HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	抗TROP-2抗体Pr1E11の生化学的特性解析と抗腫瘍活性の評価に関する研究
Author(s)	池田, 昌弘
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第13241号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13241
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70104
Type	doctoral thesis
File Information	Masahiro_Ikeda.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

抗 TROP-2 抗体 Pr1E11 の生化学的特性解析と抗腫瘍活性の評価に関する研究

池田昌弘

北海道大学

２０１８年

第 1 章. 序論 1
1-1. 抗体の構造 2
1-2. IgG の構造と機能 4
1-3. 抗体医薬品の歴史 6
1-4. TROP-2 13
1-5. 抗 TROP-2 抗体 17
1-6. ファイバー改変アデノウイルスを用いたモノクローナル抗体スクリーニング. 21
1-7. 本研究の目的 24
第 2 章. 生化学的特性解析 25
2-1. 緒言 26
2-2. 材料と方法 28
2-2-1. 被験抗体 28
2-2-2. マウス IgG 型 Pr1E11 の調製 28
2-2-3. 組み換えヒト IgG1κ 型キメラ抗体の作製 29
2-2-4. フローサイトメトリー 34
2-2-5. 免疫染色 35
2-2-6. 表面プラズモン共鳴法による親和性解析 36
2-2-7. 細胞外ドメイン欠損変異体タンパク質を用いた結合ドメインの同定... 37
2-3. 結果と考察 42
2-3-1. 精製抗体の調製 42
2-3-2. 癌細胞株結合性 43
2-3-3. 正常組織結合性 44
2-3-4. 親和性解析 49
2-3-5. エピトープ解析 50
2－4. 結言 55
第 3 章. *in vitro* 抗腫瘍活性の評価 57
3-1. 緒言 58
3-2. 材料と方法 59
3-2-1. ADCC 活性の評価 59
3-3-2. CDC 活性の評価 60

3-3-3. 細胞増殖活性に対する影響 61
3-3. 結果と考察 62
3-3-1. ADCC 活性 62
3-3-2. CDC 活性 65
3-3-3. 細胞増殖阻害活性 67
3-4. 結言 69
第 4 章. *in vivo* 抗腫瘍活性の評価 71
4-1. 緒言 72
4-2. 材料と方法 73
4-2-1. 組み換えマウス IgG1 型抗体の調製 73
4-2-2. SCID マウス担癌モデルでの抗腫瘍活性評価 74
4-2-3. 内在化活性の評価 75
4-3. 結果と考察 77
4-3-1. 組み換えマウス IgG1 型抗体の調製 77
4-3-2. Fuc(-)型キメラ型抗体の *in vivo* 抗腫瘍活性 78
4-3-3. マウス IgG1 型抗体の *in vivo* 抗腫瘍活性 81
4-3-4. 細胞表面結合持続性の評価 84
4-4. 結言 87
第 5 章. 総括 89
参考文献 94

第 1 章
序論

1-1.　抗体の構造

抗体（antibody）はリンパ球の一種であるB細胞から産生される液性因子であり、ウイルスや毒素など生体内の抗原（antigen）に対して高い親和性と優れた特異性をもって結合するタンパク質である。抗体は免疫応答において中心的な役割を担っており、抗原に結合した抗体は単球やNK細胞などの免疫細胞を活性化したり、血清成分の一種である補体分子を活性化したりすることで異物を排除する(1)。

抗体は抗原結合に関与するFab（antigen binding fragment）領域と、免疫応答の活性化に関与するFc（fragment crystallizable region）領域に分けられる（図1－1）。Fab領域のN末端側半分にはアミノ酸配列が変異性に富む可変領域（Variable region)が存在し、軽鎖可変領域(variable region of light chain ; VL）と重鎖可変領域（variable region of heavy chain ; VH）に分けられる。VL及びVHにはそれぞれ相補性決定領域（complementarity-determining regions ; CDR）と呼ばれる非常に変異性の高い領域が存在し、抗原に対する結合活性を決定している。可変領域を除くFab領域とFc領域には定常領域（constant region）と呼ばれる多様性の低い領域が存在し、軽鎖定常領域（constant region of light chain ; CL）と重鎖定常領域（constant region of heavy chain ; CH）から成る。ヒトの場合、CH部位はimmunoglobulin（Ig）A、IgD、IgE、IgG及びIgMの5つのクラスに分けられる。IgGの場合、CH部位はCH1、CH2及びCH3の3つのドメインに分けられ、CH1とCH2の間にはヒンジ領域と呼ばれる柔軟性の高い部位が存在する。さらにヒンジ領域にはジスルフィド結合が存

在し、CH3ドメイン同士の非共有結合と共にホモ二量体形成に関与している。IgEやIgGは単量体で存在する一方、IgAやIgMは通常それぞれ二量体及び五量体として存在している(1-4)。各クラスはそれぞれ異なる役割を担っており、例えばIgAは粘膜部位に多く存在しウイルスなどからの感染防御に寄与する一方、IgGは血中に多く存在し体内での異物排除に寄与している(5)。CLはκ鎖（Cκ）とλ鎖（Cλ）の二種類が存在するが、機能的な役割は明確に分けられてはいない。

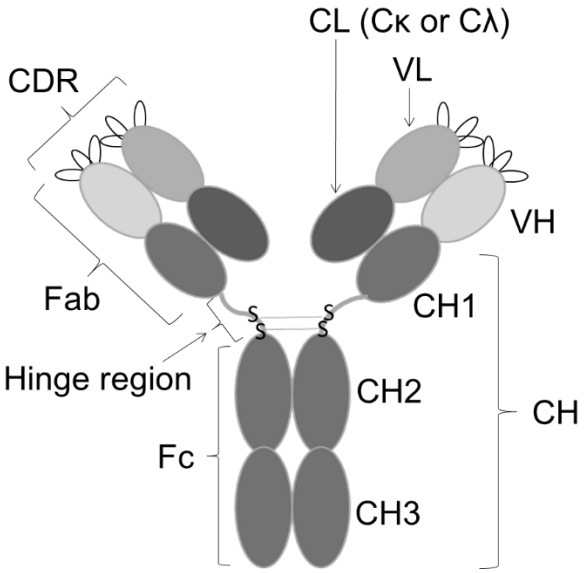


図 1－1. IgG の構造

1-2.　IgG の構造と機能

抗体医薬に汎用されているIgGの構造を図1－1に示した。IgGは約50 kDaの重鎖と約25 kDaの軽鎖から成り、各ドメインはジスルフィド結合や疎水性相互作用により安定化されたβバレル構造（イムノグロブリンフォールド）を有している(4)。

ヒトIgGにはCH部位の配列の異なる4つのサブクラス（IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4）が存在し、各サブクラスはそれぞれ異なる生物活性を有している（表1－1）。これにはFc領域が関与しており、Fc領域は特定のタンパク質に結合することでオプソニン化や抗体依存性細胞傷害活性（antibody-dependent cellular cytotoxicity ； ADCC）及び補体依存性殺細胞活性（complement-dependent cytotoxicity ； CDC）などのエフェクター活性を引き起こす(6-8)。

ADCC活性はNK細胞上のFcγ受容体IIIa（FcγRIIIa）/CD16が抗原に結合した抗体によって架橋されることで引き起こされ、NK細胞がパーフォリンやグランザイムBなど細胞溶解性タンパク質を放出したり、アポトーシス誘導活性を有するtumor related apoptosis inducing ligandを発現したりすることで標的細胞を殺傷する(9)。CDC活性は標的細胞に結合した抗体に補体成分C1qが結合し、その後補体カスケードが活性化することで引き起こされ、標的細胞膜上に膜侵襲複合体（membrane attack complex ； MAC）を形成し穴を開けることで殺傷する(10)。CD16やC1qに対するFc領域の結合活性はサブクラスによって異なり、IgG1とIgG3は高いADCC活性及びCDC活性を有する(11)。またFc領域は免疫細胞や血管内皮細胞に発現する胎児性Fc受容体（neonatal Fc receptor ； FcRn）と結合す

ることで、抗体の血中濃度の維持や組織間輸送に大きく関与している(12, 13)。

物性はサブクラス毎に異なり、IgG1は非常に安定である一方、その他のサブクラスはそれぞれ特有の課題を有している(14)。IgG2はジスルフィド結合のミスペアリングによって、不均一な構造をとることが知られている(15, 16)。IgG3はプロテアーゼ感受性が高く、分解しやすいという問題がある(11, 17)。IgG4はヒンジ領域のジスルフィド結合が不可逆的に形成されることで、ハーフ抗体を生じる(18, 19)。従って、抗体のエフェクター活性を利用する癌治療用抗体にはIgG1が汎用されている。

表1－1. 各種ヒトIgGサブクラスの特性

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
ADCC	+	−	+	±
CDC	++	+	+++	−
Half life	++	++	+	++
Stability	Good	Disulfide bond shuffling	Low protease resistant	Half antibody formation

1-3.　抗体医薬品の歴史

抗体は高い親和性をもって抗原に結合することが出来るばかりでなく、優れた特異性を有するため副作用が低かったり予測可能であったりすることや、生体内で優れた安定性を有すること、さらに血中半減期が長いため一度の投与で長期間の薬効が期待できることから、医薬品のフォーマットとして魅力的な分子である。これまでに承認されている抗体医薬品の作用機序は大きく 5 つに分けられる（図 1－2)。Fc 部位や Fab 部位に依存した作用としては、NK 細胞などの免疫細胞を活性化し標的細胞を殺傷する ADCC 活性、補体成分を活性化することで標的細胞を殺傷する CDC 活性、リガンドまたは受容体に結合しシグナル伝達を遮断するブロッキング活性、受容体に結合しシグナルを伝達するアゴニスト活性がある(20, 21)。また、抗体の特異性を利用した作用としては、抗体に薬剤や放射性同位体を結合させ、標的細胞特異的に薬剤をデリバリーする武装化抗体が挙げられる(22)。

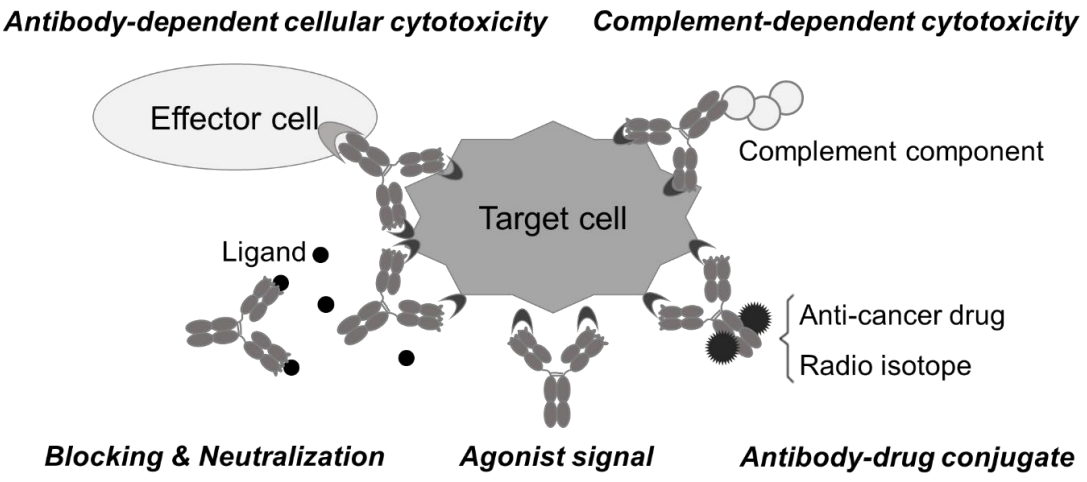


図 1－2. 抗体医薬品の作用機序

抗体のヒト疾患治療への応用は 1900 年代より検討がなされてきたが、医薬品としての応用が現実味を帯びてきたのは 1975 年にハイブリドーマ技術を用いたモノクローナル抗体の作製方法が確立されて以降である(23)。ハイブリドーマ技術を用いた一般的なモノクローナル抗体の取得方法を図 1－3 に示した。マウスやラットなどの動物に抗原を免疫後、血清中の抗体価が増加した個体から抗体産生細胞を含む脾臓やリンパ節を回収し、これをミエローマ細胞と融合することで不死化された抗体産生細胞、即ちハイブリドーマを得る。得られたハイブリドーマはポリクローナルな状態であるため、限界希釈法などでモノクローナルな状態にして培養する。その後、培養上清中に産生された抗体の親和性及び特異性を ELISA 法やフローサイトメトリー法などで評価することで、目的の活性を有するクローンを選抜する（以降、本抗体スクリーニング方法をハイブリドーマ法とする)。

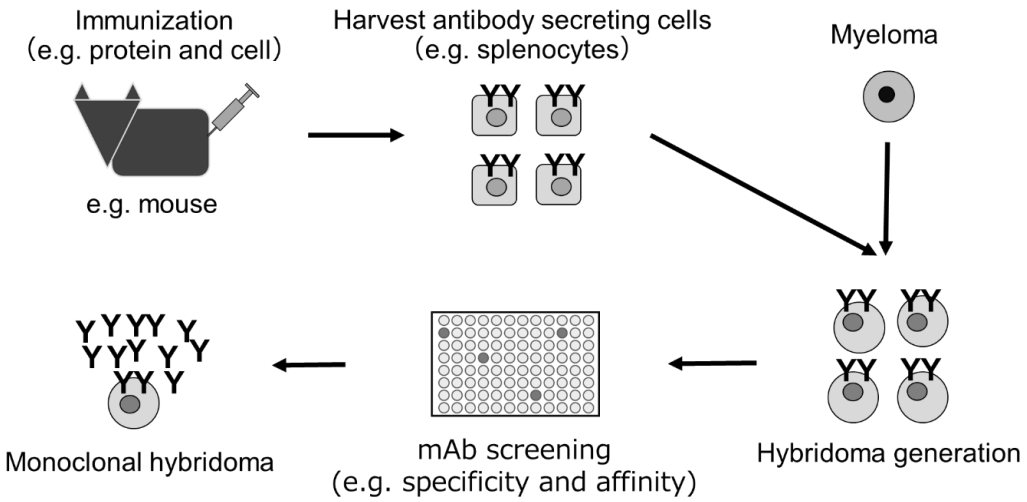
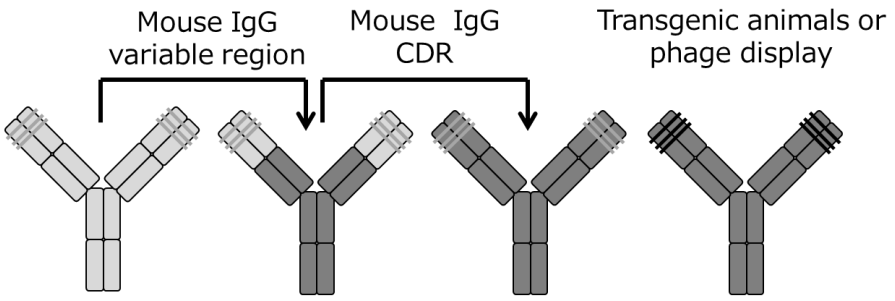


図 1－3. ハイブリドーマ法を用いた一般的なモノクローナル抗体の選抜方法

当初はハイブリドーマ法で取得されたマウスやラットなど異種動物由来の抗体をそのまま臨床研究に用いていたが、マウスやラット由来のモノクローナル抗体はヒト生体内では血中半減期が短いことに加え、高いエフェクター活性を引き起こすことも出来なかった。加えて、ヒトに投与されたマウス抗体やラット抗体は異物として認識されるため抗マウス抗体や抗ラット抗体が産生されてしまい、頻回投与によりアナフィラキシーショックを引き起こすことも大きな問題であった(24)。1986 年には世界初の抗体医薬品として、マウス抗 CD3 モノクローナル抗体 Orthoclone-OKT3 が臓器移植における拒絶反応抑制剤として承認されたが(25)、それ以外の臨床試験は失敗に終わった。

その後、異種動物由来抗体の抗原性低下を目指して、マウス抗体などを遺伝子工学的に改変し、ヒト抗体に近づける研究、すなわち抗体工学研究が発展した（図 1－4)。最初に行われたのは抗原結合に関与する可変領域をヒト抗体の定常領域と融合させたヒト型キメラ抗体（chimeric antibody）の作製である(26, 27)。ヒト型キメラ抗体はヒト生体内で長い血中半減期と高いエフェクター活性を発揮することが出来、さらに免疫原性も低下したことから、複数のヒト型キメラ抗体医薬品が上市された。しかし、依然、異種動物由来の可変領域に対しては生体内で抗抗体が生じてしまったことから、CDR 部位のみをヒト抗体に移植したヒト化抗体（humanized antibody）技術の確立が進んだ(28-30)。さらに、ファージディスプレイ法やヒト抗体産生動物を用いた完全ヒト

抗体（human antibody）作製技術が確立され、より抗原性の低い完全ヒト抗体が利用可能となった(31, 32)。



	Mouse IgG	Chimeric IgG	Humanized IgG	Human IgG
Humanization	0%	80 – 90 %	95 %	100 %
Immunogenicity	High	Middle	Low	Low
Half-life	Short	Long	Long	Long
ADCC/CDC	Low	High	High	High

図 1－4. マウス、キメラ、ヒト化及びヒト抗体の特徴

一方、ゲノム創薬研究の進展により抗体医薬品に適した標的分子が多数同定されたことも相まって、2000 年代以降は多数の抗体医薬品が上市された（図 1－5）(33)。現在、抗体は医薬品開発における主流のフォーマットの一つであり、最も活発に研究開発が行われている分野である。2022 年の世界医薬品売上予想では、上位 20 品目のうち 9 品目が抗体医薬品になると予想されており、中には年間売上高が 1 兆円を超えるとされる品目も複数ある（表 1－2）(34)。

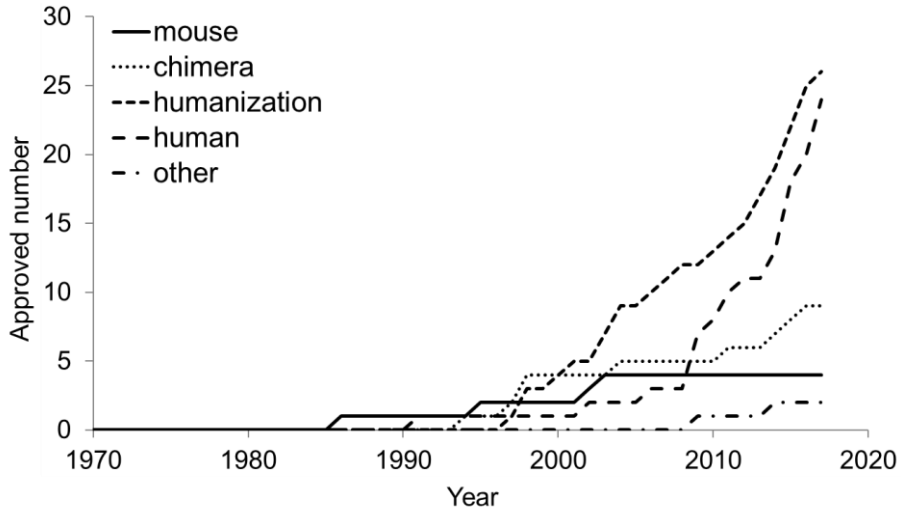


図 1-5. 抗体医薬品の承認品目数の変移

表 1－2. 2022 年の世界医薬品売上予想（文献 34 より抜粋）

	Product name	Mechanism of action	Estimated sales ($m)
1	Opdivo	Anti-PD-1 antibody	14634
2	Humira	Anti-TNFα antibody	13645
3	Revlimid	Immune modulator	13024
4	Xarelto	Factor Xa inhibitor	7827
5	Eylea	VEGFR inhibitor	7702
6	Imbruvica	BTK inhibitor	7287
7	Enbrel	TNFα inhibitor	7177
8	Prevnar 13	Pneumococcal vaccine	6069
9	Keytruda	Anti-PD-1 antibody	5959
10	Januvla/Janumet	DPP-Ⅳ inhibitor	5913
11	Ibrance	CDK4/6 inhibitor	5709
12	Soliris	Anti-C5 antibody	5657
13	Eliquis	Factor Xa inhibitor	5422
14	Tecentriq	Anti-PD-L1 antibody	5331
15	Avastin	Anti-VEGF antibody	5178
16	Prolia/Xgeva	Anti-RANKL antibody	5148
17	Victoza/Saxenda	GLP-1 agonist	4918
18	Darzalex	Anti-CD38 antibody	4909
19	Botox	Botulinum toxin	4823
20	Perjeta	Anti-HER2 antibody	4775

これまでに欧米で承認された抗体医薬品を表1－3に示した(33)。適応疾患としてはがん、自己免疫疾患、感染症、アレルギー疾患など多岐にわたっている。抗がん剤のうち、固形癌を対象としたものは複数上市されているが、その作用メカニズムは腫瘍環境を正常化することで間接的に抗腫瘍活性を発揮するもの（抗VEGF抗体Avastinや抗PD-1抗体Opdivoなど）と、エフェクター活性やブロッキングにより腫瘍細胞を直接殺傷することで抗腫瘍活性を発揮するもの（抗EGFR抗体Erbituxや抗HER2抗体Hercepinなど）の2つに大別される。前者の承認品目数は少ないものの、複数の癌種に対して適応可能なものが多い。例えば抗VEGF抗体Avastinは大腸癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、乳癌、子宮頸癌など幅広い癌種に適応されている(35)。一方、後者の承認品目数は比較的多いものの、その抗原はepidermal growth factor receptor (EGFR)、human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)、proggramed death ligand 1 (PD-L1)の3種に限られており、特定の癌種に対してのみ適応されているものが多い。例えば抗HER2抗体Herceptinの適応は乳癌と胃癌に限られている(36, 37)。また、癌は非常に不均一であるため、Herceptinであれば全ての乳癌患者に適応できるというわけではない。以上のことから、後者の抗体については依然ニーズが高く、既存薬とは異なる抗原を認識して腫瘍細胞を直接殺傷する抗体医薬の開発が求められている。

表 1－3. 米国及び EU で承認された抗体医薬品一覧（文献 33 より引用）

Year	Product name
1986	Orthoclone-OKT3 (CD3)
1991	Centoxin (Endotoxin)
1994	Reopro (GpIIb/IIIa)
1995	Panorex (EpCAM)
1997	Rituxan (CD20), Zenapax (IL2R)
1998	Simulect (IL-2Rα), Synagis (RSV), Remicade (TNFα), Herceptin (HER2)
2000	Mylotarg (CD33)
2001	MabCampath (CD52)
2002	Zevalin (CD20), Humira (TNFα)
2003	Bexxar (CD20), Xolair (IgE), Raptiva (CD11a)
2004	Erbitux (EGFR), Avastin (VEGF), Tysabri (a4 integrin)
2006	Lucentis (VEGF), Vectibix (EGFR)
2007	Soliris (C5)
2008	Cimzia (TNFα)
2009	Stelara (IL-12/IL-23p40), Simponi (TNFα), Ilaris (IL-1b), Arzerra (CD20)
2010	Prolia (RANKL), RoActemra (IL-6R)
2011	Benlysta (BLyS), Yervoy (CTLA4), Adcetris (CD30)
2012	Perjeta (HER2)
2013	Kadcyla (HER2), Gazyva (CD20)
2014	Sylvant (IL-6), Entyvio （α4β7 Integrin), Keytruda (PD-1), Cyramza (VEGFR2), Blincyto (CD19×CD3) , Opdivo (PD-1)
2015	Cosentyx (IL-17a) , Unituxin (GD2) , Repatha (PSCK9) , Praluent (PSCK9) , Nucala (IL-5) , Praxbind (Dabigatran) , Portrazza (EGFR) , Empliciti (SLAMF7) , Darzalex (CD38)
2016	Taltz (IL-17a) , Anthim (B. anthracis) , Cingaero (IL-5) , Lartruvo (PDGFRa) , Zinplava (C.difficile) , Tecentriq (PD-L1)
2017	Lumicef (IL-17R) , Bavencio (PD-L1) , Ocrevus (CD20) , Dupixent (IL-4R) , Imfinzi (PD-L1)

1-4. TROP-2

TROP-2 (trophoblast antigen 2) [別名 tumor-associated calcium signal transducer 2 (TACSTD-2)、epithelial glycoprotein-1 (EPG-1)、gastrointestinal antigen 733-1 (GA733-1)、membrane component 1 surface marker 1 (M1S1)]はヒト絨毛がん細胞株 BeWO を免疫した BALB/c マウスより得られたクローン 162-46 の抗原として同定された I 型膜タンパク質である (図 1－6、7) (38)。

ヒト TROP-2 はイントロンレスの遺伝子 *tacstd-2* にコードされている(39, 40)。タンパク質の全長は 323 アミノ酸残基であり、26 アミノ酸残基のシグナルペプチド(signal peptide ; S)、248 アミノ酸残基の細胞外ドメイン(extracellular domain ; ECD)、23 アミノ酸残基の膜貫通ドメイン (transmembrane domain ; TM) 及び 26 アミノ酸残基の細胞内ドメイン (intracellular domain ; ICD) から構成される。同じファミリー分子であり、癌抗原として知られている epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) とは類似の構造を有しており、アミノ酸配列の相同性は 49%と高い。ECD は cystein-rich domain (CRD)、thyroglobulin type-I domain (TY)及び cystein-poor domain (CPD)から構成されている。CRD と TY には 1 か所ずつ、CPD には 2 か所の N 型糖鎖付加部位が存在することから、糖鎖付加の状態によって TROP-2 の分子量は 35～49 kDa と不均一である。TROP-2 は細胞膜上では CRD と TY を介した会合によって二量体化しており(41)、細胞間接着に寄与していると考えられている(42, 43)。ICD は phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2)結合モチーフを有しており、

protein kinase C 依存的なリン酸化を受ける。リン酸化を受けた ICD は nuclear factor-kappa B、Raf などのリン酸化を促進する。また、TROP-2 は小胞体からのカルシウム流出を促進することで mitogen activated protein kinase(MAPK)をリン酸化し、細胞増殖を促進する(44)。TROP-2 の膜貫通領域は TNF-α converting enzyme やγ-secretase による切断を受けることで ECD と ICD を放出し、ICD は核内に移行しβ-catenin と相互作用することで細胞増殖を促進することも報告されている(45, 46)。

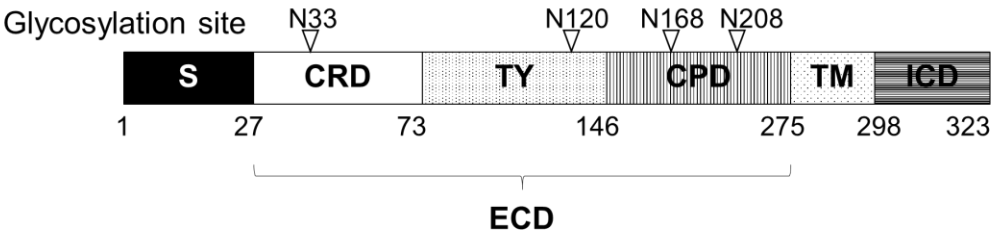


図 1－6. TROP-2 タンパク質の構造

正常組織において、TROP-2 は胚や胎児において広く発現しており、特に胚トロポブラスト細胞や、胎盤などに高発現していることが報告されている(38)。成体においても、いくつかの上皮組織に発現することが知られており、前立腺、尿細管、皮膚、乳腺などに発現することが報告されている(47)。一方、リンパ球、赤血球、血小板などの血球細胞における発現は報告されていない(38)。

正常組織のみならず、TROP-2 は複数の癌種において遺伝子及びタンパク質が高発現していることが報告されている。TROP-2 の発現が亢進されている癌種と

しては、乳癌、膵臓癌、大腸癌、食道癌、卵巣癌、前立腺癌などがあり、それらの多くで TROP-2 の発現は予後不良との関連が示唆されている(47-52)。前述の通り、TROP-2 は細胞増殖や細胞間接着に寄与することが報告されているが、癌細胞における TROP-2 の高発現は、細胞増殖、遊走、転移及びアノイキス耐性などに寄与することが報告されている(53-56)。

以上の知見から、TROP-2 は抗癌抗体医薬品の標的として適した発現プロファイル及び機能を有しており、抗体のエフェクター活性や機能阻害活性を利用して直接的に癌細胞を殺傷するための有望な抗原となり得ると考えられた。一方、正常組織における発現は組織損傷などの副作用を誘発する懸念があることから、抗 TROP-2 抗体を臨床応用する際には、癌細胞に対する作用のみならず正常組織に対する作用も精査する必要が考えられた。

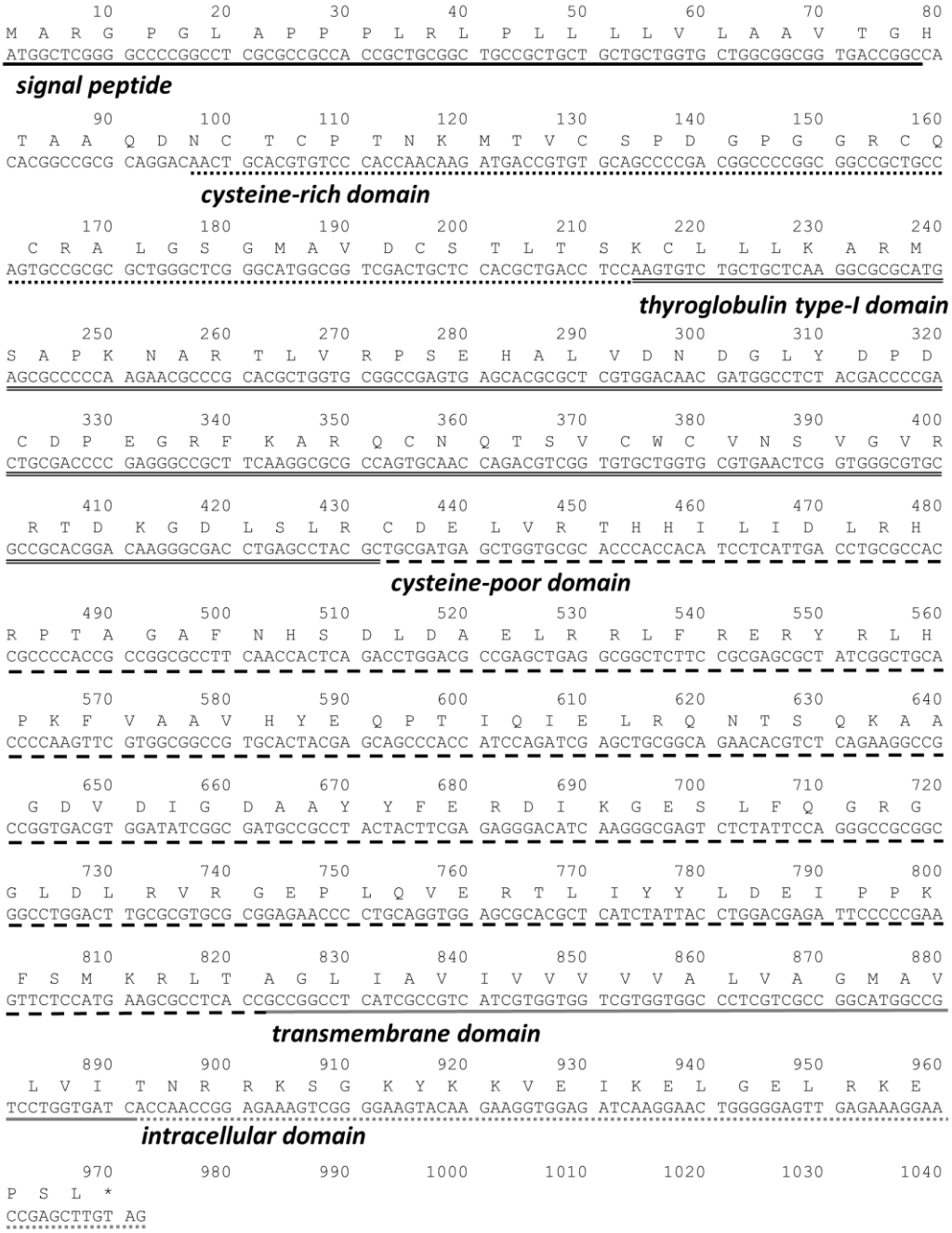


図 1-7. ヒト TROP-2 の塩基配列及びアミノ酸配列

1-5.　抗 TROP-2 抗体

前述のとおり、TROP-2 は癌細胞における発現量の増加や悪性度との関連が示唆されていることから、抗体医薬の標的分子として魅力的な性質を有していると考えられる。2017 年 9 月時点では TROP-2 を標的とした抗体医薬品は承認されていないものの、いくつかの抗 TROP-2 抗体に関する報告がなされている。以下に、ハイブリドーマ法によって取得された 4 種の抗 TROP-2 抗体クローン（162-42、MOv16、RS7、AR47A6.4.2）の特徴を記載した。

Lipinski らによって樹立された 162-42 は、ヒト絨毛がん細胞株 BeWo を免疫したマウスから作製されたハイブリドーマより、BeWo 細胞結合性を指標に単離されたクローンである。本クローンは、複数のヒト絨毛がん細胞株に結合する一方、ヒト血球細胞には結合しないことがラジオイムノアッセイにより確認されている(38)。また、Miotti らによって樹立された MOv16 は、ヒト卵巣癌細胞株 OvCa4343/83 を免疫したマウスから作製されたハイブリドーマより、高い免疫原結合性と低いヒト正常腎臓組織結合性を指標に単離されたクローンである。凍結組織切片を用いた免疫染色により、本クローンはヒト卵巣癌組織だけでなく、乳癌組織や肺癌組織に対しても強く結合することが確認されている。正常組織に対しては、乳腺、膵臓外分泌腺、尿細管、前立腺への結合も認められている(57)。両クローン共に癌細胞に対する結合性が確認されているものの、抗腫瘍活性に関する報告は皆無であり、臨床試験も実施されていない。

Stein らによって樹立された RS7-3G11（以下 RS7）は、外科的切除により採取したヒト初代非小細胞肺癌細胞の細胞膜画分を免疫したマウスより、高い免疫

原結合性と低いヒト正常肝臓組織結合性及び血球細胞結合性を指標に単離されたクローンである(58, 59)。凍結組織切片を用いた免疫染色から、本クローンは乳癌、肺癌、前立腺癌などの癌組織や、腎臓、乳腺、大腸などの正常組織にも結合することが確認されている。RS7 については、抗腫瘍活性に対するいくつかの検討結果が報告されている。マウス担癌モデルにおいて、RS7 は抗体単独では *in vivo* 抗腫瘍活性を発揮することが出来なかったが(60)、放射性同位体 ^{131}I で標識することで高い *in vivo* 抗腫瘍活性が認められている。一方、安全性の観点では、^{131}I 標識 RS7 は高い毒性が認められており、投与されたマウスの中には死亡した個体も見られている(61)。Immunomedics 社は、ヒト化 RS7（humanized RS7 ; hRS7）に、I 型トポイソメラーゼ阻害剤イリノテカンの活性代謝物である SN-38 を結合させた抗体・薬物複合体 hRS7-SN38（開発コード IMMU-132）を作製し、臨床試験を実施している(62-65)。IMMU-132 は TROP-2 結合依存的に癌細胞に SN-38 を送達することで、*in vitro* 及び *in vivo* で非常に高い抗腫瘍活性を発揮することが分かっている。これまでに実施された臨床試験においては、IMMU-132 は乳癌、尿路上皮癌、肺癌に対して優れた抗腫瘍効果を発揮し得ることが報告されており、第三相試験の実施が計画されている。一方、安全性の観点では、IMMU-132 を投与された患者の約 10%で、SN-38 に起因すると思われる重度の下痢症状が認められている。IMMU-132 は腫瘍部位で SN-38 を効率的に放出させることを目的に、血清中で切断されるリンカーを用いて SN-38 を抗体に結合させている(66)。そのため、体内循環している IMMU-132 から放出された SN-38 が消化管障害を引き起こしていることが考えられる。さらに、TROP-2 は複数の

正常上皮細胞にも発現していることから、それら組織に作用することで副作用を誘発する懸念もある。

旧 Arius Research 社により樹立されたクローン AR47A6.4.2 は、初代卵巣癌組織を免疫したマウスから作製されたハイブリドーマより、高い卵巣癌細胞株結合性と低い正常皮膚細胞株結合性を指標に単離されたクローンである(67)。*In vitro* において、AR47A6.4.2 は細胞増殖阻害活性や CDC 活性を発揮することが報告されている(68)。また、SCID マウス担癌モデルにおいて、AR47A6.4.2 は放射性同位体や薬剤を結合していない naked 型抗体フォーマットで *in vivo* 抗腫瘍活性を発揮することが報告されている。しかし、現時点では本クローンの臨床試験が実施されたとの報告は無い。

以上のように、TROP-2 は抗癌抗体医薬品の標的分子として有望な性質を有しているものの、これまでに上市された抗体クローンはない。最も臨床試験が進んでいる IMMU-132 は複数の癌種で薬効を示しているが、TROP-2 は正常組織にも発現していることから、殺細胞活性が極めて高い武装化抗体である該抗体は正常組織に対する傷害の懸念があり、副作用が許容されない可能性がある。一般的に、naked 型抗体の抗腫瘍活性は武装化抗体に比べて劣るが、その反面、安全性は高いと考えられている。エフェクター活性や機能阻害活性に対する細胞の感受性は癌種や正常組織毎に異なることから、naked 型抗体の抗腫瘍効果が最大限に発揮される癌種を選抜することが出来れば、naked 型抗体でも武装化抗体と同等以上の優れた抗腫瘍活性を発揮することが期待される。実際、皮膚などの正常組織にも発現する EGFR を標的とした抗体においては、武装化抗体はいまだ上市され

たものはないものの、naked 型抗体は複数上市されている。抗 TROP-2 抗体においても、naked 型抗体フォーマットが臨床応用に適している可能性があるが、既知の naked 型抗 TROP-2 抗体に *in vivo* 抗腫瘍活性を有する抗体クローンは非常に少なく、新たな抗体クローンの樹立が求められている。

1-6. ファイバー改変アデノウイルスを用いたモノクローナル抗体スクリーニング

ヒトアデノウイルスは直鎖状の二本鎖 DNA をゲノムとするウイルスである(69)。そのカプシドは正二十面体構造を有し、12 個のペントンベースよりファイバースパイクが突起している。ファイバー部位は根元から先端部にかけて tail、shaft、knob の構造を有しており、knob 部は標的細胞表面に存在する特定の分子に結合することでウイルスの接着に関与する。現在までに 50 種類以上の血清型のアデノウイルスが確認されているが、これらは DNA 配列の相同性などを基に A から F の 6 種の亜属に分類される。このうち、B 亜属以外に属するアデノウイルスの knob 部はコクサッキーアデノウイルス受容体（coxsackie and adenovirus receptor；CAR）に結合することで、アデノウイルスを標的細胞に接着させる。

Knob 部には HI ループと呼ばれる突出した部位が存在するが、HI ループは数十個のペプチドを挿入してもウイルスの増殖や感染能に大きな影響を与えないことが知られている(70)。Adv-FZ33 は、C 亜型に属する 5 型アデノウイルスの HI ループ部位に、黄色ブドウ球菌プロテイン A に由来する抗体結合性ペプチド Z33 モチーフを組み込んでいる（図 1－8）(71, 72)。Adv-FZ33 は抗体と複合体を形成することで、Z33 モチーフに結合した抗体依存的に標的細胞に接着することが出来る。Kato らは抗 carcinoembryonic antigen (CEA)抗体を題材に、Adv-FZ33 の感染に対する抗体クローンの生化学的特性の影響を解析した結果、フローサイトメトリー解析では同程度の結合強度を示すクローンでも、感染促進能

は大きく異なることを見出している(73)。本結果はAdv-FZ33の感染は単に用いる抗体の抗原や親和性に依存するだけでなく、エピトープ（抗体が結合する抗原の特定の領域）などその他の生化学的特性の影響を大きく受けることを示唆している。すなわち、Adv-FZ33 の感染を促進する抗体クローンは、親和性や特異性を指標とする従来の抗体スクリーニング方法では取得し難いユニークな生化学的特性を有する可能性が考えられた。

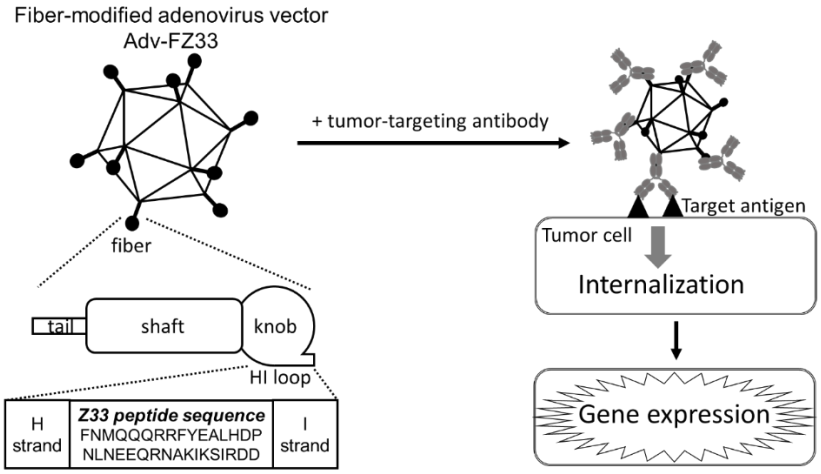


図 1－8. ファイバー改変アデノウイルスベクターAdv-FZ33

これまでに札幌医科大学では、ファイバー改変アデノウイルス Adv-FZ33 を用いた新規の抗体スクリーニング方法（以降、本抗体スクリーニング方法をアデノ法とする）を構築し、癌細胞特異的抗体の樹立に取り組んできた(74, 75)。アデノ法の手順を、抗 TROP-2 抗体の樹立を例に挙げて図 1－9 に示した。初めに、外科的切除により取得されたヒト初代前立腺癌細胞を免疫した balb/c マウスから脾細胞を採取し、これをマウスミエローマ細胞株 P3U1 と融合させることでハイ

ブリドーマを作製した。次に、得られたハイブリドーマの培養上清と、導入遺伝子として *lacZ* をコードする Adv-FZ33（Adv-LacZ-FZ33）を標的細胞であるヒト肺癌細胞株 NCI-H322 へ添加し、培養した後に、細胞の β-ガラクトシダーゼ活性を評価することで、高い Adv-LacZ-FZ33 感染促進能を有するクローンを選抜した。これと並行して、ヒト末梢血由来単核球（peripheral blood mononuclear cells ; PBMC）に対する結合性を解析することで、血球細胞に結合するクローンを除外した。その後、選抜されたクローンの抗原タンパク質を免疫沈降法により分離後、質量分析計を用いてアミノ酸配列を決定することにより同定した。その結果、新規の抗 TROP-2 抗体 Pr1E11 を樹立することに成功した。

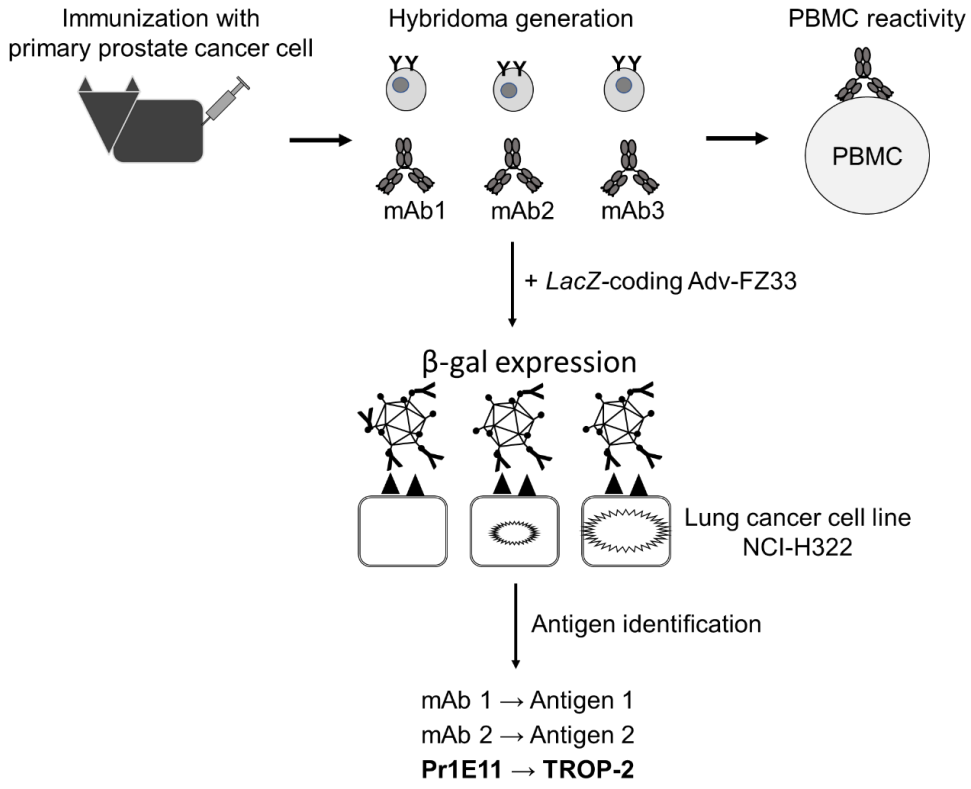


図 1－9. 抗 TROP-2 抗体 Pr1E11 の樹立

1-7.　本研究の目的

TROP-2 は naked 型抗癌抗体医薬品の標的として有望な性質を有しているものの、過去にハイブリドーマ法により取得された抗体クローンで優れた *in vivo* 抗腫瘍活性を有するものはなく、新たなクローンの樹立が求められていた。抗体の生物活性は親和性やエピトープなど様々な要因によって決定されるが、アデノ法で取得された新規の抗 TROP-2 抗体 Pr1E11 は、ハイブリドーマ法とは異なるユニークな抗体スクリーニングにより選抜されたクローンであることから、これまでに取得されているクローンとは異質の性質を有している可能性が考えられた。

そこで本研究では、アデノ法で得られた新規の抗 TROP-2 抗体 Pr1E11 の生化学的特性及び抗腫瘍活性の特徴を明らかにし、抗癌抗体医薬品としての可能性を検証することを目的とした。

本論文は五章から構成されている。各章ごとに研究を行うに至った背景を緒言としてまとめ、以下、目的、材料と方法、結果と考察及び結言を明らかにした。

第 1 章では、本研究の背景について記述し、本研究における目的を明らかにした。

第 2 章では、Pr1E11 の生化学的特性を解析した。

第 3 章では、Pr1E11 の *in vitro* 抗腫瘍活性を評価した。

第 4 章では、Pr1E11 の *in vivo* 抗腫瘍活性を評価した。

第 5 章では、本研究の総括を記述した。

第 2 章

生化学的特性解析

2-1. 緒言

第 1 章で述べた通り、TROP-2 は癌細胞のみならず、複数の正常組織においても発現していることが報告されている。癌治療用抗体の開発において、開発クローンの結合特性を把握しておくことは、適応癌種の選定や副作用の予見の観点から非常に重要である。抗体の結合は、酵素的切断や糖鎖付加など抗原側の翻訳後修飾の影響を受けることで変化する可能性があるため(76, 77)、Pr1E11 の癌細胞及び正常組織結合性は既知の抗 TROP-2 抗体とは異なる可能性がある。そこで本章では、Pr1E11 の精製抗体を調製し、複数の上皮癌細胞株及び正常組織に対する結合性を評価した。精製抗体は Pr1E11 のハイブリドーマ培養上清から精製したマウス IgG1κ型抗体と、ヒト IgG1κ由来定常領域を有するキメラ抗体の二種類を調製した。癌細胞結合性は細胞株を用いたフローサイトメトリー法で、正常組織結合性は凍結正常組織切片アレイを用いた免疫染色法で解析した。

ADCC 活性や CDC 活性などのエフェクター活性は、抗体の親和性やエピトープに大きく依存することが知られている(78)。また、TROP-2 は細胞増殖などに関与することから抗 TROP-2 抗体には増殖阻害活性が期待されるが、このような機能阻害活性も抗体の親和性やエピトープの影響を受けることが予想される。そこで本章では Pr1E11 の結合親和性及びエピトープについても解析した。組み換え TROP-2 タンパク質に対する結合親和性は、表面プラズモン共鳴法にて解析した。結合ドメインの同定は、フローサイトメトリーを用いた AR47A6.4.2 との競合試験と、組み換え TROP-2 ECD 変異体タンパク質に対する結合活性解析により実施した。

各試験では比較対象としてAR47A6.4.2のヒトIgG1κ型キメラ抗体と、一般試薬として入手した抗TROP-2抗体5クローンを用いた。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 被験抗体

本研究で使用した抗 TROP-2 抗体 7 クローンを表 2-1 に示した。Pr1E11 と AR47A6.4.2 は 2-2-2 及び 2-2-3 に記載の方法で調製したものを用いた。その他のクローンは一般試薬として購入したものを用いた。

表 2-1. 使用抗体一覧

Clone	Origin	Immunogen	Screening method
Pr1E11	Sapporo medical university	Human primary prostate cacer cell	Infection of Adv-LacZ-FZ33
AR47A6.4.2	Arius research	Human primary ovarian cancer cell	Reactivity to cancer cell
MOv16	Miotti et al.	Human ovarian cancer cell line OvCa4343/83	Reactivity to cancer cell
162-46	Lipinski et al.	Human trophoblast cell line BeWo	Reactivity to immunogen
MM0588-49D6	Novus Biologicals	Recombinant TROP-2 protein	Not reported
YY-01	Santacruz	Recombinant TROP-2 protein	Not reported
77220	R&D systems	Recombinant TROP-2 protein	Not reported

2-2-2. マウス IgG 型 Pr1E11 の調製

Pr1E11 のハイブリドーマは札幌医科大学医学部分子医学研究部門より提供されたものを用いた。ハイブリドーマ培養上清からのマウス抗体の調製は下記の通り行った。ハイブリドーマを 5 vol% low IgG fetal bovine serum (FBS) (Gibco, 16250078)、50 μg/mL gentamicin sulfate (ナカライテスク, 16672-

04）を含むHybridoma SFM（Gibco, 120045076）にて1×10^5 個/mLの密度で浮遊培養用フラスコ（greiner bio-one, 660190）に播種し、37 ℃、5 % CO_2下で1週間培養した。細胞懸濁液を4 ℃、3000 回転/分（rpm）で20分間遠心し、培養上清を 0.22 μm フィルターにより濾過した。培養上清からの抗体精製はProSep-vAレジン（Millipore, 113115827）を用いた。溶出は100 mmol/L クエン酸バッファーにて、pH 5.0、pH 3.5、pH 3.0の順に段階的に行い、各画分のタンパク質濃度を280 nmでの吸光度により見積もり、抗体を含む画分を回収した。集めた画分はNAP-10カラム（GE Healthcare, 17085402）を用いて外液を150 mmol/L NaCl含有10 mmol/L クエン酸バッファー(pH 6.0)に置換した。得られた溶液は 0.22 μm フィルターにより濾過滅菌した。抗体のサブクラスをIsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit（Sigma-Aldrich, 11493027001）により判定し、Pr1E11のサブクラスをIgG1κと決定した。

2-2-3. 組み換えヒトIgG1κ型キメラ抗体の作製

表1-1に示した通り、ヒトIgG1は高いADCC活性とCDC活性を有し、血中半減期も長く物性も安定であることから癌治療を目的とした抗体医薬品に最も適したサブクラスである。そこでヒト型キメラ抗体の作製には、IgG1 由来の定常領域を用いることとした。ここで、Fc部位のN297におけるN型糖鎖のコアフコースを欠いたFcはFcγRIIIaとの親和性が飛躍的に高まり、ADCC活性が増強されることが知られている(79)。該 N 型糖鎖のコアフコースは FUT8（α-1,6-fusocyltransferase）により付加される。従って、*FUT8* 欠損 chinese hamster

ovary（CHO）細胞から調製されたIgG1型抗体のADCC活性は、通常のCHO細胞から調製されたものよりも高い活性を有することが期待される(80)。そこで、ヒト型キメラ抗体はコアフコース付加型[Fuc(+)]とコアフコース欠損型[Fuc(-)]の二種類を調製した。ヒト型キメラ抗体の調製は下記の通り行った。

5×10^7 個のハイブリドーマよりRNeasy Maxi Kit（QIAGEN, 75162）を用いてtotal RNAを抽出した。150～250μgのtotal RNAを用い、Oligotex-dT30<super>mRNA Purification Kit（タカラバイオ, 9086）を用いてmRNAを精製した。精製したmRNAを鋳型として用いて、SMART RACE cDNA Amplification Kit（Clontech, 634914）によりcDNAを調製した.得られたcDNAを用いて5’-RACE PCR反応によりVH及びVLの塩基配列を増幅した。Forward primerにはSMART RACE cDNA Amplification Kitに付属のUniversal primerを、Reverse primerには表2-2に記載の配列を用いた。

表2-2. マウスIgG1抗体の可変領域クローニング用プライマー

Primer	Sequence
mIgG1_RV1	5’-CCAGGGTCACCATGGAGTTAGTTTGGGCAG-3’
mIgG1_RV2	5’-TCACCATGGAGTTAGTTTGGGCAGCAGATC-3’
mKappa_RV1	5’-CTAACACTCATTCCTGTTGAAGCTCTTGACAA-3’
mKappa_RV2	5’-GAAGCACACGACTGAGGCACCTCCAGATGT-3’

PCR反応液をアガロースゲル電気泳動し、約500 bpの断片をTarget Clone Plus Kit（東洋紡, TAK-201）を用いてクローニングした。複数のクローンよりプラスミドを調製して、インサートの塩基配列を解析することで、VH及びVLの塩基配列及びアミノ酸配列を決定した（図2－1)。

調製した VH または VL の塩基配列を含むプラスミドを鋳型として、表 2-3 に記載のプライマーを用いて PCR 反応を行った。下線部は抗体発現ベクターに組み入れるための制限酵素認識配列（*Not* I、*Apa* I、*Eco*R I、*Bsi*W I）を示す。

表 2-3. ヒト IgG1 型キメラ抗体作製用プライマー

Primer	Sequence
Pr1E11_VH_FW	5’-AAGGAAAAAAGCGGCCGCACCATGGAATGGAGCGGGGTC-3’
Pr1E11_VH_RV	5’-CGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTG-3’
Pr1E11_VL_FW	**5’-CCGGAATTCCAAGATGGAATCACAGACTCAGGTCC-3’**
Pr1E11_VL_RV	5’-AGCCACCGTACGTTTTATTTCCAGCTTGGTC-3’

得られた PCR 産物を TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, 450641) により TA クローニングした後に塩基配列を決定し、目的の配列が得られていることを確認した。AR47A6.4.2 については特許情報から可変領域配列を入手し、委託合成により VH または VL の cDNA を含むプラスミドをそれぞれ取得した。ヒト IgG1 の CH 領域と Cκ 領域を有する哺乳類発現用プラスミド及び各抗体の VL 配列を含むプラスミドを *Eco*R I 及び *Bsi*W I により切断した後に、アガロースゲル電気泳動を行い、目的の断片を精製した。2 つの断片をライゲーションすることで、各抗体の VL 配列を含む哺乳類細胞発現用プラスミドを得た。次に本プラスミドと各抗体の VH 配列を含むプラスミドを *Not* I 及び *Apa* I により切断した後に、上記と同様の操作を行うことで VH 配列と VL 配列を含むヒト型キメラ抗体発現プラスミドを得た。得られたプラスミドを CHO/DG44 細胞または *FUT8* 欠損 CHO/DG44 細胞株 Ms704 に Gene Pulser Xcell エレクトロポレーションシステム (Bio-rad) を用いて導入し、10 vol% dialyzed FBS (Gibco, 26400044)、50 μ

g/mL gentamicin sulfate、500 μg/mL G418 disulfate(ナカライテスク, 09380-44) 及び 500 nmol/L methotrexate (和光純薬工業, 135-12573) を含む IMDM (ナカライテスク, 11506-05) を用いて遺伝子導入細胞を選抜することで Fuc(+)型キメラ抗体及び Fuc(-)型キメラ抗体の発現細胞を作製した。得られた細胞はサブコンフルエントになるまで 37℃、5% CO_2 下で接着培養用フラスコ (greiner bio-one, 660160) にて培養後、培地を 4 mmol/L L-glutamine (ナカライテスク, 16948-04) 及び 50 μg/mL gentamicin sulfate を含む ExCELL-302 (Sigma-Aldrich, 14326C) に交換して一週間培養することで培養上清を得た。得られた培養上清からの抗体精製は 2-2-2 に記載の方法と同様に Prosep-vA レジンを用いて実施した。*In vivo* 評価に用いる抗体については外液を PBS に交換した。

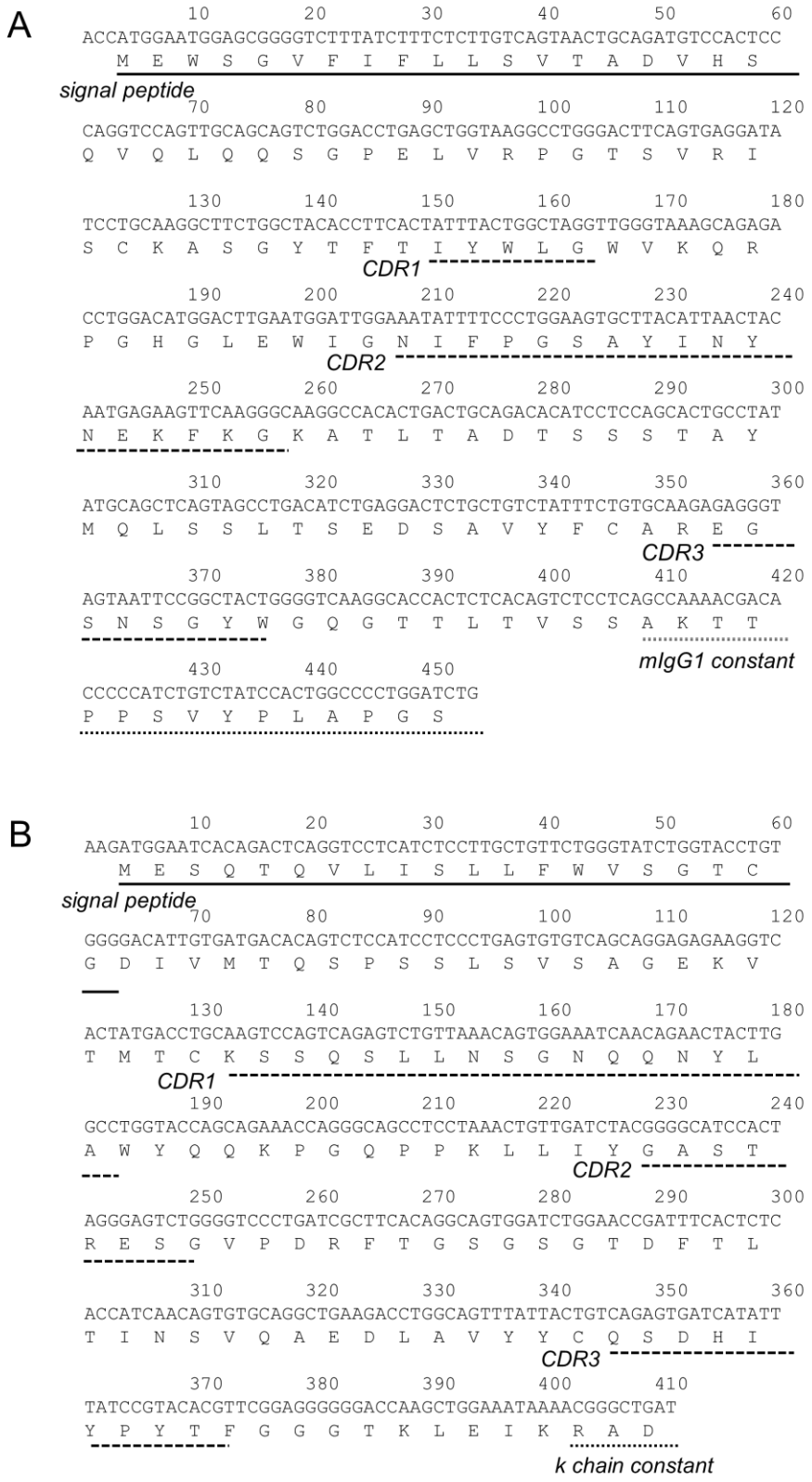


図 2-1. Pr1E11 可変領域の塩基配列及びアミノ酸配列（A:VH、B:VL）

2-2-4. フローサイトメトリー

2-2-2 及び 2-2-3 で調製した Pr1E11（マウス IgG1）と AR47A6.4.2（ヒト型キメラ IgG1)及び一般試薬として購入した 77220（マウス IgG2a）を用いてフローサイトメトリーを実施した。膵臓癌細胞株 BxPC-3、卵巣癌細胞株 CaOV-3、乳癌細胞株 MCF-7 及び大腸癌細胞株 Colo-205 を 0.02 w/v% EDTA 溶液（ナカライテスク）により剥離し、PBS にて洗浄した後、1 w/v% BSA を含む PBS（BSA-PBS）（ナカライテスク, 09968-35）にて 1×10^6 個/mL の密度の細胞懸濁液を調製した。本細胞懸濁液を 96 穴丸底プレート（Becton Dickinson, 353910）に 100 μL/well ずつ分注し、氷上で 30 分間静置することでブロッキングを行った。プレートを 1500 rpm で 3 分間遠心して上清を除いた後、一次抗体として抗 TROP-2 抗体を 10 μg/mL 含む BSA-PBS 溶液を 100 μL/well ずつ添加し、氷上で 1 時間静置した。陰性対象には各サブクラスと同じアイソタイプコントロール抗体を用いた。BSA-PBS で洗浄後、FITC 標識ヤギ抗マウス IgG（Southern Biotech, 1033-02）又は FITC 標識ヤギ抗ヒト IgG（Southern Biotech, 2048-02）を 10 μg/mL 含む BSA-PBS を 100 μL/well ずつ添加し、氷上で 30 分間静置した。BSA-PBS で洗浄後、フローサイトメーターCytomics FC MPL (Beckman Coulter)で細胞の蛍光強度を測定した。

本実験系をサブクラスの異なる抗体間の競合実験に用いる場合、一次抗体反応において二種類の抗体を共存させ、片方の抗体の濃度を固定（Pr1E11: 1000 ng/mL、AR47A6.4.2 及び 77220: 300 ng/mL）し、競合させる抗体の濃度を 0.316

μg/mL から 100 μg/mL の間で設定した（3.16 倍希釈系列)。濃度を固定した抗体のサブクラスに特異的な二次抗体を用いて検出した。

2-2-5. 免疫染色

ヒト型キメラ抗体を用いて免疫染色を実施した。抗体を EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin(Thermo Scientific, 21335)を用いてビオチン化後、NaN_3 を添加(0.05 w/v%) し、0.22μm フィルターで濾過滅菌することでビオチン標識抗体を得た。C.B17/Icr-scid Jcl(SCID)マウス(日本クレア)にヒト膵臓癌細胞株 BxPC-3 を皮下移植することで作製した腫瘍細胞塊の凍結組織切片と、ヒト正常組織アレイ Frozen Tissue Array-Human Adult Normal Tissue, Multi-tissue I (Biochain, T6234700)をアセトンを用いて-20℃で 5 分間固定し、乾燥させた。PBS にて 1 回洗浄後、0.3 vol% H_2O_2、0.1 w/v% NaN_3 を含む PBS にて内因性 Peroxidase のブロッキングを行った。PBS で 3 回洗浄後、内因性ビオチンのブロッキングを行った。PBS にて 3 回洗浄後、BSA-PBS に室温で 10 分間反応させブロッキングした。PBS にて 3 回洗浄後、ビオチン化抗体を室温で 1 時間反応させた。PBS にて 3 回洗浄後、HRP 標識 Streptavidin (DAKO, P0397) を反応させ、室温で 5 分間反応させた。PBS にて 3 回洗浄後、DAB 発色 (Sigma-Aldrich, D3939) を行った。流水にて洗浄した後、マイヤーヘマトキシリン溶液（和光純薬工業, 131-09665）にて核染色を行った。流水にて洗浄した後、70 vol% EtOH、95 vol% EtOH、100 vol% EtOH の順に 5 分間浸漬することで脱水した。次いで Xylene 中に 5 分間浸

漬する操作を3回行った。標本をエンテランニュー（MERCK, 107961）にて封入後、Digital microscope VHX-900（KEYENCE）で染色像を観察した。

2-2-6. 表面プラズモン共鳴法による親和性解析

TROP-2に対する抗TROP-2抗体の親和性をBiacore T100（GE Healthcare）を用いて解析した。抗 His タグモノクローナル抗体（QIAGEN, 34660）を Amine coupling kit（GE Healthcare, BR100050）を用いてSeries S Sensor chip CM5（GE Healthcare, BR100530）上に固定化し、次いでリガンドとしてHBS-EP+バッファー（GE Healthcare, BR100188）で希釈した組み換えHis-tagged TROP-2 ECD-Fcタンパク質（R&D Systems, 650-T2-100）を captureさせた。その後、Pr1E11、AR47A6.4.2、MOv16及び77220を313、625、1250、2500、5000 ng/mLの順に流し、センサーグラムを取得した。取得したセンサーグラムをBiacore T100 Evaluation Software version 2.0.1(GE Healthcare)を用いて解析し、Bivalent Analyte modelにより結合速度定数(association rate constant ； k_a)、解離速度定数(dissociation rate constant ； k_d)及び解離定数(dissociation constant ； K_D)を得た。リファレンスにはHis-tagged TROP-2 ECD-Fcを captureしないフローセルに対し各抗TROP-2抗体を流したものを使用した。センサーチップの再生には10 mmol/L Glycine-HCl（pH2.0）（GE Healthcare, BR100355）を用いた。

2-2-7. 細胞外ドメイン欠損変異体タンパク質を用いた結合ドメインの同定

委託合成により TROP ECD の CRD、CRD と TY 又は CRD から CPD の一部までを欠損させたドメイン欠損体の cDNA 配列を含むプラスミドを取得した。各 TROP-2 ECD を含むプラスミド及び FLAG タグ配列（DYKDDDDK）とヒト IgG1 由来 Fc 配列を含む哺乳類細胞発現用プラスミドを *Kpn*I 及び *Xba*I により切断した後にアガロースゲル電気泳動を行い、目的遺伝子断片を抽出した。この断片どうしをライゲーションすることで各 TROP-2 ECD-FLAG-Fc 発現プラスミドを得た。組み換えタンパク質は Freestyle 293 Expression system (Invitrogen, K900001)を用いて発現させた。培養上清からの TROP-2 ECD-FLAG-Fc の精製は 2-2-2 に記載の方法と同様の手順で実施した。作製した各種 TROP-2 ECD-FLAG-Fc の模式図（図 2－2）と、各構成要素[Mutant1 (Mut1) 、Mutant2 (Mut2)及び Mutant3 (Mut3)の細胞外ドメイン配列と、FLAG-hIgG1）]の塩基配列及びアミノ酸配列（図 2-3）を以下に示した。

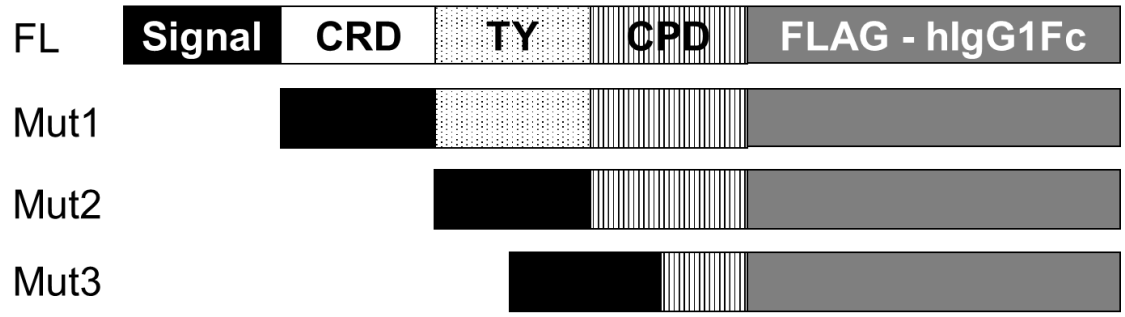


図 2－2. TROP-2 細胞外ドメイン欠損変異体

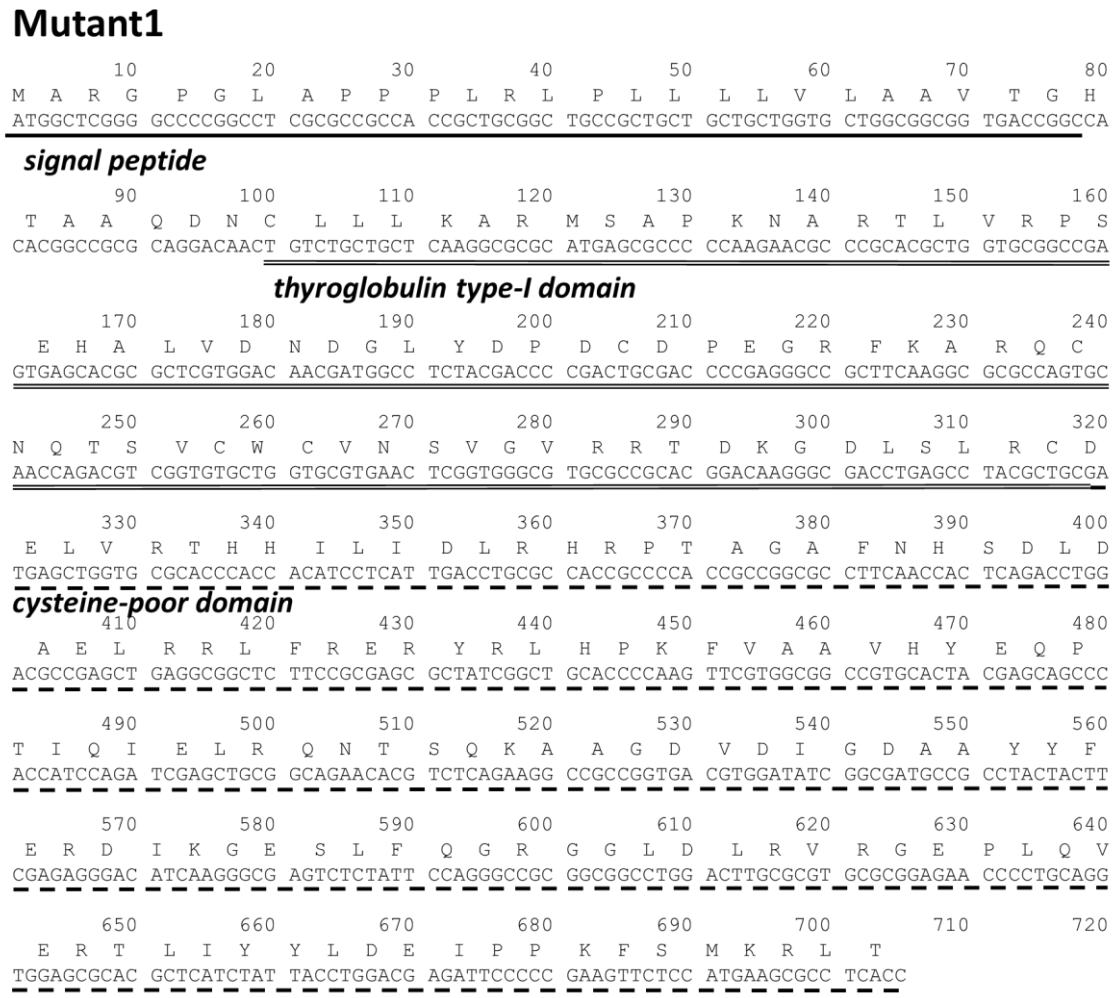


図 2－3. TROP-2 細胞外ドメイン欠損変異体の塩基配列及びアミノ酸配列

Mutant2

```
        10         20         30         40         50         60         70         80
M  A  R  G   P  G  L   A  P  P   P  L  R  L   P  L  L   L  L  V   L  A  A  V   T  G  H
ATGGCTCGGG GCCCCGGCCT CGCGCCGCCA CCGCTGCGGC TGCCGCTGCT GCTGCTGGTG CTGGCGGCGG TGACCGGCCA
```

signal peptide

```
        90        100        110        120        130        140        150        160
 T  A  A   Q  D  N  D   E  L  V   R  T  H   H  I  L  I   D  L  R   H  R  P   T  A  G  A
CACGGCCGCG CAGGACAACG ATGAGCTGGT GCGCACCCAC CACATCCTCA TTGACCTGCG CCACCGCCCC ACCGCCGGCG
```

cysteine-poor domain

```
       170        180        190        200        210        220        230        240
  F  N  H   S  D  L   D  A  E  L   R  R  L   F  R  E   R  Y  R  L   H  P  K   F  V  A
CCTTCAACCA CTCAGACCTG GACGCCGAGC TGAGGCGGCT CTTCCGCGAG CGCTATCGGC TGCACCCCAA GTTCGTGGCG

       250        260        270        280        290        300        310        320
A  V  H  Y   E  Q  P   T  I  Q   I  E  L  R   Q  N  T   S  Q  K   A  A  G  D   V  D  I
GCCGTGCACT ACGAGCAGCC CACCATCCAG ATCGAGCTGC GGCAGAACAC GTCTCAGAAG GCCGCCGGTG ACGTGGATAT

       330        340        350        360        370        380        390        400
 G  D  A   A  Y  Y  F   E  R  D   I  K  G   E  S  L  F   Q  G  R   G  G  L   D  L  R  V
CGGCGATGCC GCCTACTACT TCGAGAGGGA CATCAAGGGC GAGTCTCTAT TCCAGGGCCG CGGCGGCCTG GACTTGCGCG

       410        420        430        440        450        460        470        480
  R  G  E   P  L  Q   V  E  R  T   L  I  Y   Y  L  D   E  I  P  P   K  F  S   M  K  R
TGCGCGGAGA ACCCCTGCAG GTGGAGCGCA CGCTCATCTA TTACCTGGAC GAGATTCCCC CGAAGTTCTC CATGAAGCGC

       490        500        510        520        530        540        550        560
L  T
CTCACC
```

Mutant3

```
        10         20         30         40         50         60         70         80
M  A  R  G   P  G  L   A  P  P   P  L  R  L   P  L  L   L  L  V   L  A  A  V   T  G  H
ATGGCTCGGG GCCCCGGCCT CGCGCCGCCA CCGCTGCGGC TGCCGCTGCT GCTGCTGGTG CTGGCGGCGG TGACCGGCCA
```

signal peptide

```
        90        100        110        120        130        140        150        160
 T  A  A   Q  D  N  L   F  R  E   R  Y  R   L  H  P  K   F  V  A   A  V  H   Y  E  Q  P
CACGGCCGCG CAGGACAACC TCTTCCGCGA GCGCTATCGG CTGCACCCCA AGTTCGTGGC GGCCGTGCAC TACGAGCAGC
```

cysteine-poor domain

```
       170        180        190        200        210        220        230        240
  T  I  Q   I  E  L   R  Q  N  T   S  Q  K   A  A  G   D  V  D  I   G  D  A   A  Y  Y
CCACCATCCA GATCGAGCTG CGGCAGAACA CGTCTCAGAA GGCCGCCGGT GACGTGGATA TCGGCGATGC CGCCTACTAC

       250        260        270        280        290        300        310        320
F  E  R  D   I  K  G   E  S  L   F  Q  G  R   G  G  L   D  L  R   V  R  G  E   P  L  Q
TTCGAGAGGG ACATCAAGGG CGAGTCTCTA TTCCAGGGCC GCGGCGGCCT GGACTTGCGC GTGCGCGGAG AACCCCTGCA

       330        340        350        360        370        380        390        400
 V  E  R   T  L  I  Y   Y  L  D   E  I  P   P  K  F  S   M  K  R   L  T
GGTGGAGCGC ACGCTCATCT ATTACCTGGA CGAGATTCCC CCGAAGTTCT CCATGAAGCG CCTCACC
```

図 2－3（続き）．TROP-2 細胞外ドメイン欠損変異体の塩基配列及びアミノ酸配列

FLAG-hIgG1Fc

```
        10         20         30         40         50         60         70         80
G  T  S  R   A  D  Y   K  D  D   D  D  K  T   S  D  K   T  H  T   C  P  P  C   P  A  P
GGTACCTCTA GAGCAGACTA CAAGGACGAC GATGACAAGA CTAGTGACAA AACTCACACA TGCCCACCGT GCCCAGCACC
 KpnI     XbaI        FLAG sequence

        90         100        110        120        130        140        150        160
 E  L  L   G  G  P  S   V  F  L   F  P  P   K  P  K  D   T  L  M   I  S  R   T  P  E  V
TGAACTCCTG GGGGGACCGT CAGTCTTCCT CTTCCCCCCA AAACCCAAGG ACACCCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG

       170        180        190        200        210        220        230        240
  T  C  V   V  V  D   V  S  H  E   D  P  E   V  K  F   N  W  Y  V   D  G  V   E  V  H
TCACATGCGT GGTGGTGGAC GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT GGAGGTGCAT

       250        260        270        280        290        300        310        320
N  A  K  T   K  P  R   E  E  Q   Y  N  S  T   Y  R  V   V  S  V   L  T  V  L   H  Q  D
AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTCAGCGTC CTCACCGTCC TGCACCAGGA

       330        340        350        360        370        380        390        400
 W  L  N   G  K  E  Y   K  C  K   V  S  N   K  A  L  P   A  P  I   E  K  T   I  S  K  A
CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAAG

       410        420        430        440        450        460        470        480
  K  G  Q   P  R  E   P  Q  V  Y   T  L  P   P  S  R   D  E  L  T   K  N  Q   V  S  L
CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGG GATGAGCTGA CCAAGAACCA GGTCAGCCTG

       490        500        510        520        530        540        550        560
T  C  L  V   K  G  F   Y  P  S   D  I  A  V   E  W  E   S  N  G   Q  P  E  N   N  Y  K
ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA

       570        580        590        600        610        620        630        640
 T  T  P   P  V  L  D   S  D  G   S  F  F   L  Y  S  K   L  T  V   D  K  S   R  W  Q  Q
GACCACGCCT CCCGTGCTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTACAGCA AGCTCACCGT GGACAAGAGC AGGTGGCAGC

       650        660        670        680        690        700        710        720
  G  N  V   F  S  C   S  V  M  H   E  A  L   H  N  H   Y  T  Q  K   S  L  S   L  S  P
AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG

       730        740        750        760        770        780        790        800
G  K  *
GGTAAATGA
```

図 2－3（続き）．TROP-2 細胞外ドメイン欠損変異体の塩基配列及びアミノ酸配列

TROP-2 ECD-FLAG-Fc を還元用 SDS-PAGE 用バッファー（ナカライテスク, 09499-14)で SDS 化した後に、10-20 %ポリアクリルアミドゲル(ATTO, 2331740)を用いて電気泳動（100 ng/lane、20 mA/membrane、80 min）した。泳動後、バンドを PVDF 膜（ATTO, 2322451）に 200 mA/membrane で転写した。PVDF 膜を 5

w/v% BSA-PBS でブロッキング後、0.1 w/v% BSA と 0.05 vol% Tween-20 を含む TBS（TBS-T）で 1 μg/mL に調製した抗 TROP-2 抗体を室温で 1 時間反応させた。TBS-T で 3 回洗浄した後に、0.1 w/v% BSA を含む TBS-T で 1000 倍希釈した HRP 標識ヤギ抗ヒトκ鎖（Southern Biotech, 2060-05）又は HRP 標識ヤギ抗マウス抗体（Southern Biotech, 1037-05）を室温で 1 時間反応させた。0.05 vol%TBS-T で 3 回洗浄した後に、SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate（Pierce, 34080）を添加し、発光させた。撮影には LAS4000mini（Fuji film）を用いた。

2-3. 結果と考察

2-3-1. 精製抗体の調製

2-2-2 にて Pr1E11 のハイブリドーマ上清から精製したマウス IgG1 型抗体（図 2-4.A）及び 2-2-3 にて CHO 細胞の培養上清から精製したヒト型キメラ抗体（図 2-4.B）の CBB 染色像を図 4-1 に示した。いずれの精製抗体も還元状態で泳動した場合は重鎖（約 50 kDa）と軽鎖（約 25 kDa）に相当するバンドのみが認められた。一方、非還元状態では 200 kDa 付近に IgG 分子に相当する明確なバンドが認められた。本結果から、両クローン共に高純度の精製抗体が得られたと判断した。低分子量側にいくつかの交雑バンドが認められたが、それらのバンドは還元状態では消失したことから、IgG 分子からの軽鎖や Fab の脱落や、ハーフ抗体に起因すると考えられた。

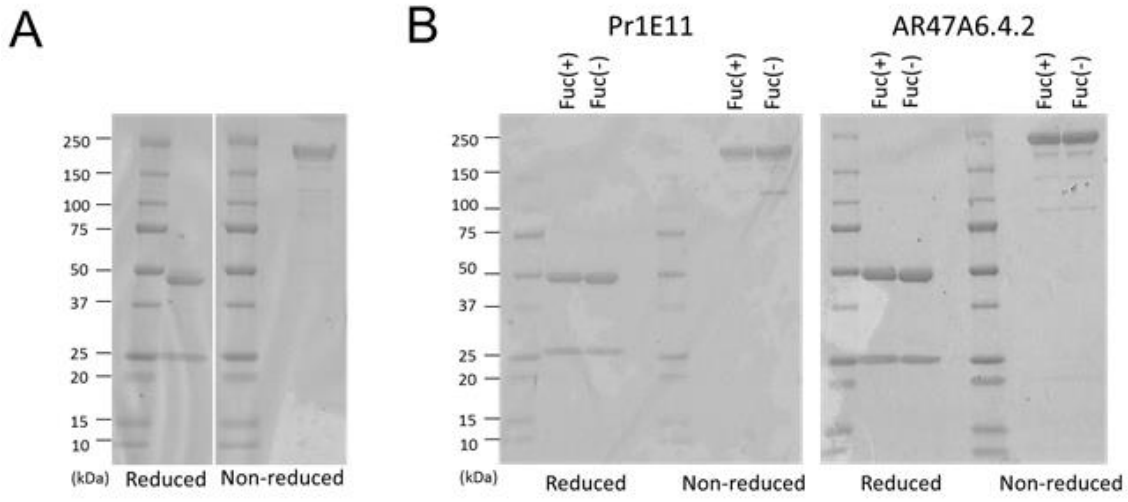


図 2-4. 精製抗体の CBB 染色像（A：ハイブリドーマ培養上清から取得したマウス IgG1 型 Pr1E11、B：組み換え CHO 細胞の培養上清から取得したヒト IgG1 κ型キメラ抗体）

2-3-2. 癌細胞株結合性

Pr1E11（マウス IgG1）及び AR47A6.4.2（ヒト型キメラ抗体）の精製抗体を調製し、上皮癌細胞株 4 種に対する結合性をフローサイトメトリーにて解析した。その結果、いずれのクローンも用いた全ての細胞株に対して Mean fluorescence intensity （MFI） がアイソタイプコントロール抗体と比較して約 30～100 倍シフトする高い結合性が認められた（図 2－5)。

抗 TROP-2 抗体は多様な固形癌を認識することが報告されていたが、Pr1E11 も AR47A6.4.2 と同様に膵臓癌細胞株 BxPC-3、卵巣癌細胞株 CaOV-3、大腸癌細胞株 Colo-205、乳癌細胞株 MCF-7 に対して強く結合することが確認された。以上の結果から、上記癌種は抗 TROP-2 抗体の適応癌種になり得ると考えられた。また、Pr1E11 はヒト初代前立腺癌細胞の免疫と、ヒト肺癌細胞株 NCI-H322 に対する Adv-FZ33 の感染促進を基に得られたクローンであることから、これらの癌種に対する結合も期待された。本結果から、Pr1E11 が多様な固形癌種を適応とし得ることが確認された。

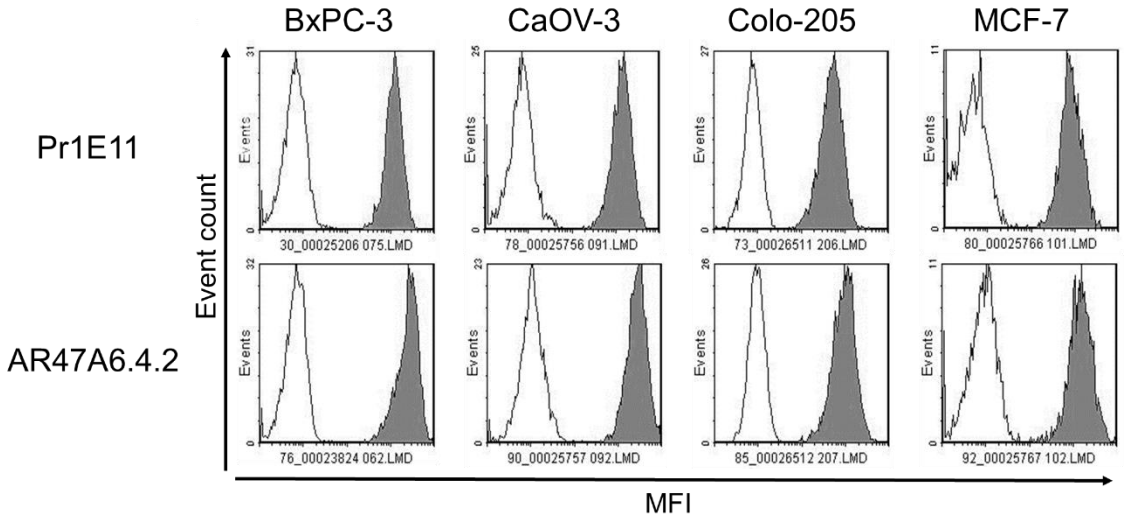


図 2－5. ヒト上皮癌細胞株に対する抗 TROP-2 抗体の結合性

2-3-3. 正常組織結合性

免疫染色用に Pr1E11 と AR47A6.4.2 のヒト型キメラ抗体を用いて、ビオチン化抗体を調製した。作製したビオチン化抗体は TROP-2 陽性癌細胞株 BxPC-3 及び MCF-7 に対して高い結合活性を示し、TROP-2 陰性癌細胞株 PANC-1 に対しては結合しないことを確認した（data not shown）。本ビオチン化抗体を用いて BxPC-3 細胞塊（陽性コントロール）及び PANC-1 細胞塊（陰性コントロール）の切片に対して免疫染色を行った結果、BxPC-3 細胞塊切片においてのみビオチン化抗 TROP-2 抗体による明瞭な染色が確認された（図 2－6-A, B）。そこで次に各種正常組織切片に対する免疫染色を行った結果、乳腺、腎臓、肝臓、肺、膵臓、皮膚、胃、及び甲状腺といった多くの組織の上皮細胞に染色が認められた（表 2－4、図 2－6-C～J）。一方、大脳、小脳、副腎、心臓、小腸、脾臓、骨格筋、卵巣、子宮頸部及び子宮はいずれの抗体も陰性であった（data not shown）。陽性組織

の種類は Pr1E11 と AR47A6.4.2 で違いは認められなかった。但し、陽性組織における染色強度は、腎臓ボウマン嚢上皮、肺胞上皮、甲状腺濾胞上皮においてPr1E11 が AR47A6.4.2 よりも強い傾向が認められた。

既知の抗 TROP-2 抗体と同様に、Pr1E11 も複数の正常組織に結合することが明らかとなった。Pr1E11 の染色パターンは AR47A6.4.2 と同様であり、染色強度はAR47A6.4.2 と同等以上であった。抗体の結合は抗原への糖鎖付加や酵素的切断などの翻訳後修飾の影響を受けることが知られているが、これらは癌種や組織ごとに異なる。Pr1E11 と AR47A6.4.2 の癌細胞結合性や正常組織結合性に大きな違いはなかったことから、これら抗体が認識する部位は翻訳後修飾の影響を受けにくい部位であることが予想された。この正常組織における発現が副作用につながるか否かは抗体の生物活性や各組織への到達度合いに依存するため、注意深く判断する必要がある。AR47A6.4.2 はカニクイザルを用いた安全性試験を実施しているが、該試験では顕著な毒性は認められていない(81)。一方、TROP-2 のファミリー分子であり、膵臓を含めた複数の正常組織の上皮細胞に発現するEpCAM を標的とした抗体においては、2000 年前後に実施された臨床試験において膵毒性が観察され、安全性不十分のため開発中止となった事例がある(82, 83)。また、皮膚に高発現する EGFR を標的とした抗体医薬 Erbitax は、副作用として高頻度で重度の皮疹を生じることが知られている(84)。Pr1E11 においても生物活性次第では副作用発現につながる可能性もあることから、各種正常組織に対する結合性は留意すべき点だと考えられた。

表 2－4. 抗 TROP-2 抗体による各種ヒト正常組織切片の染色結果一覧

Tissue	Isotype control	Pr1E11	AR47A6.4.2	Comments
BxPC-3 xenograft	−	3+ M, C Frequent	3+ M, C Frequent	positive control
PANC-1 xenograft	−	−	−	Negative control
Adrenal gland	−	−	−	
Breast	−			
Epithelium, acinus	−	3+ M, C Frequent	3+ M, C Frequent	
Epithelium, ducts	−	3+ M, C Frequent	3+ M, C Frequent	
Cerebelum	−	−	−	Non-specific staining in glia cells
Cerebrum	−	−	−	Non-specific staining in glia cells
Cervix	−	−	−	
Heart	−	−	−	Brown pigment deposition
Kidney	−			
Epithelium, renal tubles	−	3+ M, C Frequent	3+ M, C Frequent	
Epithelium, Bowman's capsule	−	3+ M, C Frequent	2+ M, C Frequent	
Liver	−			Brown pigment deposition
Epithelium, bile ducts	−	3+ M, C Frequent	3+ M, C Frequent	
Lung	−			
Epithelium, alveolus	−	2+ M, C Frequent	+ M, C Frequent	
Ovary	−	−	−	
Pancreas	−			
Epithelium, acinus	−	3+ M, C Frequent	3+ M, C Frequent	
Epithelium, ducts	−	3+ M, C Frequent	3+ M, C Frequent	
Placenta	−			
Epithelium, syncytial trophoblasts	−	3+ M, C Frequent	3+ M, C Frequent	
Salivary gland	−			Non-specific staining in ducts
Epithelium, acinus	−	3+ M, C Frequent	3+ M, C Frequent	
Epithelium, ducts	−	3+ M, C Frequent	3+ M, C Frequent	
Skeletalmuscle	−	−	−	
Skin	−			
Epidermis	−	3+ M, C Frequent	3+ M, C Frequent	
Small intestine	−	−	−	
Spleen	−	−	−	Non-specific staining in mononuclear cells
Stomach	−			
Epithelium, mucosa	−	2+ M, C Occational	2+ M, C Rare	
Thyroid	−			
Epithelium, follicules	−	3+ M, C Frequent	2+ M, C Frequent	
Uterus	−	−	−	

Criteria of intensity : −; negative, ±; very fant, +; light, 2+; light-medium, 3+; moderate, 4+; dark

Site of staining : M; membranous, C; cytoplasmic

Criteria of staining frequency : Negative; no labeled cell, Very rare; < 25% and < 50%, Occasional; > 50% and < 75%, Frequent; > 75%

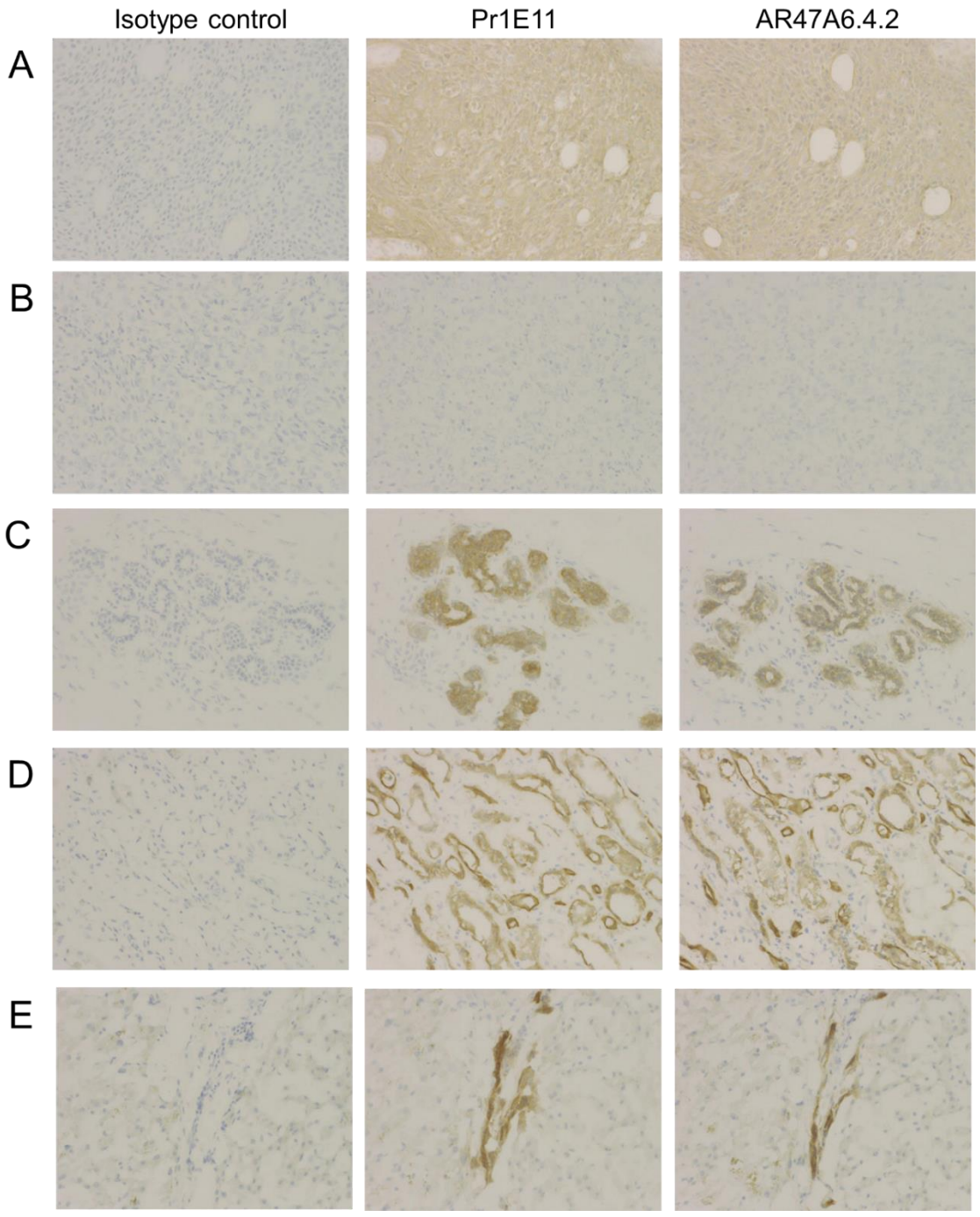


図 2－6. 各種正常組織切片の抗 TROP-2 抗体による染色像（A：BxPC-3 細胞塊、B：PANC-1 細胞塊、C：乳腺、D：腎臓、E：肝臓）

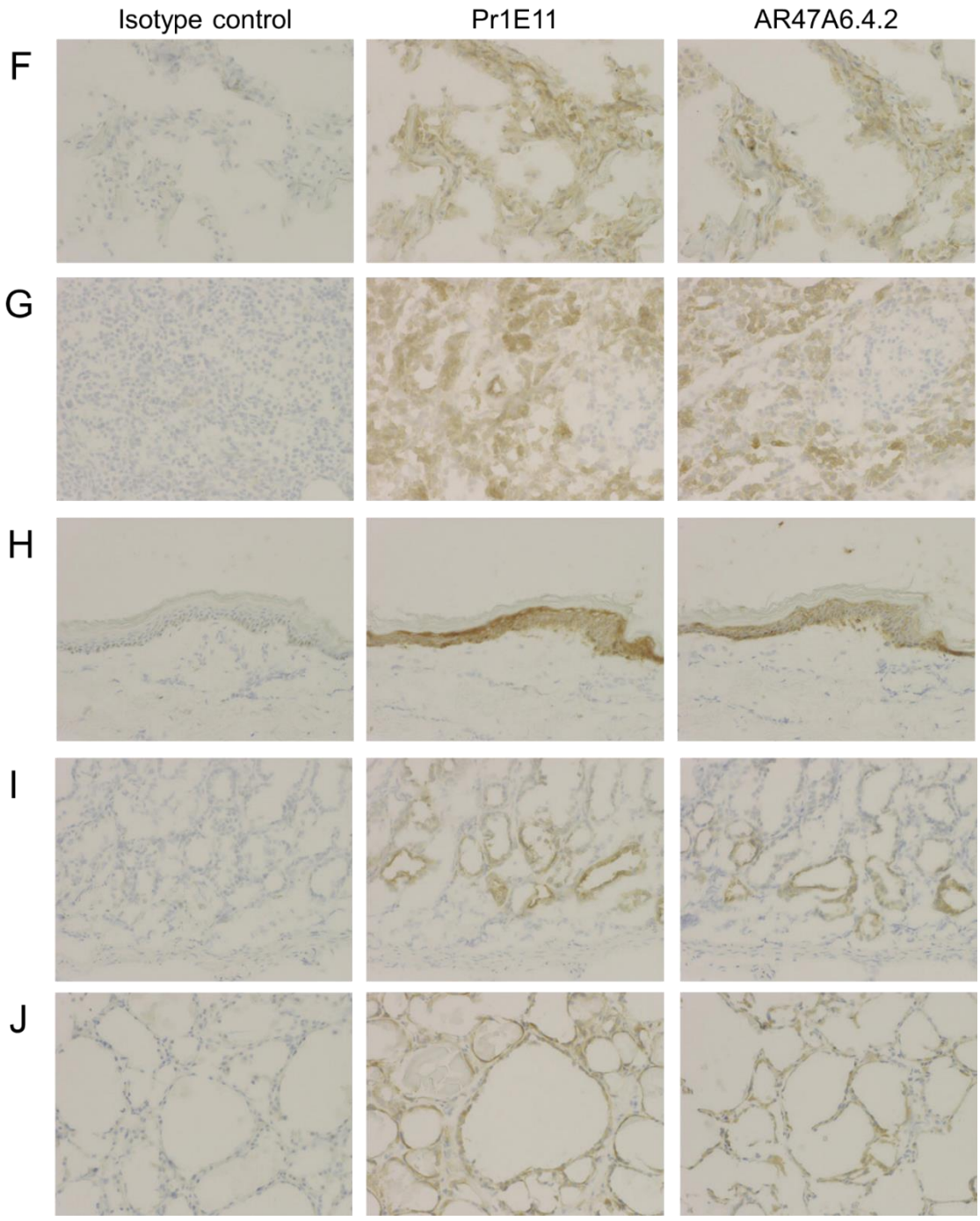


図 2－6（続き）. 各種正常組織切片の抗 TROP-2 抗体による染色像（F：肺、G：膵臓、H：皮膚、I：胃、J：甲状腺）

2-3-4. 親和性解析

抗 TROP-2 抗体の組み換え TROP-2 ECD-Fc タンパク質に対する親和性を、BIACORE T100 を用いた表面プラズモン共鳴解析系により評価した。抗 His タグ抗体を固定化した CM5 センサーチップに His-tagged TROP-2 ECD-Fc タンパク質を capture 後、各種抗 TROP-2 抗体を添加した。得られたセンサーグラムを図 2－7 に示した。

Biacore T100 Evaluation Software にて k_a、k_d 及び K_D を解析した結果、Pr1E11 は比較した他のクローンよりも高い k_a 値と低い k_d 値を示し、K_D 値は 1/10 程度低い値であった（表 2－5)。以上の結果から、Pr1E11 は他のクローンよりも優れた TROP-2 への結合活性を有していることが明らかとなった。

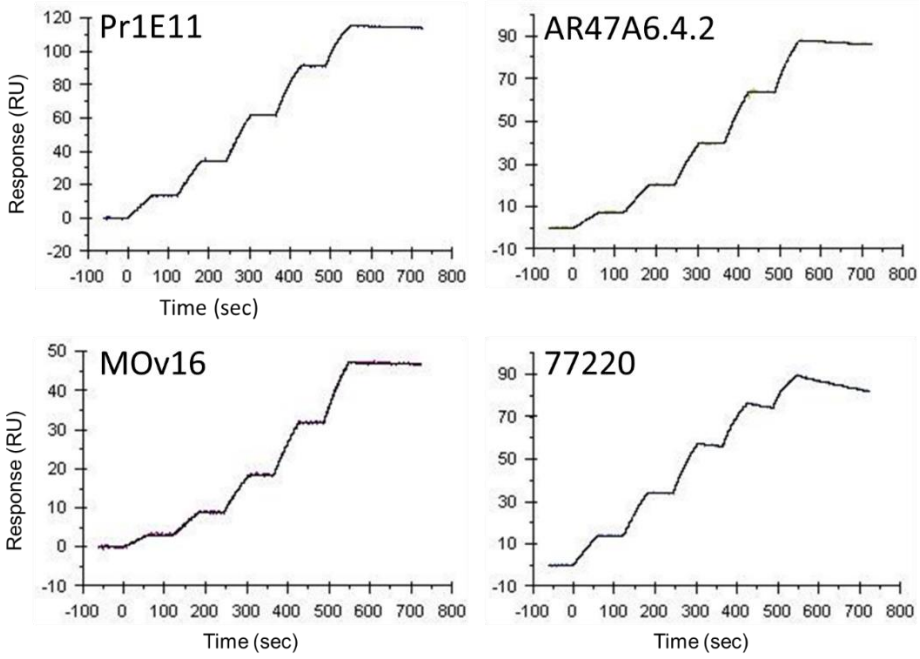


図 2-7. 各種抗 TROP-2 抗体の組み換え TROP-2 タンパク質に対する結合センサーグラム

表 2-5. 各種抗 TROP-2 抗体の反応速度論定数及び解離定数

Clone	k_a (sec^{-1}・M^{-1})	k_d (sec^{-1})	K_D (M)
Pr1E11	4.16×10^{5}	5.80×10^{-5}	1.43×10^{-10}
AR47A6.4.2	2.21×10^{5}	2.18×10^{-4}	1.01×10^{-9}
MOv16	**1.83×10^{5}**	**1.84×10^{-4}**	**9.29×10^{-10}**
77220	5.55×10^{5}	6.10×10^{-4}	1.10×10^{-9}

癌を適応とした naked 型抗体として上市されている抗 HER2 抗体 Herceptin 及び抗 EGFR 抗体 Erbitux の K_D 値はそれぞれ 5×10^{-10} M と 52×10^{-10} M であるが(85, 86)、本試験結果から Pr1E11 がこれら上市されている抗体と遜色ない親和性を有していることが確認された。抗 HER2 抗体の知見では、同一のエピトープを認識する抗体の場合、親和性が高いほど ADCC 活性が向上することが報告されている(87)。ADCC 活性以外にも、高い親和性は CDC 活性や機能阻害活性など他の生物活性におけるエフィカシーやポテンシーの向上につながることが予想されることから、Pr1E11 の高い親和性は医薬品として望ましい性質であると考えられた。

2-3-5. エピトープ解析

Pr1E11 のエピトープが既知のクローンと同一か否かを解析する目的で、膵臓癌細胞株 BxPC-3 に対する AR47A6.4.2 の結合が Pr1E11 又は 77220 で阻害されるかフローサイトメトリーにより解析した。初めに AR47A6.4.2 の濃度を固定し、競合抗体として様々な濃度の Pr1E11 又は 77220 を添加して、AR47A6.4.2 の結合をサブクラス特異的な二次抗体で検出した。その結果、AR47A6.4.2 の結合は Pr1E11 の添加により阻害されなかったのに対し、77220 を添加した場合、濃度依

存的にAR47A6.4.2の結合が低下した（図2－8. A）。また、検出抗体と競合抗体を入れ換えた試験では、77220の結合はAR47A6.4.2の添加によって阻害された一方で、Pr1E11の結合はAR47A6.4.2の添加によって変化しなかった（図2－8. B）。以上の結果から、Pr1E11はAR47A6.4.2及び77220と異なる部位を認識していることが明らかとなった。一方、AR47A6.4.2は77220と近接した部位を認識していると考えられた。

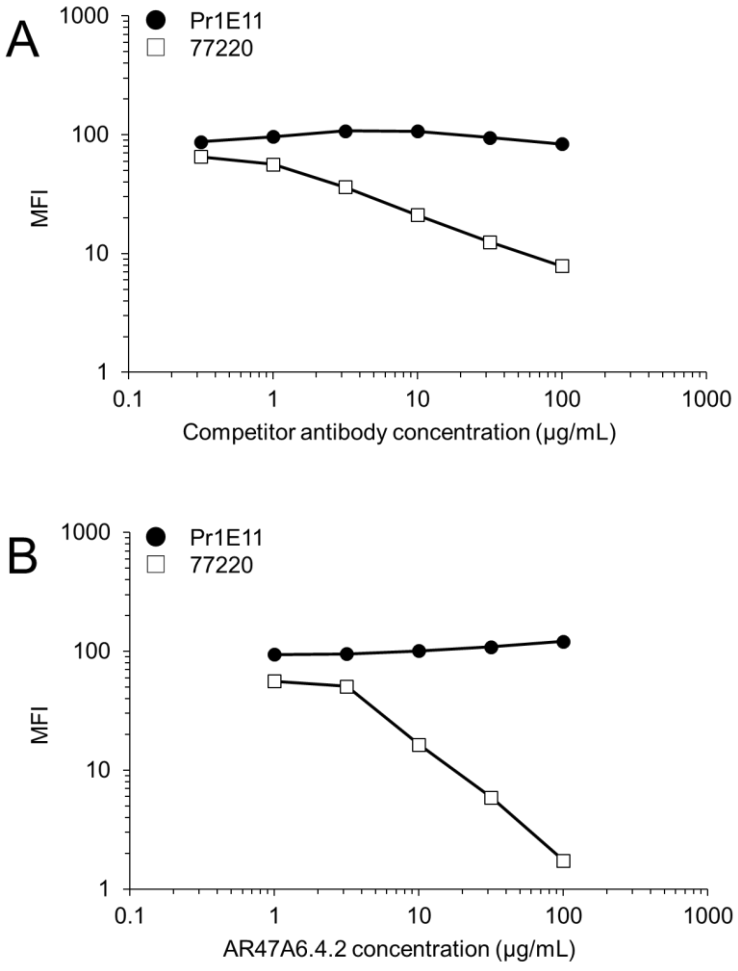


図2－8. フローサイトメトリーによる競合試験(A:AR47A6.4.2に対するPr1E11及び77220の阻害作用、B: Pr1E11又は77220に対するAR47A6.4.2の阻害作用)

続いて、各クローンの結合ドメインを同定する目的で、TROP-2 の細胞外ドメイン全長体(FL)及び 3 種類の細胞外ドメイン欠損変異体(Mut1、Mut2 及び Mut3)をヒト IgG1 由来 Fc に融合した組み換えタンパク質を調製した。得られた精製タンパク質を 3μg/lane 又は 0.3μg/lane にて SDS-PAGE に供し CBB 染色を行った結果、各種変異体タンパク質においてドメイン欠損に伴った分子量の低下が認められ、目的とする変異体が調製されたと判断した（図 2-9）。

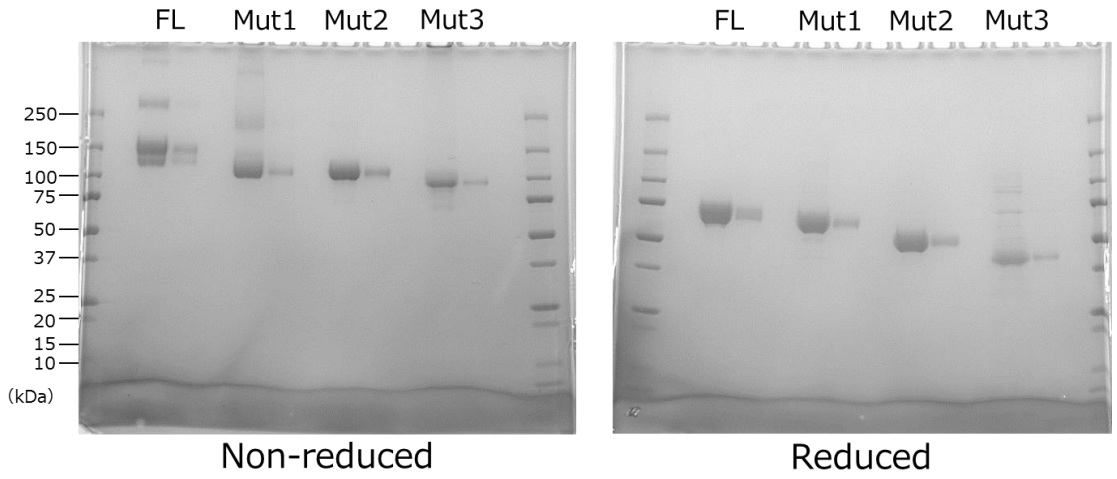


図 2-9. TROP-2 細胞外ドメイン欠損変異体タンパク質の CBB 染色像（左レーン：3 μg/lane、右レーン：0.3 μg/lane）

次に、各種変異体タンパク質に対する抗 TROP-2 抗体の結合をウエスタンブロッティングにより評価した。変異体タンパク質を 0.1 μg/lane にて SDS-PAGE に供し、PVDF 膜に転写後、各種 TROP-2 ECD-FLAG-Fc タンパク質に対する Pr1E11 及び既知の抗 TROP-2 抗体 6 クローンの結合活性を評価した（図 2－10）。その結果、Pr1E11 は FL には結合したものの、その他の変異体タンパク質 3 種に対す

る結合は認められなかった。一方、その他の 6 クローンは FL、Mut1 及び Mut2 に結合したが、Mut3 に対して結合しなかった。以上の結果から、Pr1E11 は CRD に、その他クローンは CPD の N 末端側に結合することが明らかとなった。

前述のフローサイトメトリーによる競合試験から Pr1E11 は AR47A6.4.2 及び 77220 と異なる部位に結合することが予想されたが、細胞外ドメイン欠損変異体タンパク質に対する結合性解析結果から、Pr1E11 は AR47A6.4.2 及び 77220 と結合部位が異なることが明らかとなった。Miotti らは MOv16 と 162-46 は競合することを報告しているが(88)、今回の解析結果から両クローンは共に CPD の N 末端に結合することが明らかとなった。また、Arius Research 社はペプチドマッピング法により AR47A6.4.2 のエピトープを CPD と推定していたが(89)、これは今回の解析で得られた結果と一致していた。

AR47A6.4.2、MOv16 及び 162－46 は Pr1E11 と同様に細胞免疫により得られたクローンであるが、癌細胞結合性を指標に選抜されたクローンである。一方、MM0588-49D6、YY-01 及び 77220 は、スクリーニング方法は不明であるが、組み換えタンパク質免疫により得られたことが明らかとなっている。免疫原やスクリーニング方法が異なる既知の 6 クローン全てが CPD の N 末端側を認識していたことから、該部位は抗原性が高いドミナントエピトープであると考えられた。CRD を認識するクローンは Pr1E11 ただ一つであったことから、該クローンは非常にユニークな部位をエピトープとしていると考えられた。

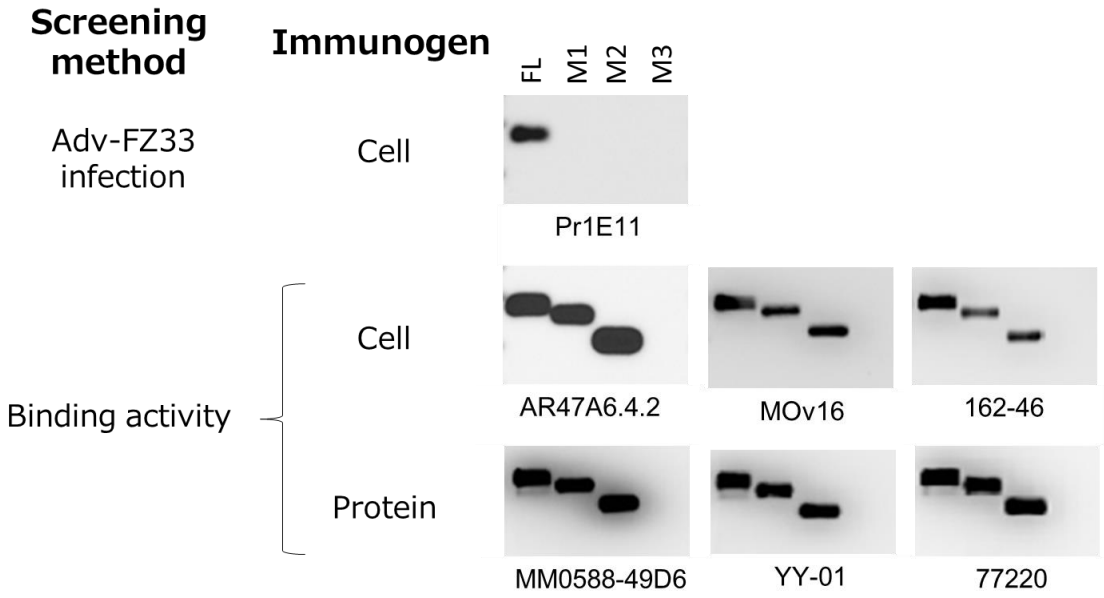


図 2-10. 各種抗 TROP-2 抗体の TROP-2 細胞外ドメイン欠損変異体タンパク質に対する結合評価

2－4. 結言

本章では、Pr1E11 の生化学的特性を解明することを目的に、Pr1E11 の精製抗体を調製し、その細胞結合性、親和性及びエピトープについて解析した。

初めに、ハイブリドーマ培養上清から精製したマウス IgG1 型抗体を用いて、複数の癌細胞株に対する結合性を評価した。その結果、Pr1E11 は AR47A6.4.2 と同様に膵臓癌細胞株 BxPC-3、卵巣癌細胞株 CaOV-3、大腸癌細胞株 Colo-205、乳癌細胞株 MCF-7 に対して強く結合することが確認された。本結果から、上記癌種が Pr1E11 の適応疾患候補に成りえると考えられた。また、Pr1E11 は初代前立腺癌細胞の免疫と、肺癌細胞株 NCI-H322 に対する Adv-FZ33 の感染促進活性を指標に樹立されたクローンであることから、これら癌種の細胞に対しても結合する可能性は極めて高く、前立腺癌と肺癌に対する適応可能性も考えられた。

続いて、キメラ抗体のビオチン化抗体を調製し、正常組織結合性を評価した。癌細胞株細胞塊を用いて染色条件を最適化した後に、凍結正常組織切片アレイを用いて結合性を解析した結果、Pr1E11 は AR47A6.4.2 と同様に膵臓や皮膚など複数の正常組織に対しても強く結合することが明らかとなった。これら正常組織に対する結合は副作用の発現につながる可能性があるため、臨床試験を実施する前には安全性を精査する必要がある。各陽性組織における TROP-2 の発現量や抗体の移行性、並びにエフェクター活性に対する感受性は組織毎に異なることが予想されるため、これらを総合的に考慮した安全性評価試験を実施するべきであろう。

次に、Pr1E11 の TROP-2 に対する親和性を BIACORE にて解析した。複数の抗 TROP-2 抗体と並べて評価した結果、Pr1E11 は他のクローンよりも高い結合速度定数と低い解離速度定数を有しており、解離定数は 1/10 程度と高い親和性を有していることが明らかとなった。Pr1E11 の解離定数は上市している他の抗体医薬品と比べて高いことは無く、臨床応用するうえで問題のない親和性を有していると考えられた。

最後に Pr1E11 のエピトープについて、AR47A6.4.2 との競合試験や、組み換え TROP-2 ECD 欠損変異体タンパク質に対する結合性解析により評価した。フローサイトメトリーによる競合試験の結果、Pr1E11 は AR47A6.4.2 と競合しないことが明らかとなった。従って、Pr1E11 は AR47A6.4.2 とは異なる部位に結合していることが予想された。次にドメイン欠損タンパク質に対する結合性をウエスタンブロット法で評価した結果、Pr1E11 は CRD に結合することが明らかとなった。一方、評価に供した Pr1E11 以外の 6 クローンは全て CPD の N 末端側に結合した。以上の結果から、Pr1E11 は非常にユニークな部位に結合するクローンであるが明らかとなった。

以上より、本章では Pr1E11 の癌細胞結合性及び正常組織結合性を明らかにした。また、Pr1E11 は既知の抗 TROP-2 抗体よりも高い親和性を有し、それらとは異なるエピトープを認識することから、他のクローンとは異質の生物活性を有している可能性が考えられた。

第 3 章
in vitro 抗腫瘍活性の評価

3-1. 緒言

第 2 章では Pr1E11 が既知の抗 TROP-2 抗体とは異なるエピトープに対し、優れた親和性をもって結合することを明らかにした。これらの特徴ある生化学的特性は、Pr1E11 が既知のクローンとは異なる生物活性を有していることを示唆していた。

TROP-2 を標的とした naked 型ヒト IgG1 に期待される抗腫瘍活性としては、NK 細胞やマクロファージなど FcγRIIIa を発現する細胞を介した ADCC 活性、補体カスケードの活性化により標的細胞を殺傷する CDC 活性、及び、TROP-2 の機能阻害に基づいた細胞増殖阻害活性などが挙げられる。

そこで本章では、2 種の上皮癌細胞株に対する Pr1E11 と AR47A6.4.2 の ADCC 活性、CDC 活性及び細胞増殖阻害活性を評価した。各アッセイには 2-2-3 で作製したヒト型キメラ抗体を用いた。

3-2. 材料と方法

3-2-1. ADCC 活性の評価

5 vol% 非働化 FBS（16140089）及び 50 μg/mL gentamicin sulfate を含むフェノールレッド不含 RPMI1640（Gibco, 11835030）を ADCC 活性評価用培地として使用した。キメラ抗体溶液を終濃度の 3 倍濃度となるよう ADCC 活性評価用培地にて調製し、96 穴 U 底プレートに 50 μL/well ずつ分注した。次に、標的細胞として用いる癌細胞株を 0.02 w/v% EDTA にて剥離し、ADCC 活性評価用培地に懸濁して 2×10^5 個/mL の密度に調製し、50 μL/well ずつ分注した。エフェクター細胞には新鮮末梢血より回収した PBMC を用いた。新鮮末梢血は協和発酵キリン株式会社の研究倫理委員会の承認の下、健常人ボランティアより採取されたものを使用した。PBMC の調製は以下の通りに実施した。密度勾配遠心法により PBMC を末梢血より単離するため、健常人末梢血 50 mL を生理食塩水 50 mL と混合して希釈し、10 mL ずつ 4.5 mL の Lymphoprep（Axis-Shield, 1114544）の上に重層した。これを 800×g で室温、30 分間遠心し、PBMC 画分を回収した。これを ADCC 活性評価用培地で洗浄した後、5×10^6 個/mL となるよう ADCC 活性評価用培地で懸濁した。本 PBMC 懸濁液を、抗体溶液と癌細胞株を分注した 96 穴丸底プレートに 50 μL/well ずつ分注し、37℃、5 % CO_2 下で 4 時間インキュベートした。プレートを遠心し、培養上清中の Lactate dehydrogenase（LDH）量を LDH-Cytotoxic test（和光純薬工業, 299-50601）を用いて定量した。560 nm での吸光度を測定し、以下の式により ADCC 活性を算出した。

ADCC 活性（%）＝ （抗体添加時の吸光度 － 標的細胞自然遊離 － エフェクター細胞自然遊離）/（標的細胞全遊離 － 標的細胞自然遊離）× 100

ここで、標的細胞自然遊離はエフェクター細胞を含まない条件、エフェクター細胞自然遊離は標的細胞を含まない条件、標的細胞全遊離はエフェクター細胞を含まない条件でインキュベートし、反応終了 45 分前に 20 μL の Triton X-100 を添加した条件での、560 nm の吸光度である。

3-3-2. CDC 活性の評価

1.4 w/v% BSA 及び 50 μg/mL gentamicin sulfate を含むフェノールレッド不含 RPMI1640 を CDC 活性評価用培地として使用した。Fuc(-)型キメラ抗体溶液を終濃度の 3 倍濃度となるよう CDC 活性評価用培地にて調製し、96 穴平底プレート（住友ベークライト, MS-3096F）に 50 μL/well ずつ分注した。次に、標的細胞として用いる癌細胞株を 0.02 w/v% EDTA にて剥離し、CDC 活性評価用培地に懸濁して 2×10^5 個/mL の密度に調製し、50 μL/well ずつ分注した。乾燥ヒト補体（Sigma-Aldrich, S1764）を滅菌水により溶解した後、CDC 活性評価用培地で 2 倍に希釈して 50 μL/well ずつ分注し、37℃で 2 時間インキュベートした。WST-1 溶液（Roche, 11644807001）を 15 μL/well 添加して 37℃、5 % CO_2 下で 4 時間インキュベートした後、生細胞数として 450 nm での吸光度を測定した。吸光度を用いて、以下の式により CDC 活性を算出した。ここで、ブランク値は培地のみの吸光度である。

CDC 活性（%）=（抗体非添加時の吸光度 - 抗体添加時の吸光度）/（抗体非添加時の吸光度 - ブランク値）×100

3-3-3. 細胞増殖活性に対する影響

10 vol% 非働化 FBS 及び 50 μg/mL gentamicin sulfate を含むフェノールレッド不含 RPMI1640 を細胞増殖抑制活性評価用培地として使用した。Fuc(-)型キメラ抗体溶液を終濃度の 2 倍濃度となるよう細胞増殖抑制活性評価用培地にて調製し、96 穴平底プレートに 50 μL/well ずつ分注した。次に、標的細胞として用いる癌細胞株を 0.02 w/v% EDTA にて剥離し、細胞増殖抑制活性評価用培地に懸濁して 1×10^4 個/mL の密度に調製し、50 μL/well ずつ分注した。37℃、5 % CO_2 下で 5 日間インキュベートした。WST-1 溶液を 10 μL/well ずつ添加して 37℃で 4 時間インキュベートした後、細胞数として 450 nm での吸光度を測定した。吸光度を用いて、以下の式により細胞増殖抑制活性を評価した。ここで、ブランク値は培地のみの吸光度である。

細胞増殖抑制活性（%）=（抗体非添加時の吸光度 - 抗体添加時の吸光度）/（抗体非添加時の吸光度 - ブランク値）× 100

3-3. 結果と考察

3-3-1. ADCC 活性

4 人の健常人ドナーより得た PBMC をエフェクター細胞に、膵臓癌細胞株 BxPC-3 又は大腸癌細胞株 Colo-205 を標的細胞として用い、Fuc(+)型及び Fuc(-)型キメラ抗体の ADCC 活性を評価した（図 3－1)。

BxPC-3 を標的細胞とした場合、Fuc(+)型抗体の ADCC 活性は抗体濃度 100 ng/mL 以上で認められた。一方、Fuc(-)型抗体の場合は抗体濃度 1～10 ng/mL で認められ、最大 ADCC 活性も向上していた。Pr1E11 と AR47A6.4.2 の活性は同程度であった（図 3－1. A)。次に Colo-205 を標的細胞とした場合、Fuc(+)型抗体では ADCC 活性は抗体濃度 10～1000 ng/mL で認められた。一方、Fuc(-)型抗体の場合は抗体濃度 1～10 ng/mL から認められ、最大 ADCC 活性も向上していた。Donor3 の PBMC を用いて Colo-205 に対する ADCC 活性を評価した場合、Fuc(+)型抗体では Pr1E11 のみが ADCC 活性を発揮した。また、Fuc(-)型抗体では Pr1E11 の方が高い ADCC 活性を発揮する傾向が認められた（図 3－1. B)。しかし、その差は僅かなものであった。

以上の結果から、Pr1E11 と AR47A6.4.2 はどちらも癌細胞に対して ADCC 活性を有しているが、その活性は同等であることが明らかとなった。また、両抗体の ADCC 活性は Fuc(-)型抗体を用いることでエフィカシー及びポテンシーが向上することも明らかになった。

ADCC 活性については、Pr1E11 と AR47A6.4.2 のいずれにおいても認められ、TROP-2 を標的とした抗体が ADCC 活性を発揮することが確認された。Colo-205 に

対する ADCC 活性では、Pr1E11 のほうが僅かに高い ADCC を有していることが確認されたが、この差は親和性の差やエピトープの違いが反映された結果だと考えられた。

ADCC 活性は臨床での抗腫瘍活性発揮に大きく寄与していることが報告されている。IgG 由来 Fc 領域の受容体である FcγRIIIa には遺伝子多型があり、Fc に対する親和性が高い 158V 型と、親和性が低い 158F 型が存在する。VV 型又は VF 型の FcγRIIIa を有するドナーでは高い ADCC 活性が発揮される一方、FF 型のドナーでは ADCC 活性が低いことが知られており、抗 HER2 抗体 Herceptin や抗 CD20 抗体 Rituxan の臨床試験では、高親和性型の FcγRIIIa を有する患者群では低親和性型の受容体を有する患者群よりも高い治療効果が得られることが報告されている(90, 91)。Fuc(-)型 IgG1 はいずれの型のドナーに対しても高い ADCC 活性を期待できることから、ADCC 活性を主薬効メカニズムとした抗体医薬品の開発を考えるうえでは、Fuc(-)型 IgG1 が適していると考えられた。

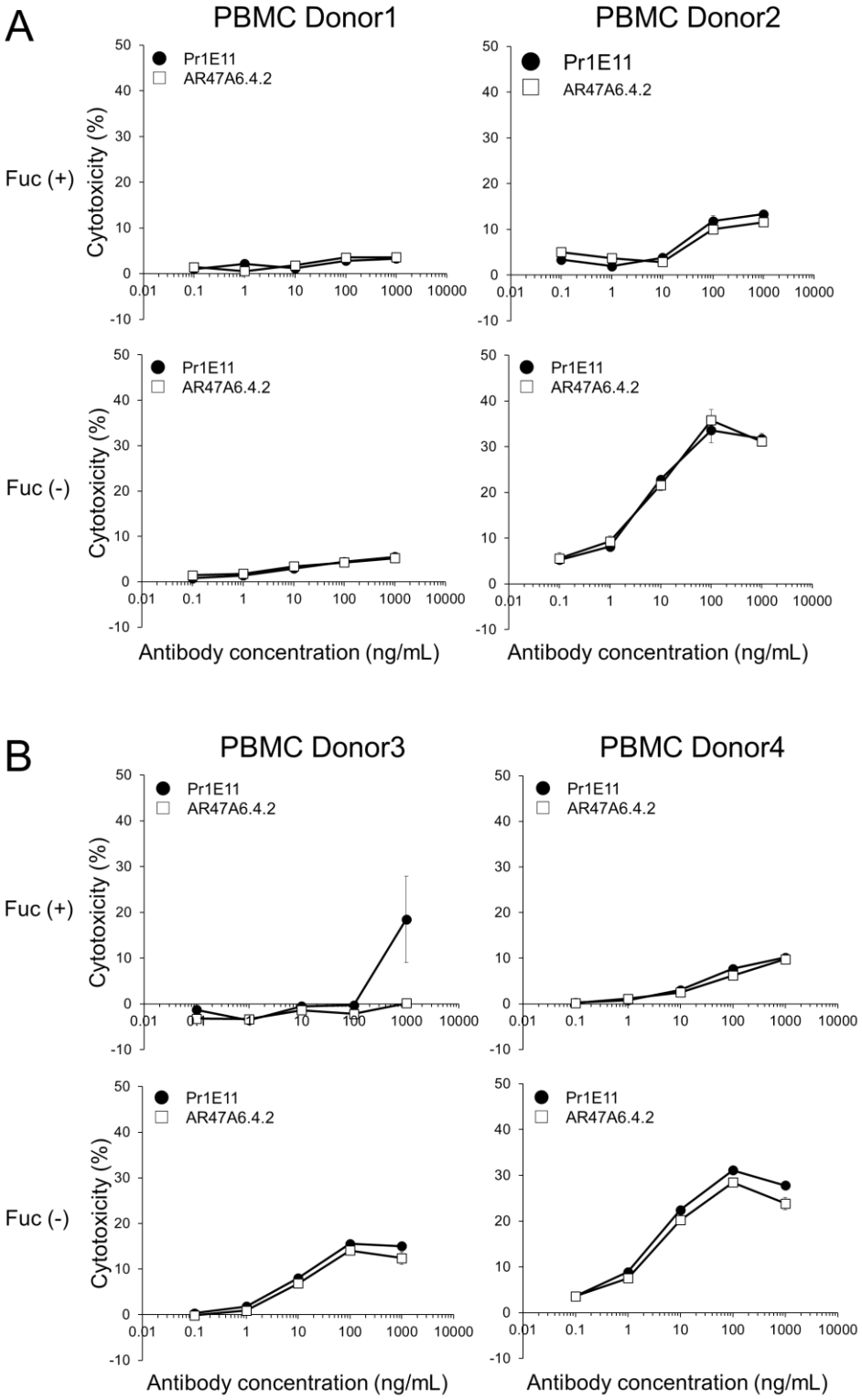


図 3－1. 上皮癌細胞株に対する抗 TROP-2 抗体の ADCC 活性（A：BxPC-3、B：Colo-205）

3-3-2. CDC 活性

膵臓癌細胞株 BxPC-3、大腸癌細胞株 Colo-205 及びヒト TROP-2 発現 CHO/DG44 に対する Pr1E11 と AR47A6.4.2 の CDC 活性をヒト補体成分存在下で評価した(図3－2)。その結果、両クローン共に検討した条件において上皮癌細胞株 2 種に対する CDC 活性は認められなかった。一方、ヒト TROP-2 発現 CHO 細胞に対する CDC 活性は両クローン共に 1 μg/mL 以上添加した場合に認められ、AR47A6.4.2 のほうが Pr1E11 よりも数倍高いポテンシーを示した (data not shown)。

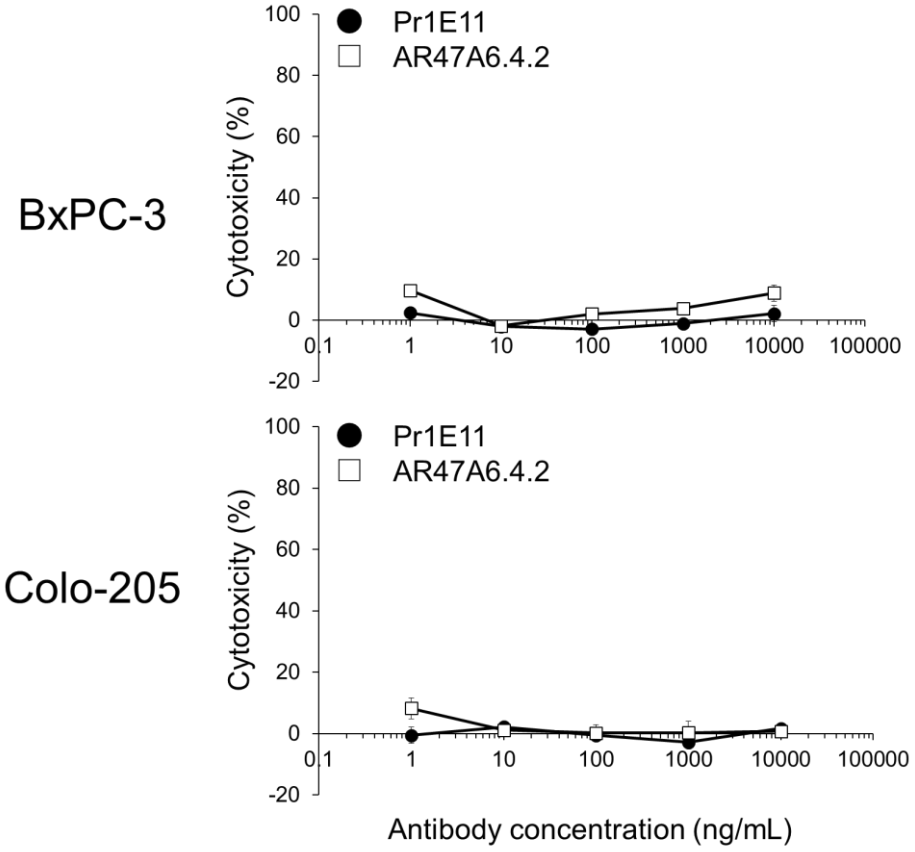


図 3－2. 上皮癌細胞株に対する抗 TROP-2 抗体の CDC 活性

Pr1E11 は評価に用いた癌細胞株に対して CDC 活性は認められなかったが、この原因としては補体制御因子の影響が考えられた。癌細胞では CD55 や CD59 といった補体制御因子が高発現することで、正常細胞よりも CDC 活性が発揮され難いことが知られている(92, 93)。Truong らは AR47A6.4.2 の CDC 活性を報告しているが、該報告ではヒト補体成分よりも高い CDC 活性を発揮することが出来るウサギ補体成分を使用していた(68)。この補体成分の違いが CDC 活性の有無につながったと考えられた。以上のことから、両クローン共に抗腫瘍活性に対する CDC 活性の寄与は小さいと考えられた。一方、両クローン共に TROP-2 発現 CHO/DG44 に対する CDC 活性は認められ、その活性は AR47A6.4.2 の方が高い活性を有していた。CDC 活性は抗体のエピトープの影響を大きく受けることが報告されていることから、これらクローン間での活性の違いはエピトープの違いを反映した結果である可能性があると考えられた。

低い CDC 活性は安全性の観点では望ましい性質だと考えられる。なぜなら、非常に高い CDC 活性を有する抗 HLA-DR 抗体のカニクイザル試験では、CDC 活性に起因した強いインフュージョンリアクション（抗体投与直後に発生する副作用）が発生し、死亡した個体が発生している(94)。TROP-2 は複数の正常組織にも発現していることから過度の細胞傷害活性は副作用を招く可能性があるため、低い CDC 活性はインフュージョンリアクションの懸念の低下につながると考えられた。

3-3-3. 細胞増殖阻害活性

膵臓癌細胞株 BxPC-3 又は大腸癌細胞株 Colo-205 の細胞増殖活性に対する Pr1E11 と AR47A6.4.2 の作用を評価した（図 3－3)。抗 CD20 抗体や抗 TRAIL receptor2 抗体などいくつかの抗体において、二次抗体による抗体の高度な架橋は Fab 依存的生物活性を増強することが報告されている(95, 96)。そこで本試験は抗 TROP-2 抗体単独 [CL(-)]もしくは二次抗体共存下[CL(+)]実施した。その結果、両クローン共にどちらの条件においても、細胞増殖に対する作用はほとんど認められなかった。

既知の抗 TROP-2 抗体 RS7、MOv16 及び 162-42 を用いた TROP-2 の架橋は、細胞内小胞体からのカルシウム放出を正に調節することが報告されている(97)。カルシウム放出は MAPK のリン酸化を促進することから、上記抗 TROP-2 抗体は細胞増殖を促進する可能性が考えられた。一方、MOv16 や 162-42 と同じ部位を認識する AR47A6.4.2 は血清刺激による MAPK リン酸化の阻害作用や細胞増殖阻害作用が報告されており(68)、抗 TROP-2 抗体の細胞増殖に対する作用は培養条件やクローンの生化学的特性により異なることが予想された。いずれにせよ、最も重要な点は上記活性が *in vivo* における抗腫瘍活性に寄与するか否かであることから、本活性の有無は *in vivo* 試験で精査する必要があると結論付けた。

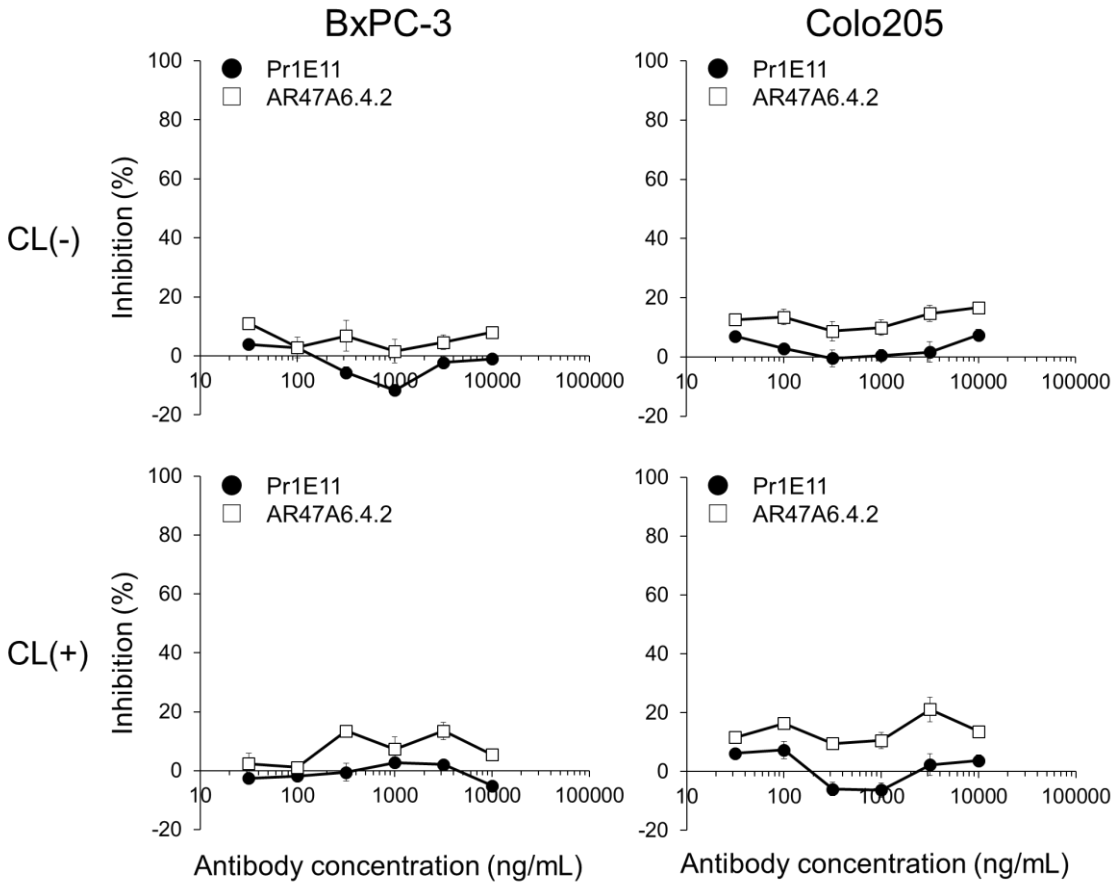


図 3－3. 上皮癌細胞株に対する抗 TROP-2 抗体の細胞増殖阻害活性（CL(-)：抗 TROP-2 抗体単独時の細胞増殖阻害活性、CL(+)：二次抗体共存下での細胞増殖阻害活性）

3-4. 結言

本章では、Pr1E11 の抗腫瘍活性メカニズムを解明することを目的に、*in vitro* における ADCC 活性、CDC 活性及び細胞増殖阻害活性を評価した。標的細胞には膵臓癌細胞株 BxPC-3 と大腸癌細胞株 Colo-205 を用い、比較対象には AR47A6.4.2 を用いた。

初めにヒト新鮮血より単離した PBMC を用いて、ADCC 活性を評価した。その結果、Pr1E11 は 2 種の標的細胞に対して ADCC 活性を発揮し、そのエフィカシー及びポテンシーは Fuc(-)型抗体を用いることで増強した。Pr1E11 と AR47A6.4.2 の ADCC 活性は同等であった。ADCC 活性は臨床での薬効発揮に大きく寄与すると考えられていることから、ADCC 活性が観察されたことは naked 型抗がん抗体医薬品を目指すうえでは望ましい結果であった。

次にヒト補体成分を用いて CDC 活性を評価した。その結果、両クローン共に癌細胞株に対して CDC 活性を発揮することは出来なかった。癌細胞は補体制御因子を高発現することで CDC 活性に対する耐性を有する場合があり、これが原因で CDC 活性が認められない可能性が考えられた。

最後に細胞増殖阻害活性を評価した。抗 TROP-2 抗体単独又は二次抗体共存下で評価を行ったが、いずれの条件においても両クローンに増殖阻害活性は認められなかった。抗 TROP-2 抗体の Fc 非依存的な生物活性は培養環境に依存することが考えられるため、この点についてはマウス担癌モデルを用いて精査する必要があると考えられた。

以上の結果から、Pr1E11 は ADCC 活性を有しており、その活性は Fuc(-)型抗体を用いることで増強されることが明らかとなった。従って、naked 型抗体として高い抗腫瘍活性を発揮するためには、Fuc(-)型抗体フォーマットを採用する必要があると考えられた。

第 4 章

in vivo 抗腫瘍活性の評価

4-1. 緒言

第3章ではPr1E11とAR47A6.4.2の*in vitro*におけるADCC活性、CDC活性及び細胞増殖阻害活性を評価した。その結果、Pr1E11はADCC活性のみを発揮し、その活性はAR47A6.4.2と同程度であることが明らかとなった。ここで、実施した各種*in vitro*試験は数時間から数日間の短期的な試験であるため、弱い活性や僅かな差は系の感度によっては検出できないことが考えられる。また、Fc非依存的な活性としては細胞増殖阻害活性のみを評価したが、TROP-2は細胞遊走や足場非依存的生存活性などへの関与も報告されていることから、増殖阻害活性以外のメカニズムで抗腫瘍活性を発揮することも考えられた。さらに、*in vitro*試験は生体内での血中半減期や体内分布などの影響は受けないことも、考慮する必要があった。

そこで本章では、SCIDマウス担癌モデルを用いて、Pr1E11とAR47A6.4.2の*in vivo*治療的効果を評価した。但し、いずれの場合も、高いADCC活性が期待されるFuc(-)型キメラ抗体と、エフェクター活性を発揮しないマウスIgG1型抗体を用いた(98, 99)。また、抗腫瘍活性のメカニズムを考察する目的で、*in vitro*におけるPr1E11とAR47A6.4.2の細胞表面結合持続性も評価した。

4-2. 材料と方法

4-2-1. 組み換えマウス IgG1 型抗体の調製

2-2-3 で作製した Pr1E11 と AR47A6.4.2 のヒト型キメラ抗体発現ベクターを鋳型として用い、表 4-1 に記載のプライマーを用いて可変領域の増幅を行った。下線部はマウス IgG1 抗体発現ベクターに組み入れるための制限酵素認識配列（*Not* I、*Bam*H I、*Eco*R I、*Hpa* I）を示した。

表 4-1. マウス IgG1 型抗体発現ベクター作製用プライマー

Primer	Sequence
VH_FW	5’-GAAAAAAGCGGCCGCTGAACACACTGACTCTAACCATG-3’
Pr1E11_VH_RV	**5’-AGCGGATCCAGGGGCCAGTGGATAGACAGATGGGGGTGTCCGTT TTGGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCCTTGAC-3’**
AR47A6.4.2_VH_RV	5’-AGCGGATCCAGGGGCCAGTGGATAGACAGATGGGGGTGTCCGTT TTGGCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTGCG-3’
VL_FW	5’- CCGGAATTCAGACAGGCAGGGGAAGCAAGATG-3’
Pr1E11_VL_RV	5’-GATGTTAACTGCTCACTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGG TGCAGCATCAGCCCGTTTTATTTCCAGCTTGGTCCC-3’
AR47A6.4.2_VL_RV	5’-GATGTTAACTGCTCACTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGG TGCAGCATCAGCCCGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC-3’

得られた PCR 産物を TOPO blunt Cloning Kit (Invitrogen, 450245) によりクローニングした後に塩基配列を決定し、目的の配列が得られていることを確認した。Pr1E11 及び AR47A6.4.2 の VL 配列を含むプラスミドと、マウス IgG1 の定常領域配列を含む哺乳類細胞発現用プラスミドを *Eco*R I 及び *Hpa* I により切断した後にアガロースゲル電気泳動を行い、それぞれ目的の遺伝子断片を抽出した。この断片同士をライゲーションして各抗体軽鎖可変領域を含むプラスミ

ドを得た。挿入した各抗体 VL の塩基配列を確認した後に、本プラスミドと各抗体 VH 配列を含むプラスミドを *Not* Ⅰ及び *Bam*H Ⅰにより切断した後にアガロースゲル電気泳動を行い、それぞれ目的の遺伝子断片を抽出した。この断片同士をライゲーションして VL と VH を含む哺乳類細胞用マウス IgG1 型抗体発現プラスミドを取得した。挿入した各抗体 VH の塩基配列を確認した後に、HiSPeed Plasmid Maxi kit (QIAGEN, 12643) にて目的プラスミドの調製を行った。得られたプラスミドを用いて 2-2-3 に記載の方法でマウス IgG1 型抗体発現 CHO/DG44 を樹立した。各種マウス IgG1 型抗体は HiTrap Protein G HP (GE Healthcare, 17040501) を用いて各培養上清から精製した。

4-2-2. SCID マウス担癌モデルでの抗腫瘍活性評価

BxPC-3 細胞あるいは Colo-205 細胞を 0.02 w/v% EDTA 溶液により剥離して PBS に懸濁し、5×10^7 個/mL の密度の懸濁液を調製した。本細胞懸濁液を 5～6 週齢の雄性 C.B17/Icr-scid Jcl マウスの右腋下部の皮下に 100 μL 注入した。BxPC-3 担癌モデルでは細胞注入 6 日後、Colo-205 担癌モデルでは細胞注入 5 日後に各群の腫瘍体積が等しくなるよう群分けし (BxPC-3: 各群 6 匹、Colo-205: 各群 5 匹) 、この日より PBS にて 1 mg/mL の濃度に調製した抗 TROP-2 抗体溶液を 2 回/週で 4 週間、200 μL/head (約 10 mg/kg) で腹腔内投与した。投与開始日より腫瘍の長径及び短径を週 2 回計測し、経過を観察した。腫瘍体積の算出には、以下の式を用いた。

腫瘍体積（mm^3） = ［長径（mm）］ × ［短径（mm）］^{2} × 0.5

抗体投与群における腫瘍体積を PBS 投与群における腫瘍体積で除した値を算出し、本値の評価期間中の最小値（T/C_{min}）を治療効果の指標として用いた。SCID マウス担癌モデルでの抗腫瘍活性評価の結果について、PBS 投与群と各抗 TROP-2 抗体投与群との比較、AR47A6.4.2 投与群と Pr1E11 投与群との比較を行った。検定は統計解析ソフト SAS（SAS Institute, Release 9.1.3）を用いて行った。$p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

4-2-3. 内在化活性の評価

肺癌細胞株 NCI-H322 を 0.02 w/v% EDTA 溶液により剥離し、PBS にて洗浄した後、BSA-PBS にて 1×10^6 個/mL の密度の細胞懸濁液を調製した。本細胞懸濁液を 96 穴丸底プレートに 100 μL/well ずつ分注した後、氷上にて 30 分間ブロッキングを行った。プレートを 4℃、1500rpm で 3 分間遠心して上清を除いた後、Fuc (-) 型キメラ抗体を 10 μg/mL 含む BSA-PBS を 100 μL/well 加えて混合し、氷上で 1 時間インキュベートした。次に、プレートを 4℃、1500 rpm で 3 分間遠心して上清を除いた後、200 μL の BSA-PBS で洗浄し、5 vol% FBS、50 μg/mL gentamicin sulfate を含むフェノールレッド不含 RPMI1640 を 200 μL/well ずつ加えて一定時間インキュベートした。0.05 w/v% NaN_3 を加え、プレートを 4℃、1500 rpm で 3 分間遠心して上清を除いた後、200 μL/well の BSA-PBS で洗浄し、FITC 標識ヤギ抗ヒト IgG を 10 μg/mL 含む BSA-PBS を 100 μL/well ずつ加えて混合し、氷上で 30 分間インキュベートした。さらにプレートを 4℃、1500

rpm で 3 分間遠心して上清を除いた後、200 μL/well の BSA-PBS で洗浄し、PBS を 200 μL/well ずつ加えて混合した。細胞上の蛍光強度をフローサイトメーターCytomics FC MPL により測定した。

4-3. 結果と考察

4-3-1. 組み換えマウス IgG1 型抗体の調製

Pr1E11 及び AR47A6.4.2 のマウス IgG1 型抗体発現ベクターを導入した CHO 細胞の培養上清から、HiTrap Protein G HP を用いて抗体を精製した。得られた精製抗体の CBB 染色像を図 4-1 に示した。いずれの精製抗体も還元状態で泳動した場合は重鎖（約 50 kDa）と軽鎖（約 25 kDa）に相当するバンドのみが認められた。一方、非還元状態では 200 kDa 付近に IgG 分子に相当する明確なバンドが認められた。本結果から、両クローン共に高純度の精製抗体が得られたと判断した。得られた抗体の結合活性をフローサイトメトリーにより測定し、キメラ抗体と同等の結合活性を有することを確認した（data not shown)。

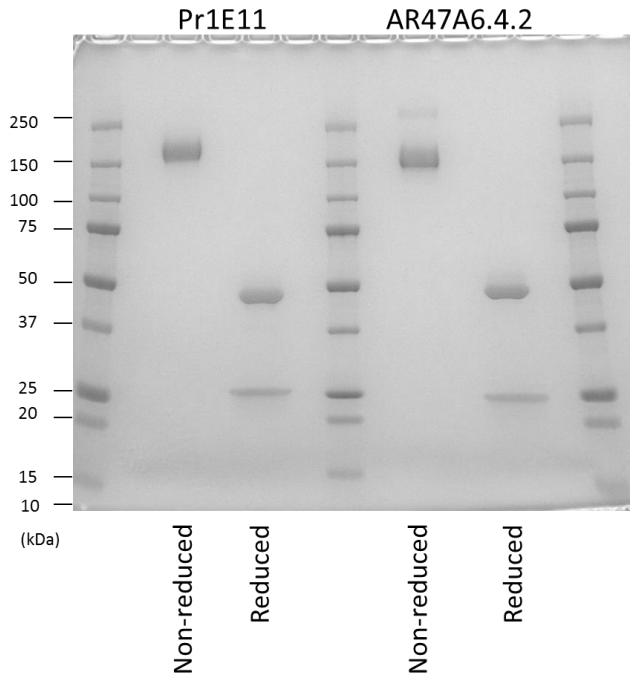


図 4-1. 組み換えマウス IgG1 型抗体の CBB 染色像

4-3-2. Fuc(-)型キメラ型抗体の *in vivo* 抗腫瘍活性

膵臓癌細胞株 BxPC-3 又は大腸癌細胞株 Colo-205 を用いた SCID マウス担癌モデルで Fuc(-)型キメラ抗体の抗腫瘍活性を評価した（図 4-2）。その結果、BxPC-3 担癌モデルにおいて、Pr1E11 は腫瘍の増殖を抑制し［T/C_{min} = 0.36（移植後 36 日後）］、PBS 投与群に対して有意な差が認められた。一方、AR47A6.4.2 も腫瘍の増殖を抑制したものの[T/C_{min} = 0.47（移植 36 日後）]、その度合いは Pr1E11 よりも弱く、PBS 投与群に対して有意な差は認められなかった。Colo-205 担癌モデルにおいても、Pr1E11 は PBS 投与群と比較して有意に腫瘍の増殖を抑制した［T/C_{min} = 0.29（移植 44 日後）］。一方、AR47A6.4.2 も PBS 投与群に対して腫瘍の増殖を抑制したが[T/C_{min} = 0.48（移植 44 日後）]、Pr1E11 よりも作用は弱く、有意差は認められなかった。いずれの担癌モデルにおいても Pr1E11 投与群と AR47A6.4.2 投与群で統計学的に有意な差は認められなかったものの、Pr1E11 投与群の T/C_{min} 値は AR47A6.4.2 投与群よりも小さい値を示したことから、Pr1E11 は AR47A6.4.2 よりも優れた *in vivo* 抗腫瘍活性を有している可能性が高いと考えられた。

両担癌モデルにおいて、Pr1E11 は AR47A6.4.2 よりも優れた抗腫瘍活性を示す傾向が認められた。*In vitro* 試験において Pr1E11 と AR47A6.4.2 は ADCC 活性のみを発揮し、そのエフィカシー及びポテンシーはほぼ同等であったことから、Pr1E11 の優れた *in vivo* 抗腫瘍活性には ADCC 活性以外の因子が関与していると考えられた。

両クローン共に、抗腫瘍活性は BxPC-3 担癌モデルよりも Colo-205 担癌モデルで強く認められる傾向があった。2-3-1 の結果から、両クローンの Colo-205 に対する抗体結合量は BxPC-3 に対するものよりも僅かに低いことが確認できた。また、*In vitro* 試験において、両クローンの Colo-205 と BxPC-3 に対する ADCC 活性は同等であったことから、Colo-205 担癌モデルに対する高い抗腫瘍活性も、抗体の結合量や ADCC 活性以外の因子が関与していると考えられた。

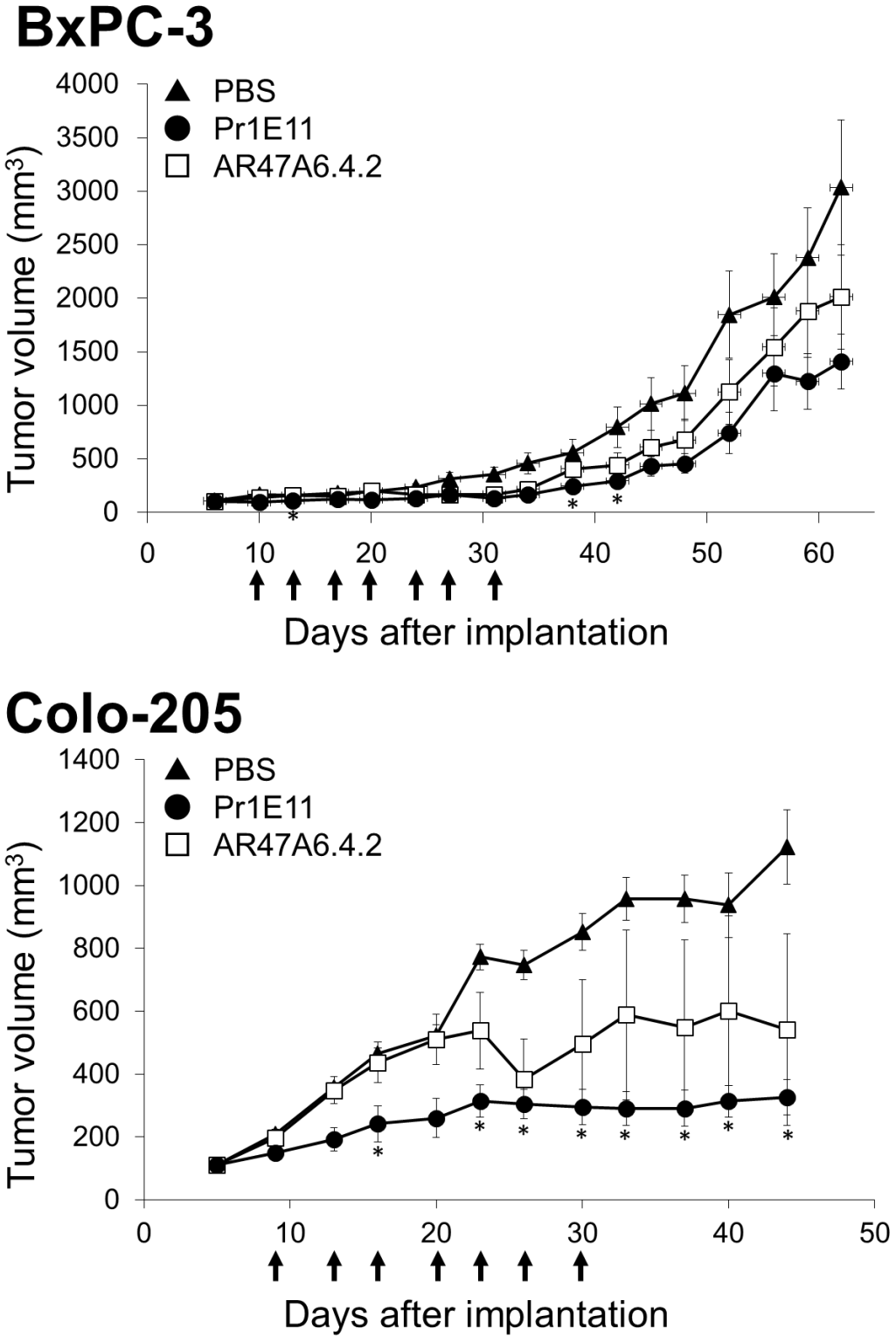


図 4-2. SCID マウス担癌モデルにおける Fuc(-)型抗体の *in vivo* 抗腫瘍活性

（↑：抗体投与、＊：$p < 0.05$）

4-3-3. マウス IgG1 型抗体の *in vivo* 抗腫瘍活性

Pr1E11 と AR47A6.4.2 の *in vivo* 抗腫瘍活性メカニズムを解明することを目的に、大腸癌細胞株 Colo-205 を用いた SCID マウス担癌モデルにて、マウス IgG1 型抗体の抗腫瘍活性を評価した（図 4-3)。比較対象には Fuc(-)型キメラ抗体を用いた。

Pr1E11 の比較試験において、Fuc(-)型キメラ抗体投与群は PBS 投与群に対して有意に腫瘍の増殖を抑制した［T/C_{min} = 0.30（移植後 44 日後)]。一方、全観察期間において、マウス IgG1 型抗体投与群に抗腫瘍効果は認められなかった。同様に、AR47A6.4.2 の比較試験においても Fuc(-)型キメラ抗体投与群は PBS 投与群に対して有意な抗腫瘍効果を示したのに対し[T/C_{min} = 0.46(移植 43 日後)]、マウス IgG1 型抗体投与群に抗腫瘍効果は認められなかった。

両クローン共にマウス IgG1 型抗体に *in vivo* 抗腫瘍活性は認められなかったことから、Fuc(-)型キメラ抗体の *in vivo* 抗腫瘍活性は Fc を介したエフェクター活性に大きく依存していることが明らかとなった。第三章において、両クローンは *in vitro* では ADCC 活性のみを発揮したことと併せると、ヒト型キメラ抗体の *in vivo* 抗腫瘍活性は ADCC 活性に大きく依存していると考えられた。すなわち、*in vivo* 環境では Pr1E11 は何らかの要因により、AR47A6.4.2 よりも高い ADCC 活性を発揮している可能性が高いと考えられた。

AR47A6.4.2 は *in vitro* において細胞増殖阻害作用や MAPK のリン酸化阻害効果を発揮することが報告されていたが、3-3-3 の結果では細胞増殖阻害効果は確認できていない。マウス IgG1 型 AR47A6.4.2 の *in vivo* 抗腫瘍効果も認められ

ていないことから、AR47A6.4.2 のエフェクター活性非依存的な抗腫瘍活性の *in vivo* 抗腫瘍活性に対する寄与は無い、もしくは非常に小さいと考えられた。

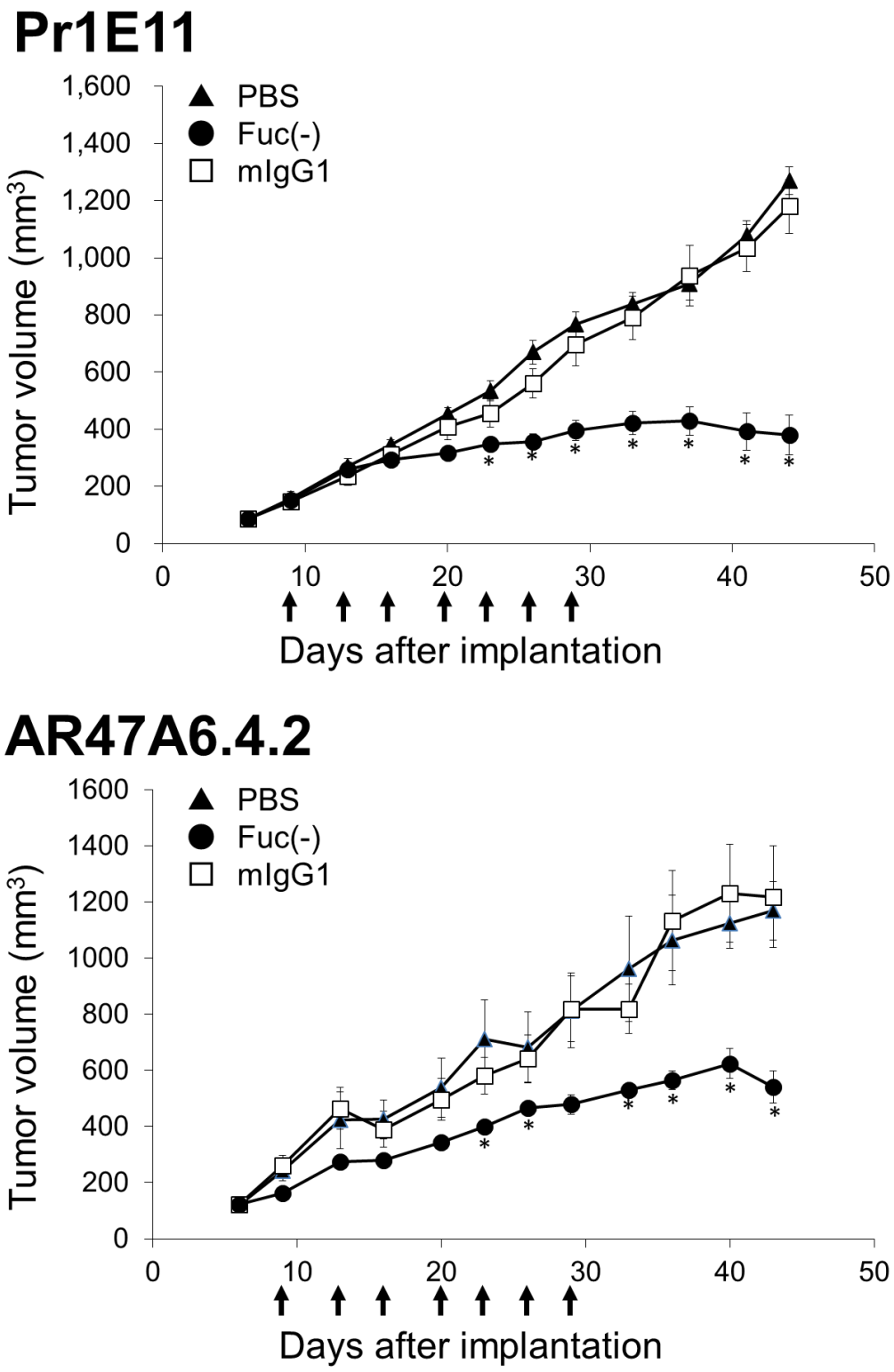


図 4-3. SCID マウス担癌モデルにおけるマウス IgG1 型抗体の *in vivo* 抗腫瘍活性（↑：抗体投与、＊：$p < 0.05$）

4-3-4. 細胞表面結合持続性の評価

SCID マウス担癌モデルにおいて、Pr1E11 は AR47A6.4.2 よりも優れた抗腫瘍活性を示したが、この差が何に起因しているのかは明らかではない。ここで、非常に高い内在化能を有している抗 TROP-2 抗体 RS7 は *in vitro* では ADCC 活性を発揮するが、SCID マウス担癌モデルでは抗腫瘍活性を発揮できないことが報告されている(60, 80)。そこで、Pr1E11 の優れた *in vivo* 抗腫瘍活性に内在化活性が寄与しているか考察するため、Pr1E11 と AR47A6.4.2 の細胞表面結合持続性を解析した。すなわち、細胞表面上に維持された抗体結合量が多いほど、内在化活性は低いと考えられる。

肺癌細胞株 NCI-H322 に Pr1E11 又は AR47A6.4.2 を添加し氷上で十分に反応後、37℃で最大 3 時間培養することで細胞表面に結合している抗体の内在化を促した（図 4-4)。その結果、両クローン共に培養時間に比例して細胞表面抗体量が減少していくことが確認された。3 時間培養後の細胞表面抗体量は、Pr1E11 のほうが AR47A6.4.2 よりも有意に高値を示した。以上の結果から、Pr1E11 は AR47A6.4.2 よりも低い内在化能を有していると考えられた。

Yamaguchi らは ADC (Antibody-drug conjugate) 用抗体の効率的なスクリーニング方法を目的として、ジフテリアトキシンと抗体結合タンパク質プロテイン G から成る毒素 DT3C を用いた新規抗体スクリーニング方法を報告している(81)。DT3C は抗体と複合体を形成し、抗体を介して細胞内に取り込まれることで標的細胞を殺傷することから、抗体-DT3C 複合体の細胞死誘導活性を評価することで、高内在化活性クローンを選抜することが出来る。該報告において、Yamaguchi ら

は Pr1E11 又は 77220 を用いて抗体-DT3C 複合体を調製し細胞死誘導活性を評価したところ、77220-DT3C 複合体は細胞死を強く誘導したのに対し、Pr1E11-DT3C 複合体は、細胞死を誘導しなかった。本結果は Pr1E11 の内在化活性が低いことを示しており、今回得られた結果と一致している。

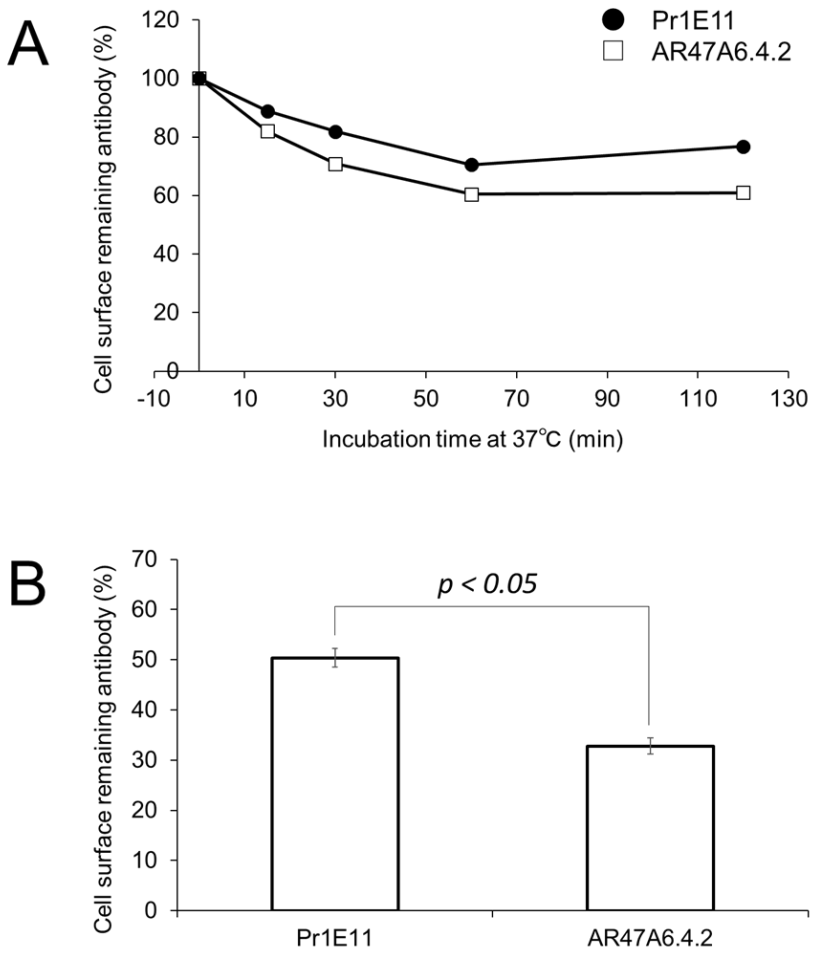


図 4-4. 抗 TROP-2 抗体の細胞表面結合持続性（A：継時変化、B：180 分間培養後）

内在化は細胞表面に存在する抗原・抗体複合体の消失を引き起こすため ADCC 活性を減弱させることが予想されるが、その度合いは癌細胞周辺に存在するエフェクター細胞の量や作用時間の影響を大きく受けると考えられる。すなわち、3-2-1 で実施した *in vitro* ADCC 試験ではアッセイ時間が 4 時間と短く、エフェクター細胞も豊富に存在していたことから、ADCC 活性に対する内在化の影響は比較的小さかったと考えられた。一方、*in vivo* 試験はアッセイ時間が数週間と長いことや、腫瘍に浸潤しているエフェクター細胞が比較的少ないことから、ADCC 活性に対する内在化の影響は大きくなると考えられた。加えて、内在化活性が高い抗体は腫瘍細胞により持続的に取り込まれることで、腫瘍部位での抗体濃度の低下や、血中半減期が低下することも報告されている(100, 101)。以上のことから、高い内在化活性は総合的にエフェクター活性による *in vivo* 抗腫瘍活性を減弱させることが考えられた。本仮説の妥当性を検証するためには、*in vivo* 試験において、抗体投与後に腫瘍細胞塊における TROP-2 発現量の変化や抗体の取り込み、及び抗体の血中半減期などを経時的に解析する必要があるだろう。

4-4. 結言

本章では、Pr1E11 の naked 型癌治療抗体としてのポテンシャルを明らかにすることを目的に、Fuc(-)型キメラ抗体の *in vivo* 抗腫瘍活性を SCID マウス担癌モデルで評価した。また、*in vivo* 抗腫瘍活性に対する Fc 非依存的活性の寄与を評価することを目的に、マウス IgG1 型抗体の *in vivo* 抗腫瘍活性を評価した。さらに、*in vivo* 抗腫瘍活性メカニズムを考察することを目的に、*in vitro* における抗体の内在化活性を測定した。

初めに Fuc(-)型キメラ抗体の *in vivo* 抗腫瘍活性を BxPC-3 担癌モデル及び Colo-205 担癌モデルで評価した。その結果、両モデルにおいて、Pr1E11 投与群及び AR47A6.4.2 投与群は抗腫瘍活性を発揮し、その活性は Pr1E11 投与群のほうが高い傾向にあることが明らかとなった。

続いて、Fuc(-)型キメラ抗体に認められた抗腫瘍活性がエフェクター活性に因るものかを明らかにするため、両クローンのマウス IgG1 型抗体を調製し、その *in vivo* 抗腫瘍活性を Colo-205 担癌モデルで評価した。その結果、Pr1E11 と AR47A6.4.2 共に、マウス IgG1 型抗体では抗腫瘍活性は認められなかった。本結果及び第 3 章の結果から、Pr1E11 と AR47A6.4.2 の Fc 非依存的活性の寄与は無い、もしくは非常に小さく、*in vivo* 抗腫瘍活性は ADCC 活性に大きく依存していることが明らかとなった。

最後に、Pr1E11 及び AR47A6.4.2 の内在化活性を評価することを目的に、両クローンの細胞表面結合持続性を解析した。その結果、両クローン共に 37℃での培養時間の増加と共に、細胞表面上の抗体結合量が減少し、その度合いは

AR47A6.4.2 のほうが Pr1E11 よりも有意に高かった。本結果から、Pr1E11 の内在化活性は AR47A6.4.2 よりも低いと考えられた。抗体の内在化は ADCC 活性や腫瘍内抗体濃度に対して負に働くことが考えられることから、Pr1E11 の高い *in vivo* 抗腫瘍活性は、低い内在化活性に起因している可能性が十分にあると考えられた。

以上の結果から、Pr1E11 は AR47A6.4.2 よりも高い *in vivo* 抗腫瘍活性を有していることが明らかとなった。Pr1E11 はこれまでに報告されている naked 型抗 TROP-2 抗体の中で最も高い *in vivo* 抗腫瘍活性を有するクローンだと考えられた。マウス IgG1 型抗体の活性評価から、Pr1E11 の *in vivo* 抗腫瘍活性は ADCC 活性に大きく依存していることが確認された。さらに内在化活性の評価から、Pr1E11 の優れた *in vivo* 抗腫瘍活性は低い内在化活性に起因していることが示唆された。

第 5 章

総括

第 1 章は序論であり、本研究の背景と目的を述べた。抗体は高い親和性と優れた特異性をもって標的分子に結合し、多様なメカニズムで生物活性を発揮することが出来る。また、血清中での安定性も高く、血中半減期も長いことから、医薬品のフォーマットとして魅力的な性質を有している。近年、抗体を利用した医薬品が多数承認されているが、固形癌を対象とした抗体医薬品は依然ニーズが高く、新たな抗体医薬品の開発が求められていた。そこで本研究では、ファイバー改変アデノウイルス Adv-FZ33 を用いた抗体スクリーニングにて取得された抗 TROP-2 抗体 Pr1E11 の生化学的特性及び抗腫瘍活性を評価し、Pr1E11 の抗癌抗体医薬品としての可能性を検証することを目的とした。

第 2 章では Pr1E11 の精製抗体を調製し、その生化学的特性を解析した。初めに細胞結合性を評価した結果、Pr1E11 は既知の抗 TROP-2 抗体 AR47A6.4.2 と同様に多様な癌種に強く結合することが確認された。一方、Pr1E11 は複数の正常組織に対しても結合したことから、臨床応用する場合は正常組織に対する作用に注意する必要が考えられた。次に、BIACORE を用いて反応速度論定数と解離定数を解析した。その結果、Pr1E11 は高い k_a 値と低い k_d 値を有しており、比較した他のクローンよりも数倍低い K_D 値を有していた。Pr1E11 の K_D 値は上市されている抗体医薬品と遜色ないことからも、Pr1E11 は優れた親和性を有するクローンであることが明らかとなった。最後に Pr1E11 のエピトープをフローサイトメトリーによる競合試験及びウエスタンブロット法による組み換え細胞外ドメイン欠損変異体タンパク質に対する結合性評価により解析した。競合試験の結果、Pr1E11 は AR47A6.4.2 と異なる部位を認識することが示唆された。ドメイン欠損

変異体に対する結合性解析結果から、Pr1E11 は CRD に、その他 6 クローンは CPD の N 末端側に結合することが明らかとなった。以上の結果から、Pr1E11 は既知のクローンとは異なるユニークな部位に結合することが明らかとなった。

第 3 章では、Pr1E11 の抗腫瘍活性メカニズムを解明することを目的に、*in vitro* における ADCC 活性、CDC 活性及び細胞増殖阻害活性を評価した。比較対象には、高い *in vivo* 抗腫瘍活性を有する AR47A6.4.2 を用いた。初めにヒト新鮮血より単離した PBMC を用いて、ADCC 活性を評価した。その結果、Pr1E11 は 2 種の TROP-2 陽性癌細胞株に対して ADCC 活性を発揮し、そのエフィカシー及びポテンシーは AR47A6.4.2 と同等であった。また、Fuc(-)型抗体を用いることで、エフィカシー及びポテンシーが向上することを確認した。次にヒト補体成分を用いて CDC 活性を評価した。その結果、両クローン共に癌細胞株に対して CDC 活性を発揮することは出来なかった。最後に細胞増殖阻害活性を評価した。抗 TROP-2 抗体単独又は二次抗体共存下で評価を行ったが、いずれの条件においても両クローンに増殖阻害活性は認められなかった。以上の結果から、Pr1E11 は少なくとも ADCC 活性を有するクローンであることが明らかとなった。また、その活性は Fuc(-)型抗体で増強されたことから、抗腫瘍活性を最大限に発揮させるためには Fuc(-)型抗体が最適なフォーマットであると考えられた。

第 4 章では、Pr1E11 の naked 型癌治療抗体としてのポテンシャルを明らかにすることを目的に、Fuc(-)型キメラ抗体の *in vivo* 抗腫瘍活性を SCID マウス担癌モデルで評価した。また、*in vivo* 抗腫瘍メカニズムを解明することを目的に、マウス IgG1 型抗体の *in vivo* 抗腫瘍活性、及び、*in vitro* における抗体の内在

化活性を評価した。比較対象にはAR47A6.4.2を用いた。初めに、BxPC-3担癌モデル及びColo-205担癌モデルを用いてFuc(-)型キメラ抗体の *in vivo* 抗腫瘍活性を評価した結果、両モデルにおいてPr1E11はAR47A6.4.2よりも優れた抗腫瘍活性を示した。次にFuc(-)型キメラ抗体に認められた抗腫瘍活性がエフェクター活性に因るものかを明らかにするため、Colo-205担癌モデルを用いてマウスIgG1型抗体の *in vivo* 抗腫瘍活性を評価した。その結果、両クローン共にマウスIgG1型抗体に抗腫瘍活性は認められなかった。本結果及び第3章の結果から、両クローンの *in vivo* 抗腫瘍活性に対するFc非依存的活性の寄与は無い、もしくは非常に小さく、*in vivo* 抗腫瘍活性はADCC活性に大きく依存していることが明らかとなった。続いて、Pr1E11及びAR47A6.4.2の内在化活性を評価することを目的に、両クローンの細胞表面結合持続性を解析した。その結果、両クローン共に37℃での培養で細胞表面上の抗体結合量が減少し、その度合いはAR47A6.4.2のほうがPr1E11よりも有意に高かった。本結果から、Pr1E11の内在化活性はAR47A6.4.2よりも低いと考えられた。抗体の内在化はADCC活性や腫瘍内抗体濃度を低下させる可能性があることから、Pr1E11の高い *in vivo* 抗腫瘍活性は、低い内在化活性に起因していると考えられた。

以上の結果から、ファイバー改変アデノウイルスAdv-FZ33を用いたスクリーニングにより樹立された抗TROP-2抗体Pr1E11は、既知の抗TROP-2抗体クローンとは異なる生化学的特性を有しており、これまでに報告されているnaked型抗TROP-2抗体の中では最も高い *in vivo* 抗腫瘍活性を有していることが明らかとなった。今後Pr1E11を抗体医薬品として開発するためには、ADCC活性による

抗腫瘍効果が最大限発揮される癌種を選定する必要があるだろう。今回の検討において、Pr1E11 の *in vivo* 抗腫瘍活性は BxPC-3 担癌モデルよりも Colo-205 担癌モデルにおいて高い作用が認められたが、両細胞における TROP-2 発現量に大きな差はなく、抗原の陽性率のみで癌種を選定することは適切ではないと考えられる。癌種によって膜型分子の内在化活性や、抗体及びエフェクター細胞の浸潤度合いが異なることが報告されているが(102, 103)、これらは ADCC 活性の強度に影響することが予想される。また、癌細胞の中には NK 細胞の活性化を阻害する分子を発現することで、ADCC 活性を減弱させるものも存在することから(104)、癌細胞側の性質や腫瘍環境は Pr1E11 の適応を選定するうえで重要な因子となるだろう。さらに、Pr1E11 は複数の正常組織にも結合したことから、これら正常組織に対する作用が許容される投与量を検討する必要もある。上記検討を通じて高い薬効と低い副作用を両立することが出来る癌種を同定し、臨床応用へと繋げていきたい。

一連の検討結果から、Pr1E11 の優れた *in vivo* 抗腫瘍活性は低い内在化活性によりもたらされている可能性が考えられたが、このような知見はこれまでに報告が無く、本知見を取り入れた抗体スクリーニングを実施することで、高い *in vivo* ADCC 活性を有するクローンを効率的に取得できる可能性が考えられた。ADCC 活性を主薬効メカニズムとした抗体医薬品は固形癌のみならず血液がんや自己免疫疾患の分野でも多く利用されており、本研究で得られた知見が、様々な分野における抗体医薬品の開発に貢献することが出来れば幸いである。

参考文献

1. Kenneth Murphy PT, Mark Walport. Janeway's immunobiology. SEVENTH EDITION ed.
2. Davies DR, Metzger H. Structural basis of antibody function. Annu Rev Immunol. 1983;1:87-117.
3. Sorensen V, Rasmussen IB, Sundvold V, Michaelsen TE, Sandlie I. Structural requirements for incorporation of J chain into human IgM and IgA. Int Immunol. 2000 Jan;12(1):19-27.
4. Harris LJ, Skaletsky E, McPherson A. Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. J Mol Biol. 1998 Feb 06;275(5):861-72.
5. Fagarasan S, Honjo T. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. Nat Rev Immunol. 2003 Jan;3(1):63-72.
6. Daeron M. Fc receptor biology. Annu Rev Immunol. 1997;15:203-34.
7. Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. Annu Rev Immunol. 2001;19:275-90.
8. Michaelsen TE, Garred P, Aase A. Human IgG subclass pattern of inducing complement-mediated cytolysis depends on antigen concentration and to a lesser extent on epitope patchiness, antibody affinity and complement concentration. Eur J Immunol. 1991 Jan;21(1):11-6.
9. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. Mol Immunol. 2005 Feb;42(4):501-10.
10. Zhou X, Hu W, Qin X. The role of complement in the mechanism of action of rituximab for B-cell lymphoma: implications for therapy. Oncologist. 2008 Sep;13(9):954-66.
11. Salfeld JG. Isotype selection in antibody engineering. Nat Biotechnol. 2007 Dec;25(12):1369-72.
12. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. Nat Rev Immunol. 2007 Sep;7(9):715-25.
13. Suzuki T, Ishii-Watabe A, Tada M, Kobayashi T, Kanayasu-Toyoda T, Kawanishi T, et al. Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: a comparative study of the affinity of monoclonal

antibodies and Fc-fusion proteins to human neonatal FcR. J Immunol. 2010 Feb 15;184(4):1968-76.
14. Correia IR. Stability of IgG isotypes in serum. MAbs. 2010 May-Jun;2(3):221-32.
15. Wypych J, Li M, Guo A, Zhang Z, Martinez T, Allen MJ, et al. Human IgG2 antibodies display disulfide-mediated structural isoforms. J Biol Chem. 2008 Jun 06;283(23):16194-205.
16. Liu YD, Chen X, Enk JZ, Plant M, Dillon TM, Flynn GC. Human IgG2 antibody disulfide rearrangement in vivo. J Biol Chem. 2008 Oct 24;283(43):29266-72.
17. Carter PJ. Potent antibody therapeutics by design. Nat Rev Immunol. 2006 May;6(5):343-57.
18. van der Neut Kolfschoten M, Schuurman J, Losen M, Bleeker WK, Martinez-Martinez P, Vermeulen E, et al. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. Science. 2007 Sep 14;317(5844):1554-7.
19. Labrijn AF, Buijsse AO, van den Bremer ET, Verwilligen AY, Bleeker WK, Thorpe SJ, et al. Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 in vivo. Nat Biotechnol. 2009 Aug;27(8):767-71.
20. Sliwkowski MX, Mellman I. Antibody therapeutics in cancer. Science. 2013 Sep 13;341(6151):1192-8.
21. Kai M, Motoki K, Yoshida H, Emuta C, Chisaka Y, Tsuruhata K, et al. Switching constant domains enhances agonist activities of antibodies to a thrombopoietin receptor. Nat Biotechnol. 2008 Feb;26(2):209-11.
22. Bakhtiar R. Antibody drug conjugates. Biotechnol Lett. 2016 Oct;38(10):1655-64.
23. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975 Aug 07;256(5517):495-7.
24. Lobo ED, Hansen RJ, Balthasar JP. Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. J Pharm Sci. 2004 Nov;93(11):2645-68.
25. A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplants. N Engl J Med. 1985 Aug 08;313(6):337-42.

26. Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 Nov;81(21):6851-5.
27. Shin SU, Morrison SL. Production and properties of chimeric antibody molecules. Methods Enzymol. 1989;178:459-76.
28. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. Nature. 1986 May 29-Jun 4;321(6069):522-5.
29. Sandhu JS. A rapid procedure for the humanization of monoclonal antibodies. Gene. 1994 Dec 15;150(2):409-10.
30. Roguska MA, Pedersen JT, Keddy CA, Henry AH, Searle SJ, Lambert JM, et al. Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Feb 01;91(3):969-73.
31. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. Making antibodies by phage display technology. Annu Rev Immunol. 1994;12:433-55.
32. Burton DR, Barbas CF, 3rd. Human antibodies from combinatorial libraries. Adv Immunol. 1994;57:191-280.
33. Society A. Therapeutic monoclonal antibodies approved or in review in the European Union or the United States. 2017; Available from: http://www.antibodysociety.org/news/approved-antibodies/.
34. EvaluatePharma. World Preview 2016, Outlook to 20222016.
35. Vasudev NS, Reynolds AR. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. Angiogenesis. 2014 Jul;17(3):471-94.
36. Goldhirsch A, Gelber RD, Piccart-Gebhart MJ, de Azambuja E, Procter M, Suter TM, et al. 2 years versus 1 year of adjuvant trastuzumab for HER2-positive breast cancer (HERA): an open-label, randomised controlled trial. Lancet. 2013 Sep 21;382(9897):1021-8.
37. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. Lancet. 2010 Aug 28;376(9742):687-97.

38. Lipinski M, Parks DR, Rouse RV, Herzenberg LA. Human trophoblast cell-surface antigens defined by monoclonal antibodies. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981 Aug;78(8):5147-50.
39. Fornaro M, Dell'Arciprete R, Stella M, Bucci C, Nutini M, Capri MG, et al. Cloning of the gene encoding Trop-2, a cell-surface glycoprotein expressed by human carcinomas. Int J Cancer. 1995 Sep 04;62(5):610-8.
40. Cubas R, Li M, Chen C, Yao Q. Trop2: a possible therapeutic target for late stage epithelial carcinomas. Biochim Biophys Acta. 2009 Dec;1796(2):309-14.
41. Pavsic M, Ilc G, Vidmar T, Plavec J, Lenarcic B. The cytosolic tail of the tumor marker protein Trop2--a structural switch triggered by phosphorylation. Sci Rep. 2015 May 18;5:10324.
42. Litvinov SV, Balzar M, Winter MJ, Bakker HA, Briaire-de Bruijn IH, Prins F, et al. Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. J Cell Biol. 1997 Dec 01;139(5):1337-48.
43. Balzar M, Briaire-de Bruijn IH, Rees-Bakker HA, Prins FA, Helfrich W, de Leij L, et al. Epidermal growth factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of Ep-CAM molecules in homophilic adhesions. Mol Cell Biol. 2001 Apr;21(7):2570-80.
44. Cubas R, Zhang S, Li M, Chen C, Yao Q. Trop2 expression contributes to tumor pathogenesis by activating the ERK MAPK pathway. Mol Cancer. 2010 Sep 21;9:253.
45. Ju X, Jiao X, Ertel A, Casimiro MC, Di Sante G, Deng S, et al. v-Src Oncogene Induces Trop2 Proteolytic Activation via Cyclin D1. Cancer Res. 2016 Nov 15;76(22):6723-34.
46. Stoyanova T, Goldstein AS, Cai H, Drake JM, Huang J, Witte ON. Regulated proteolysis of Trop2 drives epithelial hyperplasia and stem cell self-renewal via beta-catenin signaling. Genes Dev. 2012 Oct 15;26(20):2271-85.
47. Stepan LP, Trueblood ES, Hale K, Babcook J, Borges L, Sutherland CL. Expression of Trop2 cell surface glycoprotein in normal and tumor tissues: potential implications as a cancer therapeutic target. J Histochem Cytochem. 2011 Jul;59(7):701-10.

48. Ambrogi F, Fornili M, Boracchi P, Trerotola M, Relli V, Simeone P, et al. Trop-2 is a determinant of breast cancer survival. PLoS One. 2014;9(5):e96993.
49. Bignotti E, Todeschini P, Calza S, Falchetti M, Ravanini M, Tassi RA, et al. Trop-2 overexpression as an independent marker for poor overall survival in ovarian carcinoma patients. Eur J Cancer. 2010 Mar;46(5):944-53.
50. Fong D, Moser P, Krammel C, Gostner JM, Margreiter R, Mitterer M, et al. High expression of TROP2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. Br J Cancer. 2008 Oct 21;99(8):1290-5.
51. Ohmachi T, Tanaka F, Mimori K, Inoue H, Yanaga K, Mori M. Clinical significance of TROP2 expression in colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2006 May 15;12(10):3057-63.
52. Trerotola M, Ganguly KK, Fazli L, Fedele C, Lu H, Dutta A, et al. Trop-2 is up-regulated in invasive prostate cancer and displaces FAK from focal contacts. Oncotarget. 2015 Jun 10;6(16):14318-28.
53. Wu B, Yu C, Zhou B, Huang T, Gao L, Liu T, et al. Overexpression of TROP2 promotes proliferation and invasion of ovarian cancer cells. Exp Ther Med. 2017 Sep;14(3):1947-52.
54. Liu T, Liu Y, Bao X, Tian J, Yang X. Overexpression of TROP2 predicts poor prognosis of patients with cervical cancer and promotes the proliferation and invasion of cervical cancer cells by regulating ERK signaling pathway. PLoS One. 2013;8(9):e75864.
55. Trerotola M, Jernigan DL, Liu Q, Siddiqui J, Fatatis A, Languino LR. Trop-2 promotes prostate cancer metastasis by modulating beta(1) integrin functions. Cancer Res. 2013 May 15;73(10):3155-67.
56. Wang J, Day R, Dong Y, Weintraub SJ, Michel L. Identification of Trop-2 as an oncogene and an attractive therapeutic target in colon cancers. Mol Cancer Ther. 2008 Feb;7(2):280-5.
57. Miotti S, Canevari S, Menard S, Mezzanzanica D, Porro G, Pupa SM, et al. Characterization of human ovarian carcinoma-associated antigens defined by novel monoclonal antibodies with tumor-restricted specificity. Int J Cancer. 1987 Mar 15;39(3):297-303.
58. Stein R, Chen S, Sharkey RM, Goldenberg DM. Murine monoclonal antibodies raised against human non-small cell carcinoma of the

lung: specificity and tumor targeting. Cancer Res. 1990 Feb 15;50(4):1330-6.
59. Stein R, Basu A, Chen S, Shih LB, Goldenberg DM. Specificity and properties of MAb RS7-3G11 and the antigen defined by this pancarcinoma monoclonal antibody. Int J Cancer. 1993 Dec 02;55(6):938-46.
60. Cardillo TM, Govindan SV, Sharkey RM, Trisal P, Goldenberg DM. Humanized anti-Trop-2 IgG-SN-38 conjugate for effective treatment of diverse epithelial cancers: preclinical studies in human cancer xenograft models and monkeys. Clin Cancer Res. 2011 May 15;17(10):3157-69.
61. Stein R, Govindan SV, Chen S, Reed L, Spiegelman H, Griffiths GL, et al. Successful therapy of a human lung cancer xenograft using MAb RS7 labeled with residualizing radioiodine. Crit Rev Oncol Hematol. 2001 Jul-Aug;39(1-2):173-80.
62. Bardia A, Mayer IA, Diamond JR, Moroose RL, Isakoff SJ, Starodub AN, et al. Efficacy and Safety of Anti-Trop-2 Antibody Drug Conjugate Sacituzumab Govitecan (IMMU-132) in Heavily Pretreated Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. J Clin Oncol. 2017 Jul 01;35(19):2141-8.
63. Faltas B, Goldenberg DM, Ocean AJ, Govindan SV, Wilhelm F, Sharkey RM, et al. Sacituzumab Govitecan, a Novel Antibody--Drug Conjugate, in Patients With Metastatic Platinum-Resistant Urothelial Carcinoma. Clin Genitourin Cancer. 2016 Feb;14(1):e75-9.
64. Starodub AN, Ocean AJ, Shah MA, Guarino MJ, Picozzi VJ, Jr., Vahdat LT, et al. First-in-Human Trial of a Novel Anti-Trop-2 Antibody-SN-38 Conjugate, Sacituzumab Govitecan, for the Treatment of Diverse Metastatic Solid Tumors. Clin Cancer Res. 2015 Sep 01;21(17):3870-8.
65. Gray JE, Heist RS, Starodub AN, Camidge DR, Kio EA, Masters GA, et al. Therapy of Small Cell Lung Cancer (SCLC) with a Topoisomerase-I-inhibiting Antibody-Drug Conjugate (ADC) Targeting Trop-2, Sacituzumab Govitecan. Clin Cancer Res. 2017 Oct 01;23(19):5711-9.
66. Sharkey RM, McBride WJ, Cardillo TM, Govindan SV, Wang Y, Rossi EA, et al. Enhanced Delivery of SN-38 to Human Tumor Xenografts with an

Anti-Trop-2-SN-38 Antibody Conjugate (Sacituzumab Govitecan). Clin Cancer Res. 2015 Nov 15;21(22):5131-8.

67. David S. F. Young HPF, Susan E. Hahn, Luis A. G. DaCruz, Alison L. Ferry, inventor ARIUS RESEARCH, assignee. Cytotoxicity mediation of cells evidencing surface expression of TROP-2 patent US7420040B2. 2007.
68. Amandine Truong NF, Daad Sayegh, Baldwin Mak, Kevin O'Reilly, Sui-Wah Fung, Nives Ceric, Susan Hahn, Daniel Pereira, Helen Findlay and David Young. AR47A6.4.2, a functional naked monoclonal antibody targeting Trop-2, demonstrates in vivo efficacy in human pancreatic, colon, breast and prostate cancer models. AACR-NCI-EORTC International Conference; Oct 22-26, 2007; San Francisco, CA2007.
69. McConnell MJ, Imperiale MJ. Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. Hum Gene Ther. 2004 Nov;15(11):1022-33.
70. Coughlan L, Alba R, Parker AL, Bradshaw AC, McNeish IA, Nicklin SA, et al. Tropism-modification strategies for targeted gene delivery using adenoviral vectors. Viruses. 2010 Oct;2(10):2290-355.
71. Volpers C, Thirion C, Biermann V, Hussmann S, Kewes H, Dunant P, et al. Antibody-mediated targeting of an adenovirus vector modified to contain a synthetic immunoglobulin g-binding domain in the capsid. J Virol. 2003 Feb;77(3):2093-104.
72. Korokhov N, Mikheeva G, Krendelshchikov A, Belousova N, Simonenko V, Krendelshchikova V, et al. Targeting of adenovirus via genetic modification of the viral capsid combined with a protein bridge. J Virol. 2003 Dec;77(24):12931-40.
73. Kato K. [A novel screening method to establish tumor-targeting antibodies reliable for drug delivery system]. Yakugaku Zasshi. 2013;133(9):931-8.
74. Tanaka T, Huang J, Hirai S, Kuroki M, Watanabe N, Tomihara K, et al. Carcinoembryonic antigen-targeted selective gene therapy for gastric cancer through FZ33 fiber-modified adenovirus vectors. Clin Cancer Res. 2006 Jun 15;12(12):3803-13.
75. Suzuki K, Nakamura K, Kato K, Hamada H, Tsukamoto T. Exploration of target molecules for prostate cancer gene therapy. Prostate. 2007 Aug 01;67(11):1163-73.

76. Kato Y, Kaneko MK. A cancer-specific monoclonal antibody recognizes the aberrantly glycosylated podoplanin. Sci Rep. 2014 Aug 01;4:5924.
77. Gupta P, Han SY, Holgado-Madruga M, Mitra SS, Li G, Nitta RT, et al. Development of an EGFRvIII specific recombinant antibody. BMC Biotechnol. 2010 Oct 07;10:72.
78. Beers SA, Chan CH, French RR, Cragg MS, Glennie MJ. CD20 as a target for therapeutic type I and II monoclonal antibodies. Semin Hematol. 2010 Apr;47(2):107-14.
79. Shitara K. [Potelligent antibodies as next generation therapeutic antibodies]. Yakugaku Zasshi. 2009 Jan;129(1):3-9.
80. Kanda Y, Yamane-Ohnuki N, Sakai N, Yamano K, Nakano R, Inoue M, et al. Comparison of cell lines for stable production of fucose-negative antibodies with enhanced ADCC. Biotechnol Bioeng. 2006 Jul 05;94(4):680-8.
81. H. L. Truong A, Wang M, Harris V, Aziz N, Grabell J, Popp L, et al. 520 POSTER A monoclonal antibody targeting Trop2 exhibits anti-tumor efficacy in human cancer models as a monotherapy and demonstrates efficacy in combination therapy2008.
82. de Bono JS, Tolcher AW, Forero A, Vanhove GF, Takimoto C, Bauer RJ, et al. ING-1, a monoclonal antibody targeting Ep-CAM in patients with advanced adenocarcinomas. Clin Cancer Res. 2004 Nov 15;10(22):7555-65.
83. J. Posey MK, and M. Saleh. A phase I trial of the humanized anti-EGP40 monoclonal antibody 3622W94. ASCO1998. p. 436.
84. Pinto C, Barone CA, Girolomoni G, Russi EG, Merlano MC, Ferrari D, et al. Management of skin toxicity associated with cetuximab treatment in combination with chemotherapy or radiotherapy. Oncologist. 2011;16(2):228-38.
85. Zhang N, Liu L, Dumitru CD, Cummings NR, Cukan M, Jiang Y, et al. Glycoengineered Pichia produced anti-HER2 is comparable to trastuzumab in preclinical study. MAbs. 2011 May-Jun;3(3):289-98.
86. Patel D, Lahiji A, Patel S, Franklin M, Jimenez X, Hicklin DJ, et al. Monoclonal antibody cetuximab binds to and down-regulates constitutively activated epidermal growth factor receptor vIII on the cell surface. Anticancer Res. 2007 Sep-Oct;27(5A):3355-66.

87. Tang Y, Lou J, Alpaugh RK, Robinson MK, Marks JD, Weiner LM. Regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IgG intrinsic and apparent affinity for target antigen. J Immunol. 2007 Sep 01;179(5):2815-23.
88. Alberti S, Miotti S, Stella M, Klein CE, Fornaro M, Menard S, et al. Biochemical characterization of Trop-2, a cell surface molecule expressed by human carcinomas: formal proof that the monoclonal antibodies T16 and MOv-16 recognize Trop-2. Hybridoma. 1992 Oct;11(5):539-45.
89. David S. F. Young HPF, Susan E. Hahn, Cruz Luis A. G. Da, Alison L. Ferry, inventor Humanized and chimeric anti-trop-2 antibodies that mediate cancer cell cytotoxicity patent WO2008144891A1. 2008.
90. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene. Blood. 2002 Feb 01;99(3):754-8.
91. Musolino A, Naldi N, Bortesi B, Pezzuolo D, Capelletti M, Missale G, et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. J Clin Oncol. 2008 Apr 10;26(11):1789-96.
92. Jurianz K, Ziegler S, Garcia-Schuler H, Kraus S, Bohana-Kashtan O, Fishelson Z, et al. Complement resistance of tumor cells: basal and induced mechanisms. Mol Immunol. 1999 Sep-Oct;36(13-14):929-39.
93. Treon SP, Mitsiades C, Mitsiades N, Young G, Doss D, Schlossman R, et al. Tumor Cell Expression of CD59 Is Associated With Resistance to CD20 Serotherapy in Patients With B-Cell Malignancies. J Immunother (1991). 2001 May;24(3):263-71.
94. Tawara T, Hasegawa K, Sugiura Y, Harada K, Miura T, Hayashi S, et al. Complement activation plays a key role in antibody-induced infusion toxicity in monkeys and rats. J Immunol. 2008 Feb 15;180(4):2294-8.
95. Deans JP, Li H, Polyak MJ. CD20-mediated apoptosis: signalling through lipid rafts. Immunology. 2002 Oct;107(2):176-82.

96. Tamada T, Shinmi D, Ikeda M, Yonezawa Y, Kataoka S, Kuroki R, et al. TRAIL-R2 Superoligomerization Induced by Human Monoclonal Agonistic Antibody KMTR2. Sci Rep. 2015 Dec 17;5:17936.
97. Ripani E, Sacchetti A, Corda D, Alberti S. Human Trop-2 is a tumor-associated calcium signal transducer. Int J Cancer. 1998 May 29;76(5):671-6.
98. Chuntharapai A, Dodge K, Grimmer K, Schroeder K, Marsters SA, Koeppen H, et al. Isotype-dependent inhibition of tumor growth in vivo by monoclonal antibodies to death receptor 4. J Immunol. 2001 Apr 15;166(8):4891-8.
99. Miyamoto S, Iwamoto R, Furuya A, Takahashi K, Sasaki Y, Ando H, et al. A novel anti-human HB-EGF monoclonal antibody with multiple antitumor mechanisms against ovarian cancer cells. Clin Cancer Res. 2011 Nov 01;17(21):6733-41.
100. Kasai N, Yoshikawa Y, Enokizono J. Effect of antigen-dependent clearance on pharmacokinetics of anti-heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) monoclonal antibody. MAbs. 2014;6(5):1220-8.
101. Lammerts van Bueren JJ, Bleeker WK, Bogh HO, Houtkamp M, Schuurman J, van de Winkel JG, et al. Effect of target dynamics on pharmacokinetics of a novel therapeutic antibody against the epidermal growth factor receptor: implications for the mechanisms of action. Cancer Res. 2006 Aug 01;66(15):7630-8.
102. Riedl T, van Boxtel E, Bosch M, Parren PW, Gerritsen AF. High-Throughput Screening for Internalizing Antibodies by Homogeneous Fluorescence Imaging of a pH-Activated Probe. J Biomol Screen. 2016 Jan;21(1):12-23.
103. Melero I, Rouzaut A, Motz GT, Coukos G. T-cell and NK-cell infiltration into solid tumors: a key limiting factor for efficacious cancer immunotherapy. Cancer Discov. 2014 May;4(5):522-6.
104. Madsen CB, Lavrsen K, Steentoft C, Vester-Christensen MB, Clausen H, Wandall HH, et al. Glycan elongation beyond the mucin associated Tn antigen protects tumor cells from immune-mediated killing. PLoS One. 2013;8(9):e72413.