

博士論文

ROB01 抗原に対する scFv-hFc 型二重特異性抗体の開発
Development of scFv-hFc type bispecific antibody for ROB01

渡邊 裕治

東京大学大学院工学系研究科
バイオエンジニアリング専攻

2019 年度
(令和元年度)

ROB01 抗原に対する scFv-hFc 型二重特異性抗体の開発
Development of scFv-hFc type bispecific antibody for ROB01

津本研究室
指導教員 津本浩平 教授

目次

第1章、序論

- 第1節、二重特異性抗体の開発
- 第2節、バイパラトピックな二重特異性抗体
- 第3節、抗 ROBO1 二重特異性抗体の開発
- 第4節、本研究の目的

第2章、hFc を融合した抗 ROBO1 単結合性および二重特異性抗体の分子設計

- 第1節、抗 ROBO1 二重特異性抗体の分子設計
- 第2節、抗 ROBO1 単結合性抗体の発現精製結果と熱安定性
- 第3節、抗 ROBO1 二重特異性抗体の発現精製結果と熱安定性
- 第4節、本章の総括

第3章、高親和性 scFv-hFc 型抗 ROBO1 二重特異性抗体の総合評価

- 第1節、二重特異性の証明について
- 第2節、sROBO1 抗原とイムノフュージョン型単結合性抗体の発現精製
- 第3節、イムノフュージョン型二重特異性抗体の反応熱評価
- 第4節、単結合性および二重特異性抗体の抗原に対する親和性評価
- 第5節、本章の総括

第4章、抗体が結合した ROBO1 に対するリガンドの親和性の総合評価

- 第1節、本章の序論
- 第2節、Slit2N の発現精製
- 第3節、293 細胞株を用いた ROBO1 の細胞外ドメインの発現精製
- 第4節、抗原抗体複合体を用いた Slit2N の親和性評価
- 第5節、本章の総括

第5章、肝がん細胞株を用いた二重特異性抗体の結合評価

第1節、本章の序論

第2節、肝臓がん培養細胞株における ROBO1 の発現

第3節、本章の総括

第6章、本研究の総括

第1節、発現系の妥当性について

第2節、高親和性抗体の意義

第3節、ROBO1 の四次構造について

第4節、肝がん細胞株への抗体の結合について

第5節、二重特異性抗体の設計方法

実験手法

謝辞

引用文献

第 1 章

序論

第1章、序論

第1節、二重特異性抗体の開発

マウスに免疫して作製されたモノクローナル抗体の抗原認識部位を用いて、単一の抗体でありながら異なる二つの抗原を認識する二重特異性抗体の研究開発が進められてきた^{1,2}。これまでに作製された二重特異性抗体は、ひとつの抗原認識部位でがん抗原と結合し、もうひとつの抗原認識部位で CD3 や CD4 といった T 細胞に特有に発現する抗原を認識することで、T 細胞とがん細胞を生体内で近接させる手法を用いたがん治療への応用を目指したものが多く存在する^{3,4,5,6,7,8}。二重特異性を発揮する抗体の構造としては、本来の抗体の構造が二つの重鎖がジスルフィド結合を中心に会合するヘテロテトラマーを形成していることから、それぞれ異なる抗原を認識する抗体の重鎖と軽鎖からなるプロトマーを組み合わせた構造の二重特異性抗体が考え出された。さらに、抗体の可変領域をポリペプチド鎖でつないだ一本鎖抗体（Single-chain variable fragment：scFv）を用いて、別々の抗体を一本鎖で直接つなげるタンデム型（Tandem type）や、二本鎖でつなげるダイアボディ型（Diabody type）の二重特異性抗体が開発された。抗体の抗原認識部位を別の抗体の Fc 部分の C 末端に融合させたイムノフュージョン型（Immunofusion type）と呼ばれる二重特異性抗体も開発されてきた（図 1-1）。

天然に存在する抗体分子から、二重特異性抗体といった融合抗体を作製する場合、タンパク質の構造情報から融合抗体を設計しても、設計した融合抗体が必ずしも得られるとは限らない。例えば、天然では二本鎖で構成される抗体の抗原認識部位を一本鎖で構成させる scFv とした場合、フォールディングが天然の構造のようにできず、強固な二次構造を形成できないこともある。また、イムノフュージョン型のように、天然には存在しない位置に、scFv 型の抗体を融合した場合、Fc の C 末端と scFv との間に立体障害が生じてしまう可能性も考えられる。設計した分子とおりの構造を形成する抗体が作製できているかは、タンパク質のフォールディングに関する物性解析を行うことが重要である。また、抗体が高次構造を有していたとしても、元々の親抗体の親和性や特異性を維持しているとは限らない。作製した融合抗体が標的抗原に対し、親抗体と同等の機能性を有しているかを検証する必要がある。

これまでに、このような物性解析と試行錯誤の積み重ねによって、目的とする機能を有する融合抗体の開発が進められてきた⁹。

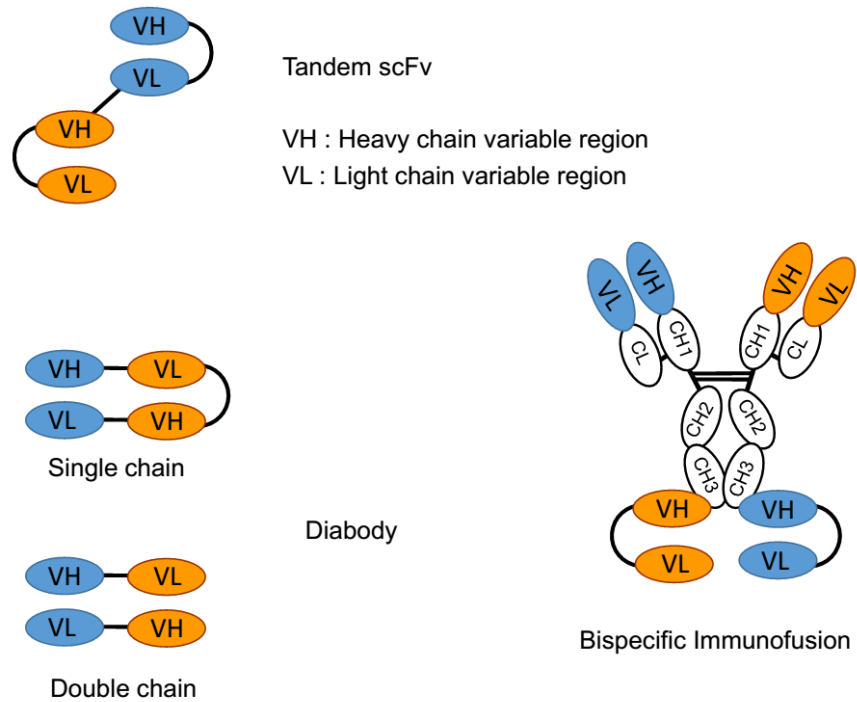


図 1-1. 二重特異性抗体の構造。 これまでに抗原認識部位の距離が異なる様々な二重特異性抗体が報告されてきた。本研究に関わる代表的な例を示す。抗体の可変領域を重鎖と軽鎖で折りたたんだ scFv を、直鎖でつなげた構造をタンデム scFv と呼び、重鎖と軽鎖の可変領域を互い違いに並べて scFv 間を二本鎖で折りたたんだ構造をダイアボディと呼ぶ。ダイアボディには、一本鎖でつなげた単独発現系と、二本鎖でつなげた共発現系で作製される形がある。また、抗体の Fc の C 末端に抗体の可変領域を融合させたものをイムノフュージョンと呼ぶ。

第2節、バイパラトピックな二重特異性抗体

標的抗原の同一分子内で異なるエピトープを認識する、いわゆるバイパラトピックな二重特異性抗体も開発され^{10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17}、乳がん細胞に発現する標的抗原である HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2) に結合し細胞内への内在化をもたらすものや^{18, 19, 20, 21}、がん組織の血管新生に重要な役割を果たすことが知られ、様々ながん細胞種に発現する標的抗原である VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) に結合し、その血管新生シグナルを阻害するものがある^{22, 23}。このように、単一の抗原のエピトープを認識するマウスモノクローナル抗体からバイパラトピックな二重特異性抗体を作製した結果、親抗体である単結合性抗体が持っていなかった機能を発揮する分子を作り出せる可能性がある。バイパラトピックな二重特異性抗体は、抗原認識部位を連結させた融合抗体を作製しても、この抗体が抗原の一分子内の異なるエピトープに結合している場合と、別の抗原分子に結合している場合、つまりは、抗体一分子に抗原二分子が結合している場合が起こり得る (図 1-2)。

このような背景から、目的とする機能を果たすための抗体が作製できているかは、抗体自身の物性解析や、抗体の抗原に対する結合の評価が重要になる²⁴。

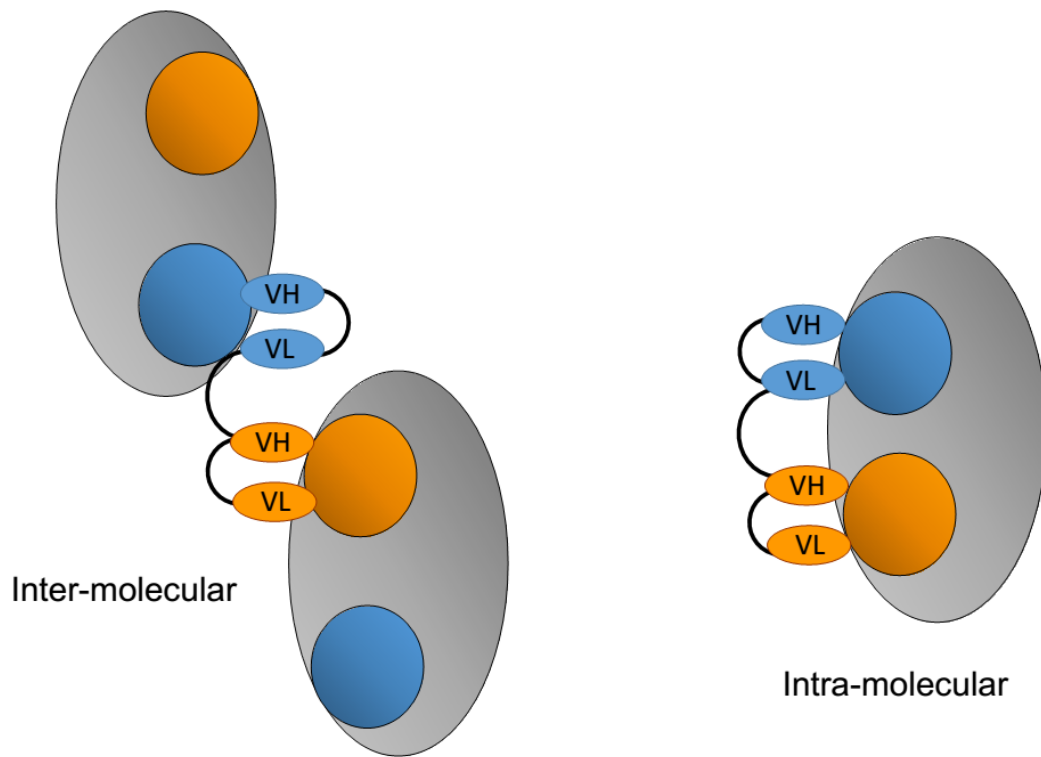


図 1-2. バイパルトピックな二重特異性抗体の結合。 同一分子に存在する異なるエピトープを同時に認識する二重特異性抗体をバイパルトピックな二重特異性抗体と呼ぶ。バイパルトピックな二重特異的な結合には、標的分子間での結合と標的分子内での結合を起こす場合がある。

第3節、抗 ROBO1 二重特異性抗体の開発

本研究においては、近年いくつものがん細胞種において高発現していることが報告されている ROBO1 (Roundabout1)^{25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38}に対する二重特異性抗体を開発する。ROBO1 は、全長でおよそ 140kDa におよぶ、細胞外受容体一回膜貫通型タンパク質であり、細胞外ドメインの構造は、N 末端側から5つのイムノグロブリン様ドメインと3つのフィブロネクチンドメインから構成される(図 1-3)。3つ目のフィブロネクチンドメインと細胞膜との間は、膜近傍領域 (Juxta-membrane domain) と呼ばれ、ここでマトリックスメタロプロテアーゼ MMP (Matrix metalloproteinase) と γ-セクレターゼによって切断され、およそ 100kDa の sROBO1 (soluble ROBO1) として、細胞外へ放出されることが報告されている^{39, 40}。特に実際の肝臓がんの患者の血清中には、この sROBO1 が検出されることから、ROBO1 に対する抗体はがんの診断や治療に有効ではないかということが提唱されてきた⁴¹。また、ROBO1 は受容体としての役割を持ち、リガンドは Slit2 である。Slit2 は、N 末端側のおよそ 140kDa と C 末端側のおよそ 55~60kDa に分解され、ROBO1 に結合するのは、N 末端側の4つのロイシンリッチリピートドメインと6つの上皮細胞増殖因子 (Epidermal Growth Factor) ドメインからなる Slit2N である。Slit2 も膵臓癌などに高発現しているという報告もあるが、正常細胞では主に肺などに発現が確認されてる⁴²。ROBO1 は始め、ショウジョウバエの胚発生期において、神経軸索が正しい方向に伸長するように機能する遺伝子として報告された⁴³。この Slit2 との結合によって、ROBO1 は細胞伸長に反発性のシグナルを伝えることで、神経軸索の発生を誘導していることが知られている^{44, 45}。

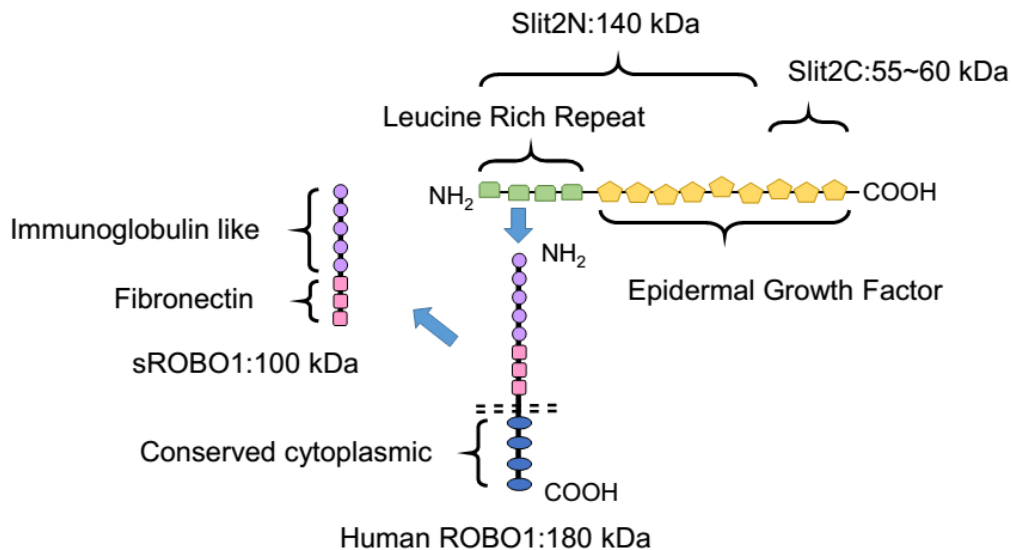


図 1-3. ROBO1 と Slit2 の構造。ROBO1 は、プロテアーゼによって細胞外ドメインで切断されることが知られている。Slit2 は細胞膜に貫通せずにアンカー型で細胞膜に結合しているか、切断されて Slit2N として細胞膜に結合しない状態でも存在する。Slit2 は、N 末端側から 2 番目のロイシンリッチリピートドメインが、ROBO1 の N 末端から 1 番目のイムノグロブリン様ドメインと結合する報告がある。

本研究がスタートした時点では、ROBO1 の細胞外ドメイン全長の高次構造は解かれていなかった。しかしながら、高次構造が解析されていなくても、実際の細胞において ROBO1 の複数の細胞外ドメインが位置を変え、構造変化が起こることが考えられる。また、この複数の細胞外ドメインから構成される ROBO1 と Slit2N が結合した際に、お互いの立体構造変化が起こる可能性も考えられる。その場合、ROBO1 の異なる各細胞外ドメインに跨って存在するエピトープに対して結合するバイパラトピックな二重特異性抗体は、このような立体構造変化を起こした ROBO1 に対しても結合できるかどうかについては検証が必要である。ROBO1 に限らず、このような立体構造変化が起こりうる標的抗原に対しては、そのような変化に対応できるバイパラトピックな二重特異性抗体の開発が重要である。

ROBO1

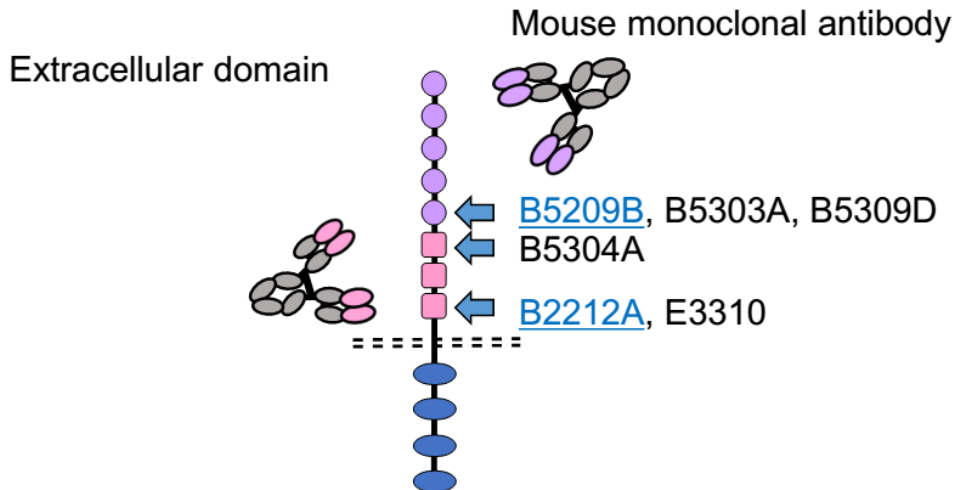


図 1-4. 各種抗 ROBO1 抗体。5 番目のイムノグロブリン様ドメインを認識する抗体が 3 つ、1 番目および 3 番目のフィブロネクチンドメインを認識する抗体が、それぞれ 1 つと 2 つ作製され解析が進められた。

これまでに ROBO1 抗原をマウスに免疫することによって、抗 ROBO1 マウスモノクローナル抗体が複数作製されてきた (図 1-4)⁴⁶。その中でも 5 番目のイムノグロブリン様ドメインを認識する抗体 B5209B と、3 番目のフィブロネクチンドメインを認識する抗体 B2212A が、高親和性を有することから当研究室ではこの二つの抗体を中心に研究を進めてきた^{47,48}。これまでに、高親和性抗体の作製を目指すため、B2212A および B5209B 抗体の可変領域をポリペプチド鎖でつないだ scFv から、それぞれ 2 つを 4 価になるように化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 由来の共有結合タグで融合させたバイパラトピックな二重特異性抗体が開発された^{49,50,51}。この二重特異性抗体の抗原への親和性は、10 のマイナス 11 乗 M の値を有し、抗原に対し高親和性になることが示された。しかしながら、この報告では抗体の熱安定性は評価しておらず、抗体の熱安定性と親和性との総合的な評価については成されていない。また、この報告での二重特異性抗体の連結部位は、微生物由来のアミノ酸配列で構成されていることから、生体内での免疫原性についての課題も残されている⁵²。

第4節、本研究の目的

本研究では、新しい抗 ROBO1 二重特異性抗体を作製するために、先行研究に倣い、scFv によって高親和性になる4価のバイパラトピックな二重特異性抗体の開発を目指す。また、免疫原性を下げるため、抗体分子の配列由来のタンパク質になるようにFc融合抗体となるような分子設計を考案する。Fc融合抗体であれば、4価の抗体を作りやすい。そして、scFv-Fc融合型の二重特異性抗体の抗原に対する親和性と、フォールディングするそれぞれのドメインの熱安定性を総合的に評価しながら、二重特異性抗体を作製する。本研究の目的は、この作製した二重特異性抗体が有する各々のscFvおよびFcの各ドメインに強固なフォールディングを形成させることであり、さらに、先行研究と同等に標的抗原に対し10のマイナス11乗Mの値を有する高親和性二重特異性抗体を作製することである。また、次の目的として、作製したバイパラトピックなこの二重特異性抗体が、実際ががん細胞上に発現する標的抗原であるROBO1に結合することを示す。がん治療への応用を目指した時に、作製した二重特異性抗体が組換えタンパク質だけでなく、実際のがん細胞上に発現する抗原へも結合することができなければ、将来的な治療への効果が期待できない。

作製した二重特異性抗体の各ドメインのフォールディングが強固で、かつ、高親和性の抗体を複数作製することに成功した場合は、それぞれの抗体分子内でのscFvの位置関係や動きの自由度が変化したことによる、標的抗原に対する結合の違いを検証する。scFvを様々な条件で持つバイパラトピックな二重特異性抗体を開発できれば、大きく構造変化を起こした細胞外ドメインに対しても、柔軟に対応できる抗体が作製できるのではないかと考えた。近年、ROBO1の細胞外ドメインに関して、ROBO1は、Slit2Nとの結合によって大きく立体構造を変化させることが報告された。そこで、二重特異性抗体のROBO1に対する結合と、リガンドであるSlit2Nの結合を比較することで、立体構造を大きく変化したROBO1にも二重特異性抗体が結合できるかを検証する。

最後に展望として、これらの結果から考えられる、がん治療への応用を目指して、求められる二重特異性抗体の機能や用途について考察する。

第 2 章

hFc を融合した抗 ROBO1 単結合性および二重特異性抗体の
分子設計

第2章、hFc を融合した抗 ROB01 単結合性および二重特異性抗体の分子設計

第1節、抗 ROB01 二重特異性抗体の分子設計

本研究では、B2212A と B5209B の scFv と、ヒト抗体の hFc を融合させる二重特異性抗体の作製を目指す (図 2-1)。hFc 融合抗体を作製する理由として、プロテイン G セファロースで容易に培養上清中から精製できること、二量体を形成するため2価や4価の抗体を作るのが容易であること、hFc を構成する CH2 および CH3 ドメインは熱安定性が高いことなどの有益な特徴を持たせること可能になる点が挙げられる^{53,54}。また、ヒト配列由来であることから生体内での免疫原性が低いことも考えられる。作製する抗体は、hFc に糖鎖が付加される大きな分子になることから、バキュロウイルス発現系を用いた^{55, 56, 57}。scFv 型の二重特異性抗体として、長さが最大で約 18 Å におよぶことが知られている4つのグリシンと1つのセリンからなる G4S リンカーを4つつなぐことによって作製した⁵⁸、リンカー: (G4S)₄ を一本鎖で二つの scFv 間をつないだタンデム型または二本鎖の (G4S)₄ をつないだダイアボディ型、そして hFc の N 末端と C 末端に scFv を融合させたイムノフュージョン型を設計した。ダイアボディ型に関しては、フォールディングし合う2つの scFv を一本のポリペプチド鎖で発現させたものと、二本のポリペプチド鎖で発現させたものを設計した。また、各々について、scFv の順番を入れ換えたコンストラクトを作製した。なお、scFv を一本鎖でフォールディングさせる場合は、重鎖と軽鎖の可変領域を (G4S)₄ リンカーで融合させた。

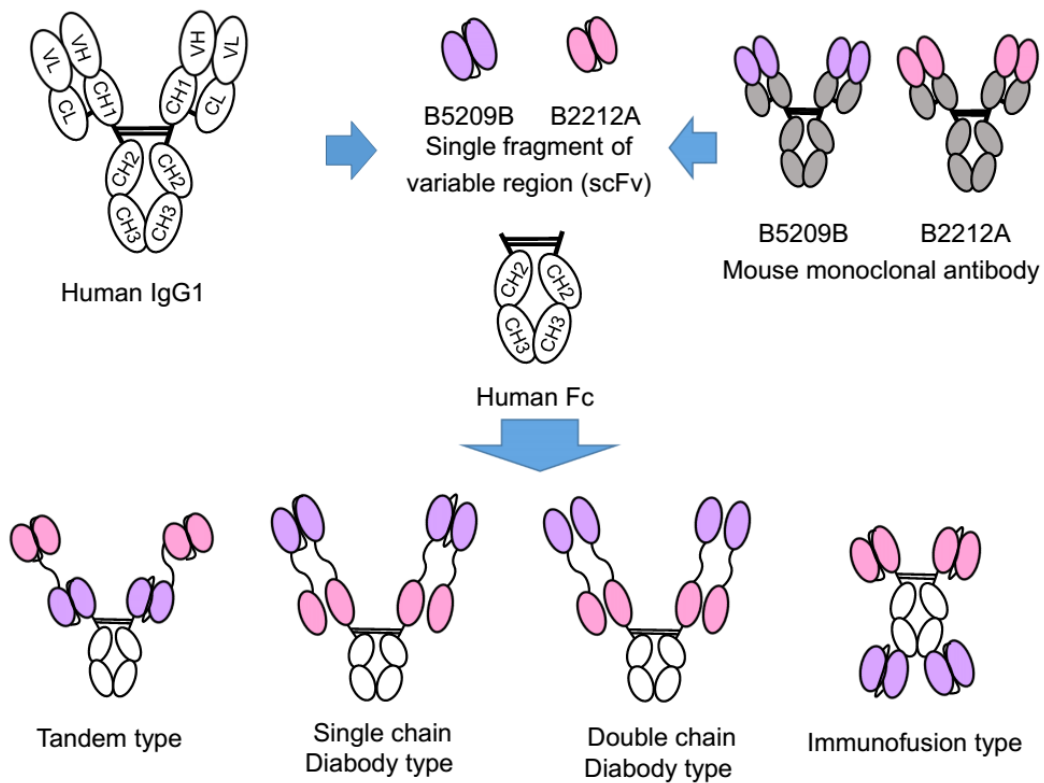
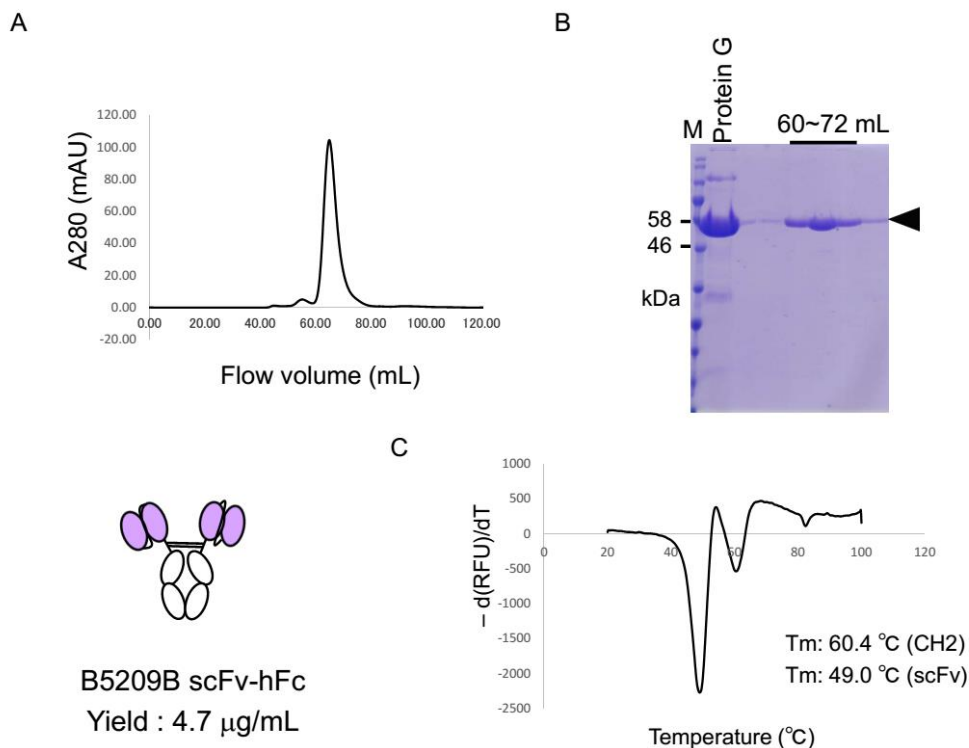


図 2-1. 本研究で作製した二重特異性抗体のデザイン。抗原認識部位の位置関係を変化させるために様々な二重特異性抗体を設計した。Fc の N 末端に二つつなげる場合、scFv 間は、1つまたは2つの $(G4S)_4$ リンカーで結んだ。本研究ではそれぞれ、タンデム型、ダイアボディ型と呼ぶ。scFv 内の重鎖と軽鎖の変領域をつなげる場合は $(G4S)_4$ リンカーで結んだ。Fc の C 末端に抗原認識部位をつなげた Immunofusion type のことを Double scFv や $(scFv)_4$ -Fc と呼ぶこともあるが、本研究では他の抗体と区別するために、これをイムノフュージョン型と呼ぶ。

第2節、抗 ROBO1 単結合性抗体の発現精製結果と熱安定性

比較検討のため、B5209B と B2212A の scFv が一つだけ hFc に融合した場合について比較検討するため、scFv-hFc 型の単結合抗体を作製した発現精製結果を示す (図 2-2)。昆虫細胞 Sf9 にバキュロウイルス液を感染後、3 日目の培養上清中から、プロテイン G セファロースを用いて精製し、さらにサイズ排除クロマトグラフィー (Size Exclusion Chromatography : SEC) による二段階精製を行った。この時の平均的な収率も示す。さらに、タンパク質のフォールディングを解析する示差走査蛍光定量法 (Differential Scanning Fluorimetry : DSF) を用いて、作製した単結合性抗体の scFv と CH2 ドメインの融点 T_m を測定した。scFv を単独で hFc に融合させた時の T_m 値は、49~50 °C 付近であり、hFc の T_m 値は、60 °C 程度となっている。



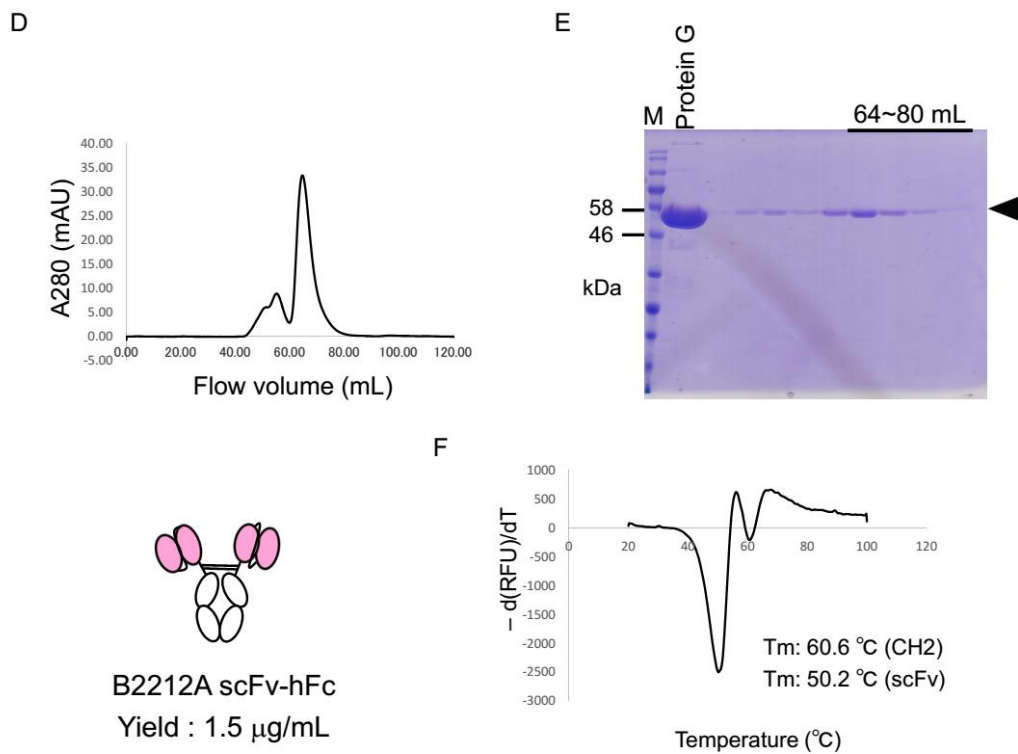
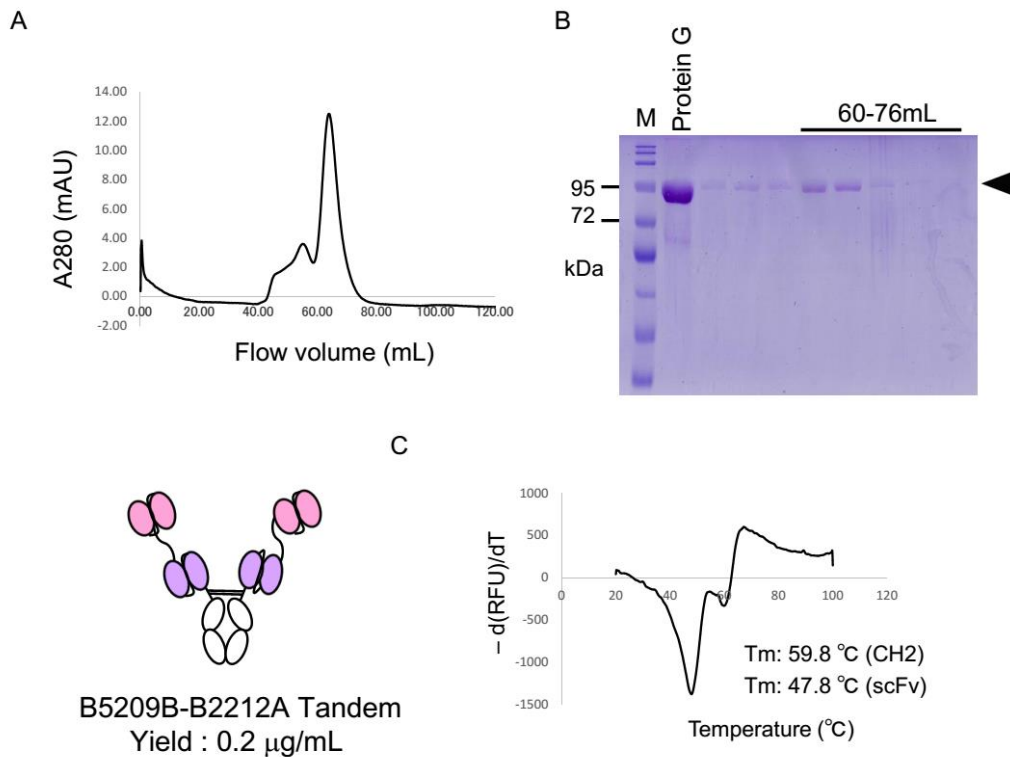


図 2-2. 抗 ROB01 単結合性抗体の発現精製。 抗 ROB01 単結合性抗体をプロテイン G セファロースを用いてアフィニティー精製後、サイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。ホモ二量体に相当するピークが主に検出され、これより大きな分子量である凝集体を除くことができた。B5209B scFv-hFc について、A は、HiLoad Superdex 200 16/600 pg カラムによって精製した結果、B は、その SDS-PAGE の結果を示す。図の体積は、凝集体を除いて解析に用いた画分を示す。M は、マーカー。Protein G は、プロテイン G セファロースを用いて培養上清から精製したサンプルを限外ろ過で濃縮して、PBS で透析した後のサンプルである。C は、DSF を用いて単結合性および二重特異性抗体の各ドメインの Tm 値を求めた結果を示す。D、E、F は、それぞれについての B2212A scFv-hFc に関する結果を示す。

第3節、抗 ROBO1 二重特異性抗体が発現精製結果と熱安定性

まずは、単純にこの scFv-hFc 型の単結合性抗体に (G4S)₄ リンカーによって融合させたタンデム型の二重特異性抗体の発現精製結果と熱安定性を示す (図 2-3)。SDS-PAGE の結果から、目的とする分子量のところにタンパク質の存在が確認できる。scFv をタンデムに2つ融合させたことによって、scFv を単独で hFc に融合させた時と比べると、収率は大幅に下がってしまった。また、DSF を用いた T_m 値の測定結果は、CH2 ドメインに大きな変化はないものの、scFv の T_m 値が約 2 °C程減少している。このことから、scFv を一本の (G4S)₄ リンカーによってタンデムに融合させただけでは、scFv 間に強固なフォールディングを形成させることができず、結果的に収率が下がってしまったことが考えられた。そこで、二つの scFv 間を二本の (G4S)₄ リンカーによって、融合させるダイアボディ型の抗体を作製することとした。



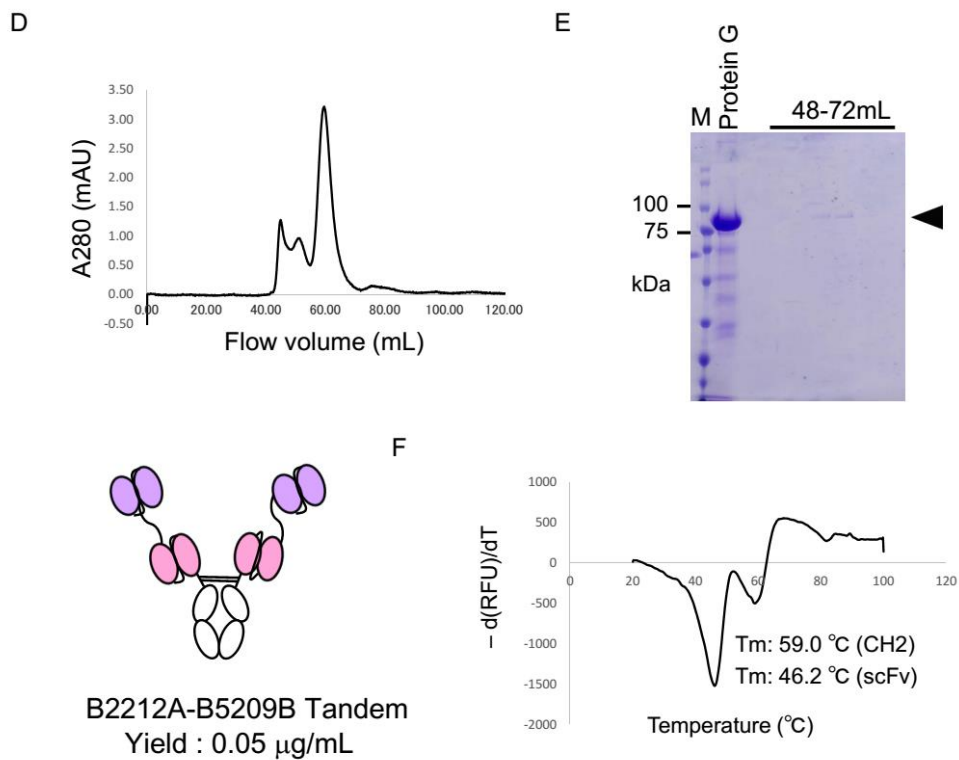
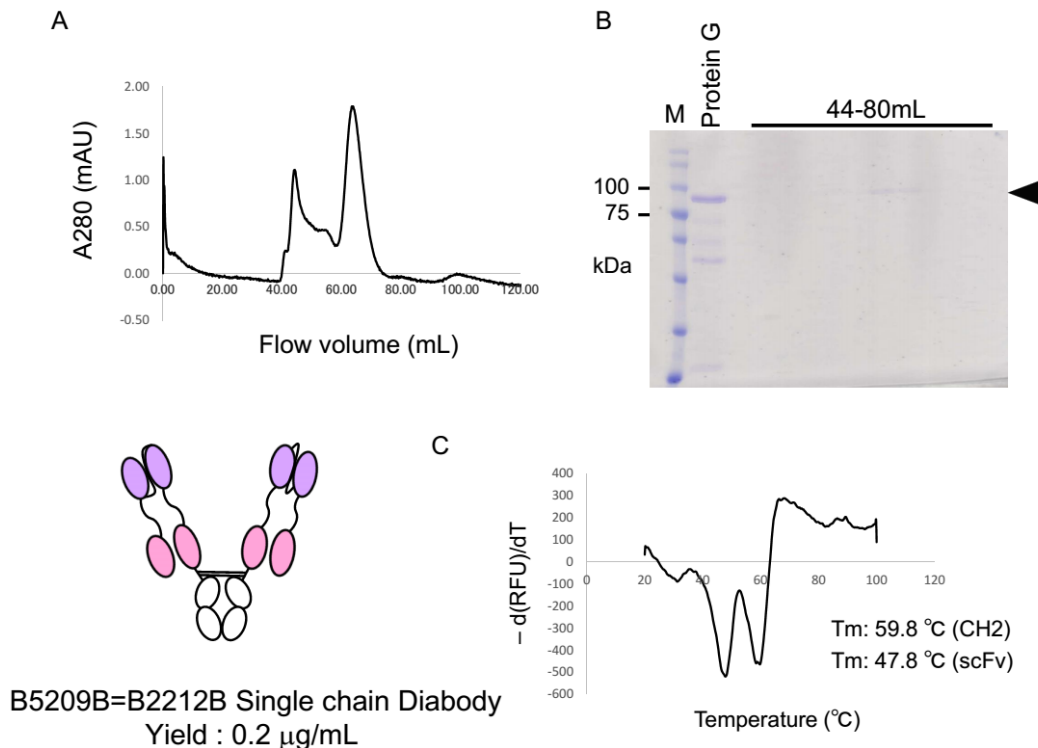


図 2-3. タンデム型抗 ROB01 二重特異性抗体の発現精製。 タンデム型抗 ROB01 単結合性抗体をプロテイン G セファロースを用いてアフィニティー精製後、サイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。ホモ二量体に相当するピークが主に検出された。B5209B-B2212A Tandem について、A は、HiLoad Superdex 200 16/600 pg カラムによって精製した結果、B は、その SDS-PAGE の結果を示す。C は、DSF を用いて単結合性および二重特異性抗体の各ドメインの T_m 値を求めた結果を示す。D、E、F は、それぞれについての B2212A-B5209B Tandem に関する結果を示す。

一本のポリペプチド鎖によって、二つの scFv 間を二本の (G4S)₄ リンカーで融合させるダイアボディ型二重特異性抗体の発現精製結果と熱安定性を示す (図 2-4)。これらのタンパク質も SDS-PAGE の結果から、目的とする分子量のところに発現が確認できる。scFv をダイアボディ型に融合させたことによっても、scFv を単独で hFc に融合させた時と比べると、収率は改善されなかった。特に B2212A=B5209B Single chain Diabody は、DSF を用いた T_m 値の測定結果は、scFv の T_m 値が約 10 °C 程減少し、収率も大幅に悪化した。これらの結果は、ダイアボディ型は二つの scFv が一本のポリペプチド鎖でつながれていた場合、各々の scFv がお互いの VH と VL が向き合うようなフォールディングを形成させるには、むしろ困難な状況にあると考えた。そこで次に、VH と VL を本来の抗体が、重鎖と軽鎖で高次構造を形成するように、二本鎖のダイアボディ型二重特異性抗体を設計することとした。



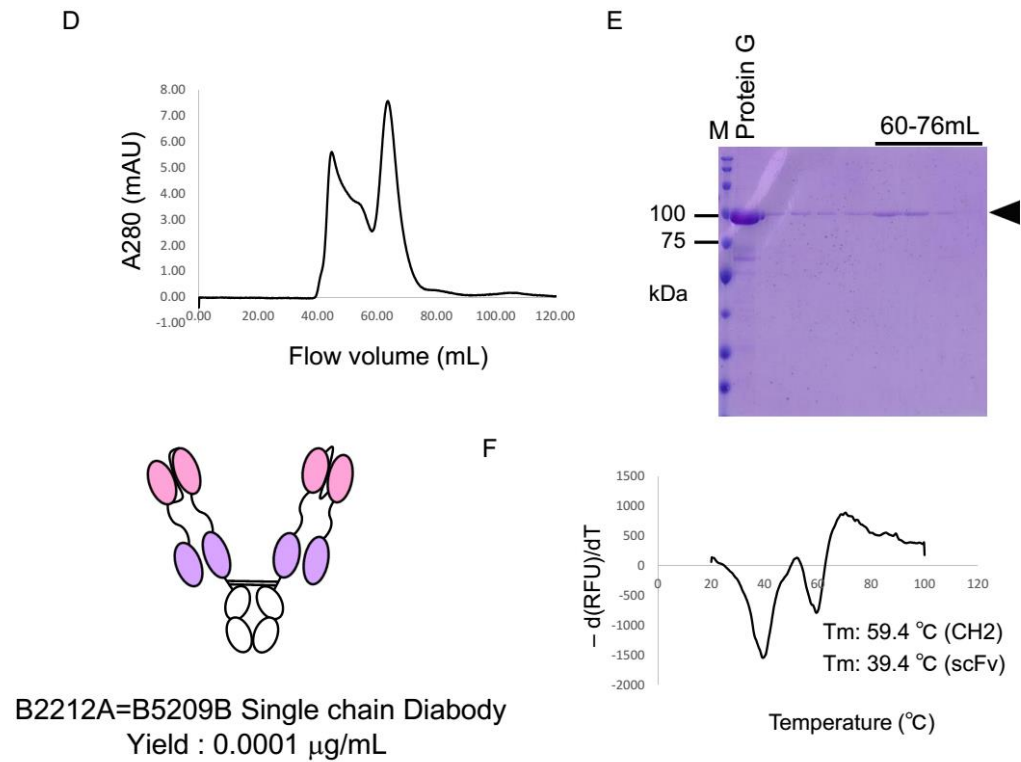
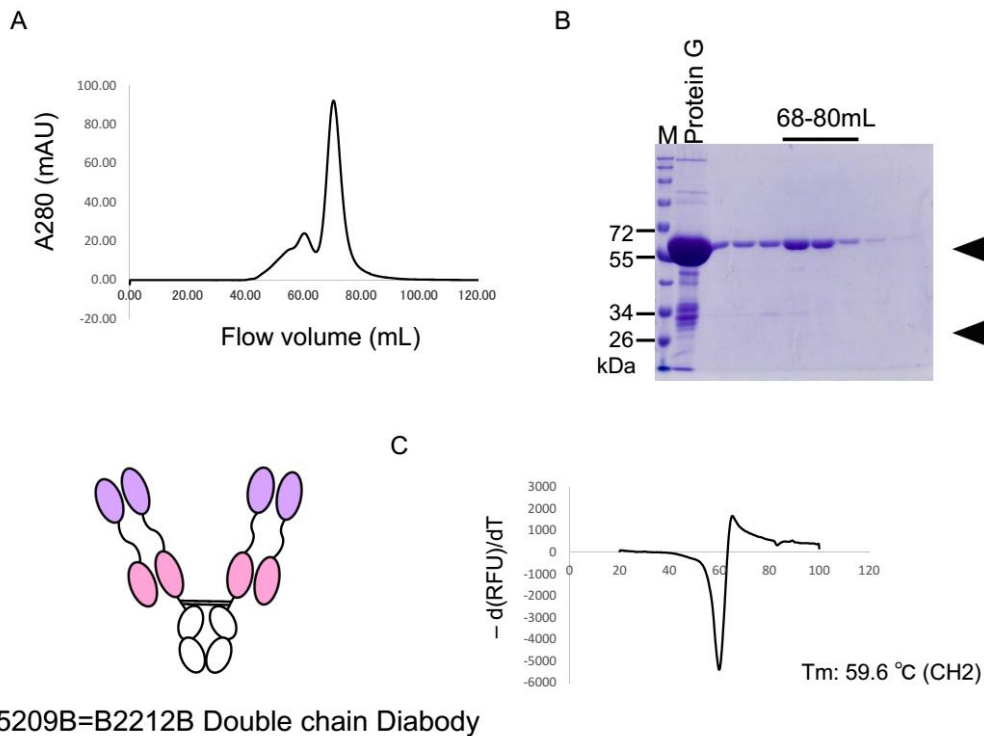


図 2-4. 一本鎖ダイアボディ型抗 ROB01 二重特異性抗体の発現精製。一本鎖ダイアボディ型抗 ROB01 単結合性抗体をプロテイン G セファロースを用いてアフィニティー精製後、サイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。ホモ二量体に相当するピークが主に検出された。B5209B=B2212B Single chain Diabody について、A は、HiLoad Superdex 200 16/600 pg カラムによって精製した結果、B は、その SDS-PAGE の結果を示す。C は、DSF を用いて単結合性および二重特異性抗体の各ドメインの T_m 値を求めた結果を示す。D、E、F は、それぞれについての B2212A=B5209B Single chain Diabody に関する結果を示す。

二本のポリペプチド鎖によって、二つの scFv 間を二本の (G4S)₄ リンカーで融合させるダイアボディ型二重特異性抗体の発現精製結果と熱安定性を示す (図 2-5)。これらのタンパク質は SDS-PAGE の結果によると、特に B5209B=B2212B Double chain Diabody は、hFc 融合タンパク質の方が多く発現してしまい、組み合わせる VH と VL の発現とバランスが取れていない結果となった。DSF を用いた T_m 値の測定結果によると、scFv の T_m 値がどちらの抗体も検出されてなかった。このようなことから、収率は求めていない。

結果的に、scFv 間を二本鎖のポリペプチド鎖で連結させる hFc 融合ダイアボディ型の二重特異性抗体は、大幅に収率が低く、scFv の T_m 値も単結合性 scFv-hFc と比べると悪化し、むしろタンデム型の方が scFv のフォールディングは強固なものであったと考えられる。そこで、hFc と二つの scFv 間を融合させる別の手段として、hFc の C 末端側に scFv を融合させるイムノフュージョン型の抗体を設計することとした。



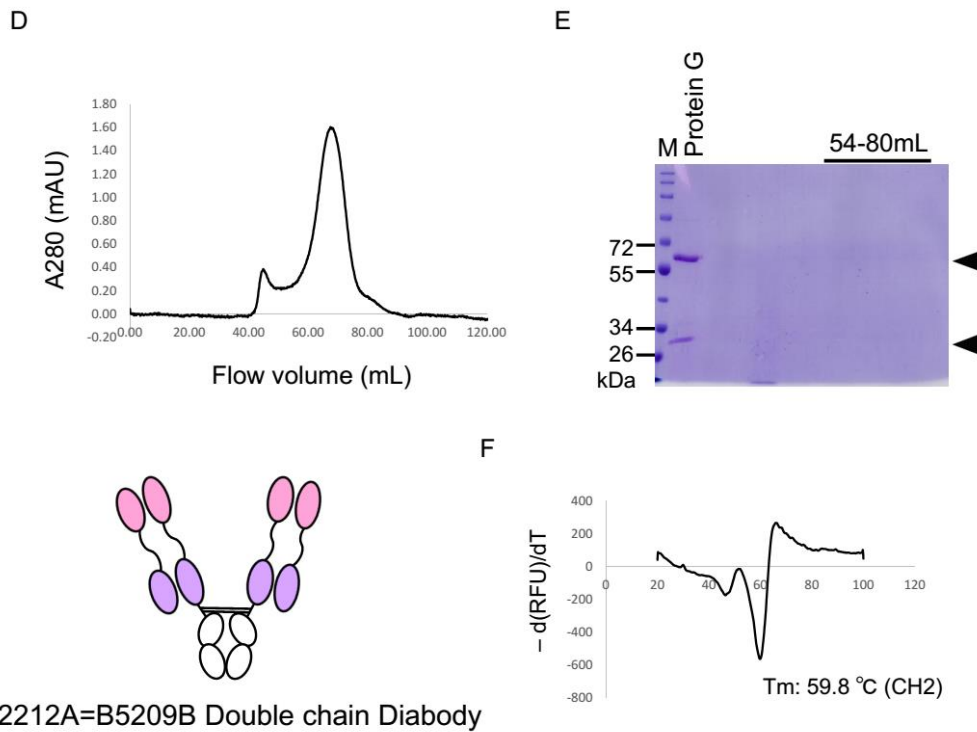
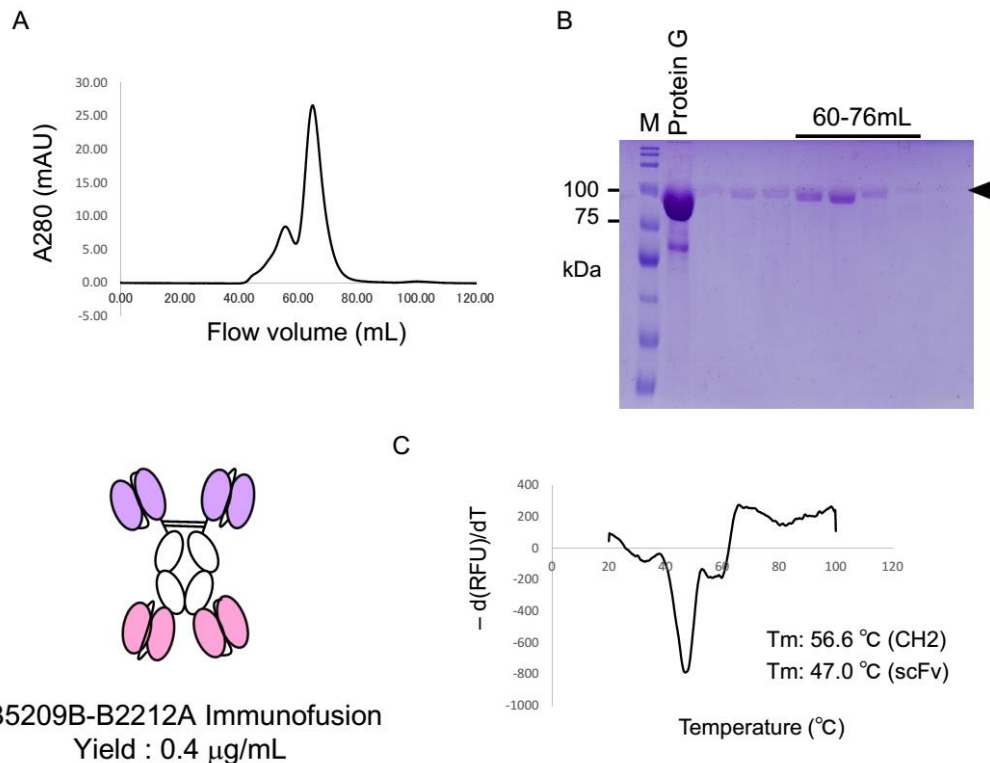


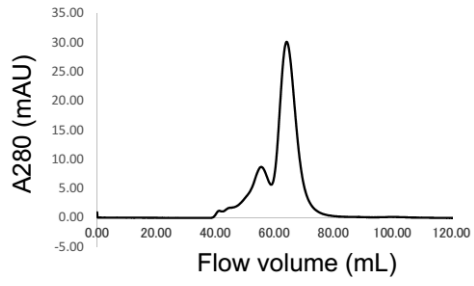
図 2-5. 二本鎖ダイアボディ型抗 ROB01 二重特異性抗体の発現精製。 二本鎖ダイアボディ型抗 ROB01 単結合性抗体をプロテイン G セファロースを用いてアフィニティー精製後、サイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。ホモ二量体に相当するピークがやや遅れて溶出されていることから、分子量が想定より小さく検出されている。B5209B=B2212B Double chain Diabody について、A は、HiLoad Superdex 200 16/600 pg カラムによって精製した結果、B は、その SDS-PAGE の結果を示す。C は、DSF を用いて単結合性および二重特異性抗体の各ドメインの Tm 値を求めた結果を示す。D、E、F は、それぞれについての B2212A=B5209B Double chain Diabody に関する結果を示す。どちらの抗体にも scFv に相当するピークが検出されていない。

hFc の C 末端側に scFv を融合させるイムノフュージョン型二重特異性抗体の発現精製結果と熱安定性を示す (図 2-6)。これらのタンパク質は、 SDS-PAGE の結果から、目的とする分子量のところに発現が確認できる。特に、B2212A-B5209B Immunofusion は収率が、単結合性抗体 scFv-hFc と同等にまで改善された。特に B5209B-B2212A Immunofusion は、収率が悪かったことから、B2212A scFv と hFc の C 末端に立体障害が生じたものと考え、ここに (G4S)₄ リンカーを挿入することとした。その結果、収率は改善された。DSF を用いた T_m 値の測定結果によると、これら全てのイムノフュージョン型二重特異性抗体において、scFv-hFc の scFv ほど高くはないが、scFv 由来と考えられる T_m 値を検出した。

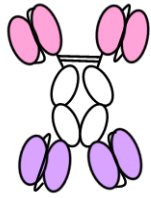
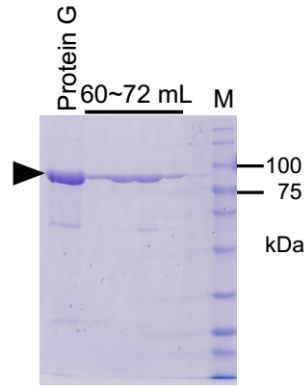
これらの結果から、scFv 型 hFc 融合二重特異性抗体としては、B2212A-B5209B Immunofusion と B5209B-(G4S)₄B2212A Immunofusion が高い収率で得られたことから、分子設計としては充分なものとし、抗原との親和性解析に進むこととした。



D

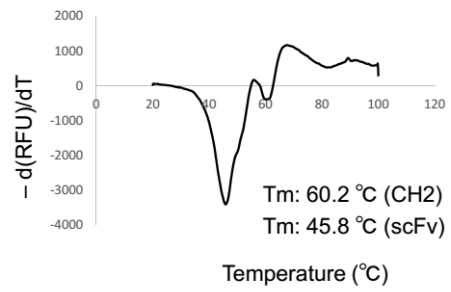


E



B2212A-B5209B Immunofusion
Yield : 2.5 μ g/mL

F



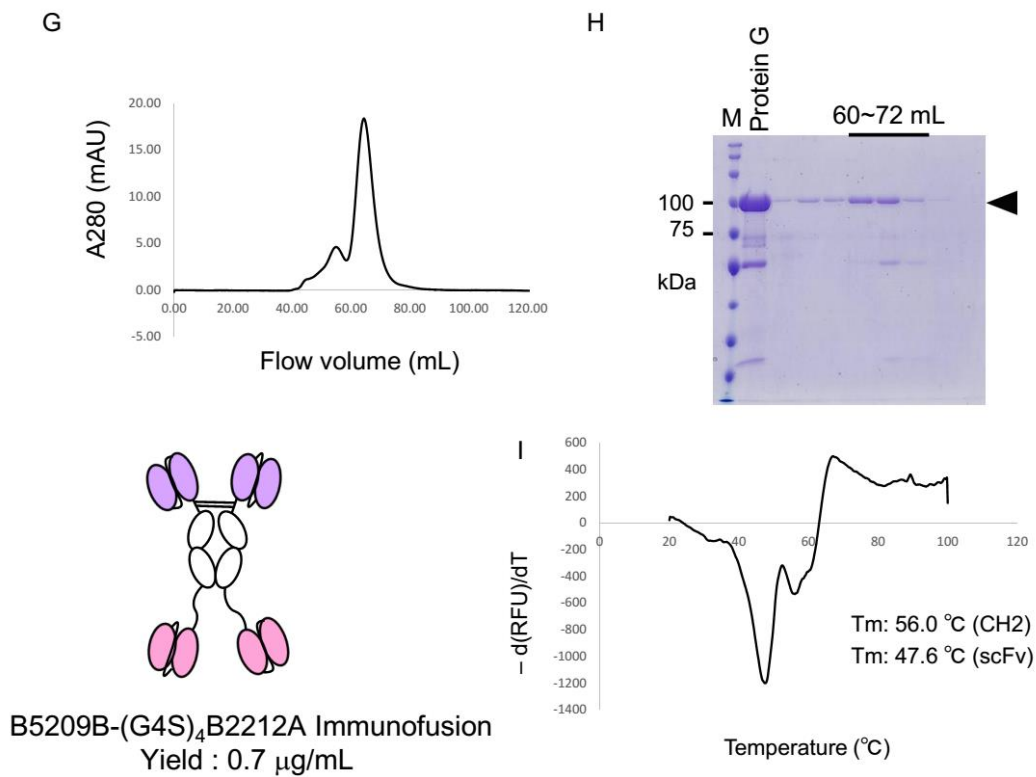
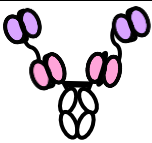
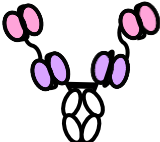
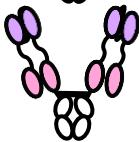
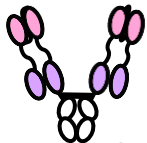
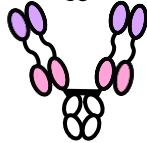

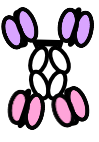
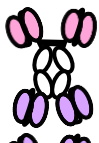
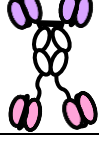


図 2-6. イムノフュージョン型抗 ROBO1 二重特異性抗体の発現精製。 イムノフュージョン型抗 ROBO1 単結合性抗体をプロテイン G セファロースを用いてアフィニティー精製後、サイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。ホモ二量体に相当するピークが主に検出された。B5209B-B2212A Immunofusion について、A は、HiLoad Superdex 200 16/600 pg カラムによって精製した結果、B は、その SDS-PAGE の結果を示す。C は、DSF を用いて単結合性および二重特異性抗体の各ドメインの T_m 値を求めた結果を示す。D、E、F は、それぞれについての B2212A-B5209B Immunofusion についての結果を示す。G、H、I は、B5209B-(G4S)₄B2212A Immunofusion についての結果を示す。

第4節、本章の総括

表 2-1. に各種二重特異性抗体の収率をまとめた。

表 2-1. 培養液あたりの各種二重特異性抗体の平均的な収率

	Antibody	Yield($\mu\text{g}/\text{mL}$)
	B5209B-B2212A Tandem	0.2
	B2212A-B5209B Tandem	0.05
	B5209B=B2212B Single chain Diabody	0.2
	B2212A=B5209B Single chain Diabody	0.0001
	B5209B=B2212B Double chain Diabody	scFv Negative
	B2212A=B5209B Double chain Diabody	scFv Negative
	B5209B-B2212A Immunofusion	0.4
	B2212A-B5209B Immunofusion	2.5
	B5209B-(G4S) ₄ B2212A Immunofusion	0.7

二重特異性抗体の収率を検証すると、イムノフュージョン型は、タンデム型およびダイアボディ型と比べると、収率が高い結果となった。タンパク質のフォールディングを解析する DSF によると、タンデム型、一本鎖ダイアボディ型は、scFv の熱安定性が減弱していたことから、強固なフォールディングができておらず、不安定なため収率が低い結果になった可能性がある。また、二本鎖ダイアボディ型は、scFv 由来の T_m 値が検出できなかった。イムノフュージョン型に関しては、B5209B scFv を hFc の C 末端に融合させた場合の CH2 ドメインの T_m 値は、B2212A の scFv を hFc の C 末端に融合させた場合の T_m 値よりも 3°C ほど高かったので、B2212A scFv は hFc のフォールディングに悪い影響を与えた可能性が考えられる。B2212A-B5209B Immunofusion が最も収率が高く、DSF の解析から scFv および CH2 ドメインの T_m 値も単結合抗体 scFv-hFc において測定された値に大きく違うことなく測定されたため、この抗体の発現精製をもって、本章で目的とする熱安定性を有する二重特異性抗体の分子設計が達成されたこととした。

結果として、タンデム型および一本鎖ダイアボディ型二重特異性抗体は、抗原への親和性を評価する表面プラズモン法 (Surface Plasmon Resonance : SPR) による解析のためには、十分な収量であったことから、これらの解析を行うこととした。さらに、イムノフュージョン型は scFv を融合させる順番にかかわらず、標的抗原に対する反応熱を解析する等温滴定型熱量測定法 (Isothermal Titration Calorimetry : ITC) まで含めた広範な解析に用いるのに十分な発現量を確保することができた。

第3章

高親和性 scFv-hFc 型抗 ROBO1 二重特異性抗体の総合評価

第3章、高親和性 scFv-hFc 型抗 ROBO1 二重特異性抗体 of 総合評価

第1節、二重特異性 of 証明について

これまでに報告されてきた二重特異性抗体は、バイパラトピックなものも含めて、がんに対する治療を目指したものが多く存在する。そのため、もっとも重要視されてきたことは、実際にがん細胞の増殖を抑えるか、あるいは死滅させるといった、がん生物学的機能を抗体が有しているかどうかであった。このことから、二重特異性抗体に期待される物性や機能として、標的であるがん抗原に高親和性に結合することや、結果的にがん細胞の増殖、転移、血管新生などのシグナルを抑制するといった効果、または、抗体による結合だけで、がん細胞死を起こすような効果が求められた。このことから、作製した二重特異性抗体の抗原への親和性が、単結合性抗体よりも向上していることを SPR 法や ITC 法などで評価し、細胞レベルや個体レベルでその二重特異性抗体が、がん細胞の増殖を抑えているという報告や、がん細胞内のシグナル伝達の評価を行う報告が多くを占めている。しかしながら、SPR 法や ITC 法、さらには作製した抗体の熱安定性を総合的に評価して、作製した二重特異性抗体が強固に高次構造を形成し、二重特異的な抗原への結合を達成していることの証明は行われてこなかった。本研究室からは、この ROBO1 抗体を使って、二つの単結合性抗体の反応熱の足し合わせが、二重特異性抗体の反応熱に相当することによって、バイパラトピックな抗原抗体反応を達成していることを証明してきた。

このような先行研究結果に基づき、本研究においても作製した二重特異性抗体が、単結合性抗体の親和性と比べて向上していることを、SPR 法を用いて証明する。また、二重特異性抗体の反応熱が、二つの単結合性抗体の反応熱の和に等しくなるかを調べる。また、第2章で検証した熱安定的に作製できた抗体と、その抗体の抗原への親和性について、比較検討する。

第2節、sROB01 抗原とイムノフュージョン型単結合性抗体の発現精製

作製した各種抗体と標的抗原との親和性を解析するため、抗原分子である ROB01 の発現精製を行った。B5209B および B2212A が認識する ROB01 の細胞外ドメインである sROB01 も同様に発現バキュロウイルスを昆虫細胞に感染させ、感染後3日目の培養上清中から Ni 精製とイオン交換クロマトグラフィーによる精製を行い、解析に十分なタンパク質量を純度良く得ることができた (図 3-1)。また、SEC-MALS を用いて分子量を測定すると、およそ 95kDa の値を示し、単量体であることが示された。また、透過型電子顕微鏡によって、ネガティブ染色法によって観察すると、単量体と思われる粒子の存在が確認できる。これらの結果から、バキュロウイルス発現系によって、Sf9 細胞を用いて作製した sROB01 は単量体であると結論付けた。

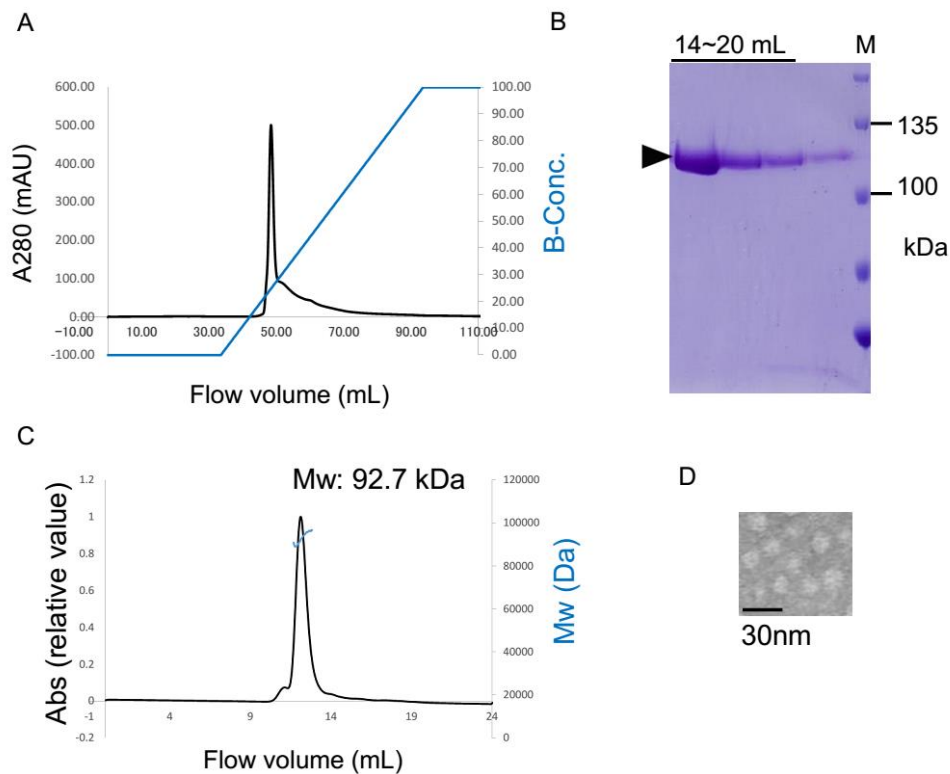
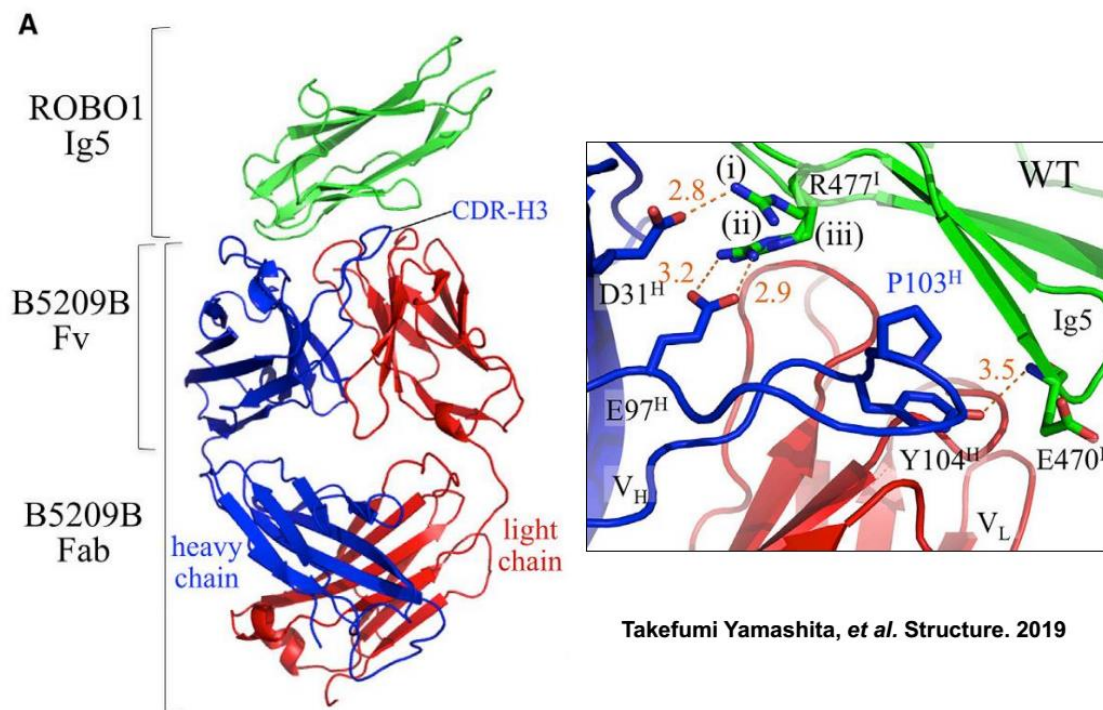


図 3-1. sROB0 抗原の発現精製。 sROB01 抗原をニッケル樹脂アフィニティークロマトグラフィー精製後、イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。A は、クロマトグラムを示し、青線は NaCl 濃度を示す。B は、SDS-PAGE の結果。C は、SEC-MALS によって、分子量を測定した結果を示す。D は、透過型電子顕微鏡撮影写真である。

さらに、作製した二重特異性抗体が標的抗原に対し、それぞれのエピトープに結合していることを評価するために、B5209B および B2212A が結合しない ROBO1 の変異体を発現精製することとした。すなわち、B5209B が認識するエピトープのホットスポットとして既に報告されている E470 と R477 をそれぞれアラニンとアスパラギン酸に置換した変異体 sROBO/E470A/R477D と、B2212A が認識する ROBO1 の細胞外ドメインである 3 番目のフィブロネクチンドメイン削った sROBO1/ Δ FN3 を作製した (図 3-2)。



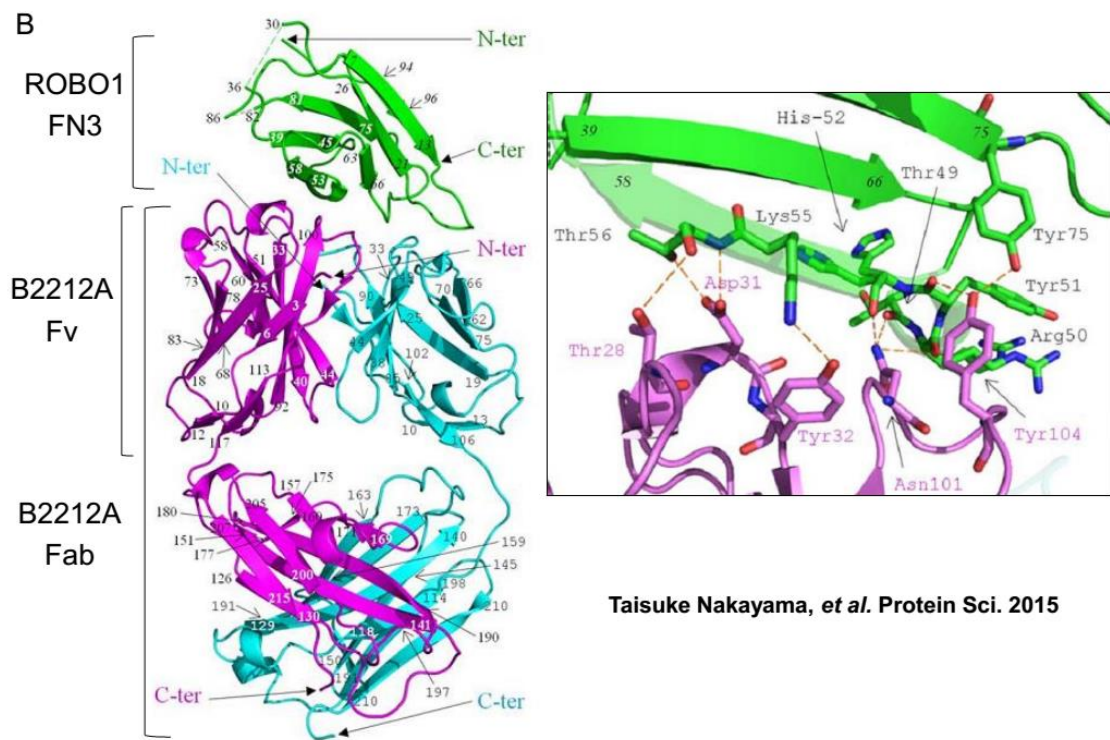


図 3-2. B5209B と B2212A の ROBO1 抗原への結合。A、変異体 B5209B は、E470 と R477 をホットスポットとして認識する。B、B2212A は、FN3 の広範なエピートープを認識している。

B5209B は、認識しているアミノ酸残基が限定的であり、2点だけの点変異とし、特に中性付近では正電荷を持つ 477 番目のアルギニンを、中性付近で負電荷を持つアスパラギン酸に置換することで、抗体との結合を反発させることを狙った。B2212A が認識しているアミノ酸残基はこれに対し、3 番目のフィブロネクチンドメインの 17 番目のアスパラギンから、75 番目のチロシンまでの広範な範囲に広がっているとされている。そこで、ROBO1 の細胞外ドメインの最も C 末端側に位置することも考慮に入れて、3 番目のフィブロネクチンドメイン全体を削る deletion mutant を作製することとした。これら変異体の発現系も同様に、発現バキュロウイルスを作製し昆虫細胞に感染させ、感染後 3 日目の培養上清中から Ni 精製とイオン交換クロマトグラフィーによる精製を行い、解析に十分なタンパク質量を得ることができた (図 3-3)。

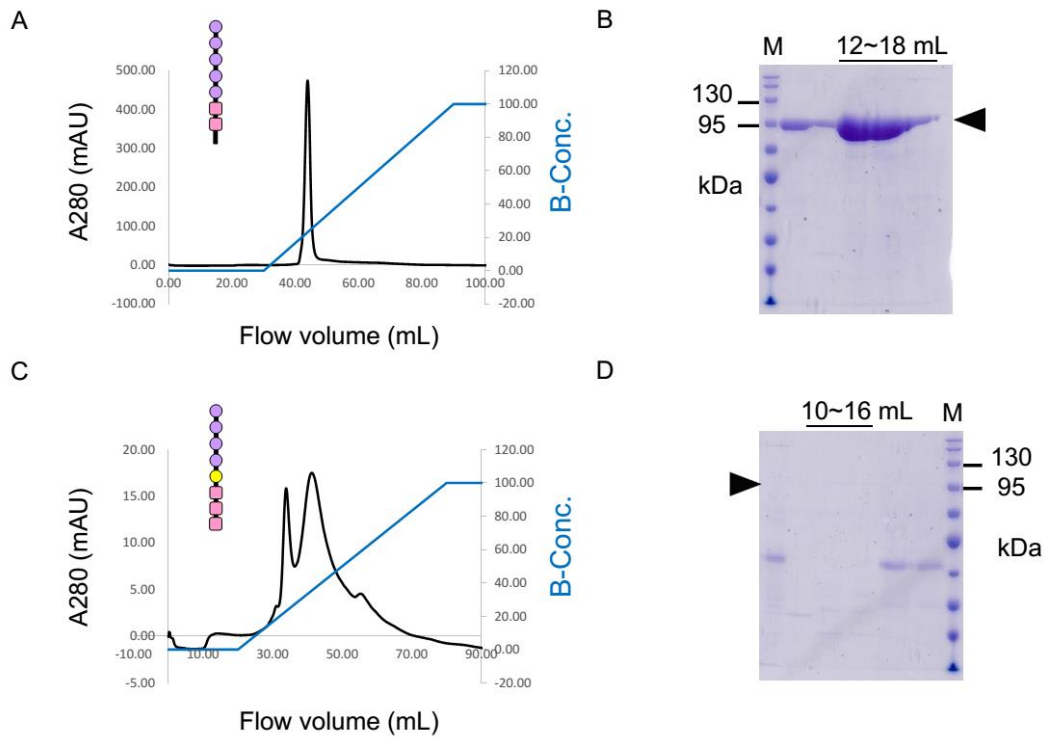


図 3-3. sROB01 抗原変異体の発現精製。変異体 sROB0/ΔFN3 および sROB0/E470A/R477D をニッケル樹脂アフィニティークロマトグラフィー精製後、イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。A は、sROB0/ΔFN3 のクロマトグラムであり、青線は NaCl 濃度を示す。B は、その SDS-PAGE の結果を示す。C は、sROB0/E470A/R477D のクロマトグラムであり、青線は NaCl 濃度を示す。D は、その SDS-PAGE の結果を示す。

一方で、イムノフュージョン型抗体の持つ scFv の一つずつが、抗原に対しそれぞれのエピトープに結合していることを証明するために、B2212A と B5209B のイムノフュージョン型の単結合抗体と二重特異性抗体の反応熱を ITC 法によって測定し、比較検討することとした。ROB01 に結合しないネガティブコントロール抗体として、ケモカインレセプター CCR5 由来の配列に対するペプチド抗体 4B08 の scFv を用いて、ROB01 に対するイムノフュージョン型の単結合抗体を作製した^{59,60}。二重特異性抗体同様、プロテイン G セファロース精製後、サイズ排除クロマトグラフィーによる二段階精製を行った (図 3-4)。

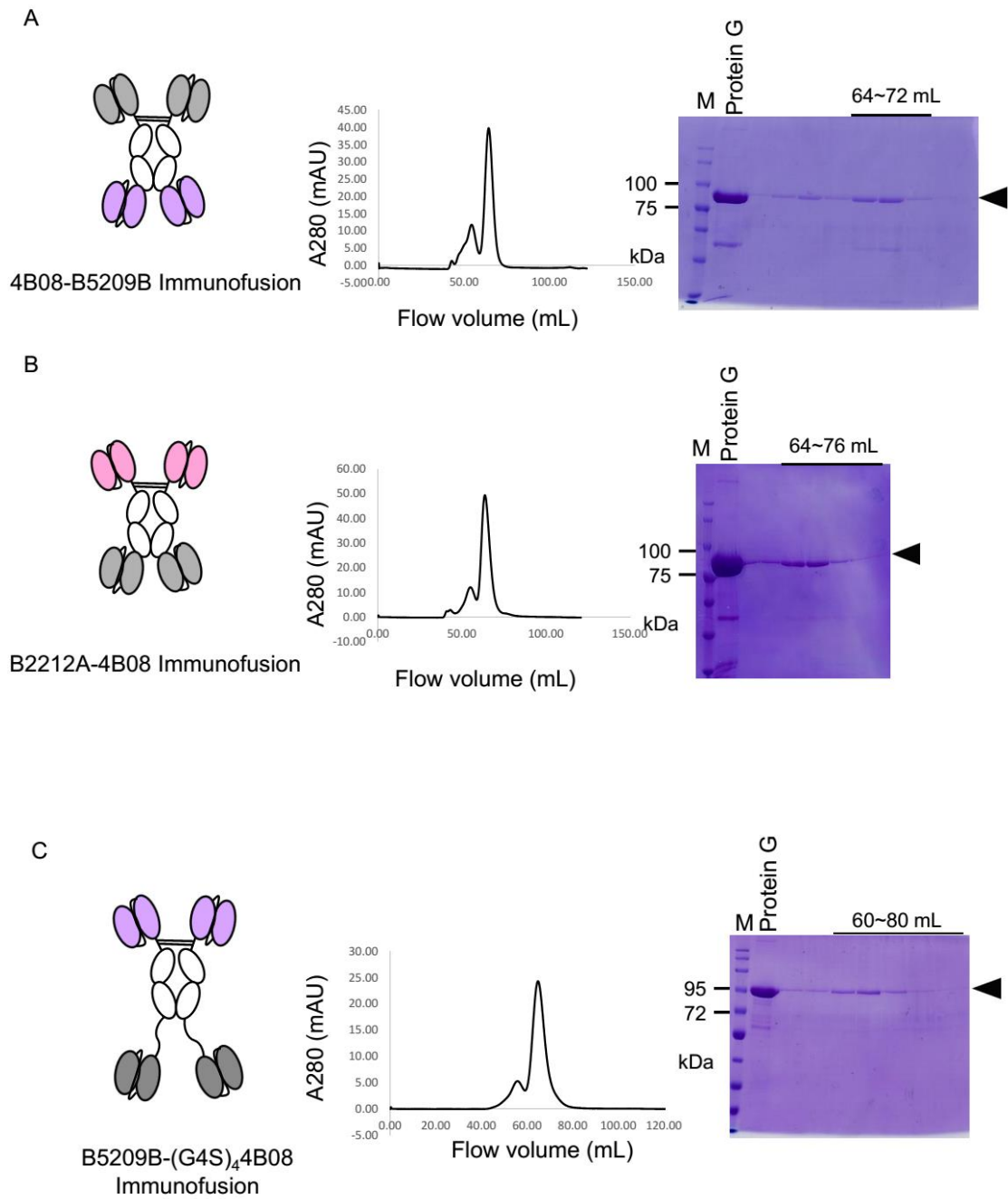
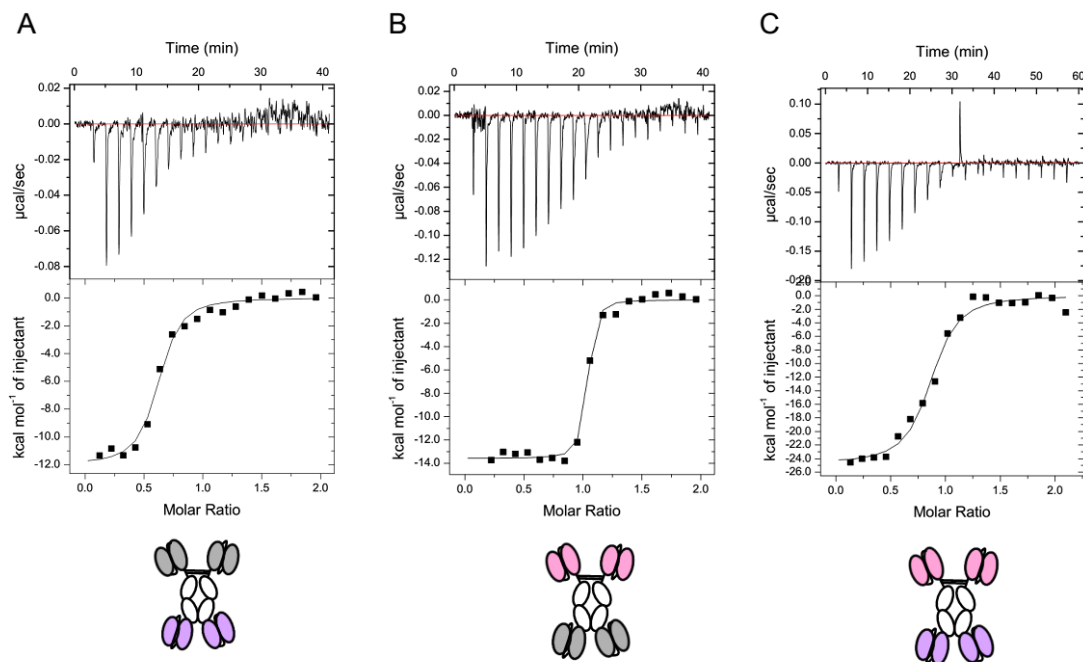
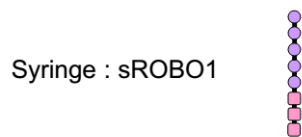


図 3-4. イムノフュージョン型単結合性抗体の発現精製。イムノフュージョン型単結合性抗体も、プロテイン G セファロース精製後、サイズ排除クロマトグラフィーによって二段階精製を行った。A は、4B08-B5209B Immunofusion。B は、B2212A-4B08 Immunofusion。C は、B5209B-(G4S)₄B08 Immunofusion。

第3節、イムノフュージョン型二重特異性抗体の反応熱評価

イムノフュージョン型単結合性および二重特異性抗体と sROB01 との反応について、ITC による測定結果を示す (図 3-5)。また、このときのストイキオメトリー、反応速度定数および反応熱を表 3-1. と表 3-2. にまとめた。イムノフュージョン型単結合性抗体である B2212A-4B08 Immunofusion、4B08-B5209B Immunofusion および B5209B-(G4S)₄4B08 Immunofusion の ΔH は、それぞれ約 -14 、 -12 および -13 kcal/mol の値を示す発熱反応が測定された。このそれぞれの値は先行研究で報告されていた単結合性抗体の反応熱が十数 kcal/mol であったこととほぼ一致する。B2212A-4B08 に対して、4B08-B5209B と B5209B-(G4S)₄4B08 Immunofusion の反応速度定数を比較すると、B2212A を有する抗体が数ナノ M の強さを示すことから、B5209B よりも B2212A の方の親和性が高いことが示唆された。また、ストイキオメトリーはそれぞれ、1.0 と 0.6 および 0.1 になった。これらの結果は、B5209B はエピトープが標的分子のアクセスし難い位置にあり、完全に 1 対 1 の反応が進んでいない可能性が考えられる。



Syringe : sROBO1

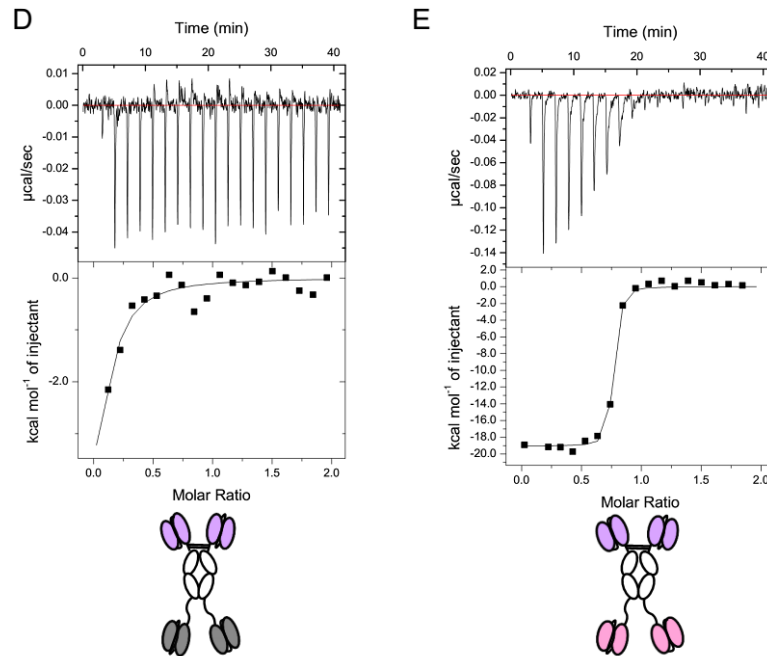


図 3-5. sROBO1 と免疫フュージョン型単結合性および二重特異性抗体の ITC 測定。シリンジに sROBO1 を約 40 μ M、セルに各種抗体を約 4 μ M で測定した。測定バッファーは、PBS を用いた。A、4B08-B5209B Immunofusion。B、B2212A-4B08 Immunofusion。C、B2212A-B5209B Immunofusion。D、B5209B-(G4S)₄B08 Immunofusion。E、B5209B-(G4S)₄B2212A Immunofusion。

B2212A-B5209B Immunofusion 型の二重特異性抗体の反応熱 ΔH を ITC により測定すると、約 -25 kcal/mol 程度と高い値を示した。この反応熱は、単結合抗体の反応熱の足し合わせにはほぼ一致する。このことから、この抗体はそれぞれのエピトープを認識して結合していることが示唆された。また、反応速度定数は数十 nM であり、単結合抗体より弱い親和性が測定された。

hFc と B2212A scFv の間に 4 つの (G4S)_{x4} リンカーを挿入した B5209B-(G4S)₄B2212A Immunofusion 型の反応熱 ΔH を ITC によって測定した。 ΔH は、約 -19 kcal/mol 程度であった。これは、単結合抗体の反応熱の足し合わせには及ばないものの、単結合抗体よりも高い値を示している。

表 3-1. sROBO1 抗原と単結合性および、B2212A-B5209B Immunofusion の反応熱

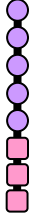
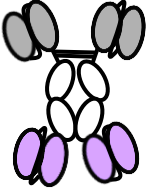
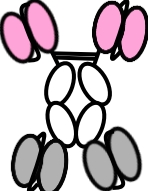
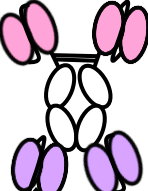

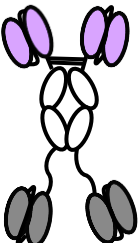
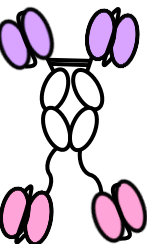
sROBO1	n	K_D (nM)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)
					
 4B08-B5209B Immunofusion	0.6	59	- 9.9	- 12.0	2.1
 B2212A-4B08 Immunofusion	1.0	4.0	- 11.5	- 13.6	2.1
 B2212A-B5209B Immunofusion	0.84	72	- 9.8	- 24.8	5.0

表 3-2. sROBO1 抗原と単結合性およびイムノフュージョン型抗体の反応熱

sROBO1	n	K_D (nM)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)
					
 B5209B- (G4S)4B08 Immunofusion	0.1	560	- 8.5	- 12.5	4.0
 B5209B- (G4S)B2212A Immunofusion	0.7	3.2	- 11.6	- 19.1	7.5

さらに、イムノフュージョン型二重特異性抗体が抗原に対し、二重特異的に結合していることを証明するために、sROB01 の変異体との反応熱を ITC 法によって測定することとした (図 3-6)。すなわち、B2212A 抗体のエピトープを削った sROB01/ Δ FN3 をシリンジ側から、セル側に充填した B2212A-B5209B Immunofusion に滴下する測定を行った。この時測定された反応速度定数を表 3-3. にまとめた。この反応の反応熱 ΔH は、 -10.8 kcal/mol の値を示す発熱反応が測定された。B2212A-B5209B Immunofusion が sROB01 と結合した時の反応熱、約 -25 kcal/mol の値が、約半分弱まで下がったことは、B2212A-B5209B Immunofusion が有する B2212A scFv が FN3 ドメインを認識して結合していることを示している。また、単結合性抗体の反応熱分、十数 kcal/mol の発熱反応が測定できたことから、B2212A-B5209B Immunofusion が有する B5209B scFv が、sROB01/ Δ FN3 に残っている 5 番目のイムノグロブリン様ドメインを認識していることが示唆された。

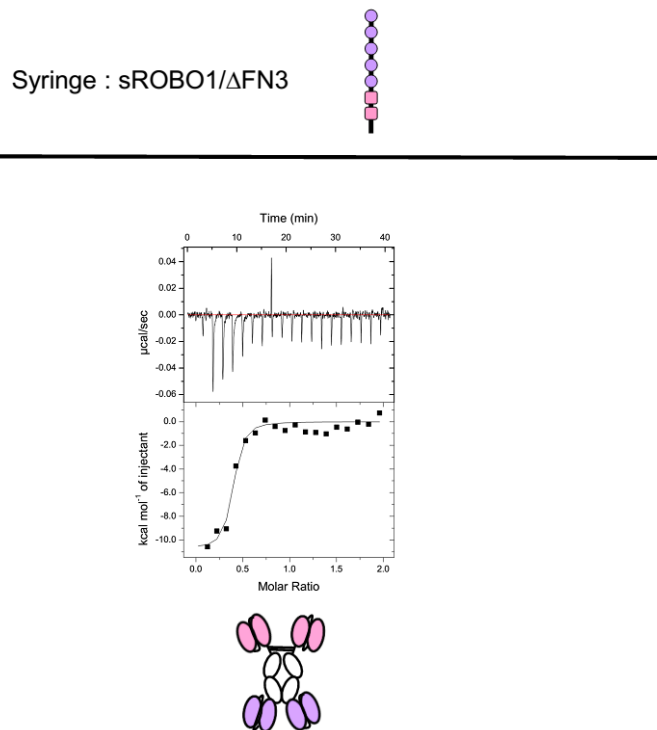
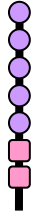


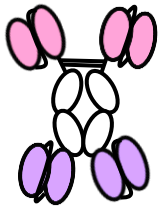
図 3-6. sROB01 の変異体と二重特異性抗体の ITC 測定。シリンジに sROB01 の変異体を約 $40\mu\text{M}$ 、セルに各種抗体を約 $4\mu\text{M}$ で測定した。測定バッファーは、PBS を用いた。セルに、B2212A-B5209B Immunofusion を入れて反応させた結果を示す。

表 3-3. sROBO1 抗原の変異体とイムノフュージョン型抗体の反応熱

sROBO1/ Δ FN3



n	K_D (nM)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)
---	------------	--------------------------	--------------------------	----------------------------



0.4	2800	- 10.4	- 10.8	0.45
-----	------	--------	--------	------

B2212A-B5209B

Immunofusion

第4節、単結合性および二重特異性抗体の抗原に対する親和性評価

一本鎖 scFv を二本鎖にした場合について検証するため、B2212A と B5209B の IgG 型のヒトキメラ単結合抗体を作製した。二重特異性抗体と同様に、バキュロウイルス発現系を用い、プロテイン G セファロースと SEC により精製を行った (図 3-7)。

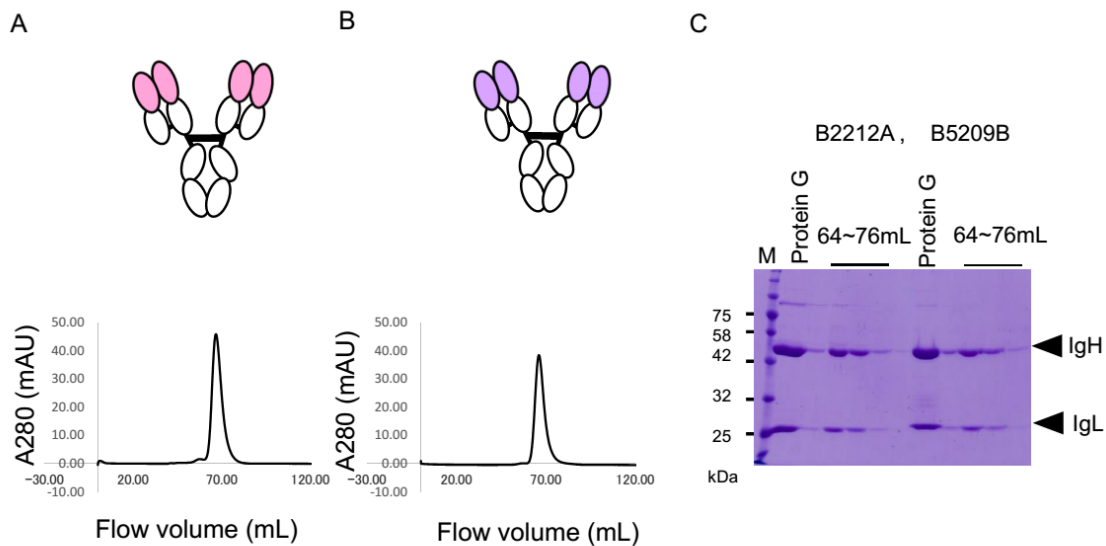
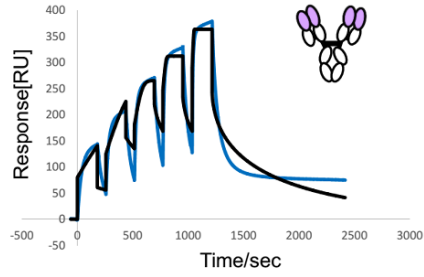


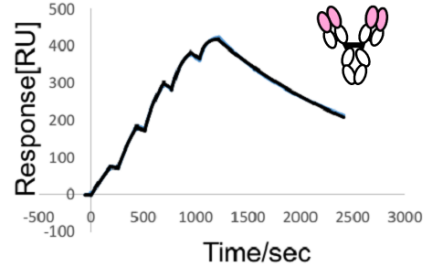
図 3-7. 単結合性 hIgG1 キメラ型抗体の発現精製。hIgG1 キメラ型の単結合性抗体もプロテイン G セファロースとサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。A は、B2212A hIgG1 chimera。B は、B5209B hIgG1 chimera。C は、それぞれの SDS-PAGE の結果を示す。

作製した二重特異性抗体の抗原に対する親和性が、単結合抗体の親和性と比べて、高親和性になっていることを確かめるため、SPR によって作製した単結合性および二重特異性抗体の反応速度定数を評価した (図 3-8)。

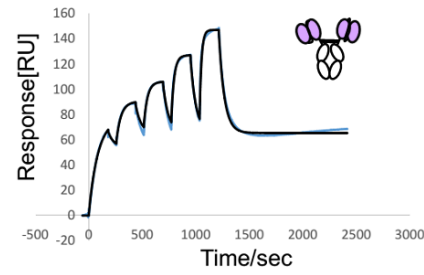
A



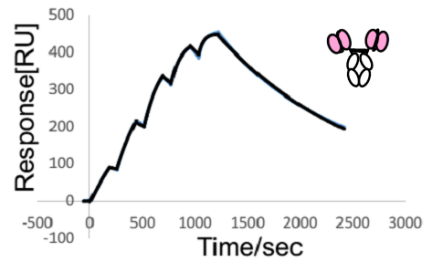
B



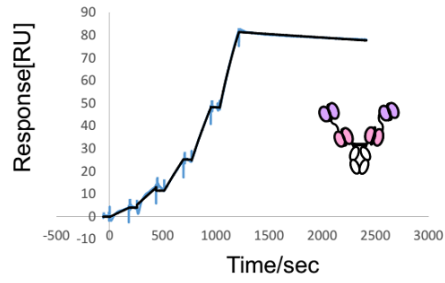
C



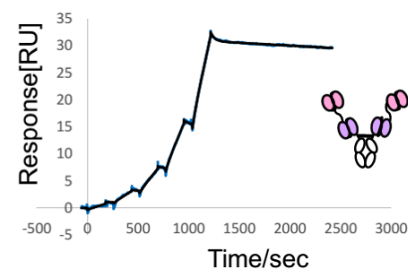
D



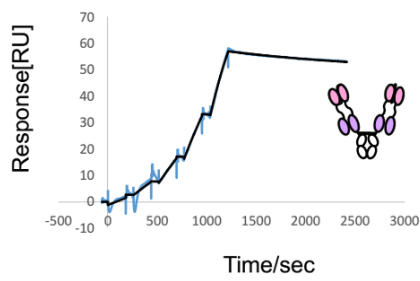
E



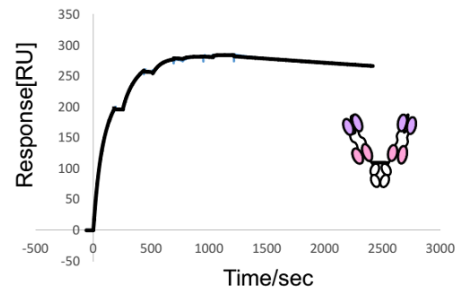
F



G



H



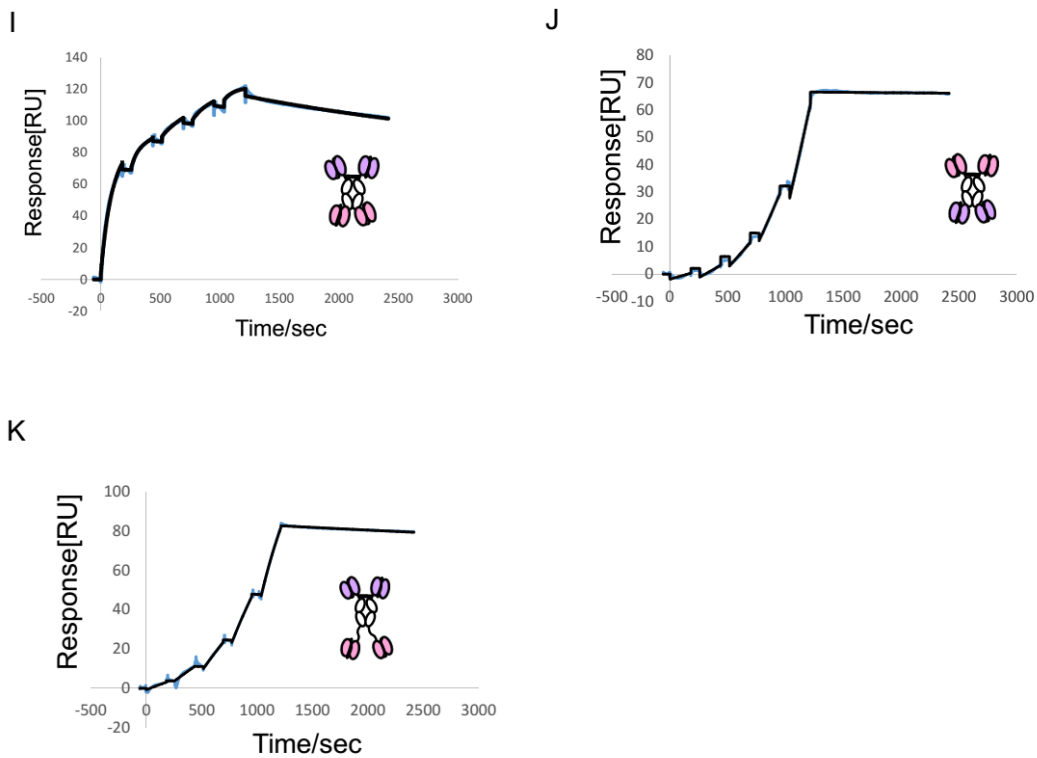


図 3-8. 単結合性および二重特異性抗体の抗原に対する SPR 測定結果。抗 Human Fc 抗体を用いて単結合性および二重特異性抗体を固定化し、アナライトとして sROB01 を 100nM~25pM の濃度で流すことで、各種抗体の親和性を測定した。バッファーには、0.005% Tween20 PBS を用いた。この時のセンサグラムを示す。青の実線は測定結果、黒の実線はフィッティング曲線を示す。A は、B5209B hIgG1 chimera。B は、B2212A hIgG1 chimera。C は、B5209B scFv-hFc。D は、B2212A scFv-hFc。E は、B5209B-B2212A Tandem。F は、B2212A-B5209B Tandem。G は、B2212A=B5209B Single chain Diabody。H は B5209B=B2212A Single chain Diabody、。I は B5209B-B2212A Immunofusion、。J は、B2212A-B5209B Immunofusion。K は、B5209B-(G4S)₄B2212A Immunofusion。

異なる二つの親和性の scFv を持つ二重特異性抗体の反応速度定数は、Heterogeneous Ligand 法によって計算した。解離反応があまり確認できないセンサグラムからは、 k_{off} が小さい反応から K_D 値を採用した。また、 K_D 値が数十 femto M 程度の極端に弱い反応は採用しなかった。

一種類の抗原認識部位を持つ B2212B キメラ抗体は、1 対 1 結合で反応速度定数を計算した。B5209B キメラ抗体も同じく、一種類の抗原認識部位を持つが、1 対 1 結合の計算では実験結果に合わず、Heterogeneous Ligand 法に合致したので、この方法で計算結果を検証した。このことは、B5209B は一つ目の抗原が結合すると二つ目の抗原が結合しにくくなる可能性も考えられる。またこの時のセンサグラムからは、大きな解離反応が確認できたので、 k_{off} が強い二段階目の K_D 値を採用した。このような判断から表 3-2. に各種単結合性および二重特異性抗体の反応速度定数をまとめた。

表 3-2. 単結合性および二重特異性抗体の反応速度定数

Antibody	$\times 10^5 k_{\text{on}} (\text{Ms}^{-1})$	$\times 10^{-4} k_{\text{off}} (\text{s}^{-1})$	K_{D} (nM)
B5209B hIgG1 chimera	3.7	0.02	52
B2212A hIgG1 chimera	2.1	0.07	3.3
B5209B scFv-hFc	140	100	11
B2212A scFv-hFc	1.8	5.8	3.2
B5209B-B2212A Tandem	23	0.81	0.035
B2212A-B5209B Tandem	24	0.52	0.022
B2212A=B5209B Single chain Diabody	2.8	5.8	2.1
B5209B=B2212A Single chain Diabody	5.3	0.97	0.18
B5209B-B2212A Immunofusion	1.2	3.5	3.0
B2212A-B5209B Immunofusion	19	1.5	0.075
B2212A-(G4S)4-B5209B Immunofusion	20	0.69	0.034

第5節、本章の総括

ITC 法による B2212A-B5209B Immunofusion 型の抗原への反応速度定数が低かったことは、最初の反応で抗原を捉えた結果、二つ目の反応が同一分子内で起こったため、動きを制限され、反応速度が減弱したことが推察される。これに対し、リンカーを挿入した B5209B-(G4S)₄ B2212A Immunofusion 型の抗原への反応速度定数は強く、抗原への親和性は改善されているが、反応物一分子あたりの反応熱 ΔH は、単結合抗体の足し合わせには及ばなかった。このことは、最初の抗体の反応後、次の抗体の反応は、同一分子に対してだけではなく、別の抗原分子との 1 : 2 の反応も同時に起こっており、1 : 2 結合の方が容易に行われるため反応速度定数が改善され、1 分子あたりの反応熱は減少したことが考えられる。

表3にまとめた SPR 法による反応速度定数の測定結果によると、何れの二重特異性抗体も単結合性抗体より、全般に親和性が強い傾向があった。二重特異性抗体の中でもタンデム型とイムノフュージョン型それぞれ2つ、計4つの二重特異性抗体は、その他の二重特異性抗体と比べても強い親和性が測定され、本研究において目的とする、 10^{-11} 乗 M の値を有する高親和性抗体を4つ作製することに成功した。また、ヒトキメラ抗体から scFv 一本鎖抗体にしても、親和性に大きな変化はなかった。

この4つの scFv の位置や自由度の異なる二重特異性抗体に関し、抗原との結合の違いについて可能性を検証することとした。

第4章

抗体が結合した ROBO1 に対するリガンドの親和性評価

第4章、抗体が結合した ROBO1 に対するリガンドの親和性の総合評価

第1節、本章の序論

第3章において、タンデム型二重特異性抗体の方が、イムノフュージョン型二重特異性抗体よりも sROBO1 抗原に対して親和性が高くなったのかについて考察する。近年、クライオ電子顕微鏡によって解かれた ROBO1 の細胞外ドメインの高次構造を参照すると、ROBO1 同士が二量体を形成し折りたたまれることで、B5209B および B2212A のエピトープである5番目のイムノグロブリン様ドメインと3番目のフィブロネクチンドメインは、構造上近接している (図 4-1) ⁶¹。

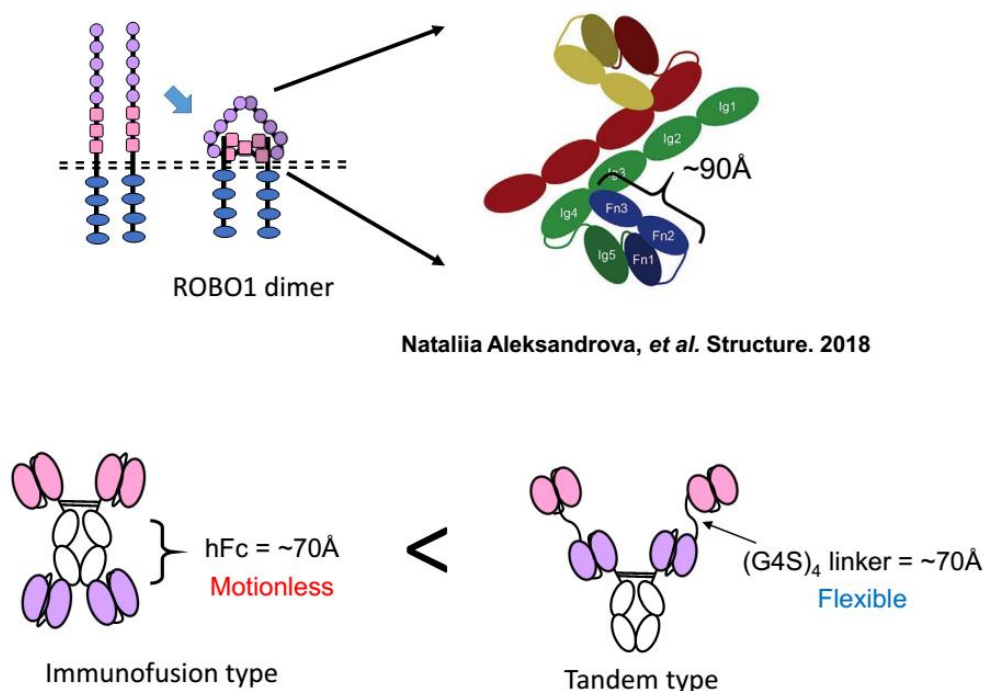


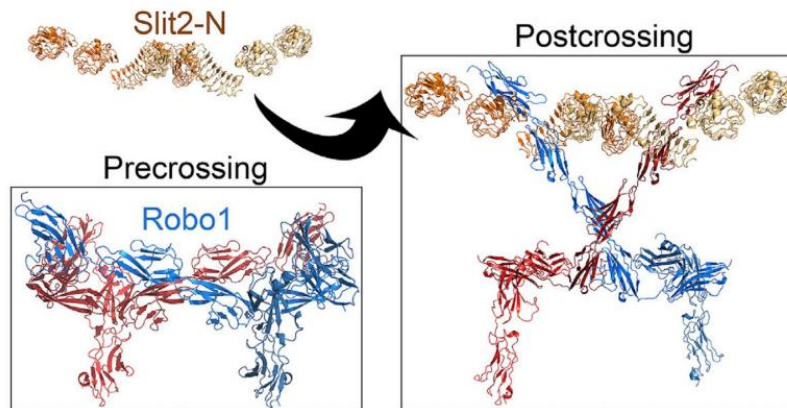
図 4-1. ROBO1 の細胞外ドメインと二重特異性抗体の関係。イムノフュージョン型のプロトマー内の2つの scFc は、強固に折りたたまれた高次構造を維持する hFc に挟まれているのに対し、タンデム型は高次構造をとらず、動きの自由度の高い一本のポリペプチド鎖でつながれている。

第3章までに解析した sROB01 は、バキュロウイルス発現系によって Sf9 細胞を用いて作製した単量体分子であったが、仮に単量体でもこの報告と同じような高次構造を形成していると仮定すると、タンデム型二重特異性抗体のプロトマーが有する異なる2つの scFv は、4つの(G4S) リンカーによってつながれているため、動きの自由度が高く、この折りたたまれた構造の ROB01 の細胞外ドメインに対して優位に結合した可能性が考えられる。一方、イムノフュージョン型二重特異性抗体のプロトマーが有する異なる2つの scFv は、強固な折りたたみによって立体構造を形成している hFc を挟んでいるので、2つの scFv の動きの自由度は低く、近接した2つのエピトープに結合するには、タンデム型と比べて不利だった可能性が考えられる。図 4-1. で報告されている二量体または四量体の ROB01 の細胞外ドメインは、HEK293 細胞を用いて作製している。このことから哺乳動物細胞を使った発現系の場合、ROB01 は二量体を形成する可能性があり、実際のがん細胞膜上の ROB01 も二量体以上の高次構造を形成している可能性がある。そこで本章では、同じ 293 系列の細胞株である Expi293F 細胞を用いて ROB01 を作製し、この四次構造を検証する。また、この Expi293F 細胞を用いて作製した ROB01 に対しても、第3章までに作製した二重特異性抗体が結合することを示す。

ROB01 と Slit2 の組織中での局在について調べると、ヒトの正常組織では、ROB01 は脳などの神経組織や神経系の細胞に発現していることが知られている^{62,63}。一方、ROB01 のリガンドとして既に知られている Slit2 の発現は肺や骨髄に多く、また腎臓などに至るまで広範な組織に発現していることが知られている⁶⁴。ROB01 は当初ショウジョウバエの胚発生期に神経軸索誘導遺伝子として見つかっており、近年では哺乳動物であるマウスにおいても、発生期に重要な役割を果たすこと⁶⁵、傷ついた網膜などの修復時に機能することといった報告もある⁶⁶。このような背景から、ROB01 は正常組織では、通常 Slit2 と結合して、そのシグナルを受けることは殆どないと考えられる。しかしながら、肝臓がん細胞などにおいては⁶⁷、ROB01 が異常な高発現状態を呈し、Slit2 の結合によって、細胞内にシグナルが伝えられ、がんが進行するという結果になっている。

図 4-1. の先行研究結果によると、ROB01 と Slit2 の結合状態について、分子レベルではともに二量体同士であり、それぞれ単量体では、100kDa の ROB01 の細胞外ドメインと、140kDa の Slit2 の N 末端ドメイン Slit2N が結合すると、この大きな分子同士でダイナ

ミックな立体構造変化を起こす（図 4-2）。また、Slit2N の ROBO1 に対する結合の反応速度定数は、約 8nM とされる⁶⁸。このようなことから、本研究で作製した親和性の強いバイパラトピックな二重特異性抗体が ROBO1 に結合したことで、Slit2N が ROBO1 の高次構造変化を起こさせる結合ができなくなる可能性を検証する。



Nataliia Aleksandrova, *et al.* Structure. 2018

図 4-2. ROBO1 と Slit2N の高次構造変化。 ROBO1 は、リガンドである Slit2N と結合することで、大きく開いた構造をとる。

第2節、Slit2N の発現精製

Slit2N の結合によって高次構造が変化した ROBO1 の評価系を作製するために、まず Slit2N の発現精製を行った (図 4-3)。Slit2N も sROBO1 同様、糖鎖が付加されるヒト由来の細胞外タンパク質であることから、バキュロウイルス発現系を用いることとした。細胞外の機能ドメインとされる4つのロイシンリッチリピートドメインと、6つのエピダーマルグロースファクタードメインからなる Slit2 の N 末端ドメインを C 末端にヒスタグ融合タンパク質になるように発現ベクターにクローニングした。これによりバキュロウイルス液を作製し、昆虫細胞 Sf9 に感染させた。感染後3日目の培養上清を回収し、Ni 精製とサイズ排除クロマトグラフィーによって、Slit2N を精製した。

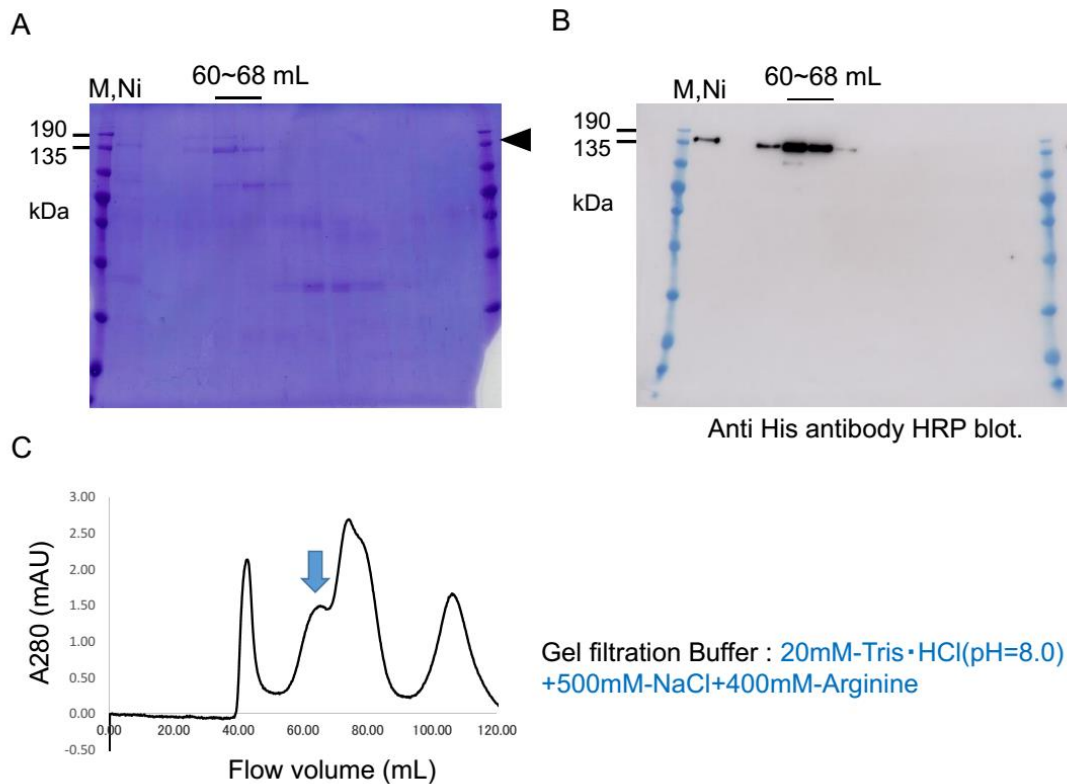


図 4-3. Slit2N の発現精製結果。 Slit2N は、収率が低く、純度も高くないが、SPR 法による解析には十分な収量となった。A は、SEC 後の SDS-PAGE の結果。Ni はニッケル精製後のサンプル。B は、抗ヒスタグ抗体によるウェスタンブロットによって、目的タンパク質の発現を確認した。C は、SEC による目的タンパク質のピークの位置を示す。

第3節、293細胞株を用いた ROBO1 の細胞外ドメインの発現精製

先行研究により、HEK293 細胞株を用いた発現系により作製された ROBO1 の細胞外ドメインによって、高次構造の解析がなされたことから、本研究においても 293 細胞株による発現系で ROBO1 の細胞外ドメインを改めて発現精製することを試みた。全長の ROBO1 を発現ベクター *pcDNA3.4* にクローニングし、Expi293 細胞株に遺伝子導入した。この細胞のライセート中には全長の ROBO1 が発現し、遺伝子導入 3 日目以降の培養上清中に、ROBO1 の細胞外ドメインが放出されていることを B2212A キメラ抗体によるウェスタンブロット法により確認した (図 4-4)。

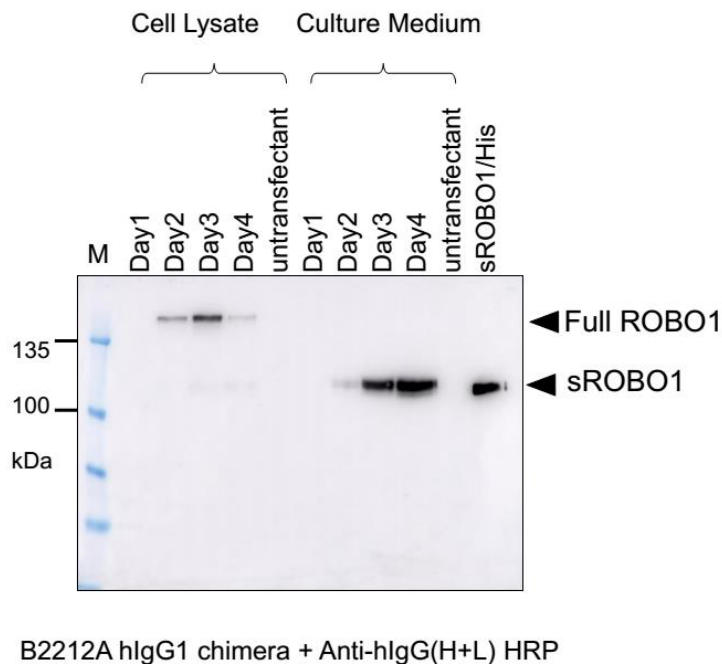


図 4-4. Expi293F 細胞による ROBO1 の細胞外ドメインの発現。ROBO1 は、Expi293F 細胞に全長で発現させると、細胞外ドメインが培養上清中に切断される。細胞ライセートおよび培養上清中の標的タンパク質の発現を、経時変化を追ってウェスタンブロットによって確認した。

さらにこの切断された ROBO1 の細胞外ドメインが、先行研究で報告されているように二量体や四量体を形成していることを確かめるために、ヒスタグを N 末端側に融合させた発現系を作製し、この His-ROBO1 の細胞外ドメインを Ni 精製し、SEC 分析カラムを通過させることで、分子量を見積もることとした。その結果、バキュロウイルス発現系で作製した単量体であった sROBO1 に対し、Expi293F 細胞で発現させた His-ROBO1 は、単量体よりも分子量が大きかったことから、先行研究で示されているように二量体以上の多量体を形成していることが示唆された (図 4-5)。

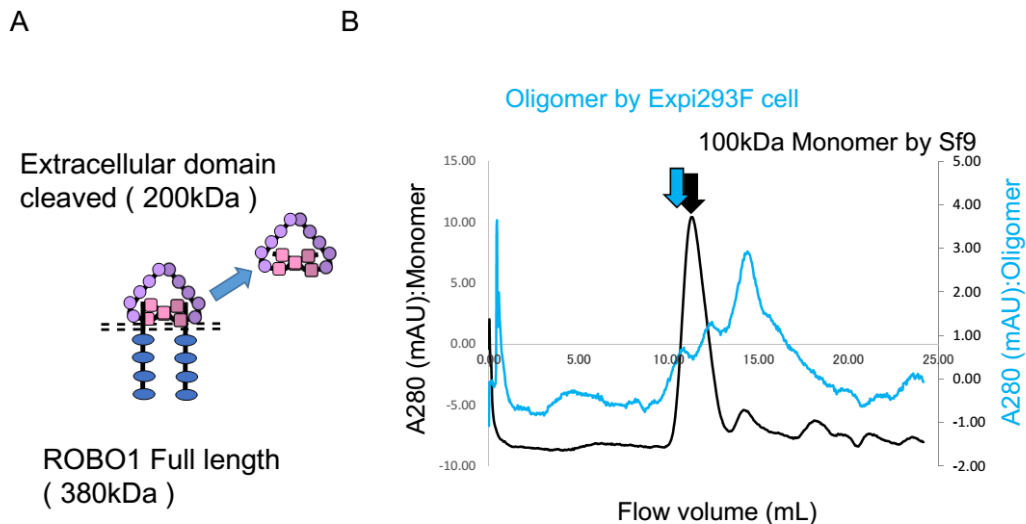


図 4-5. Expi293F 細胞で発現させた His-ROBO1 の細胞外ドメインの精製。全長の ROBO1 を Expi293F 細胞に発現させ、培養上清中に切断されてきた細胞外ドメインを Ni アフィニティー精製後、SEC 精製を行った。A は、構造の模式図で、ダイマーであった場合の分子量を示す。B は、分析カラムのクロマトグラムを示す。バキュロウイルス発現系で作製したモノマーの分子量よりも大きな分子量のタンパク質がわずかに検出されている。

第4節、抗原抗体複合体を用いた Slit2N の親和性評価

この多量体を形成する ROBO1 の細胞外ドメインに第3章までに作製した抗体を結合させることで、抗原抗体複合体を形成し、これをセンサーチップ上に固定化することで、Slit2N の抗体が結合した ROBO1 への親和性を評価することとした (図 4-6)。

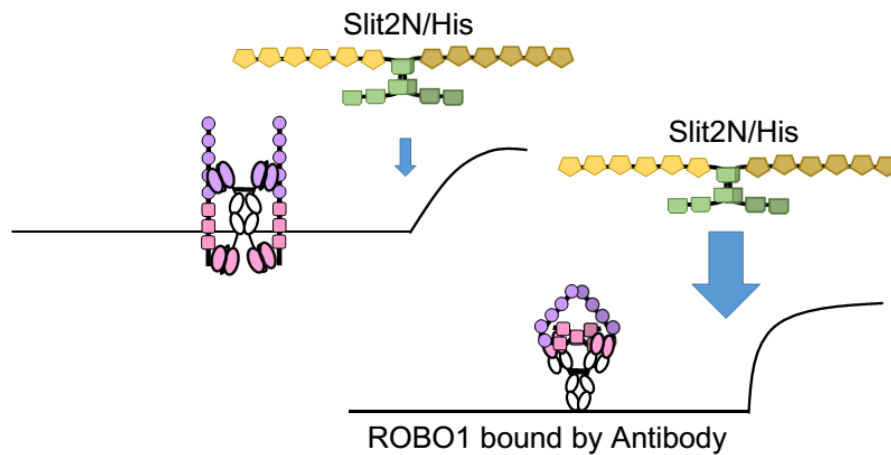


図 4-6. Slit2N の親和性評価。 Expi293F 細胞で発現させた多量体を形成する ROBO1 の細胞外ドメインを、抗体と結合させた状態で固定化することで、ROBO1 に対する各種抗体の結合によって、Slit2N の結合の親和性への影響を評価する。

タグを付加していない ROBO1 の細胞外ドメインを、抗体カラムを使用して抗原と抗体を共に精製した (図 4-7)。B2212A キメラ抗体、または、B2212A-B5209B イムノフュージョン型二重特異性抗体をプロテイン G セファロースに結合させ、ROBO1 の細胞外ドメインを、遺伝子導入 7 日目の Expi293 細胞の培養上清中から精製した。

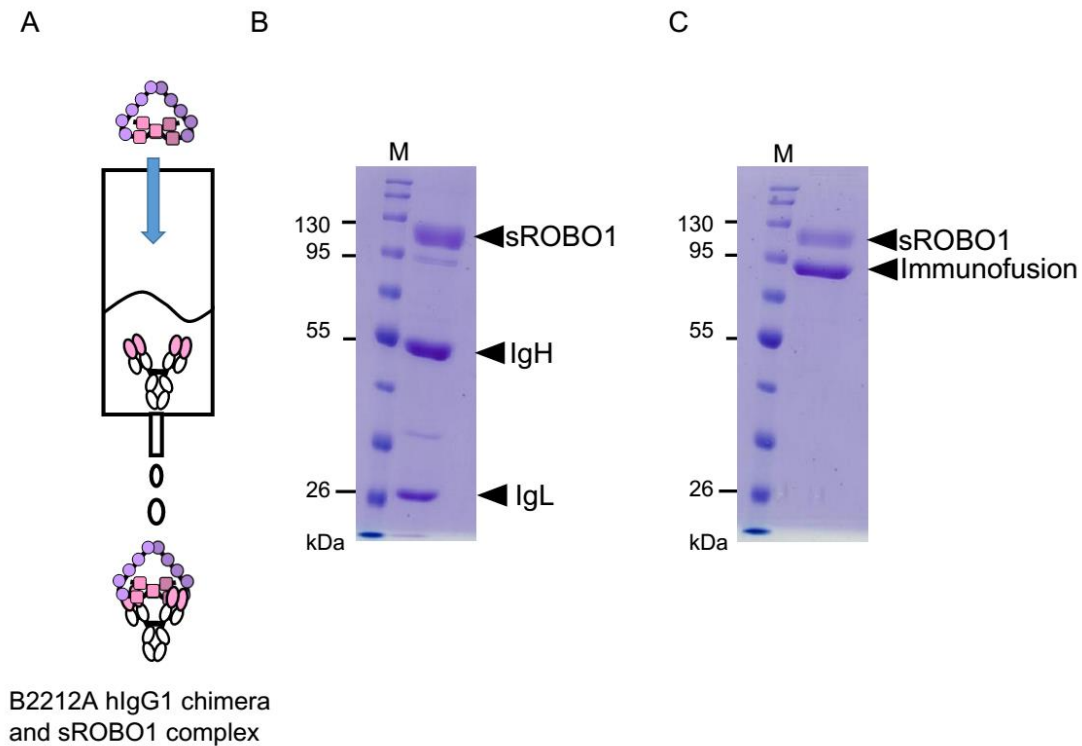


図 4-7. 抗体カラムによる ROBO1 の細胞外ドメインの精製。A は、抗体カラムの模式図。B は、B2212A キメラ抗体と ROBO1 の細胞外ドメインの複合体の SDS-PAGE で展開した結果を示す。C は、B2212A-B5209B Immunofusion 型抗体と ROBO1 の細胞外ドメインの複合体の SDS-PAGE で展開した結果である。

抗体カラムで精製された抗原抗体複合体をサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した（図 4-8）。単一のピークとして得られた精製画分を、標的タンパク質の存在を確認するために、B5209B キメラ抗体と二次抗体として抗ヒト IgG 抗体を用いたウェスタンブロットを行った。ROB01 抗原と B2212A キメラ抗体、および、B2212A-B5209B イムノフュージョン型二重特異性抗体の存在を確認できた。これらの結果から、第 3 章までに作製した抗体が、単量体だけでなく多量体にも結合できることが示された。

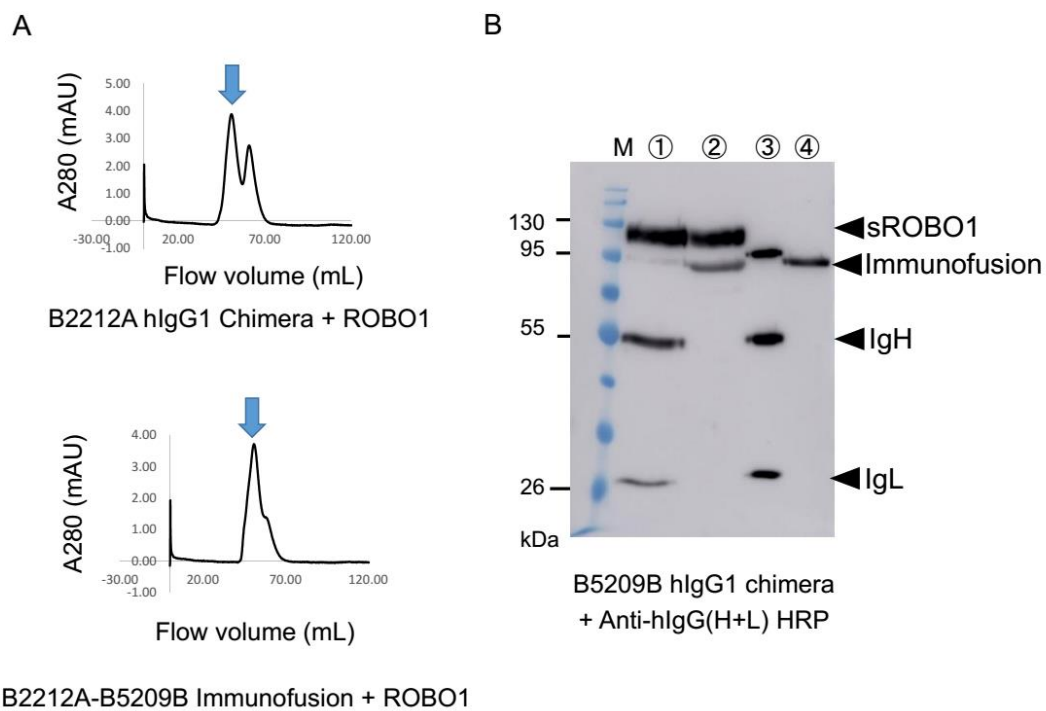


図 4-8. sROBO1 と B2212A hIgG1 キメラ抗体およびイムノフュージョン型抗体複合体の SEC 精製。切断された ROB01 の細胞外ドメイン (sROBO1) と B2212A hIgG1 キメラ抗体およびイムノフュージョン型抗体の複合体を SEC によって精製した結果を A に示す。過剰量加えた抗体と複合体が分離できている。B は、SEC 後のサンプルをウェスタンブロットによって sROBO1 と キメラ抗体およびイムノフュージョン型抗体の存在を確認した。①は、ROB01 と B2212A hIgG1 キメラ抗体複合体。②は、ROB01 とイムノフュージョン型抗体複合体。③は、B2212A hIgG1 キメラ抗体のみ。④は、イムノフュージョン型抗体のみ。①と②に、sROBO1 の存在が確認できる。

二重特異性抗体が結合した状態の ROB01 に対し、Slit2N の結合の親和性を評価することで、二重特異性抗体による Slit2N の ROB01 への結合の阻害を評価できるかについて検証することとした。

取得した ROB01 抗原に結合した B2212A キメラ抗体複合体を、センターチップ上に固定化し、SPR 法を用いて Slit2N の結合を測定した (図 4-9)。しかしながら、マイナスの値を示している反応にあり、Slit2N をアナライトとして流し、解離を測定する際に、ROB01 も固定化した抗体から剥がれていると思われる。また、Slit2 の純度が低いため、Slit2N と抗体と共に固定化した ROB01 への親和性を評価する詳細な解析には至らなかった。

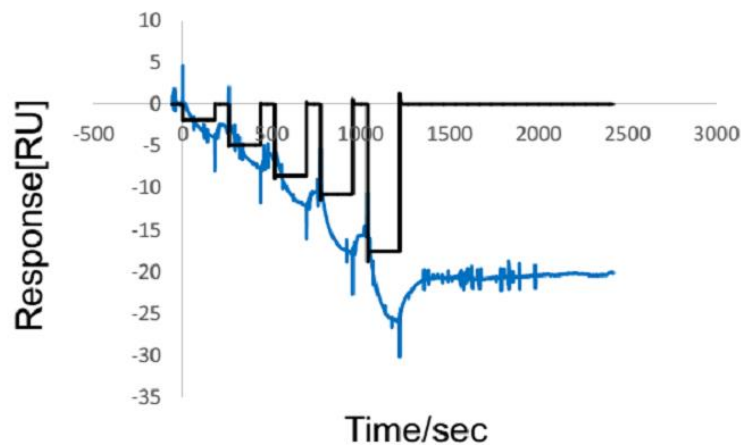


図 4-8. 抗原抗体複合体の Slit2N に対する SPR 測定結果。抗 Human Fc 抗体を用いて ROB01 と B2212A-B5209B Immunofusion 型抗体の複合体を固定化し、アナライトとして Slit2N を $40\text{nM} \sim 2.5\text{nM}$ の濃度で流すことで、親和性を評価することを試みた。バッファーには、0.005% Tween20 20mM-HEPES (pH=7.4) を用いた。この時のセンサグラムを示す。青の実線は測定結果、黒の実線はフィッティング曲線を示す。センサグラムが下がってきていることから、固定化した ROB01 抗原が剥がれていることが推察される。

第5節、本章の総括

Slit2N の発現精製は、困難であった。Ni 精製した時点での収量も低く、その後、PBS に透析すると沈殿しやすく、また、限外ろ過によって濃縮する際にも沈殿しやすい傾向にあった。このことから、PBS には置換せずに、アルギニンを加えた Tris 緩衝液で精製を行い、SPR 測定は、HEPES 緩衝液を用いるなどの工夫を施した。

全長の ROBO1 を Expi293 F 細胞で発現させた時に、細胞外ドメインが自発的に切断されてきたことは、最初は想定外であった。しかしながら、先行研究により、MMP や γ -セクレターゼによって、細胞外ドメインが切断されることは、既に報告されていることから、おそらく Expi293 F 細胞においても同様の活性を持つプロテアーゼの発現があつて、ROBO1 の細胞外ドメインは切断されて、培養上清中に放出されたことが推察される。

Expi293 F 細胞培養上清中の ROBO1 は、クルードなサンプルであるが、ここから抗 ROBO1 抗体カラムを用いて、ROBO1 抗原を純度高く精製することができた。このことから本研究で作製した単結合性および二重特異性抗体は、抗原に対し高い特異性を維持していたことがわかる。そして、バキュロウイルス発現系によって作製した単量体だけでなく、293 細胞系によって作製した多量体の ROBO1 にも本研究で作製した抗体が結合できることが示された。

さらに、精製した抗原抗体複合体を用いた SPR の結果から、この抗原抗体複合体と Slit2N の結合を評価することを試みたが、Slit2N の解離を測定する際に、おそらく ROBO1 も固定化した抗体から剥がれていたことが原因となり、親和性を評価する詳細な解析には至らなかった。このことから、二重特異性抗体が、Slit2N による ROBO1 の高次構造変化を抑制するといったような結果は得ることはできなかった。

Slit2N が結合することで高次構造が変化した ROBO1 に対する各種二重特異性抗体の結合の評価をするために、さらに ROBO1 を発現する培養がん細胞を使ったフローサイトメトリーによる実験系を行うこととした。

第 5 章

肝がん細胞株を用いた二重特異性抗体の結合評価

第5章、肝がん細胞株を用いた二重特異性抗体の結合評価

第1節、本章の序論

肝臓がん細胞^{69,70,71}などにおいては、過剰発現を呈した ROBO1 はリガンドである Slit2 からの刺激を受けて、肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor : HGF) からのシグナルが増強され、肝臓がんが進行することが報告されてきた⁷²。その後、HGF からのシグナルを受けると細胞質内のシグナル伝達タンパク質の Akt がリン酸化を起すこと、ROBO1 が Slit2 の刺激を受けると Akt がリン酸化されるといったメカニズムが次々に解明された。Akt のリン酸化によって、さらに下流の低酸素誘導性因子 HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor) の発現が行進し、がん細胞の血管新生に関わる VEGFR や浸潤転移に関する MMP2、さらに細胞内に糖を取り込む GLUT1 などの、がんが行進する上で重要な遺伝子群が発現することが分かっている (図 5-1)^{73,74}。

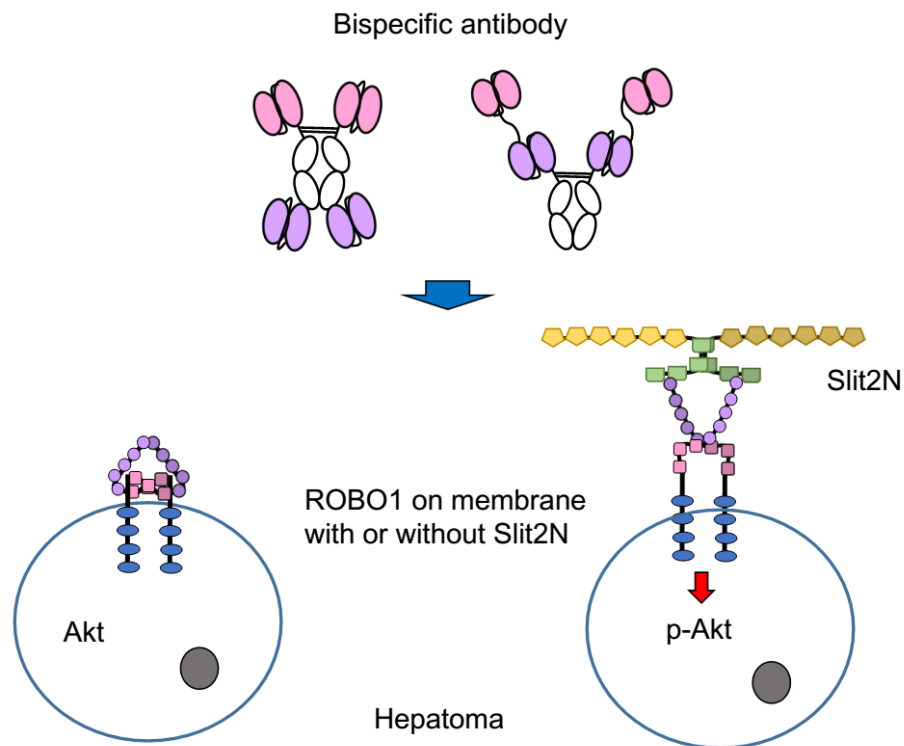


図 5-1. 肝臓がん培養細胞株を用いた、構造変化した ROBO1 への二重特異性抗体の結合。がん細胞上の ROBO1 に二重特異性抗体が結合できるか確かめる。Slit2N が結合することによって構造変化した ROBO1 にも、二重特異性抗体が結合できるか確かめる。

図 4-1. で報告されている ROBO1 は、二量体または四量体の細胞外ドメインを形成していて、第 4 章ではこのような多量体を形成する ROBO1 にも、第 3 章で作製した単結合性および二重特異性抗体が結合することを示した。本章では、ROBO1 を発現する肝臓がん培養細胞株を用いて、作製した二重特異性抗体ががん細胞上に発現する ROBO1 にも結合できるかを調べる。さらに、Slit2N の結合によって構造が変化する ROBO1 に対しても、第 3 章までに作製した二重特異性抗体が結合できるか検証する。

第2節、肝臓がん培養細胞株における ROBO1 の発現

抗体の結合を調べる前に、ROBO1 が発現していることが既に報告されている肝臓がん培養細胞株 HepG2 および PLC/PRF/5 において、当研究室においても ROBO1 が発現していることをウェスタンブロット法によって事前に確認した (図 5-2)。培養した各種細胞株のライセートを作製し、B2212A キメラ抗体を用いて、内在性の ROBO1 の発現を確認した。比較のため、全長の ROBO1 発現ベクターを、肝臓がん細胞株へ遺伝子導入し、同様にライセートを作製し、ウェスタンブロット法によって発現確認を行った。このライセートによると、遺伝子導入した HepG2 において、マーカの 190kDa 以上に優位なバンドが検出された。遺伝子導入していない HepG2 および PLC/PRF/5 のどちらにも、同等の分子量のタンパク質が、確認できたことから、内在性の ROBO1 の発現を確認することができた。

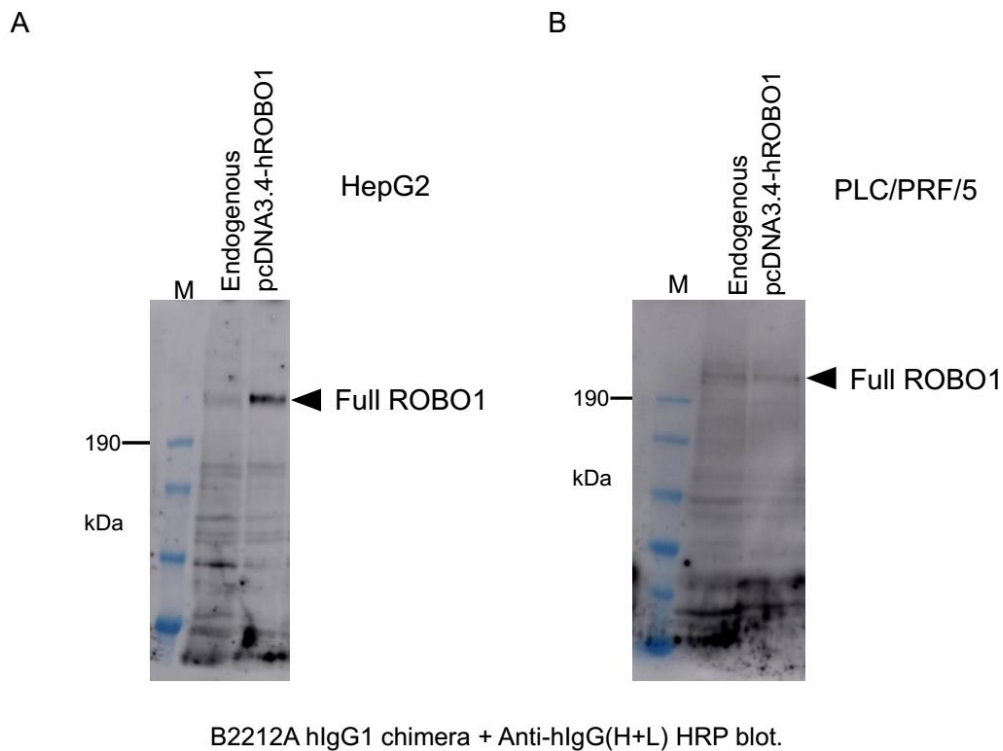


図 5-2. 肝臓がん培養細胞株に発現する ROBO1。ウェスタンブロットによって内在性の ROBO1 の発現を遺伝子導入した細胞と比較することで確認することができた。A は、HepG2 の細胞ライセート。B は、PLC/PRF/5 の細胞ライセート。遺伝子導入したライセートには、有意に発現する標的分子の発現が確認できる。

次に、この HepG2 に発現する ROBO1 が、作製した Slit2N と結合し細胞内の Akt をリン酸化するかを調べるために、HepG2 の培養液中に 6nM の濃度になるように精製した Slit2N を加えて刺激し、経時的に細胞ライセートを回収した。これを BCA 法によりタンパク質濃度をそろえてウェスタンブロットを行った (図 5-3)。473 番目のセリンがリン酸化されている Akt を検出する抗体で、シグナル導入の有無を検証した。その結果、Slit2N の刺激後 10 分以降から、Akt の 473 番目のセリンがリン酸化されていることが確認できた。このことから、本研究で作製した Slit2N は活性を有し、HepG2 の細胞上の ROBO1 に結合し、下流にシグナルを伝える機能を持っていることが確認できた。

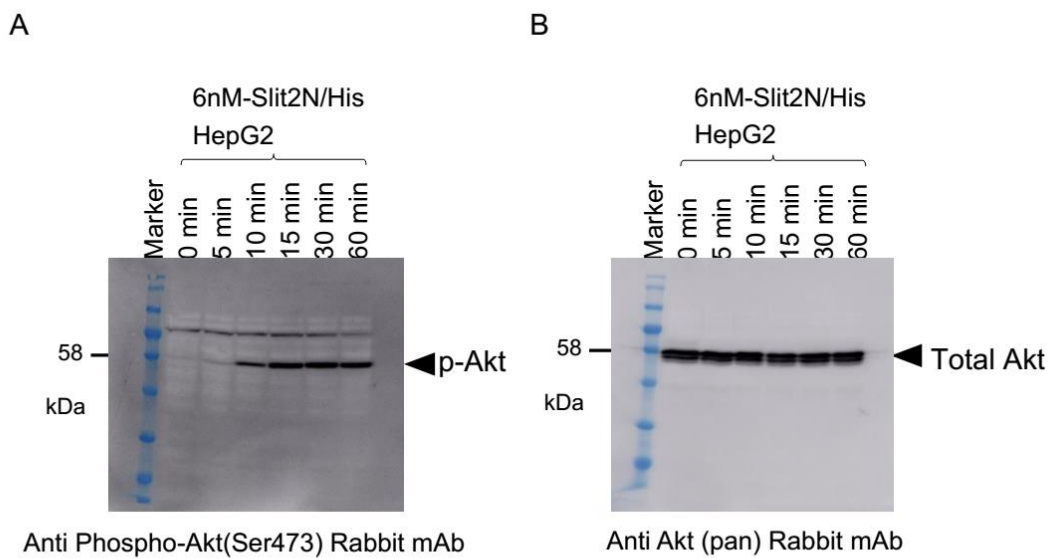


図 5-3. 精製した Slit2N による Akt のリン酸化。 HepG2 を Slit2N によって刺激すると、10 分目以降に Akt のリン酸化が行進していることが確認できる。A は、抗リン酸化 Akt 抗体。B は、抗 Akt (pan) 抗体で、リン酸化されていない Akt も全て含めた発現を示す。

さらに、フローサイトメトリーにより HepG2 の細胞膜上に発現する ROBO1 への二重特異性抗体の結合について、タンデム型とイムノフュージョン型抗体を用いて確認した (図 5-4)。タンデム型、イムノフュージョン型のいずれも、二次抗体のみ及び抗体なしのコントロールと比べて有意に結合していることが確かめられた。さらに HepG2 を Slit2 と各種二重特異性抗体とを混合し、それぞれの二次抗体で検出した (図 5-5)。HepG2 に結合したヒスタグが融合している Slit2N を、抗ヒスタグ抗体で検出すると、二重特異性抗体の存在下においても、Slit2N は HepG2 に結合した。一方、同じ条件で抗ヒト Fc 抗体で検出すると、Slit2N の存在下においても、二重特異性抗体は HepG2 に結合している。

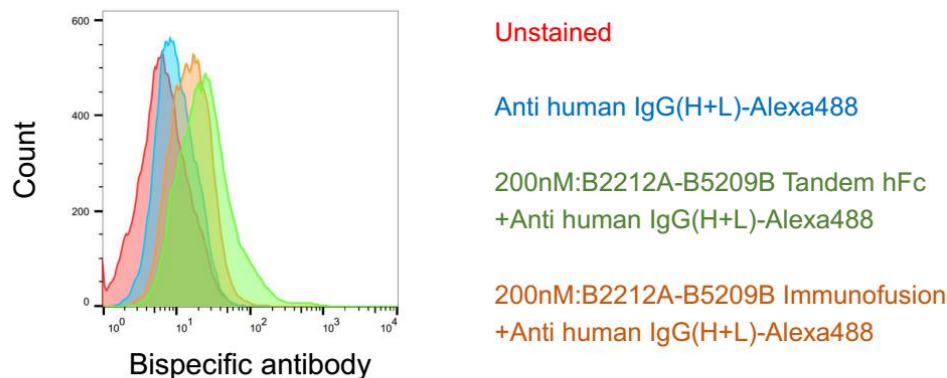
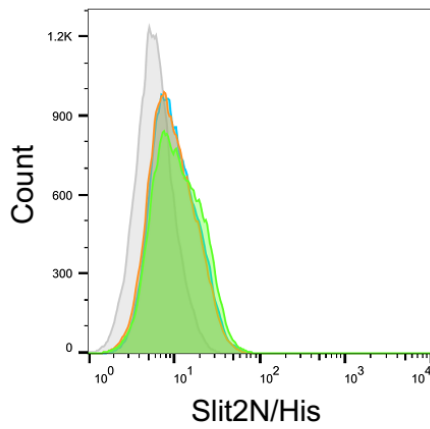


図 5-4. がん細胞に発現する ROBO への二重特異性抗体の結合。 フローサイトメトリーによって、HepG2 に発現する内在性の ROBO1 に二重特異性抗体が結合することを確認した。赤は、無染色。青は、二次抗体のみ。緑は、一次抗体として B2212A-B5209B タンデム型。橙は、一次抗体として B2212A-B5209B イムノフュージョン型をそれぞれ使用した。

A



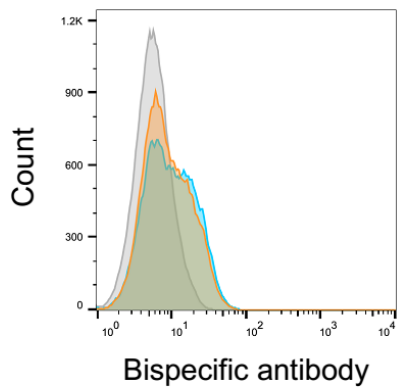
Anti His-tag mAb-Alexa488

6nM:Slit2N/His
+Anti His-tag mAb-Alexa488

6nM: Slit2N/His
+200nM:B2212A-B5209B Tandem hFc
+Anti His-tag mAb-Alexa488

6nM: Slit2N/His
+200nM:B2212A-B5209B Immunofusion
+Anti His-tag mAb-Alexa488

B



Anti human IgG(H+L)-Alexa488

6nM: Slit2N/His+200nM: B2212A-B5209B
Tandem hFc +Anti human IgG(H+L)-Alexa488

6nM: Slit2N/His+200nM: B2212A-B5209B
Immunofusion +Anti human IgG(H+L)-Alexa488

図 5-5. がん細胞に発現する ROBO への Slit2N と二重特異性抗体の結合。フローサイトメトリーによって、HepG2 に発現する内在性の ROBO1 に二重特異性抗体と Slit2N が共存する状況で、どちらも結合することを確認した。A において、黒は、抗ヒスタグ二次抗体のみ。緑は、Slit2N/His のみ。橙は、Slit2N/His と B2212A-B5209B タンデム型。青は、Slit2N/His と B2212A-B5209B イムノフュージョン型をそれぞれ混合した。

第3節、本章の総括

肝がん細胞株 HepG2 に発現していた ROB01 は、先行研究で報告されているほどの高発現は確認できなかった。本研究で用いた HepG2 は、理研バイオバンクより購入したもののだが、培養方法の検討が必要である。

フローサイトメトリーの結果は、二重特異性抗体を 200nM の高濃度で検出している。SPR 測定によるタンデム型およびイムノフュージョン型二重特異性抗体の親和性の測定結果は、10 のマイナス 11 乗 M の値を示していたが、必ずしも SPR 測定結果と同等の親和性で細胞上に発現する ROB01 抗原に結合するとは限らないので、本研究では十分に結合が確認できる濃度で、フローサイトメトリー測定を行うこととした。その結果、HepG2 に発現している ROB01 に対しても、作製した二重特異性抗体の結合を確認することができた。また、Slit2N の結合と二重特異性抗体の HepG2 への結合を検出することができた。

図 5-4. で測定された ROB01 の発現と比べると、図 5-5. において測定された ROB01 の発現が低く測定されている。このことから、HepG2 に発現する ROB01 に Slit2N が結合すると、二重特異性抗体の結合が減弱しているように見える。図 5-4. と図 5-5. は同時に測定した結果ではないので、さらなる検証が必要であるが、本研究で作製した二重特異性抗体は、Slit2N が結合していない ROB01 に優位に結合し得る可能性がある。

いずれにしても、本章において、第3章までに作製した二重特異性抗体が、がん細胞上に発現する ROB01 抗原に対しても結合できることを確認できた。

第6章

本研究の総括

第6章、本研究の総括

第1節、発現系の妥当性について

本研究において、タンパク質の発現系は全てバキュロウイルス発現系を用いている。この発現系の特徴の一つとしては、細胞外に目的タンパク質を翻訳後修飾、すなわち糖鎖修飾を施して分泌できる点がある。内在性のヒト抗体に修飾される糖鎖は、ヘテロな集団であることが知られ、抗体によって施される糖鎖修飾は様々である。よって組換えタンパク質として発現させる抗体に修飾させる糖鎖は、どのような糖鎖修飾が適切となるかは、発現させてみないと分からない⁷⁵。実際に本研究においても、昆虫細胞 Sf9 を用いて二重特異性抗体を発現させたが、糖鎖修飾が異なる昆虫細胞株 High Hive にも同じウイルス液を感染させて、一部の二重特異性抗体の発現精製を試みたところ、収率は極端に下がり、明らかな沈殿物が生じてしまった。また、糖鎖修飾がシアル酸まで結合することが知られている昆虫細胞株 Mimic Sf9 も試したが、シアル酸の供給源として血清を加えなければならず、プロテイン G 精製の際に血清由来のグロブリンが混在し精製が困難であった。このような背景から、本研究では Sf9 株を用いて抗体を発現精製することとした。

第2章において、抗 ROB01 抗体 B5209B および B2212A の抗原認識部位から作製した2つの scFv を用いて4価になる二重特異性抗体を、タンデム型、一本鎖および二本鎖ダイアボディ型、そしてイムノフュージョン型と呼ばれる構造を持つ形で8つ設計し、その結果、抗原認識部位の位置を変化させることで、抗体を構成する各ドメインの熱安定性や親和性の異なる様々な二重特異性抗体の発現精製に成功した。DSF の結果から、scFv を hFc に融合させる位置や順によって、scFv そのものや hFc の CH2 ドメインの Tm 値に変化を及ぼした。SPR の結果からは、親和性の異なる二重特異性抗体を複数作製できたことが確認された。このような抗体の熱安定性と親和性といった物性解析を検証することで、scFv-hFc 型の最適な融合抗体の分子設計を結論付けることができた。

第2節、高親和性抗体の意義

第3章において、B5209B および B2212A の scFv-hFc 型抗体およびヒト IgG1 型キメラ抗体を作製し、親和性を評価した。親抗体であるマウスモノクローナル抗体は、親和性がそれぞれ B5209B:0.025nM、B2212A:0.021nM と報告されている。これと比べるとヒト IgG1 型キメラ抗体は、B5209B:52nM、B2212A:3.3nM となり減弱している。これまでに作製されてきた様々なマウスモノクローナルは、臨床応用を目指して、その抗体の可変領域をヒト抗体の定常領域に融合させることで、ヒトキメラ化にした場合、親和性が減弱することが報告されている⁷⁶。例えば、セツキシマブなどの抗体で実績がある、がん細胞抗原の標的として上皮成長因子受容体（Epidermal Growth Factor Receptor：EGFR）に対する抗体の相補性決定領域（Complementarity Determining Region：CDR）をフレームワーク領域（Framework region：FR）に移植しただけでは抗体の親和性が減弱してしまうので、最適化が必要であるという報告がある⁷⁷。本研究においても、マウスモノクローナル抗体であった B5209B と B2212A の抗原認識部位をヒト IgG1 抗体の定常領域に移植し、キメラ抗体としたことで親和性の減弱が確認された。しかし、このキメラ抗体と二重特異性抗体の親和性を、親抗体であるマウスモノクローナル抗体の親和性と比較すると、キメラ抗体の親和性は、二重特異性抗体を作製したことで、抗原に対する親和性が親抗体と同等に改善された。当研究室はこれまで、二重特異性抗体の作製に代表される親和性の向上を目指した研究を進めてきた。この成果の一つとして、このようなキメラ抗体の親和性を親抗体の親和性まで回復させる効果がある。キメラ抗体などの減弱した融合抗体の親和性を改善する手法として、二重特異性抗体の作製以外には、抗体の可変領域に変異を入れて、親和性を向上させる方法も採られてきた^{78, 79, 80}。しかしながら、この方法は直接的に抗体と抗原の結合海面に影響を与えることから、親和性が見かけ上高くなっても抗原に対する特異性が失われてしまう危険性もある。キメラ抗体を作製せずに、ヒト化抗体を作製する方法も存在する⁸¹。すなわち、ヒト免疫グロブリンのトランスジェニックマウスに抗原を免疫して、ヒト化抗体を得る方法である⁸²。この方法で得られた抗体は定常領域が、ヒト抗体の配列をしているので、ヒトキメラ抗体を作製する必要はない。しかしながら、本研究において、一本鎖抗体 scFv-hFc を作製した場合、親抗体よりも親和性が低かったように、このヒト化抗体から一本鎖抗体を作製し、二重特異性抗体などの改変抗体を設計

した場合、同様に親和性が減弱する恐れがある。

実際のがん患者のがん細胞への抗体の結合を考えた時、標的とするがん細胞に ROBO1 抗原の発現が多い場合、抗体に求められる物性としては、親和性が低くても多くの抗体を安定に患者に投与できることが重要になり、ROBO1 抗原の発現が低い場合には、患者に投与できる量が少なくても、親和性の高い抗体が求められると考えられる (図 6-1) ⁴⁶。第 2 章において収率の異なる抗体が取得されたことと、第 3 章において解析したように、抗原に対する親和性の異なる性質を持つ抗体が作製されたことを鑑みると、患者の ROBO1 の発現に応じて求められる治療戦略を提案できる。すなわち、がん細胞上の ROBO1 の発現が高ければ、ある程度親和性が低くても、多くの抗体を投与することが効果的になり、イムノフュージョン型のような二重特異性抗体が理想的である。一方、がん細胞上の ROBO1 の発現が低ければ、少ない抗体投与量でも高親和性抗体が治療においては有効になることが考えられ、タンデム型のような抗体が理想的である。

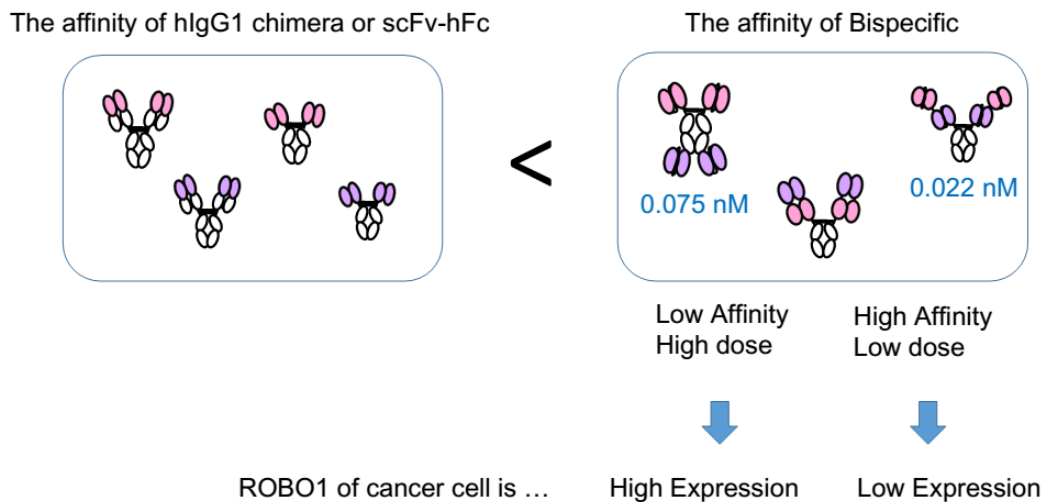


図 6-1. 二重特異性抗体の機能と用途。収量や親和性といった各種二重特異性抗体の特徴に適した使用法が考えられる。

第3節、ROB01 の四次構造について

第4章で得られた、Epi293 F 細胞培養上清中に発現する ROB01 は、二量体以上の多量体を形成していることが示唆された。第3章までは、バキュロウイルス発現系を用いて作製した単量体である sROB01 によって親和性や反応速度定数を解析した。実際のがん細胞上に発現する ROB01 は、単量体であるのか多量体であるのか、あるいは、どちらがどの程度存在するのかは分からない。おそらくどちらもタンパク質としては安定に精製できることから、単量体と多量体の平衡状態にあるのかも知れない。いずれにしても、本研究で作製した抗体は、単量体にも多量体にも結合することが確かめられた。

抗 ROB01 抗体カラムを用いて、Epi293 F 細胞培養上清中から ROB01 抗原を純度高く精製することができた。このことから、本研究で作製した単結合性および二重特異性抗体は、多量体を形成した ROB01 抗原に対しても、高い特異性を維持していることがわかる。さらに、精製した抗原抗体複合体を用いた SPR の結果から、この抗原抗体複合体と Slit2 の結合を評価した。しかしながら、Slit2N と抗体と共に固定化した ROB01 への親和性を評価する詳細な解析には至らなかった。このことから、Slit2N が結合し、高次構造が変化した ROB01 への二重特異性抗体の結合については、フローサイトメトリーを用いて評価することとしたが、固定化される ROB01 は必ず抗体に結合しているはずなので、分子レベルで抗体が結合した ROB01 に Slit2N が結合するかを検証できる実験系のはずであった。分子レベルでの検証を実施するためには、この方法が望ましいと考えられる。

第4節、肝がん細胞株への抗体の結合について

第5章では、フローサイトメトリーの結果から、がん細胞株に発現する ROB01 に結合する二重特異性抗体と Slit2N の結合をそれぞれ検出した。この実験系は細胞レベルでの評価系であり、必ずしも抗 ROB01 抗体が結合した ROB01 抗原に対する Slit2N の結合を検出しているとは限らない。細胞上に発現している ROB01 には、抗 ROB01 抗体がのみ結合している場合と Slit2N のみが結合している場合の可能性もあれば、Slit2N が結合することによって抗 ROB01 抗体が離れてしまう可能性もある。このようなことから、第4章での分子レベルでの結果をふまえて、第5章での細胞レベルの結果について考察するのが望ましかった。

肝がん細胞株を用いた実験系において、ウェスタンブロットによって Slit2N の刺激による Akt のリン酸化が行進することが示された。作製した二重特異性抗体に、このリン酸化を阻害するような抗体があれば、その抗体はがんが行進することを阻害するような抗体になり得ることも考えられる。このようなアンタゴニストとしてのバイパラトピックな二重特異性抗体は、VEGFR に対する抗体で例がある。バイパラトピックな二重特異性抗体の機能として、他にアゴニストや細胞内への内在化を促すものがある。しかしながら、これらの先行研究には本研究で示したような、scFv 間の位置や順を検証し、SPR と ITC そして、DSF による実験結果から総合してアンタゴニストやアゴニストを作製したという先行研究はない。多くは、SPR によって単結合性抗体の親和性よりも、バイパラトピックな二重特異性抗体の方が、親和性が向上したということから、バイパラトピックなアンタゴニストやアゴニストを作製できたと報告している。しかしながら、本研究で示したように、SPR によって親和性が向上したとしても、ITC の結果から必ずしも標的とする抗原に対し、二重特異性抗体が、1 対 1 のバイパラトピックな結合をしているとは限らない。このような結果から、複数の評価系によって物理化学的指標を総合的に評価することが、反応機構の正しい解明には重要である。

第5節、二重特異性抗体設計方法

近年では、標的抗原の立体構造解析の結果から、抗体のエピトープ間の距離を計算し、この情報から最適な抗体を分子設計してから、抗体の発現系を構築するという研究がある。本研究が始まった時点では、ROB01 の細胞外ドメイン全長の構造解析はなされておらず、このような立体構造情報から抗体の分子設計を行うことは困難であった。その後、ROB01 の細胞外ドメイン全長の構造解析が、クライオ電子顕微鏡を用いた研究によって明らかとなった。この情報によって、本研究では第4章から進めた作製した幾つかのバイパラトピックな二重特異性抗体が、リガンドである Slit2N が ROB01 に結合したときに起こす構造変化に対応できるのではないかと考えた。そこで、実際のがん細胞上で、リガンドの結合など様々な動きの変化を抗原側に起こさせ、この標的抗原に対しても結合できる二重特異性抗体を作製するに至ったことを証明しようと考えた。高次構造情報は、予め抗体の合理的デザインを行う上で必要不可欠であるが、本研究で示されたように作製しようと試みた抗体の中でも、実際には収率が低く作製が困難な分子もある。このような場合、融合抗体を作製し得る幾つかの分子設計の中から特有の機能を持つ抗体を検索していく手法が効果的である。

実験手法

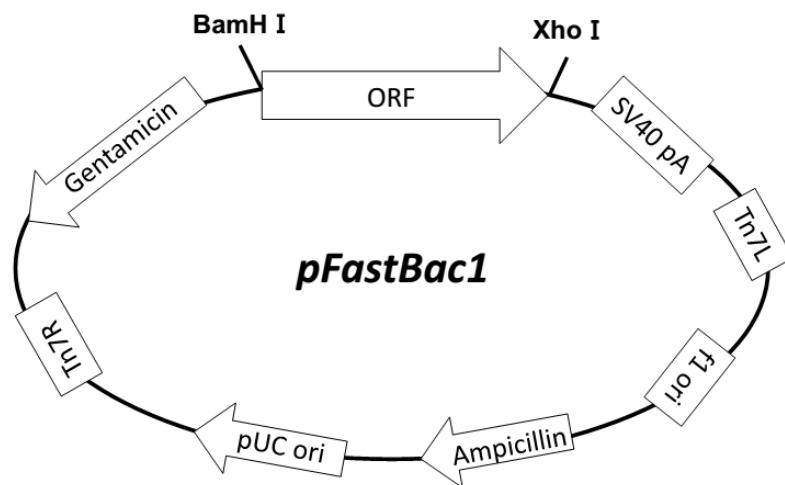
実験手法

単結合性および二重特異性抗体の発現ベクターの調整

共同研究先である浜窪隆雄研究室により供与を受けた、抗 ROBO1 抗体 B5209B および B2212A の可変領域の DNA 配列をヒト抗体の Fc に融合させるように、バキュロウイルス発現系ベクター *pFastBac* (Invitrogen) に挿入することで Fc 融合型二重特異性抗体の発現ベクターを構築した (図 7-1)。また、細胞外分泌シグナルとして SP12 配列を ORF の N 末端に融合させた⁸³。単結合性抗体も同様に ヒト Fc 融合型になるように可変領域を *pFastBac* に ORF を挿入した。また、キメラ抗体の作製には、ヒト IgG1 の定常領域の遺伝子配列に挿入し、軽鎖には λ 鎖の配列を使用した。

Slit2N および、sROBO1 の変異体についても同様に、バキュロウイルス発現系ベクター *pFastBac* を用いて発現系を構築した (図 7-2)。

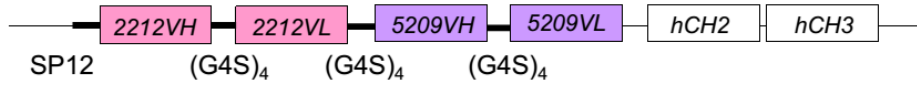
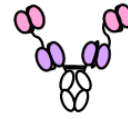
A



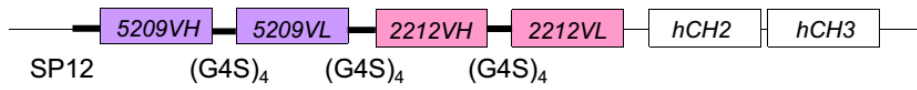
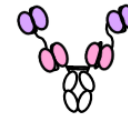
B

Tandem type

B2212AscFv-B5209BscFv-hFc



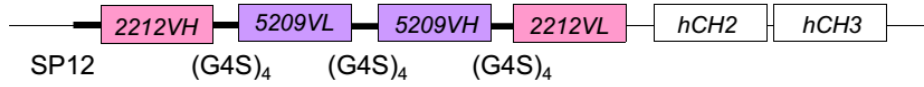
B5209BscFv-B2212AscFv-hFc



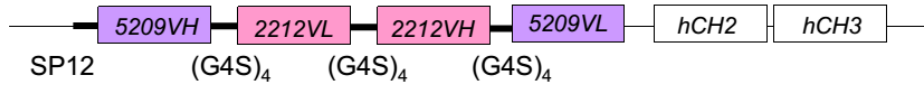
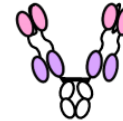
C

Single chain Diabody type

B5209BscFv=B2212AscFv-hFc



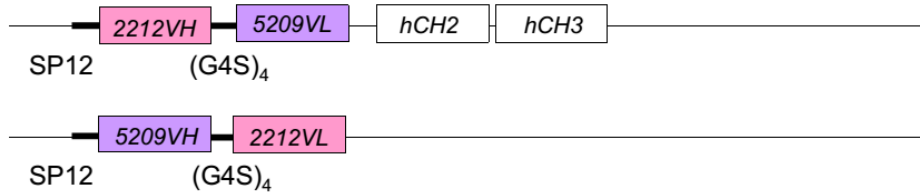
B2212AscFv=B5209BscFv-hFc



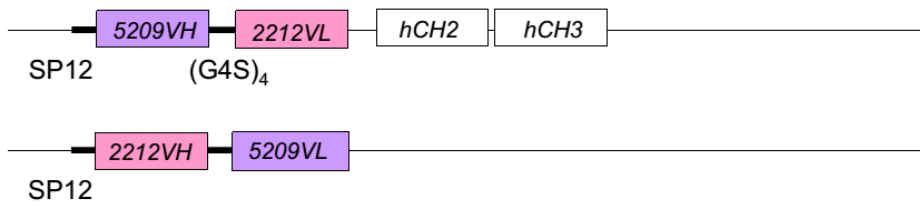
D

Double chain Diabody type

B5209BscFv=B2212AscFv-hFc



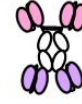
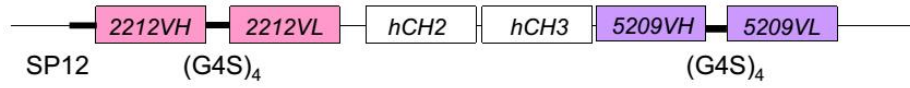
B2212AscFv=B5209BscFv-hFc



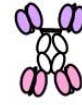
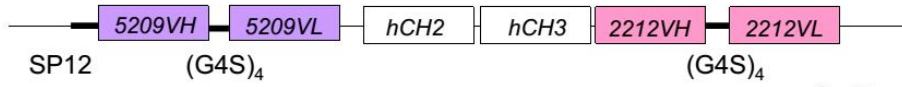
E

Bispecific Immunofusion type

B2212AscFv-hFc-B5209BscFv



B5209BscFv-hFc-B2212AscFv



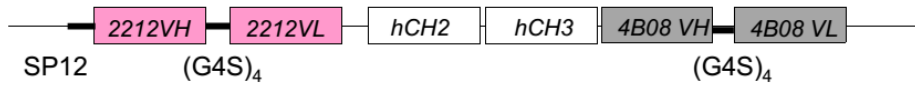
B5209BscFv-hFc-(G4S)₄-B2212AscFv



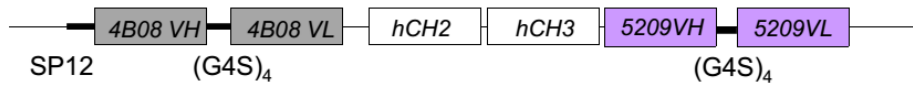
F

Monospecific Immunofusion type

B2212AscFv-hFc-4B08scFv



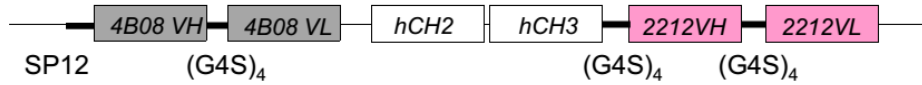
4B08scFv-hFc-B5209BscFv



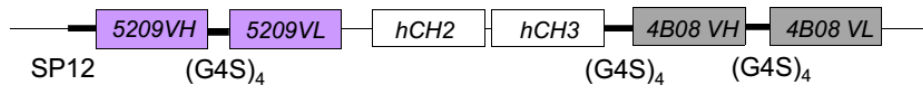
G

Monospecific Immunofusion type

4B08scFv-hFc-(G4S)₄-B2212AscFv



B5209BscFv-hFc-(G4S)₄-4B08scFv



H

Human chimera IgG1

B2212A hIgG1



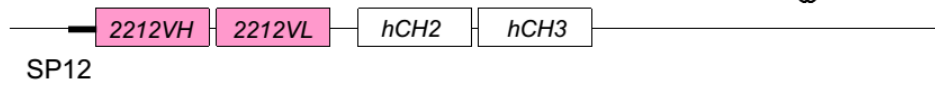
B5209B hIgG1



I

scFv-hFc

B2212A scFv-hFc



B5209B scFv-hFc

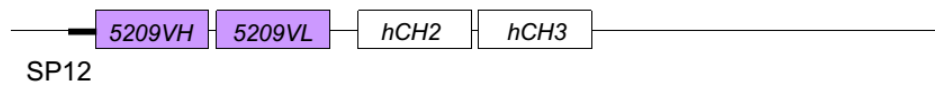
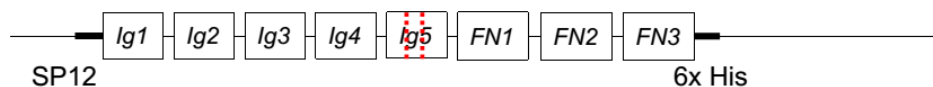


図 7-1. 各種抗体のバキュロウイルス発現系ベクター。A は、発現ベクターの図。B~I には、ORF にそれぞれ挿入した、各種単結合性および二重特異性抗体の配列を示す。D の二本鎖ダイアボディ型と、H のキメラ hIgG1 抗体は、二つの発現ベクターからバキュロウイルス液をそれぞれ作製し、これを混ぜて共感染して発現させた。

A

ROBO1 extracellular domain mutant

sROBO1 / E470A / R477D / His



sROBO1 / ΔFN3 / His



B

Slit2N/His

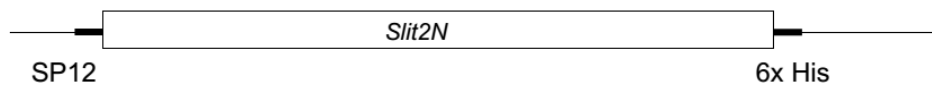


図 7-2. ROBO1 抗原および Slit2N のバキュロウイルス発現系ベクター。A は、B5209B 抗体のエピトープに二ヶ所点変異を起こした変異体と、B2212A 抗体のエピトープである FN3 ドメインを削った変異体の配列を示す。B は、Slit2N の配列を示す。

バキュロウイルス発現系

単結合性および二重特異性抗体の発現系には、バキュロウイルス発現系を用いた。100 μL の大腸菌 DH10Bac 株コンピテントセル (Invitrogen) に構築した発現ベクター 1 ng / μL を 1 μL 添加した。30 分間氷上静置した後に、ThermoStat plus (Eppendorf) にて 42 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分間のヒートショックを行い、大腸菌を形質転換した。

形質転換した大腸菌は、LB プレート培地 (10g/L Tryptone, 5 g/L yeast extract, 10g/L NaCl, 15 g/L Agar, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tetracycline, 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Gentamicin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ X-gal, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IPTG) に播種し、37 $^{\circ}\text{C}$ で二晩以上静置培養した。プレート培地上に形成した白色のコロニーを 3mL LB 液体培地 (10g/L Tryptone, 5 g/L yeast extract, 10g/L NaCl, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tetracycline, 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Gentamicin) に植菌し、NR-1(TAITEC) にて 170 rpm、37 $^{\circ}\text{C}$ で一晩培養した。

培養液 3 mL から、GenElute Plasmid Miniprep kit (SIGMA) を用いて、シャトルベクターである Bacmid DNA を精製した。6 well-plate に接着培養している昆虫細胞 Sf9 株を、 1.0×10^6 個/well を播種し、1 時間静置後、1 μg の Bacmid DNA を Cellfectin II reagent (Invitrogen) を用いて遺伝子導入した。4 日目の培養上清 2mL を、 $1.0 \times 10^6/\text{mL}$ の Sf9 培養液 48 mL に感染させて、二晩培養した。培養上清を 8 krpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間遠心分離し、培養上清を P2 ウイルス液として回収した。

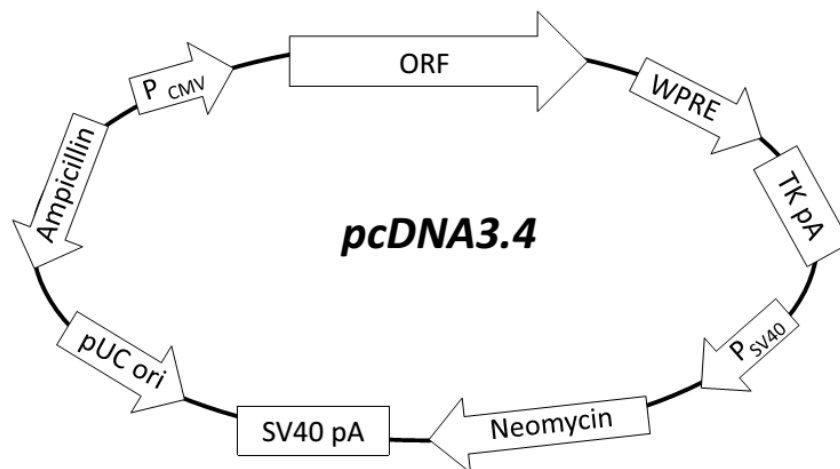
示差走査蛍光定量法 (DSF)

装置は、CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad) を用い、蛍光プローブは SYPRO Orange (Invitrogen) を用いた。フィルタは励起 / 発光: 470/570 nm のフィルタを用いた。測定する抗体を前日に、リン酸緩衝液 (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, pH 7.4) に 12 時間以上の一晩透析した。この透析外液を用いて、抗体を 3.0 μM 以下になるように調製し、SYPRO Orange 蛍光色素溶液を終濃度 1/1000 になるように混合し、昇温による抗体の変性を追跡した。温度変化は 20 $^{\circ}\text{C}$ から 100 $^{\circ}\text{C}$ まで 0.2 $^{\circ}\text{C}$ /分の割合で昇温した。

Expi293F 細胞発現系

293 細胞株を用いた ROBO1 の切断される細胞外ドメインの発現系には、Expi293F 細胞発現系を用いた。共同研究先である浜窪隆雄研究室により供与を受けた、全長の ROBO1 の cDNA 配列を哺乳細胞株発現系ベクターに挿入し、*pcDNA3.4-hrobo1* を構築した (図 7-3)。125 mL-flask に、 2.9×10^6 /mL の Expi293F 細胞培養液 25.5 mL を用意し、30 μ g の発現ベクターを ExpiFectamine293 reagent を用いて遺伝子導入した。20 時間後の培養液に、Enhancer solution 1 および 2 をそれぞれ、150 μ L および 1.5mL 添加した。経時変化を追って発現を確認し、最大で 7 日間培養した。

A



B

Full Length ROBO1

ROBO1



His-ROBO1

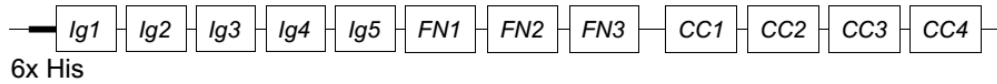


図 7-3. Expi293 発現系ベクター。A は、発現ベクターの図。B は、ORF に挿入した、ROBO1 の全長配列を示す。N 末端にヒスタグを融合した発現系も作製した。

目的タンパク質の精製

作製した単結合および二重特異性抗体の P2 ウイルス液を Sf9 に感染後、3 日目の培養液を 8 krpm, 4°C で 10 分間遠心分離し、培養上清を 0.45 μ m のフィルター (Millipore) でろ過したものを、プロテイン G セファロース 4FF 充填カラムに結合させ、20mM-TrisHCl (pH=8.0)+500mM-NaCl 緩衝液を用いて洗浄し、0.1M-Glycine (pH=3.0) 緩衝液で溶出後、直ちに十分の一量の 1.5M-TrisHCl (pH=8.8) 緩衝液で中和した。また、sROB01 および Slit2N は、ヒスタグ融合タンパク質なので、同様に回収した培養上清を Ni-NTA Agarose (Qiagen) 充填カラムに結合させ、20mM-TrisHCl (pH=8.0)+500mM-NaCl 緩衝液を用いて洗浄し、これに 200~500mM のイミダゾールを加えた緩衝液で溶出した。最終精製は、サイズ排除クロマトグラフィー (HiLoad 16/600 superdex 200pg を用いて AKTA prime, GE health care を使った) を行った。なお、sROB01 はイオン交換クロマトグラフィーを行った。

精製した画分に、3xSDS サンプルバッファを加えて、5 分間煮沸し、10% アクリルアミドゲルを用いて、Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) を行った。

透過型電子顕微鏡 (TEM)

フォルムバルでコーティングした銅製マイクログリッドに、0.05mg/mL の sROB01 溶液を添加後、1% 酢酸ウラニル水溶液で染色した。乾燥したサンプルを透過型電子顕微鏡 (HITACHI High Tech. H-7500) を用いて観察した。

等温滴定型熱量測定 (ITC)

ROB01 抗原と抗体との結合の熱力学パラメータは、等温滴定型熱量測定計 MicroCal Auto-iTC 200 (GE Healthcare) を用いて、25°C 条件下で行った。各種抗体と sROB01 抗原は、測定前日にリン酸緩衝液 (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂P0₄, pH 7.4) に 12 時間以上の一晚透析した。その際、透析外液は透析液の 50 倍量以上となるようにした。sROB01 抗原は 40 μ M、抗体は 4 μ M 程度となるように調製した。ITC 測定は、reference power 5 μ cal/sec、シリンジ回転速度は、750 rpm にて行った。

それぞれの測定は、0.5 μ L の滴定 1 回と 5.0 μ L の滴定 18 回からなり、滴定の間隔は 120 sec として行った。測定結果を用いた熱力学パラメータの算出には、ORIGIN 7.0(OriginLab)の single-site binding model 1 を用いた。

表面プラズモン共鳴測定 (SPR)

sROB01 抗原と抗体の親和性は、Biacore T200 (GE Healthcare) を用いて測定した。測定する前日に sROB01 抗原と抗体、リン酸緩衝液 (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, pH 7.4) に 12 時間以上の一晩透析した。この透析外液を 0.005% Tween になるように調製し、フィルタ脱気したものをランニング緩衝液とした。

次に、Human antibody capture kit (GE Healthcare) を用いて、CM5 センサーチップ上に抗 Human IgG (Fc) 抗体をアミンカップリング法で固定化した。まず、センサーチップに EDC/NHS 混合溶液を流してチップ表面上のデキストランのカルボキシル基を活性化し、抗 Human IgG (Fc) 抗体を固定化緩衝液として 10mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH=5.0) で 25 μ g/mL に希釈したものを、活性化したチップ表面に流すことで固定化した。その後、1M-エタノールアミン (pH=8.5) によって、抗 Human IgG (Fc) 抗体が結合しなかった活性化側鎖を不活性化した。

精製した各種単結合性および二重特異性抗体をランニング緩衝液によって、5.0 μ g/mL に希釈し、センサーチップ上に 20 μ L/min の流速で流して固定した。この種抗体の結合したセンサーチップ精製した sROB01 抗原を、ランニング緩衝液によって希釈系列を作って希釈し、各種抗体を固定化したセンサーチップ上に薄い順に流して、反応速度定数を求めた。

細胞培養

ヒト肝がん細胞株 HepG2 および PLC/PRF/5 は、理化学研究所バイオリソース研究センターより購入した。何れの細胞も低糖 DMEM 培地 (1.0 g/L Glucose) を用いて継代した。添加物として、ウシ胎児血清を 10% 、抗生物質の 10U/mL ペニシリン・ 10 μ g/mL ストレプトマイシンになるように添加した。これに加えて、HepG2 の継代には、非必須アミノ酸を加えた。

フローサイトメトリー

単層で培養した HepG2 細胞を Trpsine・EDTA 溶液で回収し、 $1\sim 3 \times 10^6/\text{mL}$ になるように PBS で懸濁した後、一次抗体として発現精製した各種抗体を 200nM、または、Slit2N/His を 50nM の濃度になるように再懸濁し、室温 30 分間インキュベーションした。その後、PBS で洗浄後、二次抗体として、Goat anti-human IgG(H+L)-Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa488 (ThermoFisher, 1:1000) および Anti-His-tag mAb-Alexa Fluor 488 (MBL, 1:500) を加えて、室温 30 分間インキュベーションした。再び PBS で洗浄後、FACS Calber (BD Biosciences) を用いて測定を行った。

タンパク質定量およびウェスタンブロット

6 穴プレートに接着培養した肝臓がん細胞株 HepG2 にプロテアーゼ阻害剤を加えた RIPA バッファを 300 μL 加えて細胞を溶解して回収した。Slit2N によって刺激する時は、培養液を精製した Slit2N が 6nM になるように希釈した培養液に置換して、5、10、15、30、60 分間インキュベーションしてから同様に溶解して回収した。回収した細胞ライセートは、14500rpm で 10 分間遠心分離した後、上清を回収して、BCA Protein Assay Kit (Pierce) を用いて定量した。

等濃度に調製した細胞ライセートに、3xSDS サンプルバッファを加えて、5 分間煮沸し、10% アクリルアミドゲルを用いて、Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) を行った。このゲルをニトロセルロース膜に転写し、5% Bovine Serum Albumin を含む、Tris-buffered saline (TBS:50mM Tris-Cl pH=7.5, 150mM NaCl) で室温、1 時間ブロッキングした。その後、一次抗体として Phospho-Akt(Ser473) (D9E) XP Rabbit mAb (Cell Signaling, 1:2000) または、Akt (pan) (C67E7) Rabbit mAb (Cell Signaling, 1:3000) を用いた。二次抗体としては、Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody 7074S (Cell Signaling, 1:10000) を用いた。

謝辞

本研究は、著者が東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻の博士課程において、同専攻の津本浩平教授のご指導のもと行われたものをまとめたものです。

指導教員である津本浩平教授には、多大なるご指導を頂きました。心より感謝申し上げます。

副審を務めて頂きました、本学名誉教授・日本医科大学 教授 浜窪隆雄 先生、本学大学院工学系研究科 化学システム工学専攻 准教授 伊藤大知 先生、バイオエンジニアリング専攻 准教授 河原正浩 先生、化学生命工学専攻 准教授 山口哲志 先生、バイオエンジニアリング専攻 特任准教授 長門石暁 先生 に感謝申し上げます。

研究室におきまして日頃から多くのご指導を頂きました長門石先生をはじめ、本学大学院工学系研究科 講師 黒田大祐 先生、助教 中木戸誠 先生、特任助教 田部亜季 先生に感謝申し上げます。また、日頃よりお世話になっている研究室の職員・学生全員に感謝致します。

津本研究室が本学柏キャンパスから白金台キャンパスに異動してきてから、医科学研究所技術職員であった私は2020年3月で約9年間、お世話になっています。2年目からは安全衛生管理室の任務と、4年前からは電子顕微鏡の担当者を任され、この間も津本研究室で職務を続けさせて頂くことを認めて頂きました。この度は、博士の学位取得という挑戦を受け入れて頂いたことを、津本先生を始めとする多くの先生方に感謝申し上げます。この9年間にお世話になり、現在は他大学等へ移動になった先生方に感謝致します。特に、九州大学大学院薬学系研究科グローバルヘルスケア分野 准教授 ホセ・マヌエル・マルチネス・カーベイロ 先生に感謝致します。医薬基盤・健康・栄養研究所 秋葉宏樹 研究員に感謝致します。

また、現在では社会人となった津本研究室でお世話になった卒業生の皆さんにも、心からお礼申し上げます。

私は、本学医科学研究所技術職員という社会人の身分でありながら、このような研究活動に専念することを許可して下さいました、博士課程入学当時の医科学研究所 技術室長兼務 教授 三宅健介 先生に、心より特別な感謝を申し上げます。

医科学研究所技術職員としての職務を続けながら、本研究活動に専念することにご理解と協力を下さいました疾患プロテオミクスラボラトリー長 教授 井上純一郎 先生、同微細形態解析グループ 助教 相良洋 先生に感謝致します。

また、安全衛生管理室のメンバーにも多くの負担を負って頂くことになりました。心より、お礼申し上げます。

ここでは名前を挙げきれなかった多くの方々のおかげで、博士論文をまとめることができました。有難うございました。

引用文献

-
- ¹ Labrijn, A. F., Janmaat, M. L., Reichert, J. M., & Parren, P. W. H. I. **2019**. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(8), 585-608. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0028-1>
- ² Beck, A., Wurch, T., Bailly, C., & Corvaia, N. **2010**. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nature Reviews Immunology*, 10(5), 345-352. <https://doi.org/10.1038/nri2747>
- ³ Hoseini, S. S., & Cheung, N. K. **2017**. Acute myeloid leukemia targets for bispecific antibodies. *Blood Cancer Journal*, 7(2), e0-12. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.2>
- ⁴ Lee, N. K., Zhang, Y., Su, Y., Bidlingmaier, S., Sherbenou, D. W., Ha, K. D., & Liu, B. **2018**. Cell-type specific potent Wnt signaling blockade by bispecific antibody. *Scientific Reports*, 8(1), 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17539-z>
- ⁵ Thakur, A., Huang, M., & Lum, L. G. **2018**. Bispecific antibody based therapeutics: Strengths and challenges. *Blood Reviews*, 32(4), 339-347. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.02.004>
- ⁶ Viardot, A., & Bargou, R. **2018**. Bispecific antibodies in haematological malignancies. *Cancer Treatment Reviews*, 65(February), 87-95. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.04.002>
- ⁷ Sedykh, E. S., Prinz, V. V., Buneva, V. N., Nevinsky, G. A. **2018**. Bispecific antibodies : design , therapy , perspectives. *Drug Design, Development and Therapy*, 12, 195-208.
- ⁸ Krishnamurthy, A., & Jimeno, A. **2018**. Bispecific antibodies for cancer therapy: A review. *Pharmacology and Therapeutics*, 185(December 2017), 122-134. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.12.002>
- ⁹ Brinkmann, U., & Kontermann, R. E. **2017**. The making of bispecific antibodies. *MAbs*, 9(2), 182-212. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1268307>
- ¹⁰ Robert, B., Dorvillius, M., Buchegger, F., Garambois, V., Mani, J. C., Pugnieres, M., Mach, J. P., & Pèlegri, A. **1999**. Tumor targeting with newly designed biparatopic antibodies directed against two different epitopes of the carcinoembryonic antigen (CEA). *International Journal of Cancer* (Vol. 81, Issue 2, pp. 285-291). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19990412\)81:2<285::AID-IJC19>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19990412)81:2<285::AID-IJC19>3.0.CO;2-T)
- ¹¹ Roovers, R. C., Vosjan, M. J. W. D., Laeremans, T., Khoulati, R. Bruin, R. C. G., Ferguson, K. M., Verkleij, A. J., Dongen, G. A. M. S., and Henegouwen, P. M. P. **2011**. A bi-paratopic anti-EGFR nanobody efficiently inhibits solid tumour growth. *International Journal of Cancer* (Vol. 129, Issue 8, pp. 2013-2024).
- ¹² Kelton, C., Wesolowski, J. S., Soloviev, M., Schweickhardt, R., Fischer, D., Kurosawa, E., McKenna, S. D., & Gross, A. W. **(2012)**. Anti-EGFR biparatopic-SEED antibody has enhanced combination-activity in a single molecule. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 526(2), 219-225.

<https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.03.005>

- ¹³ Godar, M., Morello, V., Sadi, A., Hultberg, A., De Jonge, N., Basilico, C., Hanssens, V., Saunders, M., Lambrecht, B. N., El Khattabi, M., De Haard, H., Michieli, P., & Blanchetot, C. **2016**. Dual anti-idiotypic purification of a novel, native-format biparatopic anti-MET antibody with improved in vitro and in vivo efficacy. *Scientific Reports*, 6(August), 1-12. <https://doi.org/10.1038/srep31621>
- ¹⁴ Kasturirangan, S., Rainey, G. J., Xu, L., Wang, X., Portnoff, A., Chen, T., Fazenbaker, C., Zhong, H., Bee, J., Zeng, Z., Jenne, C., Wu, H., and Gao, C. *J. Biol. Chem.* **2017**. 292(4361-4370).
- ¹⁵ Shi, S.Y., Lu, Y., Liu, Z., Stevens, J., Murawsky, C.M., Wilson, V., Hu, Z., Richards, W. G., Michaels, M. L., Zhang, J., Yan, W., Li, Y. *J. Biol. Chem.* **2018**. 293(5909-5919).
- ¹⁶ Schütze, K., Petry, K., Hambach, J., Schuster, N., Fumey, W., Schriewer, L., Röckendorf, J., Menzel, S., Albrecht, B., Haag, F., Stortelers, C., Bannas, P., & Koch-Nolte, F. **2018**. CD38-specific biparatopic heavy chain antibodies display potent complement-dependent cytotoxicity against multiple myeloma cells. *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue NOV). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02553>
- ¹⁷ Andres, F., Iamele, L., Meyer, T., Stuber, J. C., Kast, F., Gherardi, E., Niemann, H. H. and Pluckthun, A. *J. Mol. Biol.* **2019**. 431(2020-2039).
- ¹⁸ Li, J. Y., Perry, S. R., Muniz-Medina, V., Wang, X., Wetzel, L. K., Rebelatto, M. C., Hinrichs, M. J. M., Bezabeh, B. Z., Fleming, R. L., Dimasi, N., Feng, H., Toader, D., Yuan, A. Q., Xu, L., Lin, J., Gao, C., Wu, H., Dixit, R., Osbourn, J. K., & Coats, S. R. **2016**. A Biparatopic HER2-Targeting Antibody-Drug Conjugate Induces Tumor Regression in Primary Models Refractory to or Ineligible for HER2-Targeted Therapy. *Cancer Cell*, 29(1), 117-129. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.12.008>
- ¹⁹ Oganessian, V., Peng, L., Bee, J. S., Li, J., Perry, S. R., Comer, F., Xu, L., Cook, K., Senthil, K., Clarke, L., Rosenthal, K., Gao, C., Damschroder, M., Wu, H., and Dall'Acqu, W. *J. Biol. Chem.* **2018**. 293(8439-8448).
- ²⁰ Pegram, M. D., Miles, D., Tsui, C. K., Zong, Y., *Clin. Cancer Res.* **2019**. DOI:10.1158/1078-0432.
- ²¹ Liu, J., Wu, X., Lin, L., Pan, H., Wang, Y., Li, Y., Zhao, Y., & Wang, Z. **2019**. Bp-Bs, a Novel T-cell Engaging Bispecific Antibody with Biparatopic Her2 Binding, Has Potent Anti-tumor Activities. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 14(September), 66-73. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2019.03.009>
- ²² Fleetwood, F., Güler, R., Gordon, E., Ståhl, S., Claesson-Welsh, L., & Löfblom, J. **2016**. Novel affinity binders for neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(8), 1671-1683. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2088-7>
- ²³ Mitran, B., Güler, R., Roche, F. P., Lindstrom, E., Selvaraju, R. K., Fleetwood, F., Rinne, S. S., Claesson-Welsh, L., Tolmachev, V., Stahl, S., Orlova, A., Löfblom, J. *Theranostics* **2018**. 8(4462-4476).

-
- ²⁴ Tanabe, A., Nakano, K., Nakakido, M., Nagatoishi, S., Tanaka, Y., Tsumoto, K., Uchimaru, K., & Watanabe, T. **2018**. Production and characterization of a novel site-specific-modifiable anti-OX40-receptor single-chain variable fragment for targeted drug delivery. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 496(2), 614-620. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.051>
- ²⁵ Wang, B., Xiao, Y., Ding, B., Zhang, N., Yuan, X., Gui, L., Qian, K., Duan, S., Chen, Z., Rao, Y., and Geng, J. *Cancer Cell* **2003**. 4(19-29).
- ²⁶ Ito, H., Funahashi, S. I., Yamauchi, N., Shibahara, J., Midorikawa, Y., Kawai, S., Kinoshita, Y., Watanabe, A., Hippo, Y., Ohtomo, T., Iwanari, H., Nakajima, A., Makuuchi, M., Fukayama, M., Hirata, Y., Hamakubo, T., Kodama, T., Tsuchiya, M., & Aburatani, H. **2006**. Identification of ROBO1 as a novel hepatocellular carcinoma antigen and a potential therapeutic and diagnostic target. *Clinical Cancer Research*, 12(11 I), 3257-3264. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2787>
- ²⁷ Stella, M. C., Trusolino, L., & Comoglio, P. M. **2009**. The Slit/Robo system suppresses hepatocyte growth factor-dependent invasion and morphogenesis. *In Molecular Biology of the Cell* (Vol. 20, Issue 2, pp. 642-657). <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-03-0321>
- ²⁸ Mehlen, P., Delloye-Bourgeois, C., & Chédotal, A. **2011**. Novel roles for Slits and netrins: Axon guidance cues as anticancer targets? *Nature Reviews Cancer*, 11(3), 188-197. <https://doi.org/10.1038/nrc3005>
- ²⁹ Zhou, W., Geng, Z. H., Chi, S., Zhang, W., Niu, X., Lan, S., Ma, L., Yang, X., Wang, L., Ding, Y., Geng, J. *Cell Res.* **2011**. 21(609-626).
- ³⁰ Chang, P., Hwang-Verslues, W. W., Chang, Y., Chen, C., Hsiao, M., Jeng, Y., Chang, K., Lee, E. Y.-H. P., Shew, J., and Lee, W. *Cell Res.* **2012**. 72(4652-4661).
- ³¹ Granito, A., Guidetti, E., Gramantieri, L. *J. Hepatocellular Carcinoma* **2015**. 2(29-38).
- ³² Gu, F., Ma, Y., Zhang, J., Qin, F., & Fu, L. **2015**. Function of Slit/Robo signaling in breast cancer. *In Frontiers of Medicine* (Vol. 9, Issue 4, pp. 431-436). <https://doi.org/10.1007/s11684-015-0416-9>
- ³³ Zhao, Y., Zhou, F., Li, W., Wang, J., and Wang, L. *Mol. Med. Rep.* **2016**. 14(1901-1906).
- ³⁴ Yuan, M., Guo, H., Li, J., Sui, C., Qin, Y., Wang, J., Khan, Y., Ye, L., Xie, F., Wang, H., Yuan, L., & Ye, J. **2016**. Slit2 and Robo1 induce opposing effects on metastasis of hepatocellular carcinoma Sk-hep-1 cells. *International Journal of Oncology* (Vol. 49, Issue 1, pp. 305-315). <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3506>
- ³⁵ Wang, J., Zhou, Y., Fei, X., Chen, X., Chen, R., Zhu, Z., and Chen Y. *Oncotarget* **2017**. 8(61327-61337).
- ³⁶ Xu, F., Wu, L., He, L., Wu, D., Zhang, Z., Song, L., Zhao, Y., Su, J., Zhou, L., Guo, J., Chang, C. and Li, X., *Scientific Reports.* **2017**. 7(1-10).
- ³⁷ Jiang, Z., Liang, G., Xiao, Y., Qin, T., Chen, X., Wu, E., Ma, Q., & Wang, Z. **2019**. Targeting the SLIT/ROBO pathway in tumor progression: molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 11, 1-14.

<https://doi.org/10.1177/1758835919855238>

³⁸ Koochini, Z., Koochini, Z., & Teimourian, S. **2019**. Slit/Robo Signaling Pathway in Cancer; a New Stand Point for Cancer Treatment. *Pathology and Oncology Research*, 25(4), 1285-1293. <https://doi.org/10.1007/s12253-018-00568-y>

³⁹ Seki, M., Watanabe, A., Enomoto, S., Kawamura, T., Ito, H., Kodama, T., Hamakubo, T., & Aburatani, H. **2010**. Human ROBO1 is cleaved by metalloproteinases and γ -secretase and migrates to the nucleus in cancer cells. *FEBS Letters* (Vol. 584, Issue 13, pp. 2909-2915). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.05.009>

⁴⁰ Barak, R., Lahmi, R., Gevorkyan-Airapetov, L., Levy, E., Tzur, A., & Opatowsky, Y. **2014**. Crystal structure of the extracellular juxtamembrane region of Robo1. *Journal of Structural Biology* (Vol. 186, Issue 2, pp. 283-291). <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.02.019>

⁴¹ Fujiwara, K., Koyama, K., Suga, K., Ikemura, M., Saito, Y., Hino, A., Iwanari, H., Kusano-Arai, O., Mitsui, K., Kasahara, H., Fukayama, M., Kodama, T., Hamakubo, T., & Momose, T. **2015**. 90Y-labeled anti-ROBO1 monoclonal antibody exhibits antitumor activity against small cell lung cancer xenografts. *PLoS ONE* (Vol. 10, Issue 5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125468>

⁴² Barak, R., Lahmi, R., Gevorkyan-Airapetov, L., Levy, E., Tzur, A., & Opatowsky, Y. **2014**. Crystal structure of the extracellular juxtamembrane region of Robo1. *Journal of Structural Biology* (Vol. 186, Issue 2, pp. 283-291). <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.02.019>

⁴³ Seeger, M., Tear, G., Ferres-Marco, D., & Goodman, C. S. **1993**. Mutations affecting growth cone guidance in drosophila: Genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* (Vol. 10, Issue 3, pp. 409-426). [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90330-T](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90330-T)

⁴⁴ Brose, K., Bland, K. S., Kuan, H. W., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M., & Kidd, T. **1999**. Slit proteins bind robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* (Vol. 96, Issue 6, pp. 795-806). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80590-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80590-5)

⁴⁵ Coleman, H. A., Labrador, J. P., Chance, R. K., & Bashaw, G. J. **2010**. The Adam family metalloprotease Kuzbanian regulates the cleavage of the roundabout receptor to control axon repulsion at the midline. *Development*, 137(14), 2417-2426. <https://doi.org/10.1242/dev.047993>

⁴⁶ Kusano-Arai, O., Fukuda, R., Kamiya, W., Iwanari, H., & Hamakubo, T. **2016**. Kinetic exclusion assay of monoclonal antibody affinity to the membrane protein Roundabout 1 displayed on baculovirus. *Analytical Biochemistry*, 504, 41-49. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.04.004>

⁴⁷ Yamashita, T., Mizohata, E., Nagatoishi, S., Watanabe, T., Nakakido, M., Iwanari, H., Mochizuki, Y., Nakayama, T., Kado, Y., Yokota, Y., Matsumura, H., Kawamura, T., Kodama, T., Hamakubo, T., Inoue, T., Fujitani, H., & Tsumoto, K. **2019**. Affinity Improvement of a Cancer-Targeted Antibody through Alanine-Induced Adjustment of Antigen-Antibody Interface. *Structure*, 27(3), 519-527. e5.

<https://doi.org/10.1016/j.str.2018.11.002>

⁴⁸ Nakayama, T., Mizohata, E., Yamashita, T., Nagatoishi, S., Nakakido, M., Iwanari, H., Mochizuki, Y., Kado, Y., Yokota, Y., Satoh, R., Tsumoto, K., Fujitani, H., Kodama, T., Hamakubo, T., & Inoue, T. **2015**. Structural features of interfacial tyrosine residue in ROBO1 fibronectin domain-antibody complex: Crystallographic, thermodynamic, and molecular dynamic analyses. *Protein Science*, 24(3), 328-340. <https://doi.org/10.1002/pro.2619>

⁴⁹ Yumura, K., Akiba, H., Nagatoishi, S., Kusano-Arai, O., Iwanari, H., Hamakubo, T., & Tsumoto, K. **2017**. Use of SpyTag/SpyCatcher to construct bispecific antibodies that target two epitopes of a single antigen. *Journal of Biochemistry*, 162(3), 203-210. <https://doi.org/10.1093/jb/mvx023>

⁵⁰ Khairil Anuar, I. N. A., Banerjee, A., Keeble, A. H., Carella, A., Nikov, G. I., & Howarth, M. **2019**. Spy&Go purification of SpyTag-proteins using pseudo-SpyCatcher to access an oligomerization toolbox. *Nature Communications*, 10(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09678-w>

⁵¹ Akiba, H., Takayanagi, K., Kusano-Arai, O., Iwanari, H., Hamakubo, T., & Tsumoto, K. **2020**. Generation of biparatopic antibody through two-step targeting of fragment antibodies on antigen using SpyTag and SpyCatcher. *Biotechnology Reports*, 25, e00418. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00418>

⁵² Goldenberg, D. M., Sharkey, R. M., Paganelli, G., Barbet, J., & Chatal, J. F. **2006**. Antibody pretargeting advances cancer radioimmunodetection and radioimmunotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 24(5), 823-834. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.03.8471>

⁵³ Gong, R., Wang, Y., Feng, Y., Zhao, Q., and Dimitrov, D. S. *J. Biol. Chem.* **2011**. 286(27288-27293).

⁵⁴ Wozniak-Knopp, G., Stadlmann, J., & Rüker, F. **2012**. Stabilisation of the FC fragment of human IgG1 by engineered intradomain disulfide bonds. *PLoS ONE*, 7(1), 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030083>

⁵⁵ Parekh, R. B., Dwek, R. A., Sutton, B. J., Fernandes, D. L., Leung, A., Stanworth, D., and Rademacher, T. W., Mizuochi, T., Taniguchi, T., Matsuta, K., Takeuchi, F., Nagano, Y., Miyamoto, T., and Kobata, A. *Nature* **1985**. 316(452-457).

⁵⁶ Palmberger, D., Rendić, D., Tauber, P., Krammer, F., Wilson, I. B. H., & Grabherr, R. **2011**. Insect cells for antibody production: Evaluation of an efficient alternative. *Journal of Biotechnology*, 153(3-4), 160-166. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.02.009>

⁵⁷ Kiyoshi, M., Caaveiro, J. M. M., Kawai, T., Tashiro, S., Ide, T., Asaoka, Y., Hatayama, K., & Tsumoto, K. **2015**. Structural basis for binding of human IgG1 to its high-affinity human receptor Fc γ RI. *Nature Communications*, 6, 1-11. <https://doi.org/10.1038/ncomms7866>

⁵⁸ Steinhardt, J. J., Guenaga, J., Turner, H. L., McKee, K., Louder, M. K., O' Dell, S., Chiang, C. I., Lei, L., Galkin, A., Andrianov, A. K., Doria-Rose, N. A., Bailer, R. T., Ward, A. B., Mascola, J. R., & Li, Y. **2018**. Rational design of a

-
- trispecific antibody targeting the HIV-1 Env with elevated anti-viral activity. *Nature Communications*, 9(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03335-4>
- ⁵⁹ Miyanabe, K., Akiba, H., Kuroda, D., Nakakido, M., Kusano-Arai, O., Iwanari, H., Hamakubo, T., Caaveiro, J. M. M. and Tsumoto, K. *J. Biochem.* **2018**. 164(65-76).
- ⁶⁰ Miyanabe, K., Yamashita, T., Abe, Y., Akiba, H., Takamatsu, Y., Nakakido, M., Hamakubo, T., Ueda, T., Caaveiro, J. M. M. and Tsumoto, K. *Biochemistry*. **2018**. 57(4177-4185).
- ⁶¹ Aleksandrova, N., Gutsche, I., Kandiah, E., Avilov, S. V., Petoukhov, M. V., Seiradake, E., & McCarthy, A. A. **2018**. Robo1 Forms a Compact Dimer-of-Dimers Assembly. *Structure*, 26(2), 320-328.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.12.003>
- ⁶² Liu, X., Lu, Y., Zhang, Y., Li, Y., Zhou, J., Yuan, Y., Gao, X., Su, Z., and He, C., *J. Biol. Chem.* **2012**. 287(17503-17516).
- ⁶³ Park, J. H., Pak, H. J., Riew, T. R., Shin, Y. J., & Lee, M. Y. **2016**. Increased expression of Slit2 and its receptors Robo1 and Robo4 in reactive astrocytes of the rat hippocampus after transient forebrain ischemia. *Brain Research* (Vol. 1634, pp. 45-56). <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.12.056>
- ⁶⁴ Liu, J., Hou, W., Guan, T., Tang, L., Zhu, X., Li, Y., Hou, S., Zhang, J., Chen, H., & Huang, Y. **2018**. Slit2/Robo1 signaling is involved in angiogenesis of glomerular endothelial cells exposed to a diabetic-like environment. *Angiogenesis* (Vol. 21, Issue 2, pp. 237-249). <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9592-3>
- ⁶⁵ Li, Y., Zhang, X. tan, Wang, X. yu, Wang, G., Chuai, M., Münsterberg, A., & Yang, X. **201**. Robo signaling regulates the production of cranial neural crest cells. *Experimental Cell Research*, 361(1), 73-84. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.10.002>
- ⁶⁶ Rama, N., Dubrac, A., Mathivet, T., Ní Chárthaigh, R. A., Genet, G., Cristofaro, B., Pibouin-Fragner, L., Ma, L., Eichmann, A., & Chédotal, A. **2015**. Slit2 signaling through Robo1 and Robo2 is required for retinal neovascularization. *Nature Medicine*, 21(5), 483-491. <https://doi.org/10.1038/nm.3849>
- ⁶⁷ Avci, M. E., Konu, O., & Yagci, T. **2008**. Quantification of SLIT-ROBO transcripts in hepatocellular carcinoma reveals two groups of genes with coordinate expression. *BMC Cancer*, 8, 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-392>
- ⁶⁸ Morlot, C., Thielens, N. M., Ravelli, R. B. G., Hemrika, W., Romijn, R. A., Gros, P., Cusack, S., & McCarthy, A. A. **2007**. Structural insights into the Slit-Robo complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(38), 14923-14928. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705310104>
- ⁶⁹ Llovet, J. M., Montal, R., Sia, D., & Finn, R. S. **2018**. Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(10), 599-616. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0073-4>
- ⁷⁰ Villanueva, A. **2019** Hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 380, 1450-1462
- ⁷¹ Finn, R. S., Qin, S., Ikeda, M., Galle, P. R. Ducreux, M. Kim, T. Kudo, M., Breder, V., Merle, P., Kaseb, A. O., Li, D., Verret, W., Xu, D., Hernandez, S.,

-
- Liu, J., Huang, C., Mulla, S., Wang, Y., Lim, H. Y., Zhu, A. X., & Cheng, A. **2020** Atezolizumab plus bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 382, 1894-1905
- ⁷² Stella, M. C., Trusolino, L., & Comoglio, P. M. **2009**. The Slit/Robo system suppresses hepatocyte growth factor-dependent invasion and morphogenesis. *Molecular Biology of the Cell* (Vol. 20, Issue 2, pp. 642-657). <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-03-0321>
- ⁷³ Yuan, M., Guo, H., Li, J., Sui, C., Qin, Y., Wang, J., Khan, Y., Ye, L., Xie, F., Wang, H., Yuan, L., & Ye, J. **2016**. Slit2 and Robo1 induce opposing effects on metastasis of hepatocellular carcinoma Sk-hep-1 cells. *International Journal of Oncology* (Vol. 49, Issue 1, pp. 305-315). <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3506>
- ⁷⁴ Wan, X., Liu, Y., Zhao, Y., Sun, X., Fan, D., & Guo, L. **2017**. Orexin A affects HepG2 human hepatocellular carcinoma cells glucose metabolism via HIF-1 α -dependent and -independent mechanism. *PLoS ONE*, 12(9), 1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184213>
- ⁷⁵ Egashira, Y., Nagatoishi, S., Kiyoshi, M., Ishii-Watabe, A., & Tsumoto, K. **2018**. Characterization of glycoengineered anti-HER2 monoclonal antibodies produced by using a silkworm-baculovirus expression system. *Journal of Biochemistry*, 163(6), 481-488. <https://doi.org/10.1093/jb/mvy021>
- ⁷⁶ Beck, A., Wurch, T., Bailly, C., & Corvaia, N. **2010**. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nature Reviews Immunology*, 10(5), 345-352. <https://doi.org/10.1038/nri2747>
- ⁷⁷ Makabe, K., Nakanishi, T., Tsumoto, K., Tanaka, Y., Kondo, H., Umetsu, M., Sone, Y., Asano, R., & Kumagai, I. **2008**. Thermodynamic consequences of mutations in vernier zone residues of a humanized anti-human epidermal growth factor receptor murine antibody, 528. *Journal of Biological Chemistry*, 283(2), 1156-1166. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706190200>
- ⁷⁸ Akiba, H., Tamura, H., Kiyoshi, M., Yanaka, S., Sugase, K., Caaveiro, J. M. M., & Tsumoto, K. **2019**. Structural and thermodynamic basis for the recognition of the substrate-binding cleft on hen egg lysozyme by a single-domain antibody. *Scientific Reports* (Vol. 9, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50722-y>
- ⁷⁹ Akiba, H., & Tsumoto, K. **2015**. Thermodynamics of antibody - Antigen interaction revealed by mutation analysis of antibody variable regions. *Journal of Biochemistry*, 158(1), 1-13. <https://doi.org/10.1093/jb/mvv049>
- ⁸⁰ Yamashita, T. **2018** Toward rational antibody design: recent advancements in molecular dynamics simulations. *Int. Immunol.* 30, 133-140
- ⁸¹ Uchiyama, S., Suzuki, Y., Otake, K., Yokoyama, M., Ohta, M., Aikawa, S., Komatsu, M., Sawada, T., Kagami, Y., Morishima, Y., & Fukui, K. **2010**. Development of novel humanized anti-CD20 antibodies based on affinity constant and epitope. *Cancer Science*, 101(1), 201-209. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01392.x>
- ⁸² Lin, T. S. **2010**. Ofatumumab: A novel monoclonal anti-CD20 antibody. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine* (Vol. 3, Issue 1, pp. 51-59).

<https://doi.org/10.2147/pgpm.s6840>

⁸³ Futatsumori-Sugai, M., & Tsumoto, K. **2010**. Signal peptide design for improving recombinant protein secretion in the baculovirus expression vector system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391(1), 931-935. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.167>