

モノクローナル抗体結合制癌剤に関する研究

第 2 編

抗 HLA モノクローナル抗体結合代謝拮抗制癌剤（サイトシンアラビノシド，メソトレキセート）の作製とその生物活性

岡山大学医学部第 2 内科（主任：木村郁郎教授）

眞 鍋 雄 一

（昭和59年11月24日受稿）

Key words : 抗 HLA モノクローナル抗体，
methotrexate (MTX)，
cytosine arabinoside (ara-C)

結 言

ヒト癌に特異的な免疫化学療法の開発を目的として各種制癌剤ならびに細胞毒素に癌特異抗体を結合しようとする試みがなされている¹⁻³⁾。その内、制癌剤については methotrexate⁴⁻⁷⁾、adriamycin⁸⁾、neocarzinostatin²⁾その他³⁾に抗体を結合し、それら抗体結合制癌剤の生物活性について in vitro あるいは in vivo での研究がなされ報告されている。

我々の実験目的は各種制癌剤にモノクローナル抗体を covalent に結合させ抗体特異的制癌剤を作製、その生物活性を検討し臨床応用の可能性について研究することである。第 1 編においては bleomycin, mitomycin C, macromycin の各制癌剤に抗体を結合させ、その in vitro 生物活性について検討した。本編では抗 HLA マウスモノクローナル IgG₁抗体(H-1)に 2 種類の代謝拮抗制癌剤：cytosine arabinoside (ara-C)ならびに methotrexate (MTX) をそれぞれ結合させ、抗体特異性を付与し得るか否かを検討した。Ara-C あるいは MTX と抗体の結合は両代謝拮抗剤の結合における新しい試みとして multivalent carrier である dextran T-40 を支持体とする結合方法で H-1 に結合した。

実験材料及び実験方法

1) 薬剤

代謝拮抗制癌剤としては ara-C (日本新薬)、MTX 及び MTX エンザイム・アッセイキット (日本レダリー) を用いた。Dextran T-40 は Pharmacia Fine Chemicals 社、過ヨウ素酸ナトリウム、水素化ホウ素ナトリウムは SIGMA 社製を用いた。

2) 腫瘍細胞

急性リンパ球性白血病患者より樹立された null 白血病細胞株 (NALL-1)⁹⁾、B 白血病細胞株 (BALL-1)⁹⁾ を用いた。これらの細胞はともに HLA 抗原陽性である。コントロールとして、HLA 抗原陰性であるマウス骨髄腫細胞株、P3-NS1/1-Ag4-1(NS-1)¹⁰⁾ を使用した。これらの細胞は 37°C、5%CO₂ のインキュベーター内にて、RPMI 1640 に 10% 牛胎児血清 (FCS) と抗生物質を加えた培養液中で維持した。

3) モノクローナル抗体

当教室の春田が作製したハイブリドーマが産生する抗 HLA 抗体 IgG₁ (H-1)¹¹⁾ を BALB/c マウスの腹水抗体として集め、Protein A-Sepharose CL-4B affinity chromatography で精製し用いた^{12,13)}。

4) Ara-C と H-1 抗体の結合

Dextran T-40 を過ヨウ素酸ナトリウムで酸化して polyaldehyde-dextran (PAD) とし、蒸留

水に透析後凍結乾燥した¹⁴⁾¹⁵⁾。

PAD 60mg, H-120mgを10ml phosphate buffered saline, pH7.2 (PBS) で溶解し, 4℃, 24時間攪拌後, ara-C 40mg を加えて更に4℃, 24時間攪拌した。水素化ホウ素ナトリウム10mgを10ml PBSに溶解しその0.3mlを加えて更に2時間攪拌後, 超遠沈(10,000r.p.m., 30分)し, Sephadex G-200 カラムで分画した。Control IgG と ara-C も PAD で同様に結合させた。

結合物の組成は次の様にして求めた。IgG 量は Bio-Rad 法¹⁶⁾で求め, 吸光係数(マウス IgG の $E_{1\text{cm}}^{1\%}(280\text{nm})=14.5^{17)}$ で OD_{280} に変換し総 OD_{280} より差し引いた値を ara-C の吸光度とし, ara-C 検量曲線 ($E_{1\text{cm}}^{1\%}(280\text{nm})=320$) より ara-C 量を求めた。

5) MTX と H-1 の結合

PAD 60mg と H-1 20mg を 8 ml PBS で溶解し 4℃, 24時間攪拌後, 5 ml PBS に溶解した MTX 50mg を加えて更に 4℃ で 24時間攪拌した。水素化ホウ素ナトリウム 30mg を 10 ml PBS に溶解してその 0.2ml を加えて更に 2時間攪拌後, 超遠沈し, Sephadex G-200 カラムで分画した。control IgG と MTX を同様に PAD で結合させた。結合物中の IgG 量は Bio-Rad 法¹⁶⁾で求め, MTX 活性 (MTX equivalent) は エンザイム・アッセイ法で求めた。

6) 免疫学的分析

抗体と制癌剤結合前後の抗体の力価の変動を HLA 抗原陽性 NALL-1 を標的細胞とする間接膜蛍光抗体法で検討した。HLA 陰性 NS-1 細胞に対する制癌剤結合抗体の反応性についても同様に調べた。

7) H-1 抗体結合 ara-C の in vitro 細胞障害活性

3×10^6 個の HLA 抗原陽性 NALL-1 細胞を各種濃度の ara-C, H-1 結合 ara-C (ara-C-(H-1)) あるいは ara-C-control IgG を含む培養液に 37℃, 30分間あるいは 2時間接触させた後, 培養液で 2回洗浄し, 3日間培養してトリパン染色法で生細胞率を求めた。コントロールとして HLA 陰性細胞である NS-1 細胞についても同様の検討を行なった。

次に, 3×10^6 個の NALL-1 細胞を各種濃度の H-1, ara-C, ara-C-(H-1) あるいは ara-C-control IgG を含む培養液中で 3日間培養し, 同様に生細胞率を求めた。HLA 陰性 NS-1 についても検討した。

8) H-1結合 MTX の in vitro 細胞障害活性

3×10^6 個の HLA 抗原陽性 NALL-1 細胞あるいは BALL-1細胞を各種濃度の MTX, H-1 結合 MTX (MTX-(H-1)) あるいは MTX-control IgG を含む培養液に 37℃, 2時間培養後, 2回培養液で洗浄, 3日間培養した場合の生細胞率をトリパン染色法で求めた。NS-1 細胞についても同様の検討を行なった。

次に, 3×10^6 個の NALL-1 あるいは BALL-1 細胞を各種濃度の H-1, MTX, MTX-(H-1) あるいは MTX-control IgG を含む培養液中で 3日間培養し, 同様に生細胞率を求めた。NS-1 についても検討した。

結 果

1) H-1 結合制癌剤の分画

Ara-C, PAD と H-1 抗体の反応物を水素化ホウ素ナトリウムで還元し, Sephadex G-200 カラムで分画した。図 1 に示すように, 分画 1 は free IgG ピークにほぼ一致し, 分画 2 は free ara-C ピークにほぼ一致していた。Ara-C と H-1 を単に混合したものを Sephadex G-25 カラムにかけ最初に溶出したピークの吸収スペクトルは H-1 の吸収スペクトルに一致し, 上記分画 1 の吸収スペクトルとは異なっていた。さらに分画 1 のスペクトルは ara-C のそれと異なるものであり, このものが ara-C と H-1 の共有結合物である可能性が強く示唆された。以下この分画を ara-C-(H-1) とし実験をすすめた。

MTX と H-1 の結合においては, MTX, PAD と H-1 の反応物を水素化ホウ素ナトリウムで還元し, Sephadex G-200 カラムで分画した。図 2 に示すように, 分画 1 は free IgG ピークに, 分画 2 は free MTX ピークにそれぞれほぼ一致しており, エンザイム・アッセイ法による MTX 活性は分画 1, 分画 2 とともに認められた。MTX と H-1 を単に混合したものを Sephadex G-25 カラムにかけ最初に溶出したピークの吸収スペ

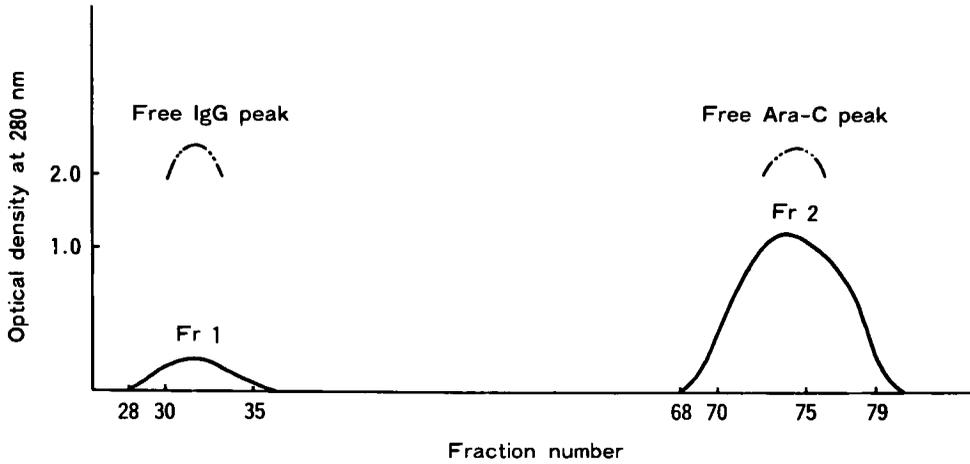


図1. Sephadex G-200カラムによる ara-C-(H-1)の分画.

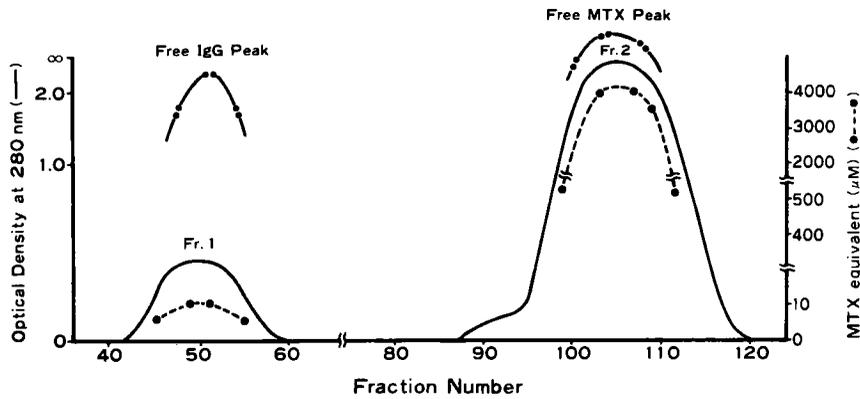


図2. Sephacryl S-300カラムによる MTX-(H-1) の分画.

クトルは H-1 の吸収スペクトルに一致し、分画 1 のそれとは異なっていた。即ち、MTX と H-1 を単に混合した場合には MTX-(H-1) は生じないことが示され、PAD を用いた反応の結果、MTX はデキストランを介して H-1 抗体に共有結合したことが判明した。

2) 抗体結合制癌剤の抗体活性

NALL-1 細胞を標的細胞とする間接膜蛍光抗体法を用いて結合反応前後の抗体活性を調べた。図 3 に示すように、MTX-(H-1) 及び ara-C-(H-1) の抗体活性は H-1 に比べて有意の低下を示さなかった。即ち、今回用いたデキストランによる結合方法では抗体活性の著明な低下を来さないことが示された。

3) トリパンプル法による殺細胞効果の検討

(1) ara-C-(H-1) の in vitro 細胞障害活性

図 4 に示すように、ara-C-(H-1)、ara-C 及び ara-C-control IgG を各濃度にて HLA 陽性 NALL-1 細胞と 37℃、30 分間あるいは 2 時間反応させ、培養液で 2 回洗浄、3 日間培養後、生細胞率を比較検討した。30 分薬剤を反応させた場合には、ara-C-(H-1) は ara-C より強く NALL-1 細胞を障害した。一方、ara-C-control IgG は ara-C と同程度の細胞障害作用を示した (図 4-A)。薬物反応時間を 2 時間にした場合には、ara-C-(H-1) と ara-C の NALL-1 細胞障害作用の差が 30 分の反応で検討した場合に比べて少なかった (図 4-B)。

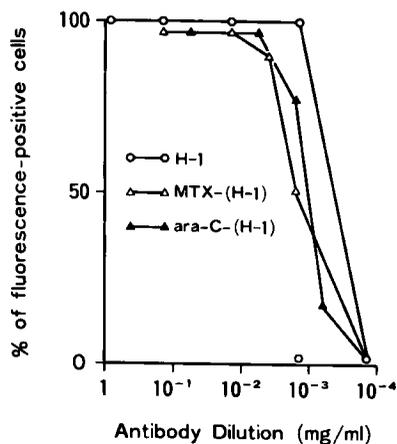


図3. 間接膜蛍光抗体法でみた H-1 と MTX, ara-C 結合前後の抗体価の比較.

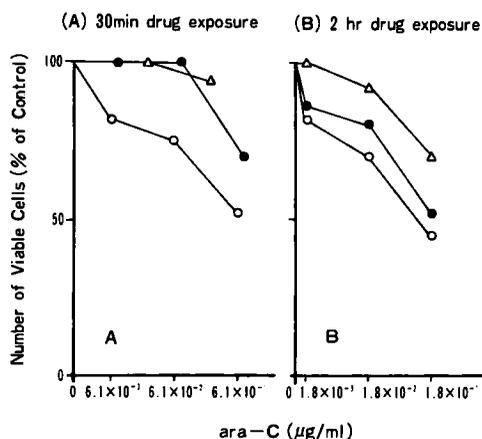


図4. Ara-C あるいは ara-C-(H-1) による NALL-1 細胞増殖阻害効果. 薬剤を (A) 30分間 (B) 2時間接触させた後, 3日間培養して生細胞率を求めた. 各点は duplicate の平均を示す. (○) ara-C-(H-1); (●) ara-C; (△) ara-C-control IgG.

次に ara-C-(H-1) の作用を HLA 陰性 NS-1 細胞に対し同様に検討した. この結果, 図5に示すように, 30分ならびに2時間の反応とともに ara-C-(H-1) の NS-1 細胞に対する細胞障害活性は ara-C に比し有意に弱いことが示された.

HLA 陽性 NALL-1 細胞を, ara-C-(H-1), ara-C, ara-C-control IgG 及び H-1 を含む培養液で3日間培養した場合の細胞増殖阻害効果の結果を図6-Aに示す. H-1 は細胞障害作用を示さなかったが, ara-C と ara-C-(H-1) は同等の細胞障害作用を示した. しかし, ara-C と ara-

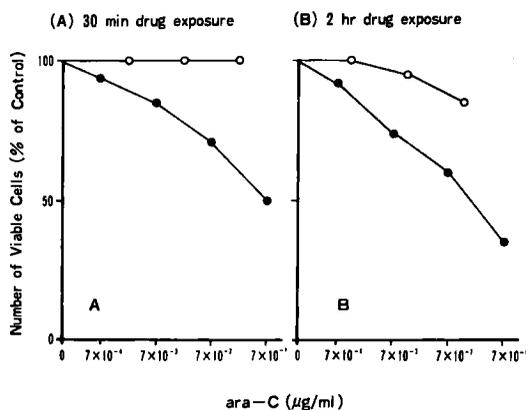


図5. Ara-C あるいは ara-C-(H-1) による NS-1 細胞増殖阻害効果. 薬剤を (A) 30分間 (B) 2時間接触させた後, 3日間培養した. 各点は duplicate の平均を示す. (○) ara-C-(H-1); (●) ara-C.

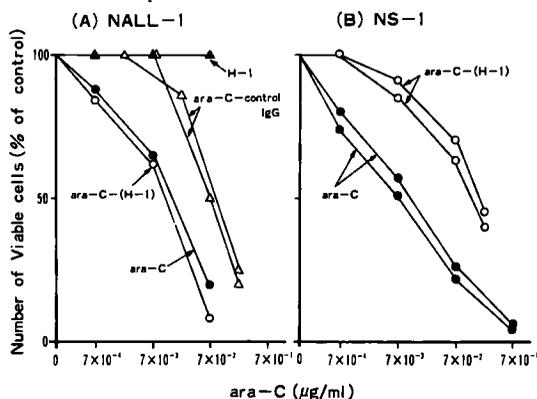


図6. Ara-C あるいは ara-C-(H-1) を含む培養液で培養した場合の細胞増殖阻害効果. NALL-1 (A) あるいは NS-1 (B) 細胞を薬剤を混入した培養液中で3日間培養した. 各点は duplicate の平均を示す.

C-(H-1) の NALL-1 細胞に対する50%殺細胞濃度 (IC_{50}) はそれぞれ $1.10 \pm 0.30 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$, $1.04 \pm 0.16 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$ であったのに対し, ara-C-control IgG の IC_{50} は $7.90 \pm 0.90 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$ であった. これらの結果は, ara-C-(H-1) は, 3日間作用させた場合, HLA 抗原陽性細胞に対し ara-C とほぼ同等の細胞障害活性を発揮するが, その作用は ara-C-control IgG に比し約7倍強いことを示しており, その差は統計的に有意であった ($p < 0.001$).

次に, HLA 陰性 NS-1 細胞に対する作用を同

様に検討した結果 (図 6-B), ara-C及びara-C-(H-1)のIC₅₀はそれぞれ $9.50 \pm 0.20 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$, $1.43 \pm 0.17 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$ であった。即ち, ara-C-(H-1)はHLA 陰性細胞に対し ara-C よ

り有意に約15倍障害作用が弱いことが示された ($p < 0.001$)。

(2) MTX-(H-1)の in vitro 細胞障害活性

図 7-A に示すように, MTX-(H-1), MTX, H-1 及び MTX-control IgG を含む培養液で HLA 陽性 NALL-1 細胞を 2 時間培養後, 2 回培養液で洗浄, 3 日間培養した場合の細胞増殖阻害効果を検討した。H-1 は細胞障害作用を示さなかったが, MTX-(H-1), MTX, MTX-control IgG の IC₅₀ はそれぞれ $2.50 \pm 0.50 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$, $8.40 \pm 0.55 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$, $4.00 \pm 0.60 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$ であり, MTX-(H-1) は NALL-1 細胞に対し, MTX ($p < 0.001$) および MTX control IgG ($p < 0.02$) より有意に強い細胞障害作用を発揮することが示された。一方, 図 7-B に示すように, HLA 陰性 NS-1 細胞に対しては MTX-(H-1), MTX, MTX-control IgG は同等の細胞障害作用を示した。

図 8-A に示すように, MTX-(H-1), MTX, H-1, MTX-control IgG を含む培養液で HLA 陽性 NALL-1 細胞を 3 日間培養した場合の細胞

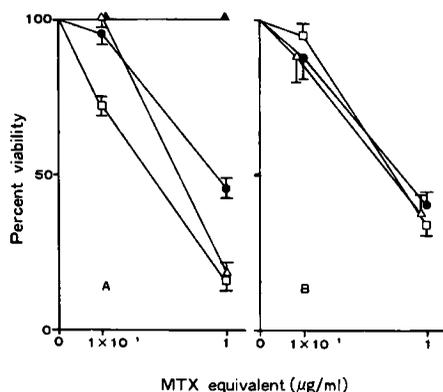


図 7. MTX あるいは MTX-(H-1) を 2 時間反応させた場合の細胞増殖阻害効果。NALL-1(A) あるいは NS-1(B) 細胞を薬剤と 2 時間反応させ 3 日間培養した。各点は triplicate の平均 ± 標準誤差を示す。
 (▲)H-1; (□)MTX-(H-1);
 (●)MTX; (△)MTX-control IgG.

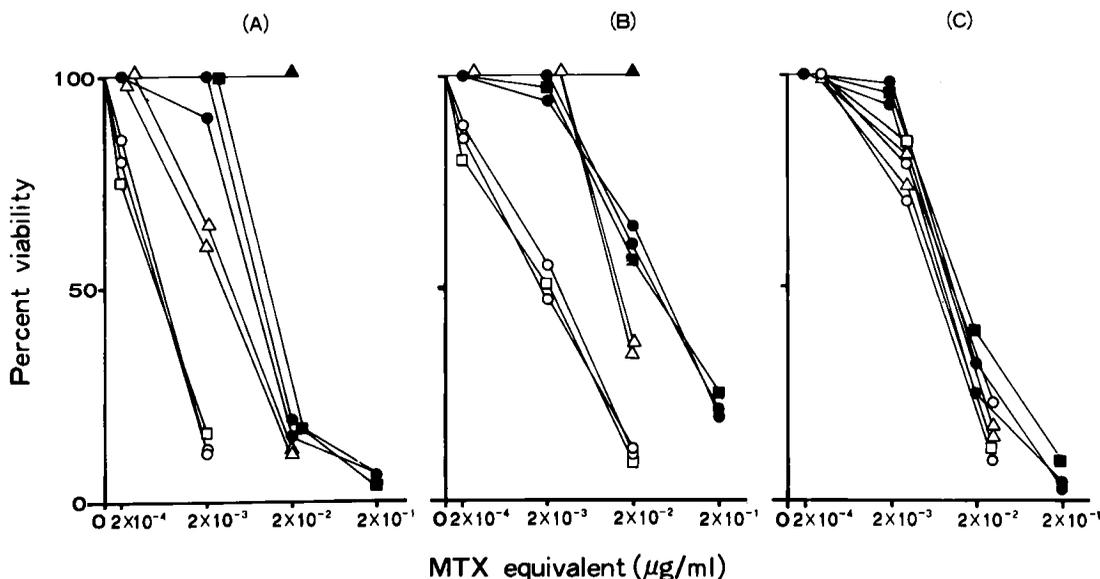


図 8. MTX あるいは MTX-(H-1) を含む培養液で培養した場合の細胞増殖阻害効果。NALL-1(A), BALL-1(B), NS-1(C) 細胞を薬剤を混入した培養液で 3 日間培養した。各点は duplicate の平均を示す。(▲) H-1;
 (○)MTX-(H-1)(MTX/IgG モル比: 3.96);
 (□)MTX-(H-1)(MTX/IgG モル比: 9.29);
 (●)MTX; (△)MTX-control IgG;
 (■)水素化ホウ素ナトリウムで還元した MTX.

増殖阻害効果を検討した、MTX-(H-1)、MTX、MTX-control IgG の IC₅₀ はそれぞれ 5.80 ± 0.20 × 10⁻⁴ μg/ml, 7.50 ± 0.70 × 10⁻³ μg/ml, 4.40 ± 0.40 × 10⁻³ μg/ml であった。即ち、MTX-(H-1) は NALL-1 細胞に対して MTX、MTX-control IgG よりそれぞれ約13倍あるいは7.6倍強い障害作用を示し、かつこの差は有意であった (p < 0.001)。更に、HLA 陽性 BALL-1 細胞に対する MTX-(H-1)、MTX、MTX-control IgG の IC₅₀ はそれぞれ 2.10 ± 0.40 × 10⁻³ μg/ml, 3.80 ± 0.20 × 10⁻² μg/ml, 1.30 ± 0.10 × 10⁻² μg/ml であり、MTX-(H-1) は BALL-1 細胞を MTX、MTX-control IgG よりそれぞれ約18倍あるいは6倍強く障害した。この差は NALL-1 細胞に対すると同様統計的に有意であった (p < 0.001)。一方、図 8-C に示すように、HLA 陰性 NS-1 細胞に対する MTX-(H-1)、MTX、MTX-control IgG の細胞障害作用はほぼ同等であった。なお、結合実験に使用した量とほぼ同量の水素化ホウ素ナトリウムで処理した MTX は MTX と同等の細胞障害作用を示した(図 8)。

考 按

著者は第 1 編において制癌抗生剤 bleomycin, mitomycin C, macromomycin をそれぞれ抗 HLA 抗体 (H-1) に結合させその生物活性について報告した。

今回の研究では、代謝拮抗制癌剤 ara-C, MTX を dextran T-40 を中間体として、それぞれ抗 HLA 抗体 IgG₁(H-1) を結合させその生物活性を in vitro で検討した。

Ara-C を抗体に結合させた報告はなく今回が初めての試みである。また MTX についてはこれまでに diazo 法⁴⁾、carbodiimide 法⁵⁾、mixed anhydride 法⁶⁾、active ester 法⁷⁾ で抗体に結合させ報告されているが、dextran を中間支持体として抗体に結合させた報告はなく今回が初めての試みである。multivalent carrier としての dextran を用いて抗体に結合させる利点は、抗体 1 分子に 1 種類の制癌剤の複数分子を結合させることができることと、抗体 1 分子に 2 種類以上の制癌剤を結合させる多剤併用療法の可能性

を有していることである³⁾。今回用いた dextran 法では、間接膜蛍光抗体法で判定したところ、抗体活性の有意な低下は認められなかった。

Dextran 法で MTX と抗体を結合させる場合、MTX の第 2 又は第 4 アミノ基が酸化デキストラン (PAD) と結合し Schiff base を形成するものと考えられるが、Venditti や Mead 等の研究グループは MTX が制癌作用を発揮するためには第 4 アミノ基は必要であるが第 2 アミノ基は重要ではないと報告した¹⁸⁻²⁰⁾。このことより考えると、今回作製した MTX-(H-1) のうち MTX 活性を有するものは第 2 アミノ基を通してデキストラン抗体に結合した結合体であると考えられる。次に MTX を還元したのも制癌効果を有することが報告されているが¹⁸⁾、本実験では、還元 MTX は MTX とほぼ同等の細胞障害作用を示し、かつ MTX-control IgG の作用はより弱いものであったので、MTX-(H-1) の増強された細胞障害作用は MTX 還元によるものではないと考えられる²¹⁾。

Ara-C-(H-1) は ara-C に比べ HLA 抗原陽性細胞に対し同等ないしより強い細胞障害作用を示し (図 4、図 6-A)、一方 HLA 陰性細胞に対しては弱い障害作用を示した (図 5、図 6-B)。MTX-(H-1) は MTX に比べ HLA 陽性細胞に対してより強い細胞障害作用を示し (図 7-A、図 8-A、-B)、一方 HLA 陰性細胞に対しては同等の細胞障害作用を示した (図 7-B、図 8-C)。

以上の結果、コントロール細胞である HLA 陰性細胞に対する障害作用を基準にして HLA 陽性細胞に対する障害作用を比較すると、ara-C-(H-1)、MTX-(H-1) は抗原陽性細胞に対しそれぞれ ara-C、MTX に比べより増強された細胞障害作用を示すことが明らかとなった。即ち、ara-C-(H-1) および MTX-(H-1) は結合された H-1 抗体により ara-C あるいは MTX の細胞障害作用に抗体特異性が付与されることが判明した。

代謝拮抗剤である ara-C、MTX に抗体を結合させた場合、抗体作用により標的細胞膜抗原に結合した抗体結合代謝拮抗剤はその後いかなる機序で細胞障害作用を発揮するか今回の実験

では不明である。本実験はモデル実験のため抗体として抗 HLA 抗体を用いたが、癌特異抗原を認識するモノクローナル抗体が得られるならば、ヒト悪性腫瘍の治療に応用し得る可能性があり、今後、in vivo における抗体結合代謝拮抗制癌剤の有用性についての検討が期待される。

結 語

代謝拮抗制癌剤 ara-C 及び MTX を dextran T-40 を用いて抗 HLA モノクローナル抗体 IgG₁

(H-1) に結合させた。このデキストランによる結合方法では抗体力価の有意の低下は認められなかった。

Ara-C-(H-1) 及び MTX-(H-1) は H-1 抗体作用により標的細胞である HLA 抗原陽性細胞の膜抗原に結合し抗体特異的細胞障害作用を發揮することが示された。

御指導を戴いた木村郁郎教授ならびに坪田輝彦博士に深謝致します。

文 献

1. Olsnes, S.: Directing toxins to cancer cells. *Nature* **290**, 84, 1981.
2. Kimura, I., Ohnoshi, T., Tsubota, T., Sato, Y., Kobayashi, T. and Abe, S.: Production of tumor antibody-neocarzinostatin (NCS) conjugate and its biological activities. *Cancer Immunol. Immunother.* **7**, 235—242, 1980.
3. Ghosé, T. and Blair, A.H.; Antibody-linked cytotoxic agents in the treatment of cancer: current status and future prospects. *J. Natl. Cancer Inst.* **61**, 657—676, 1978.
4. Mathe, G., Loc, T. and Bernard, J.: Effet sur la leucémie 1210 de la souris d'un combinaison par diazotation d'améthoptérine et de γ -globulines de hamsters porteurs de cette leucémie par hétérogreffe. *C.R. Acad. Sci.* **246**, 1626—1628, 1958.
5. Robinson, D.A., Whiteley, J.M. and Harding, N.G.L.: Cell-directed antimetabolites: alternative syntheses of cytotoxic methotrexate-containing macromolecules. *Biochem. Soc. Trans.* **1**, 722—726, 1973.
6. Burstain, S. and Knapp, R.: Chemotherapy of murine ovarian carcinoma by methotrexate-antibody conjugates. *J. Med. Chem.* **20**, 950—952, 1977.
7. Kulkarni, P.N., Blair, A.H. and Ghose, T.I.: Covalent binding of methotrexate to immunoglobulines and the effect of antibody-linked drug on tumor growth in vivo. *Cancer Res.* **41**, 2700—2706, 1981.
8. Hurwitz, E., Levy, R., Maron, R., Wilchek, M., Arnon, R. and Sela, M.: The covalent binding of daunomycin and adriamycin to antibodies, with retention of both drug and antibody activities. *Cancer Res.* **35**, 1175—1181, 1975.
9. Miyoshi, I., Hiraki, S., Tsubota, T., Kubonishi, I., Matsuda, Y., Nakayama, T., Kishimoto, H. and Kimura, I.: Human B cell, T cell and null cell leukemic cell lines derived from acute lymphoblastic leukemias. *Nature* **267**, 843—844, 1977.
10. Köhler, G. and Milstein, C.: Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.* **6**, 511—519, 1976.
11. 春田祐郎: Null 細胞型急性リンパ球性白血病細胞株, NALL-1 に対する monoclonal 抗体の作製とその解析. *岡山医学会雑誌* **96**, 137—147, 1984.
12. Ey, P.L., Prowse, S.J. and Jenkin, C.R.: Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b} immunoglobulines from mouse serum using protein A-Sepharose. *Immunochemistry* **15**, 429—436, 1978.
13. Watanabe, M., Ishii, T. and Nariuchi, H.: Fractionation of IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} and IgG₃ immunoglobulines from mouse serum by Protein A-Sepharose column chromatography. *Jpn. J. Exp. Med.* **51**, 65—70, 1981.

14. Foster, R.L.: Preparation and properties of a soluble trypsin-dextran conjugate. *Experientia* **31**, 772—773, 1975.
15. Hurwitz, E., Maron, R., Bernstein, A., Wilchek, M., Sela, M. and Arnon, R.: The effect in vivo of chemotherapeutic drug-antibody conjugates in two murine experimental tumor systems. *Int. J. Cancer* **21**, 747—755, 1978.
16. Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248—254, 1976.
17. Hudson L. and F.C. Hay.: *Practical Immunology*, Second Edition, Blackwell Scientific Publication, Edinburgh, p. 3. 1980.
18. James, F., Holland and Emil, Frei III, *Cancer Medicine*, Second Edition, Philadelphia, 1982, Lea and Fediger, p. 775.
19. Mead, J.A.R., Wood, H.B., Jr and Goldin, A.: Relationship of structure to antitumor activity in compounds related to folic acid. *Cancer Chemother. Rep. (Part 2)* **1**, 273—361, 1968.
20. Venditti, J.M., Humphreys, S.R., Mantel, N., Kline, I. and Goldin, A.: Evaluation of antileukemic agents employing advanced leukemia L1210 in mice. III. Congeners of folic acid. *Cancer Res. (part II)* **20**, 698—705, 1960.
21. Manabe, Y., Tsubota, T., Harta, Y., Kataoka, K., Okazaki, M., Haisa, S., Nakamura, K. and Kimura, I.: Production of a monoclonal antibody-methotrexate conjugate utilizing dextran T-40 and its biological activity. *J. Lab. Clin. Med.* **104**, 445—454, 1984.

**Studies of anticancer agent-mono-clonal antibody conjugates
and their biological activities**

**Part II. Production of anti-HLA monoclonal antibody-ara-C and
-MTX conjugates and their biological activities**

Yuichi MANABE

Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director: Prof. I. Kimura)

The anticancer agents 1- β -D-arabinofuranosylcytosine (ara-C) and methotrexate (MTX) were linked covalently to murine monoclonal IgG₁ antibody (H-1) with the use of dextran T-40. H-1 alone did not inhibit cell growth. The ara-C-(H-1) conjugate showed weaker cytotoxicity to an HLA-lacking cell line than ara-C, while ara-C-(H-1) and ara-C showed the same cytotoxicity to HLA-bearing cells. The MTX-(H-1) conjugate showed stronger cytotoxicity to HLA-bearing cells than MTX, while MTX-(H-1) and MTX showed the same cytotoxicity to cells lacking HLA. These results indicate that ara-C-(H-1) and MTX-(H-1) exert antibody-targeting cytotoxicity in vitro.