

不同力达霉素与抗 VI 型胶原酶单抗偶联物的抗肿瘤作用

封云^{1,2}, 甄永苏¹, 戴士士¹, 尚伯杨¹, 张敏¹, 何红伟¹, 李保卫¹, 邵荣光^{1*}

(1. 中国医学科学院, 中国协和医科大学 医药生物技术研究所, 北京 100050;

2. 江苏大学 医学院, 江苏 镇江 212013)

摘要: 研究不同偶联方法制备的力达霉素 (LDM) 与抗 IV 型胶原酶单抗 3G11 免疫偶联物的选择性抗肿瘤作用。采用 SPDP 和 SMBS 作为偶联剂, 将 LDM 辅基蛋白 69 位赖氨酸与 2-亚氨基四氢噻吩修饰的单抗 3G11 连接, 制备免疫偶联物; ELISA 法测定偶联物的免疫活性, 克隆形成法及人 HT-1080 细胞免疫缺陷小鼠移植模型观察两种偶联物的抗肿瘤作用。偶联物保留了单抗 3G11 对 IV 型胶原酶的免疫活性, 3G11-SMBS-LDM 对体外培养的 HT-1080 细胞的杀伤作用强于 LDM 和 3G11-SPDP-LDM。动物实验显示, LDM 在等摩尔剂量条件下 3G11-SMBS-LDM 的抑瘤率为 86.1%, 游离的 LDM 组为 71.2%, 3G11-SPDP-LDM 组为 77.1%, 3G11-SMBS-LDM 的抑制作用显著增强。3G11-SMBS-LDM 组动物的平均生存时间延长为 163.7%, 3G11-SPDP-LDM 组为 125.3%, LDM 组为 71.9%, 3G11-SMBS-LDM 能显著延长荷瘤鼠的生存期, 两个偶联物之间有显著性差异。3G11-SMBS-LDM 偶联物更具有选择性抗肿瘤作用, 疗效显著提高, 荷瘤动物生存期延长, 毒性明显降低, 可能成为新的肿瘤治疗药物。

关键词: 免疫偶联物; 力达霉素; IV 型胶原酶; 单克隆抗体; 靶向治疗

中图分类号: R967; R979.1 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)07 - 0704 - 06

Antitumor activities of various immunoconjugates composed of lidamycin and anti-type IV collagenase monoclonal antibody

FENG Yun^{1,2}, ZHEN Yong-su¹, DAI Yao¹, SHANG Bo-yang¹, ZHANG Min¹,
HE Hong-wei¹, LI Bao-wei¹, SHAO Rong-guang^{1*}

(1. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. Medical College of Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: This study is to investigate the antitumor activities of the immunoconjugates composed of anti-type IV collagenase monoclonal antibody 3G11 and lidamycin (LDM) prepared by different methods. The immunoconjugates were prepared by linking 2-iminothiolane modified 3G11 to lysine-69 of LDM apoprotein by SPDP and SMBS as the intermediate drug linker. Immunoreactivity of the conjugates was determined by ELISA. The cytotoxicity of the conjugates was examined by clonogenic assay. Antitumor effects of the conjugates *in vivo* were evaluated in nude mice bearing subcutaneously implanted HT-1080 tumor. ELISA assay showed that the immunoconjugates retained the immunoreactivity of 3G11 against type IV collagenase. The cytotoxicity of the 3G11-SMBS-LDM to HT-1080 cells was significantly more potent than that of free LDM and 3G11-SPDP-LDM. In animal model at the same condition, free LDM inhibited the growth of HT-1080 tumor by 71.2%, while 3G11-SPDP-LDM and 3G11-SMBS-LDM reached 77.1% and 86.1%, respectively. The median survival time of the mice treated with free LDM was prolonged by 71.9% compared with that of untreated group. Whereas, the median survival time of 3G11-SPDP-LDM and 3G11-SMBS-LDM was prolonged by 125.3% and 163.7%, respectively, indicating that 3G11-SMBS-

收稿日期: 2006-12-30.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (2002CB513108); 国家自然科学基金资助项目 (30472107); 江苏大学高级专业
人才科研启动基金项目 (06jdg045).

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 10 - 63026956, E-mail: shaor@public3.bta.net.cn

LDM was more effective than 3G11-SPDP-LDM in tumor suppression and life span prolongation. 3G11-SMBS-LDM has more selective antitumor efficacy and lower toxicity, and might be a novel candidate for cancer therapy.

Key words: immunoconjugate; lidamycin; type IV collagenase; monoclonal antibody; target therapy

肿瘤靶向治疗是提高肿瘤治疗效果的一条重要途径。以单抗作为靶向载体与化疗药物、放射性核素、毒素等弹头药物组成免疫偶联物,可以提高肿瘤治疗的选择性。基质金属蛋白酶(MMPs)参与肿瘤的生长和扩散过程,在多种肿瘤中过度表达,是向肿瘤运载高效细胞毒药物的重要靶标^[1]。MMPs家族的重要成员Ⅳ型胶原酶可以降解基底膜中作为其他组分构建支架的Ⅳ型胶原,从而有利于肿瘤细胞破坏和穿透基底膜进行侵袭和转移,并在肿瘤的新生血管形成过程中发挥重要的作用^[2]。本研究室制备的抗Ⅳ型胶原酶单抗,可以与Ⅳ型胶原酶特异结合并抑制其活性。

抗肿瘤抗生素力达霉素(lidamycin, LDM, 又称C-1027)对肿瘤细胞有较强的杀伤力,是研制单抗导向药物的高效“弹头”药物^[3,4],其偶联物在小鼠肿瘤模型中显示了确切的疗效^[5,6]。偶联方法在偶联物活性物质的释放中发挥重要作用,抗CD33抗体与加里奇霉素偶联物连接方法的不同导致了偶联物活性的显著性差异^[7]。偶联物连接键的不同直接影响偶联物在体内的清除速度,不可断裂的硫醚键连接的免疫毒素比可切割的二硫键连接的免疫毒素稳定,体内代谢明显变慢^[8]。本研究以此为基础,定向制备了由两种交联剂连接的抗Ⅳ型胶原酶单抗3G11与LDM辅基蛋白赖氨酸-69位偶联的新型免疫偶联物,并观察其体内外的抗肿瘤作用。

材料与方法

药物与试剂 LDM由本所金莲舫教授提供。单抗3G11为本室制备。Ⅳ型胶原酶、辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG抗体、四氮唑蓝(MTT)等购自Sigma公司;2-亚氨基四氢噻吩、N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二硫基)丙酸酯(N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, SPDP)和间-马来酰亚胺苯甲酸-N-羟基磺琥珀酰亚胺酯(m-maleimido-benzoyl-N-hydroxysulfosuccinimide ester, SMBS)均购自Pierce公司;Sephacryl S-200 HR丙烯葡聚糖凝胶、PD-10脱盐柱购自Pharmacia公司,RPMI 1640干粉为Gibico公司产品。其他常规生化试剂均为分析纯。

肿瘤细胞株与动物 人纤维肉瘤HT-1080细胞由本室传代保存。实验用BALB/c裸小鼠,6~8周龄,体重16~20g,由中国医学科学院实验动物研究所提供。

单抗3G11与LDM免疫偶联物(3G11-LDM)的制备 单抗3G11用 $0.16 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸盐缓冲液(pH 8.0)调整至 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,用 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 2-亚氨基四氢噻吩在充氮气的条件下于室温反应20 min,反应结束后交换缓冲液并离心浓缩。另取LDM溶解于转胺缓冲液中室温搅拌反应1 h,用磷酸盐缓冲液平衡的PD-10脱盐柱交换缓冲液,经浓缩离心后得到N端1位丙氨酸 α -氨基转变为酮基的LDM。3G11-SPDP-LDM的制备:将修饰后的LDM加入二甲基甲酰胺(DMF)溶解的SPDP,室温反应30 min,PD-10柱脱盐除去未反应的SPDP,浓缩离心后立即与2-IT修饰的抗体反应,室温过夜。3G11-SMBS-LDM的制备:将上述修饰后的LDM加入二甲基甲酰胺溶解的小分子交联剂SMBS,将两者混合室温反应。PD-10脱盐柱除去未反应的SMBS,浓缩离心后立即与2-IT修饰的抗体混合反应30 min。反应产物分别经过凝胶Sephacryl S-200 HR柱除去未反应的修饰后的LDM,得到纯化的偶联物。

偶联物中各组分的分子比计算 根据LDM在341 nm附近有特征吸收的肩峰,将3G11-LDM稀释至一定浓度后检测341 nm吸收度值,扣除相应浓度3G11的吸收度值,其差值对应LDM在341 nm的标准曲线即可得到偶联物中LDM的含量,进一步得到相应的辅基蛋白的含量,再根据LDM辅基蛋白的含量推算出其在280 nm的吸收度值。根据光吸收的加合性^[9,10],用偶联物在280 nm的吸收度值减去LDM辅基蛋白在280 nm的吸收度值计算出单抗3G11在280 nm的吸收度值,进而得到3G11的含量,再计算出3G11和LDM的分子比。

3G11-LDM偶联物在280 nm和341 nm的吸收度分别为:

$$A_{280} = \epsilon_{3G11(1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1})}^{280} C_{3G11} + \epsilon_{LDM(1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1})}^{280} C_{LDM} \quad (\text{I})$$

$$A_{341} = \epsilon_{3G11(1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1})}^{341} C_{3G11} + \epsilon_{LDM(1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1})}^{341} C_{LDM} \quad (\text{II})$$

将 (II) 除以 (I) 得到:

$$\frac{C_{LDM}}{C_{3G11}} = \frac{R\epsilon_{3G11(1\text{ mg}\cdot\text{ mL}^{-1})}^{280} - \epsilon_{3G11(1\text{ mg}\cdot\text{ mL}^{-1})}^{341}}{\epsilon_{LDM(1\text{ mg}\cdot\text{ mL}^{-1})}^{341} - R\epsilon_{LDM(1\text{ mg}\cdot\text{ mL}^{-1})}^{280}} \quad (\text{III})$$

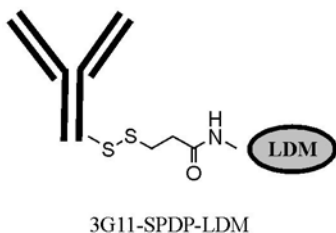
其中 $R = A_{341} / A_{280}$ 。根据 (III) 式可计算出 LDM 和 3G11 的分子比。

偶联物的免疫活性分析 以 Bradford 法进行蛋白定量, 蛋白浓度调整为一致后, 用间接 ELISA 法测定 3G11 和 3G11-LDM 对 IV 型胶原酶和 HT-1080 细胞的免疫活性, 计算亲和力常数, 考察偶联前后单抗对 IV 型胶原酶以及 IV 型胶原酶高表达的 HT-1080 细胞的免疫活性的变化。

体外细胞增殖抑制实验 取对数生长期的 HT-1080 细胞以细胞数 50 孔接种于 24 孔培养板, 37 °C, CO₂ 细胞培养箱培养 24 h。加入无血清 RPMI 1640 培养液 200 μL 稀释的药物, 每浓度 4 孔, 无药对照孔加入无血清 RPMI 1640 培养液 200 μL, 继续培养 1 h。轻轻吸去培养液, 每孔加入无血清 RPMI 1640 培养液 200 μL 轻轻洗涤 1 次, 然后每孔加入新鲜的 RPMI 1640 培养液 1 mL, 在 CO₂ 细胞培养箱内继续培养 6 d, 在倒置显微镜下计数每孔克隆数 (大于 30 个细胞计为 1 个克隆), 计算克隆形成百分率^[10]。

3G11-LDM 偶联物对免疫缺陷小鼠移植性人纤维肉瘤 HT-1080 的治疗作用 将 HT-1080 细胞接种至 BALB/c 裸小鼠右侧腋窝。传代后取新鲜肿瘤组织接种于裸小鼠右侧腋窝皮下, 接种后 1 d 和 8 d 静脉注射给药 2 次。实验期间每 3 d 称体重 1 次并测定肿瘤大小, 根据公式 $V = ab^2 / 2$ 计算瘤块的体积, a 为长径, b 为短径。同时每天观察动物的死亡情况。

统计学处理 皮下肿瘤体积以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。



结果

1 3G11-LDM 偶联物的制备

LDM 辅基蛋白 N 端 1 位丙氨酸 α 伯氨基和转胺缓冲液中的乙醛酸钠反应转变为羰基, 其 69 位赖氨酸的 ε 伯氨基和交联剂 SPDP 反应, 在辅基蛋白上引入吡啶二硫基 PDP-LDM; 或者, LDM 发生上述转变后和 SMBS 反应, 在辅基蛋白上引入马来酰亚胺基 MB-LDM, 单抗经 2-IT 的修饰引入了巯基, 巯基化的单抗 3G11-SH 与 PDP-LDM 反应或者与 MB-LDM 反应, 最终通过二硫键将 3G11 和 LDM 连接起来。两种方法偶联的 3G11-LDM 偶联物的结构见图 1 所示。

偶联物过 Sephacryl S-200 凝胶柱纯化, 得洗脱曲线见图 2, 其中第 1 峰为偶联物, 第 2 峰为 LDM。通过分光光度法测定的偶联物 A_{280} 和 A_{341} 值, 计算 LDM 和 3G11 的比例, 结果 3G11 在 341 nm 几乎无吸收, 所以 $\epsilon_{3G11(1\text{ mg}\cdot\text{ mL}^{-1})}^{341} \approx 0$ 。绘制 LDM 和 3G11 在 280 nm 及 341 nm 处光吸收的标准曲线, 求出吸光系数 $\epsilon(\text{ mL}\cdot\text{ mg}^{-1}\cdot\text{ cm}^{-1})$, 分别为 $\epsilon_{LDM(1\text{ mg}\cdot\text{ mL}^{-1})}^{341} = 1.46$, $\epsilon_{LDM(1\text{ mg}\cdot\text{ mL}^{-1})}^{280} = 1.05$, $\epsilon_{3G11(1\text{ mg}\cdot\text{ mL}^{-1})}^{280} = 1.45$ 。

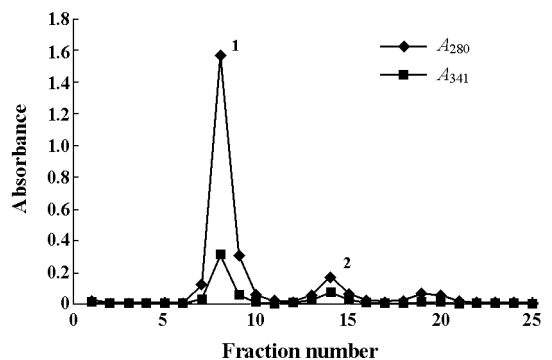


Figure 2 Separation of 3G11-LDM conjugate on Sephacryl S-200 size exclusion chromatography. Column: Sephacryl S-200 (1.0 cm × 35 cm). Peak 1: 3G11-LDM conjugate; Peak 2: Unconjugated LDM

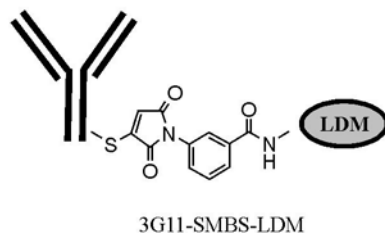


Figure 1 Structures of 3G11-SPDP-LDM and 3G11-SMBS-LDM immunoconjugates

根据公式得到偶联物分子中 LDM 和 3G11 的分子比约为 1:1。由于两种方法得到的偶联物的凝胶过滤纯化情况以及全波长扫描图谱均相似,以下仅列出其中的一个批次偶联物的分离情况。

2 3G11-LDM 偶联物的免疫活性

因为两种偶联方法对于抗体的改变是相同的,所以两种偶联物的免疫活性相似,在此共同表示为 3G11-LDM。ELISA 结果表明,两种偶联物对 HT-1080 细胞的免疫活性与 3G11 相比有所降低(图 3)。亲和常数测定表明,3G11 和 3G11-LDM 对于 IV 型胶原酶的亲和常数分别为 1.3×10^{-8} 及 $4.1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,对于 HT-1080 细胞的亲和常数分别为 5.4×10^{-8} 及 $1.1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,偶联物保留了单抗对抗原和抗原高表达细胞的免疫反应性,但偶联物结合能力与 3G11 相比略有降低,偶联物对 IV 型胶原酶的亲和力约为偶联前的 1/3,对 HT-1080 肿瘤组织的亲和力约为偶联前的 1/2。

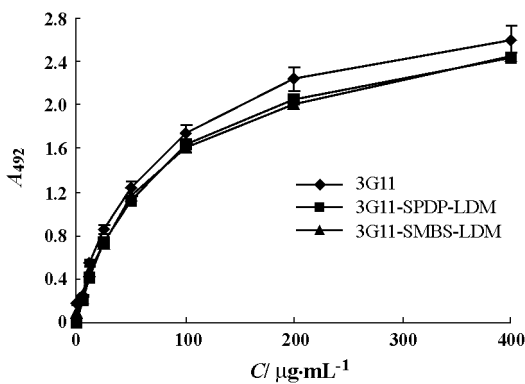


Figure 3 The immunoreactivity of 3G11 and 3G11-LDM with human fibrosarcoma HT-1080 cells in ELISA

3 3G11-LDM 偶联物对体外培养细胞的增殖抑制作用

比较 3G11-LDM 偶联物和游离 LDM 对靶细胞 HT-1080 的细胞集落生成的抑制作用,结果表明,3G11-SPDP-LDM, 3G11-SMBS-LDM 和 LDM 抑制 50% 集落生成的浓度 (IC_{50}) 分别为 0.57, 0.074 和 $0.69 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$,偶联物的作用强于 LDM,其中以 SMBS 为交联剂的偶联物对靶细胞的克隆形成抑制作用最强,为游离 LDM 的 9.3 倍(图 4)。

4 3G11-LDM 偶联物对免疫缺陷小鼠移植性肿瘤 HT-1080 的抑制作用

裸鼠皮下接种 HT-1080 瘤块 24 h 后,静脉注射 LDM 及偶联物 1 次,第 8 天再给药 1 次。在实验第 22 天,各组的抑瘤率分别为:LDM 组 71.2%, 3G11

组 5.4%, 3G11-SPDP-LDM 组 77.1%, 3G11-SMBS-LDM 组 86.1%。结果表明:偶联物与 LDM 以及对对照相比,对 HT-1080 移植瘤的生长均具有显著抑制作用,其中 3G11-SMBS-LDM 偶联物的抑瘤率高于 3G11-SPDP-LDM 组,两组之间有显著性差异(图 5,表 1)。

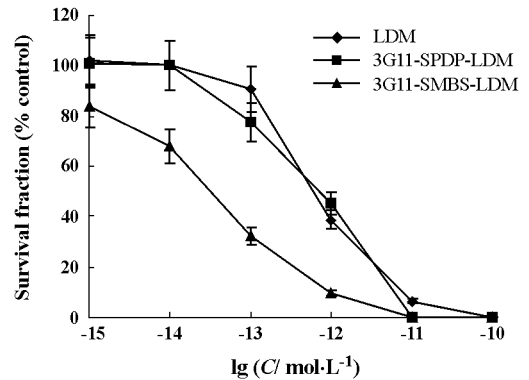


Figure 4 Inhibitory effect of free LDM and 3G11-LDM conjugate on the growth of HT-1080 cells in clonogenic assay

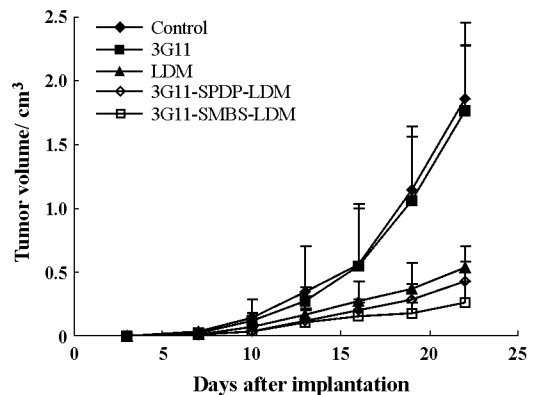


Figure 5 3G11-LDM ($1.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and LDM ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) inhibited the growth of HT-1080 in nude mice. Drugs were administered $iv \times 2$ on day 1 and 8 after tumor implantation. $n = 5$

生存期观察提示 3G11-LDM 偶联物和 LDM 均能明显延长生存期:LDM 组的平均生存时间延长为 71.9%, 3G11-SPDP-LDM 组为 125.3%, 3G11-SMBS-LDM 组为 163.7%,其中 3G11-LDM 偶联物对 HT-1080 肿瘤移植裸鼠的生存期延长作用与 LDM 相比有显著性差异,3G11-SMBS-LDM 组的生存期延长作用高于 3G11-SPDP-LDM 组,两组之间有显著性差异(图 6,表 2)。实验期间各组动物一般状况良好,可耐受所用剂量。

Table 1 Inhibitory effects of 3G11 immunoconjugates on the growth of fibrosarcoma in nude mice

Group	Dose /mg• kg ⁻¹	BWC/g	Tumor volume /cm ³	Inhibition rate /%
Control	0.0	+2.41	1.86 ±0.41	0.0
3G11	1.5	+0.96	1.76 ±0.69	5.4
LDM	0.1	+0.74	0.53 ±0.17	71.2 ^{△△}
3G11-SPDP-LDM	1.6	+1.55	0.43 ±0.16	77.1 ^{△△*}
3G11-SMBS-LDM	1.6	+2.50	0.26 ±0.17	86.1 ^{△△*} ♦

Drugs were administered iv × 2 on day 1 and 8 after tumor implantation. Results were recorded on day 22. BWC: Average body weight change. n = 5, $\bar{x} \pm s$. ^{△△} P < 0.01 vs control group; * P < 0.05 vs LDM group; ♦ P < 0.05 vs 3G11-SPDP-LDM group

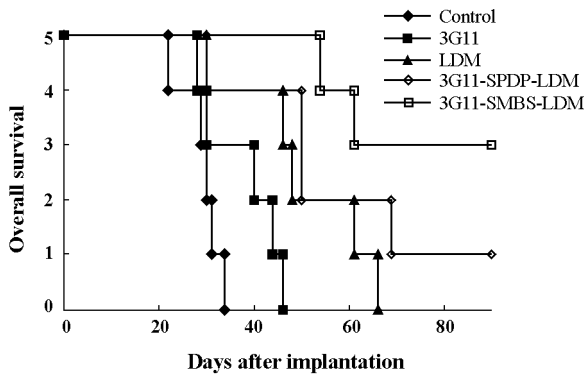


Figure 6 3G11-LDM conjugates increased the survival of mice bearing human fibrosarcoma HT-1080 xenografts. Drugs were administered iv × 2 on day 1 and 8 after tumor implantation

Table 2 Effects of 3G11-LDM and LDM on the survival time of nude mice bearing HT-1080

Group	Dose /mg• kg ⁻¹	Mean survival/day	ILS ^a /%	Long term survivor ^b
Control	0	29.2	0	0
3G11	1.5	37.6	28.8	0
LDM	0.1	50.2	71.9	0
3G11-SPDP-LDM	1.6	65.8	125.3 [*]	1
3G11-SMBS-LDM	1.6	77.0	163.7 ^{**△}	3

^a ILS: Increase of life span = (T - C) / C; C: Mean survival days of control; T: Mean survival days of treatment group. ^b Animals survived over 90 days were recorded as long term survivor. n = 5. * P < 0.05, ** P < 0.01 vs LDM group; [△] P < 0.05 vs 3G11-SPDP-LDM group

讨论

本研究表明, 单抗 3G11 对 IV型胶原酶高表达的 HT-1080 细胞和肿瘤组织均体现了良好的免疫反应性。用新方法定向制备的 3G11-LDM 偶联物保留了单抗 3G11 对抗原的结合活性。烯二炔类抗肿瘤抗生素 LDM 具备高效的特点, 本研究免去中间载体, 而按照 1:1 分子比通过小分子交联剂将 LDM 与单抗连接, 这有助于偶联物的小型化^[11]。体外细胞毒研究表明, 以小分子交联剂连接单抗和 LDM 制备的免疫偶联物显示了较强的细胞毒作用, 这可能是由于偶联物通过单抗和肿瘤细胞表面高表达的抗原相结合而浓集继而杀伤细胞导致的。偶联物对裸鼠体内移植的 HT-1080 的生长有显著抑制作用, 与游离 LDM 相比抗肿瘤作用明显增强, 同时偶联物显著延长动物的生存期, 3G11-SPDP-LDM 组延长 125.3%, 3G11-SMBS-LDM 组延长 163.7%, 提示偶联物具有更强的选择性作用, 以及更低的毒性。

偶联方法的选择可能对偶联物中活性物质的释放起至关重要的作用^[7], 本研究表明不同的交联剂和交联方法制备的免疫偶联物的体内抗肿瘤活性不同, 在抗肿瘤作用以及对荷瘤动物的生存期的延长方面, 以小分子交联剂 SMBS 为中介得到的硫醚键连接的免疫偶联物与以 SPDP 为中介得到的可切割的二硫键连接的偶联物相比, 两者有显著性差异, 前者的抗肿瘤作用更强, 显示了其更强的选择性作用, 提示硫醚键连接的偶联物更适合在体内应用。这种更强的选择性作用可能和连接键的稳定性有关, 因为连接键在体内是否容易断裂是影响其在体内清除的重要因素, 以 SMBS 连接得到的不可断裂的硫醚键连接的偶联物比以 SPDP 连接得到的可切割的二硫键连接的偶联物稳定并且在体内代谢相对较慢^[8]。

上述研究结果提示, 新制备的 3G11-SMBS-LDM 偶联物具有比游离 LDM 以及 3G11-SPDP-LDM 偶联物更高的疗效。动物实验结果显示, 硫醚键偶联物更适合在体内应用, 表明了此偶联方法的可行性, 为进一步研究以 LDM 为弹头、以引入硫醚键的小分子交联剂为中介的单抗靶向药物提供了依据。

References

[1] Lee HJ, Cooperwood JS, You Z, et al. Prodrug and antedrug: two diametrical approaches in designing safer drugs [J]. Arch Pharm Res, 2002, 25: 111 - 136.

- [2] Francis RJ, Shama SK, Springer C, et al. A phase I trial of antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) in patients with advanced colorectal carcinoma or other CEA producing tumours [J]. Br J Cancer, 2002, 87: 600 - 607.
- [3] Shao RG, Zhen YS. Relationship between the molecular composition of C1027, a new macromolecular antibiotic with enediyne chromophore, and its antitumor activity [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 1995, 30: 336 - 342.
- [4] Chen Y, Shao R, Bartlam M, et al. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of a macromolecular antitumor antibiotic, C1027 [J]. Acta Cryst, 2002, D58: 173 - 175.
- [5] Wang FQ, Shang BY, Zhen YS. Antitumor effects of the immunoconjugate composed of lidamycin and monoclonal antibody 3G11 [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2003, 38: 515 - 519.
- [6] Liu XJ, Jiang M, Liu XY, et al. Antitumor effects of the conjugates of pingyangmycin linked to monoclonal antibody 3D6 and its Fab' fragment on hepatoma in mice [J]. Chin J Antibiot (中国抗生素杂志), 2002, 27: 496 - 501.
- [7] Hamann PR, Hinman LM, Beyer CF, et al. An anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. Choice of linker [J]. Bioconjugate Chem, 2002, 13: 40 - 46.
- [8] Ji YS, He YH, Chen X, et al. Immunotoxins prepared with different coupling methods and their characteristics *in vitro* and *in vivo* [J]. Prog Biochem Biophys (生物化学生物物理进展), 1991, 18: 443 - 447.
- [9] Hamblett KJ, Senter PD, Chace DF, et al. Effects of loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10: 7063 - 7070.
- [10] Dai Y, Liu XJ, Zhen YS. Antitumor effect of the novel immunoconjugate composed of pingyangmycin and anti-type collagenase monoclonal antibody [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2006, 41: 41 - 46.
- [11] Zhen YS, Shao RG, Jiang M, et al. Antitumor activity of the conjugates composed of C1027, an anticancer antibiotic, and monoclonal antibody [J]. Chin J Cancer Biother (中国肿瘤生物治疗杂志), 1995, 2: 94 - 98.