受态细胞,挑取克隆测序,测序结果显示所构建的 pET28a-抗 CD19-ScFv 质粒与抗 CD19 单抗轻、重链可变区基因一致,两者间由连接肽(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> 相连。

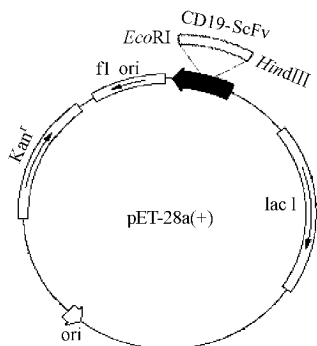


图3 抗 CD19 单链抗体表达载体 pET28a-抗 CD19 ScFv 的构建  
Fig. 3 Construction of expression vector pET28a-anti-CD19 ScFv

### 2.4 抗 CD19-ScFv 的诱导表达、鉴定和纯化

含有表达载体 pET28a-抗 CD19-ScFv 的 *E. coli* BL21 经 IPTG 于 37℃ 诱导 5h 后其表达产物以包涵体形式存在。SDS-PAGE 凝胶电泳结果显示在分子量约为 30kD 处有一明显的诱导条带,与该单链抗体的理论计算值相符,Western-blot 试验结果则进一步证实了其特异性,包涵体经盐酸胍溶解变性,镍离子亲和层析柱纯化和体外复性过程,最终获得高纯度的单链抗体片段(图4、5)。复性后所得活性蛋白产量为 6μg/mL,浓缩后达到 85μg/mL。

### 2.5 抗 CD19-ScFv 抗原结合活性测定

为进一步检测经复性后的抗 CD19-ScFv 与 CD19 抗原的结合活性,我们应用流式细胞仪和竞争性免疫荧光结合实验对复性后的抗 CD19-ScFv 的结

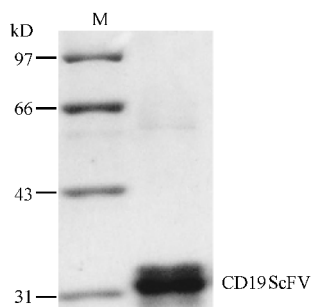


图4 抗 CD19-ScFv 纯化后样品,10%SDS-PAGE 凝胶电泳  
Fig. 4 10%SDS-PAGE analysis of the purified anti-CD19-ScFv

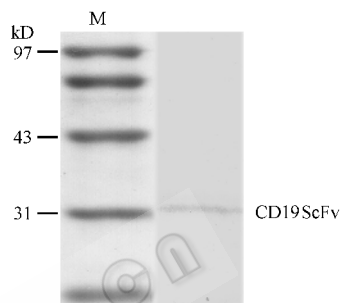


图5 抗 CD19-ScFv 纯化后样品,Western-blot 试验结果  
Fig. 5 Western-blot analysis of the purified anti-CD19-ScFv

合活性进行检测,结果表明复性后的表达产物能够与抗 CD19 单克隆抗体竞争性结合细胞表面的 CD19 抗原。结果见图6,6a 为阴性对照组(AB 血清 + 鼠源 IgG),6b 为阳性对照组(HIT9a + PBS),6c 为竞争性抑制实验组(抗 CD19-ScFv + HIT9a),6d 为阳性对照组 6b 与实验组 6c 重叠图,峰 1 为竞争性抑制实验组,峰 2 为阳性对照组。

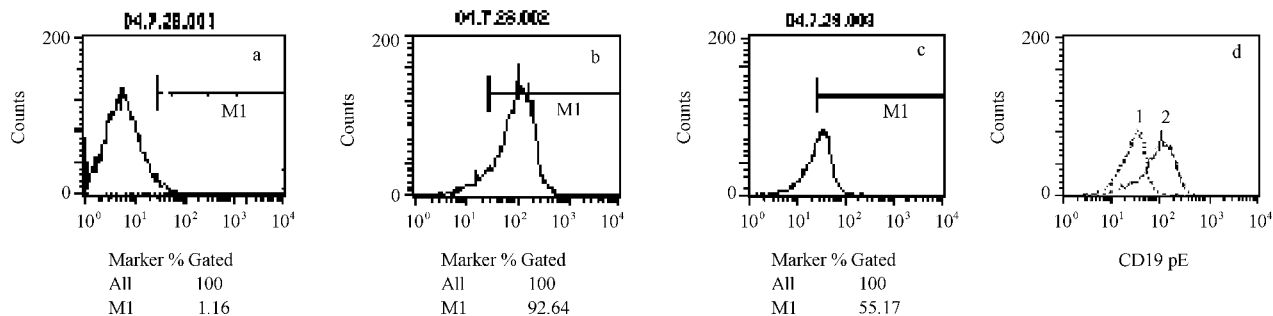


图6 竞争性免疫荧光结合实验

Fig. 6 Competitive inhibition of immune fluorescence experiment

a. Negative control; b. HIT9a + PBS; c. HIT9a + anti-CD19-ScFv; d. overlap of 2 and 3.

### 2.6 抗 CD19-ScFv 解离常数的测定

每个抗 CD19-ScFv 浓度的光吸收值取均值,将

数据代入  $\Delta A = \Delta A_{MAX} \times L / (K_d + L)$  即  $\Delta A = -K_d \times \Delta A / L - \Delta A_{MAX}$  ( $\Delta A$  为实验组与对照组的 OD 值的

差  $\Delta L$  为加入的重组的抗 CD19 ScFv 的浓度。回归分析, 计算解离常数  $K_d$  值。经计算解离常数  $K_d$  值,  $K_d = 1.7 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$  ( $R^2 = 0.99$ ) 结果见图 7。

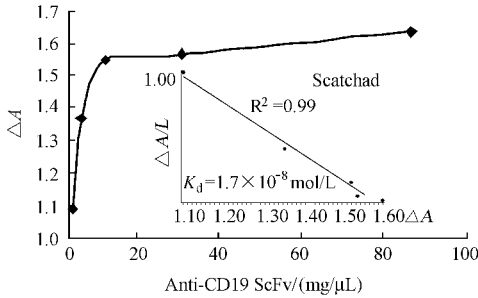


图 7 抗 CD19-ScFv 解离常数的测定及 Scatchard 曲线

Fig. 7 anti-CD19-ScFv dissociation constant and Scatchard curve

### 3 讨论

急性淋巴细胞白血病(acute lymphoid leukemia, ALL)是一种以原始淋巴细胞积聚为特征的血液系统恶性疾患, 占有白血病的 25%。而在 ALL 中, B 细胞 ALL(B-ALL)占 70% ~ 80%。由于成人 ALL 患者的临床治疗效果较差, 大多不能达到长期无病生存。因此开展以化疗、干细胞移植、免疫治疗及生物治疗等综合手段以提高患者远期疗效的研究方兴未艾。应用基因工程抗体进行肿瘤免疫治疗是当前的研究热点之一, 生物工程类抗体美罗华的临床应用为肿瘤的生物免疫治疗开创了新的局面, 研究表明联合应用美罗华及化疗可以明显提高 B-ALL 和 B 细胞淋巴瘤(B-NHL)患者的临床预后<sup>[6,7]</sup>。

CD19 是广泛分布在 B 淋巴细胞表面的一种功能受体分子, 在干细胞以外的 B 淋巴细胞所有发育阶段均有表达, 在 B 淋巴系统恶性肿瘤如急性淋巴细胞白血病、非何杰金氏淋巴瘤中广泛表达。而在造血干细胞、浆细胞、T 细胞及其他组织中则没有表达。因此可以作为 B-ALL 和 B-NHL 的一个理想治疗靶点。与毒素相联结的 CD19 单克隆抗体的白血病和淋巴瘤治疗现已应用于临床试验<sup>[8]</sup>。

由于鼠源性抗体因具有较强的免疫原性, 应用于人体时会产生强烈的人抗鼠抗体反应, 因此严重限制了其在临床的应用<sup>[9]</sup>; 单链抗体是由接头(linker)将轻链可变区和重链可变区基因以两种取向(5'V<sub>L</sub>-Linker-V<sub>H</sub> 3'和 5'V<sub>H</sub>-Linker-V<sub>L</sub> 3')连接而成的具有特异性抗原结合功能的小分子片段。因其具有分子量小、穿透力强、能较好的保持抗原亲和性及特异性同时降低免疫原性、体内半衰期短, 易与效应

分子相连构成多种新功能的抗体分子, 在细菌中易于大量生产等特点, 已成为当前应用生物工程方法进行肿瘤免疫治疗的一种重要手段。为此我们进行了抗 CD19 单链抗体的研制。

目前构建单链抗体基因片段应用最为广泛的 Linker 序列是由重复的 4 个甘氨酸和一个丝氨酸构成的 15 个氨基酸序列的短肽, 其中甘氨酸是分子量最小, 侧链最短的氨基酸, 可增加侧链的柔性; 丝氨酸是亲水性最强的氨基酸, 可增加其亲水性<sup>[10]</sup>。本研究采用了 (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> 作为柔性连接短肽, 经复性及透析后所得单链抗体表现出良好的稳定性。

本文采用了 pET28a 表达载体进行诱导表达, 此载体所表达的外源性蛋白以包涵体形式存在, 表达产量高, 同时其目的蛋白比较稳定, 不会被蛋白酶所降解。其多克隆位点的下游有一个能编码 6 × His-Tag 序列, 可与上游的表达序列形成融合蛋白, 它通常不影响表达产物的生物学活性, 因此不必通过酶水解来获得目的蛋白。同时该序列可作为蛋白标签用于目的蛋白的纯化和检测。经过镍柱亲和层析、变性及透析复性, 我们得到了具有良好生物学活性的单链抗体, 复性后所得活性蛋白产量为 6 μg/mL, 浓缩后达到 85 μg/mL。体外研究证明此 ScFv 可与抗 CD19 单克隆抗体竞争性结合 CD19 细胞表面抗原, 解离常数检测显示  $K_d = 1.7 \times 10^{-8}$  ( $R^2 = 0.99$ )。结合活性较强。CD19 单链抗体的成功构建为下一步在此基础上进行 B 淋巴细胞白血病和淋巴瘤的靶向免疫诊断、治疗奠定了基础。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Barclay AN, Beyers AD, Birkeland ML *et al.* The Leukocyte Antigen Facts Book. Academic Press, London, 1994, pp. 142
- [2] Anderson KC, Bates MP, Slaughenhoupt BL. Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation. *Blood*, 1984, **63**: 1424-1433
- [3] May RD, Vitetta ES, Moldenhauer G *et al.* Selective killing of normal and neoplastic human B cells with anti-CD19- and anti-CD22-ricin A chain immunotoxins. *Cancer Drug Deliv*, 1986, **3**: 261-272
- [4] Löffler A, Kufer P, Lutterbüse R *et al.* A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 × CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood*, 2000, **95**: 2098-2103
- [5] Sapra P, Allen TM. Improved outcome when B-cell lymphoma is treated with combinations of immunoliposomal anticancer drugs targeted to both the CD19 and CD20 epitopes. *Clin Cancer Res*,

- [ 6 ] Thomas DA , O 'Brien S , Bueso-Ramos C *et al.* Rituximab in relapsed or refractory hairy cell leukemia. *Blood* , 2003 , **102**( 12 ) : 3906 - 3911
- [ 7 ] Hainsworth JD , Litchy S , Barton JH *et al.* Single-agent rituximab as first-line and maintenance treatment for patients with chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma : a phase II trial of the minnie pearl cancer research network. *J Clin Oncol* 2003 , **21**( 9 ) : 1746 - 1751
- [ 8 ] Stone MJ , Sausville EA , Fay JW *et al.* A phase I study of bolus versus continuous infusion of the anti-CD19 immunotoxin , IgG-HD37-dgA , in patients with B-cell lymphoma , *Blood* , 1996 , **88** : 1188 - 1197
- [ 9 ] Shawler DL , Bartholemew MR , Smith LS *et al.* Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG. *J Immunol* , 1985 , **135**( 2 ) : 1530 - 1535
- [ 10 ] Li R( 李容 ) , Xiong DS( 熊冬生 ) , Shao XF( 邵晓枫 ) *et al.* Construction and expression of single chain Fv gene against domain III of human VEGF receptor II . *Chinese Journal of Biotechnology* ( 生物工程学报 ) , 2004 , **20**( 2 ) : 187 - 191