

201313071A

平成25年度厚生労働科学研究費補助金
第3次対がん総合戦略研究事業

抗腫瘍サイトカインTNFの医薬品化を目指した
活性増強型リジン欠損TNFに対する
部位特異的バイオコンジュゲーションの最適化
(H25-3次がん若手-010)

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 向 洋平

平成26年5月

平成25年度厚生労働科学研究費補助金
第3次対がん総合戦略研究事業

抗腫瘍サイトカインTNFの医薬品化を目指した
活性増強型リジン欠損TNFに対する
部位特異的バイオコンジュゲーションの最適化

(H25-3 次がん若手-010)

平成25年度 研究報告書

研究代表者 向 洋平

平成26年5月

目次

1. 研究報告	1
2. 研究成果の刊行に関する一覧表	10
3. 研究成果の刊行物・別刷り	11

平成 25 年度第 3 次対がん総合戦略研究事業

課題番号：H25-3 次がん-若手-010

研究報告抄録

抗腫瘍サイトカイン TNF の医薬品化を目指した 活性増強型リジン欠損 TNF に対する部位特異的バイオコンジュグーションの最適化

主任研究者 向 洋平

(独)医薬基盤研究所 創薬支援スクリーニングセンター

抗体スクリーニングプロジェクト サブプロジェクトリーダー

研究概要

本申請課題は、抗腫瘍サイトカインとして期待されるもののその全身毒性により臨床応用が断念された腫瘍壊死因子 TNF の医薬品化を目指し、申請者らが独自に開発した活性増強型リジン欠損 TNF：mutTNF-K90R に対し、分子量の異なるポリエチレングリコール（PEG）による部位特異的 PEGylation を実施することにより、全身投与型 TNF 療法に最適な PEG 化 TNF を見出そうとするものである。

A. 研究目的

腫瘍壊死因子 TNF はその高い抗腫瘍活性から医薬品化が望まれたが、1990 年代初頭の臨床治験にて全身投与時の副作用が問題となり、その医薬品化は断念された。1990 年代後半には、堤らにより PEG などの高分子で TNF を修飾するバイオコンジュグーション（PEGylation）が、TNF の副作用を軽減し、その全身投与を実現可能であることが示されたものの、通常のリジン残基を修飾する PEGylation では TNF の比活性低下を避けることはできず、十分な技術とはなり得なかった。この点、申請者は堤らと共同で、独自の機能性人工蛋白質の創製技術により TNF 中の全てのリジン残基を欠損しつつも活性を増強した mutTNF-K90R（以下 K90R と略称）を創製し、その N 末端部位特異的な PEGylation によって、PEG 化の致命的問題点を最小限に抑えることに成功した。この部位特異的 PEGylation は、TNF の全身投与を達成し、その医薬品化を強力に推進可能な基盤技術となり得ることが期待されている。

現在、TNF は、その全身投与時の副作用に懸念は残っているものの、その強力な抗腫瘍効果には

未だ注目が集まっており、現在 EU では黒色腫に対し四肢のみに TNF を循環させる分離式肢灌流法が認可されている。また近年、TNF の体内動態を制御することでその全身性の副作用を軽減可能であることが見出され、難治性固形腫瘍に対する L19-TNF（TNF と腫瘍標的化モノクローナル抗体の融合体）や、悪性胸膜中皮腫に対する NGR-hTNF（腫瘍標的化ペプチドと TNF の融合体）が現在臨床治験中である。申請者らの目指す PEG 化 TNF は、部位特異的 PEG 化により獲得する血中滞留性の上昇（投与間隔の拡大等）・副作用の軽減といった、先行品には無い特性を有しており、これらに対しても十分な競争力を有するものと期待される。しかしながら、これまで我々は、比較的小さな分子量の PEG 修飾（分子量 5 kDa など）において、PEG 化の問題を克服できることを見出してきたものの、より長期の生体内安定性を付与するための PEG 修飾（分子量 20 kDa など）における部位特異的 PEGylation の有用性は、未だ解析が進んでいない。

そこで、本申請課題では、申請者らが開発した活性増強型 TNF 変異体 K90R に対し、異なる分子

量の PEG を修飾し、それら PEG 化体の物性評価、*in vitro* 評価、*in vivo* 評価を通じて、最適な PEG 化体を決定することで、TNF の臨床応用のためのトランスレーショナルリサーチを推進することを目的とした検討を実施した（図 1）。

研究方法

B-1. PEG-K90R の調製

B-1-1. K90R の PEG 化

K90R は、過去に我々の研究室で樹立した、大腸菌発現系を利用した手法によって、リコンビナント蛋白質として調製した。分子量 5 kDa、10 kDa、20 kDa の活性化 PEG（日油株式会社；SUNBRIGHT® ME-050TS、ME-100TS、ME-200TS）を、K90R の PEG 修飾に用いた。K90R の 10 倍モル濃度となるように活性化 PEG 粉末をあらかじめ秤量し、そこへ PBS で 1 mg/ml に希釈した K90R 溶液を添加した。5 kDa の活性化 PEG については、4°C で 15 分間、10 kDa 及び 20 kDa の活性化 PEG については、25°C で 15 分間、1000 rpm で攪拌することで、活性化 PEG と K90R を反応させた。反応液に対し、活性化 PEG の 25 倍モル濃度となるように 1 M εアミノカプロン酸溶液を添加し、PEG 化反応を終了させた。得られた PEG-K90R は、次項の精製操作まで、氷上で保存した。

B-1-2. PEG 化 K90R の精製

PEG-K90R 反応液から未反応の PEG 及びεアミノカプロン酸を除くため、AKTA Explorer 100S（GE Healthcare UK Ltd）及び HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade（GE Healthcare）を用いたゲルろ過クロマトグラフィー（流速：1.7 ml/min、溶媒：PBS）により、PEG-K90R を精製した。未反応の K90R のピークから高分子量側に出現したピークを、分子量の小さな順に、mono-PEG 化体、di-PEG 化体として分取した。得られた PEG-K90R の蛋白質量は、BCA assay により定量した。得ら

れた PEG-K90R は-80°C にて凍結保存するとともに、各々 5 µg の精製蛋白質を SDS-PAGE により解析することで、PEG 化の確認を行った。

B-2. PEG-K90R の *in vitro* 特性解析

B-2-1. PEG 化が K90R の親和性に与える影響の評価（BIAcore による親和性測定）

センサーチップ CM5（GE Healthcare）に対し、Amine Coupling Kit（GE Healthcare）を用い、リコンビナント human TNFR1-Fc(R&D Systems, Inc.)、TNFR2-Fc(R&D Systems)、ovalbmin(OVA; Sigma-Aldrich Corporation) を固相化した。PEG-K90R を HBS-EP Buffer（GE Healthcare）で 200 nM、100 nM、50 nM に希釈し、BIAcore3000（GE Healthcare）を用い、各固相化抗原に対する親和性を測定した。得られたセンサーグラムを BIAevaluation software（GE Healthcare）で解析し、解離定数 kd を結合定数 ka で除することで、KD 値を算出した。

B-2-2. PEG 化が K90R の生物活性に与える影響の評価（L-M assay）

マウス線維芽細胞株：L-M細胞を、E-MEM液体培地（1%牛胎児血清、1%抗生物質-抗菌剤混合液、1 µg/ml アクチノマイシンDを含有）に懸濁し、 3×10^4 cells/wellの細胞数で96 well plateに播種した。PEG-K90RをE-MEM液体培地（1%牛胎児血清、1%抗生物質-抗菌剤混合液を含有）で段階希釈し、終濃度150~0.0025 ng/mlとなるように、細胞溶液と混合し、5%CO₂存在下で、37°C、24時間培養した。翌日、TNF依存的な細胞傷害活性を、下記に示すメチレンブルーアッセイにより評価した。終濃度2.5%となるように、25%グルテルアルデヒド溶液を各wellに添加し、室温で15分間反応させることで、細胞を固定化した。水で3回洗浄を行った後、0.05%メチレンブルー溶液を100 µl/well添加し、室温で15分間、300 rpmで攪拌することで、細胞を染色した。水で3回洗浄、1時間風乾させた後

に、1/3 N HCl溶液を200 μ l添加し、室温で15分間、300rpmで攪拌することで、細胞からメチレンブルーを溶出させた。655nm-415nmの吸光度（測定波長655 nm、参照波長415 nm）を測定することで、細胞の生存率を評価した。

B-3. PEG-K90R の生体内安定性の評価

B-3-1. PEG-K90R の血中濃度を測定するための ELISA 系の構築

溶液中の PEG-K90R を定量するために、Human TNF alpha ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience, Inc.) をによる ELISA を実施した。Capture Antibody (Anti-Human TNF alpha Purified) を 1 \times Coating Buffer で 250 倍希釈し、Maxisorb immunoplate (ThermoFisher Scientific, Inc.) に添加し、一晩 4 $^{\circ}$ C で静置して固相化した。0.05% Tween-20 含有 PBS (PBST) で 3 回洗浄後、1 \times Assay Diluent を各 well に添加し、室温で 1 時間のブロッキングを行った。PBST で well を 3 回洗浄後、1 \times Assay Diluent で段階希釈した PEG-K90R 溶液を添加し、室温で 2 時間静置した。結合した PEG-K90R は、マニュアルに記載された濃度のビオチン化 Anti-Human TNF alpha、及び、Avidin-HRP で検出した。

C. 研究結果及び考察

C-1. PEG-K90R の調製

5 kDa の PEG で修飾した反応液のゲルろ過の結果、di-PEG 化体はほとんど検出されなかったことから、Mono-PEG 化体のフラクションのみを分取・精製した (5k-mono-PEG-K90R)。10 kDa 及び 20 kDa の PEG で修飾した反応液からは、Mono-PEG 化体、di-PEG 化体双方のピークが観察されたため、各々を別個に分取・精製した (10k-monoPEG-K90R、10k-diPEG-K90R、20k-monoPEG-K90R、20k-diPEG-K90R) (図 2)。得られた PEG-K90R の SDS-PAGE の結果、修飾した PEG の分子量に応じ、K90R のバンドが高分子量側へとシフトしており、PEG 化が正常に行われ

ていることが確認できた (図 2)。また、各々の反応条件において、PEG 化体のバンドは 1 本ずつしか観察されなかったことから、mono-PEG 化体では、K90R 三量体のうち 1 つが、di-PEG 化体では、K90R 三量体のうち 2 つが PEG 修飾を受けている可能性が示唆された。

C-2. PEG-K90R の in vitro 特性解析

通常のリジン残基を標的としたランダム PEGylation では、分子量の大きな PEG での修飾は、その生体内安定性を飛躍的に向上できるものの、比活性低下はより顕著になることが知られている。これまでに、我々の検討により、K90R は、分子量 5 kDa の PEG で修飾された際に、ほとんど比活性低下を受けないことが分かっているが、より大きな PEG 修飾を受けた際の影響は不明である。そこで、高分子量の PEG で修飾された際の、K90R の親和性及び生物活性に与える影響を評価するために、BIAcore で親和性を、L-M assay でその生物活性を評価した。

サンプルとして、5k-mono-PEG-K90R、10k-monoPEG-K90R、10k-diPEG-K90R、20k-monoPEG-K90R、20k-diPEG-K90R を使い、human TNFR1-Fc、human TNFR2-Fc、ネガティブコントロールとして ovalbumin への結合性を BIAcore により評価した。その結果、全ての PEG-K90R は、ovalbumin への結合性が観察されない条件で、TNFR1 に対しては、KD=1.17-2.94 nM、TNFR2 に対しては、KD=1.22-2.84 nM という高い親和性を保持していた (図 3)。次にその生物活性を評価する目的で、同様のサンプルを用いた L-M assay を実施した。その結果、生物活性においても、全ての PEG-K90R は、未修飾の K90R と同程度の比活性を保持していることが判明した (図 3)。これまでの我々の検討から、ランダム PEGylation で TNF を修飾した場合、5 kDa の PEG が 1 分子結合するだけで、その親和性・生物活性は 1/10 以下にまで減少することが判明している。

従って、K90R に対し、より高分子量の PEG で修飾した修飾条件においても比活性がほとんど低下しないという事実は、K90R の N 末端部位特異的 PEGylation の有用性を強く示唆するものである。

C-2. PEG-K90R の生体内安定性の評価（予備検討）

PEG-K90R の生体内安定性を評価するためには、マウスへと静脈内投与し、その血中濃度の推移を経時的に評価する必要がある。これまでに我々の研究室では、放射性同位体（RI）で K90R をラベル化し、その放射線量から血中濃度を測定する方法を用いてきたが、より安全な non-RI の実験系で、PEG-K90R の血中濃度を測定できることが望ましい。そこで、我々は、PEG-K90R の血中濃度推移を評価するためにサンドイッチ ELISA 法に着目し、生体内安定性評価の予備検討を実施した。PEG-K90R を段階希釈し、2 種の抗 TNF 抗体によるサンドイッチ ELISA を実施したところ、いずれの PEG 化体においても、10 pg/ml という極めて微量のサンプルを高感度に検出、定量できることが明らかとなった（図 4）。本結果を元に、現在、マウスを用いた血中安定性の評価の実験を準備している。

D. 研究成果の意義及び今後の発展性

TNF は、その強力な抗腫瘍効果から、有望な抗がん剤として注目が集まったものの、その強い副作用によって全身投与が断念された経緯がある。その副作用を軽減し得る最適技術と期待された PEGylation においても、致命的な比活性低下が問題となり、実用化に至っていない。本研究では、活性増強 TNF 変異体である K90R に対し、N 末端特異的な PEGylation を行うことで、高い PEG 修飾率（20 kDa PEG を 2 分子）においても、親和性・生物活性を保持し得ることを初めて明らかとした。これは、今までの PEG 化 TNF の致命的問題を克服し得るものであり、難治性がんに対する

画期的医薬として期待される、全身投与型 TNF の開発に大きく貢献するものと考えられる。今後、in vivo での安定性の評価、種々の腫瘍モデルマウスを用いた有用性の検証を行うことで、PEG-K90R の実用化を目指す予定である。

E. 倫理面への配慮

該当事項なし

F. 研究発表

・論文発表

1. Nagano K, Kanasaki S, Yamashita T, Maeda Y, Inoue M, Higashisaka K, Yoshioka Y, Abe Y, **Mukai Y**, Kamada H, Tsutsumi Y, Tsunoda S. Expression of Eph receptor A10 is correlated with lymph node metastasis and stage progression in breast cancer patients. *Cancer Med.* 2013;2(6):972-7.
2. Yoshikawa M, ***Mukai Y(CA)**, Okada Y, Tsumori Y, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Aird WC, Yoshioka Y, Okada N, Doi T, ***Nakagawa S(CA)**., Robo4 is an effective tumor endothelial marker for antibody-drug conjugates based on the rapid isolation of the anti-Robo4 cell-internalizing antibody., *Blood.* 2013;121(14):2804-13.
3. Seino S, Shibata Y, Yamanaka M, Nakagawa T, **Mukai Y**, Nakagawa S, Yamamoto TA., Design of Au/SPIO composite nanoparticle for facile and biocompatible surface functionalization via Au-S bond., *J Nanopart Res.*, 2013;15(1):1-8.
4. Morishige T, Yoshioka Y, Narimatsu S, Ikemizu S, Tsunoda S, Tsutsumi Y, **Mukai Y**, Okada N, Nakagawa S., Mutants of lymphotoxin- α with augmented cytotoxic activity via TNFR1 for use in cancer therapy. *Cytokine.* 2013;61(2):578-84.

・総説、著書

1. **向洋平**、中川 晋作：細胞内侵入抗体による

- 腫瘍血管へのドラッグデリバリー., *Drug Delivery System.*, 2013; 28(5):430-438.
2. 向 洋平 : がんのサイトカイン療法とその医薬品化のための DDS., *応用が広がる DDS*, 2013; 344-348.
 3. 向 洋平、中川 晋作 : ポリγグルタミン酸ナノ粒子による ER-endosome fusion に基づく抗原の効率的なクロスプレゼンテーション., *臨床免疫・アレルギー科*, 2013;59(3):379-385.
- ・学会発表 (国際学会)
1. **Mukai Y** : Robo4 is an effective tumor endothelial marker for antibody-drug conjugates based on the rapid isolation of the anti-Robo4 cell-internalizing antibody., Single Chain Club Meeting 2013, Zurich (Switzerland) , June 15, 2013.
 2. Kamada H., Inoue M., Abe Y., Nagano K., **Mukai Y.**, Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Evaluation of biologics bioactivity by analysis of conformational change using ion mobility mass spectrometry., American Association of Pharmaceutical Scientists, San Diego (USA), 20-22 May, 2013.
 3. **Mukai Y.**, Yoshikawa M., Okada Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Aird W.C., Yoshioka Y., Okada N., Doi T., Nakagawa S. : Tumor vascular targeting using anti-Robo4 cell-internalizing monoclonal antibody that is isolated via phage display-based screening system., World Biotechnology Congress 2013, Boston (USA), 3-6 June, 2013.
 4. Nagano K., Maeda Y., Kanasaki S., Yamashita T., Inoue M., Higashisaka K., Yoshioka Y., Abe Y., **Mukai Y.**, Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Evaluation of a novel breast cancer-related protein, Eph receptor A10 for targeting therapy., 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Honolulu, Hawaii (USA), 21-24 July, 2013.
 5. Kamada H., Yamashita T., Inoue M., Nagano K., Katayama S., **Mukai Y.**, Yoshioka Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Proteomic analysis of tumor-derived exosomes derived from cultured human lung cancer cell as tumor biomarkers., HUPPO 12th Annual World Congress, Yokohama (Japan), 14-18 September, 2013.
 6. **Mukai Y.**, Yoshikawa M., Okada Y., Tsumori Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Aird W.C., Yoshioka Y., Okada N., Doi T., Nakagawa S. : Phage display-based high throughput screening to identify cell-internalizing monoclonal antibodies for antibody-drug conjugates., 12th HUPPO World Congress, Yokohama (Japan), 14-18 September, 2013.
 7. Nagano K., Yamashita T., Maeda Y., Higashisaka K., Yoshioka Y., Inoue M., Abe Y., **Mukai Y.**, Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Search for biomarker proteins related to cisplatin-susceptibility in malignant mesothelioma., HUPPO 12th Annual World Congress, Yokohama (Japan), 14-18 September, 2013.
 8. Nagano K., Maeda Y., Yamashita T., Inoue M., Abe Y., **Mukai Y.**, Kamada H., Higashisaka K., Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Anti-EphA10 monoclonal antibody is a potential therapy against EphA10 positive breast cancer., AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Boston (USA), 19-23 October, 2013.
 9. Kamada H., Yamashita T., Inoue M., Nagano K., Katayama S., **Mukai Y.**, Yoshioka Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Proteome profiling and detecting method of lung cancer cell-derived exosomes as tumor

biomarkers, AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Boston (USA), 19-23 October, 2013.

10. Taki S., Kamada H., Maeda Y., Nagano K, Mukai Y., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Development of EphA10/CD3 bispecific tandem scFv as a drug candidate against breast cancer., AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Boston (USA), 19-23 October, 2013.
- ・学会発表 (国内学会)
1. 長野一也, 山下琢矢, 井上雅己, 阿部康弘, 向 洋平, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一 : プロテオミクスによるシスプラチン感受性マーカー蛋白質 : Annexin A4 の同定., 第 60 回日本生化学会近畿支部例会., 吹田 (大阪), 2013 年 5 月.
 2. 向 洋平, 吉川 舞, 岡田欣晃, William C Aird, 吉岡靖雄, 角田慎一, 堤 康央, 岡田直貴, 土井健史, 中川晋作 : 腫瘍血管マーカー Robo4 に対する細胞内侵入抗体の抗体薬物複合体としての有用性評価., 第 29 回日本 DDS 学会学術集会., 京都 (京都), 2013 年 7 月.
 3. 瀧慎太郎, 鎌田春彦, 井上雅己, 前田祐香, 長野一也, 向 洋平, 堤 康央, 角田慎一 : 乳がん関連たんぱく質 EphA10 を標的とした tandem scFv 型 bispecific 抗体の開発., 第 29 回日本 DDS 学会学術集会., 京都 (京都), 2013 年 7 月.
 4. 中村照也, 向 洋平, 吉岡靖雄, 角田慎一, 堤 康央, 山縣ゆり子 : TNF-TNFR2 複合体のシグナル伝達開始機構., 新学術領域研究「修飾シグナル病」第 3 回公開シンポジウム., 東京, 2014 年 1 月.
 5. 向 洋平, 小椋健正, 三里一貴, 永野貴士, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 長野一也, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 新規非免疫ヒト型ファージ抗体ライブラリの構築とその品質評価., 日本薬学会第 134 年会., 熊本 (熊本), 2014 年 3 月.
 6. 長野一也, 前田祐香, 金崎聡一郎, 渡邊貴信, 山下琢矢, 井上雅己, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 阿部康弘, 向 洋平, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一 : 新規乳がん関連蛋白質 Eph receptor A10 に対するモノクローナル抗体のゼノグラフトモデルマウスでの評価., 日本薬学会第 134 年会., 熊本 (熊本), 2014 年 3 月.
 7. 小椋健正, 向 洋平, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 長野一也, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 非免疫ファージ抗体ライブラリからの抗体取得の最適化に関する基礎検討., 日本薬学会第 134 年会., 熊本 (熊本), 2014 年 3 月.
 8. 永野貴士, 向 洋平, 菅森泰隆, 加藤玄樹, 大谷啓一, 青木和広, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 長野一也, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : ファージ表面提示法を駆使した新規高親和性骨再生ペプチドの創製に向けた基礎検討., 日本薬学会第 134 年会., 熊本 (熊本), 2014 年 3 月.
 9. 三里一貴, 向 洋平, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 長野一也, 鎌田春彦, 藤尾 慈, 望月秀樹, 角田慎一, 堤 康央 : 血管プロテオミクスによるパーキンソン病診断マーカーの探索研究., 日本薬学会第 134 年会., 熊本 (熊本), 2014 年 3 月.
 10. 瀧慎太郎, 鎌田春彦, 井上雅己, 長野一也, 向 洋平, 堤 康央, 角田慎一, EphA10 と CD3 を認識する新規 Bispecific 抗体 (EphA10/CD3) の創製と T 細胞活性化に関する考察., 日本薬学会第 134 年会., 熊本 (熊本), 2014 年 3 月.
 11. 井上雅己, 鎌田春彦, 阿部康弘, 長野一也, 向 洋平, 堤 康央, 角田慎一, APP3 が介在する TNFR2 シグナルの炎症保護作用に及ぼ

す影響，日本薬学会第 134 年会，熊本(熊本)，
2014 年 3 月。

G. 知的財産権の出願・登録状況

・特許取得


該当事項なし

・実用新案登録

該当事項なし

図 1：活性増強型TNF:K90Rと部位特異的バイオンジュゲーション⁰

腫瘍壊死因子TNF



かつて夢の抗がん剤として期待
1990年代初頭、全身投与による重篤な副作用で臨床応用は断念

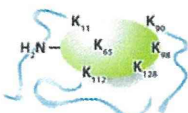
しかし、
現在もTNFの医薬品化は有望視

- 隔離大腿部の局所還流（EU；メラノーマ）
- 腫瘍標的ペプチドとの融合体（Phase III；悪性胸膜中皮腫）

適切に副作用を制御すれば
TNFの医薬品化は可能。

高分子バイオンジュゲーション：
TNFの全身性副作用を軽減

野生型 TNF

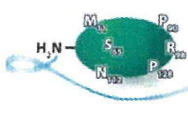


活性に重要なリジン残基へのランダム PEG 修飾

著しい活性低下

Nat Biotech 2003, Clin Can Res 2004

USN 欠損 TNF 変異体



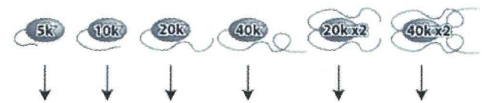
活性増強 K90R

N 末端への部位特異的 PEG 修飾

高地活性保持

部位特異的バイオンジュゲーションがこれまでの問題を克服
※5 kDa PEGで修飾した際の結果であり、より生体内安定性に優れる高分子量のPEG（10 kDa, 20 kDaなど）で修飾した際の有用性は明らかでない。

平成 25 年度（どの PEG 化体が最も有効性・安全性に優れるのが評価）



種々の物性・有用性評価

K90Rに対し、様々な分子量のPEGで修飾したPEG化体の活性を評価し、PEG化K90Rのがん治療薬としてのPOC取得を目指す。

図 2：分子量の異なるPEG修飾体の創製¹

$CH_3O-(CH_2CH_2O)_n-CO-N$ + K90R
PEG-NHS
 (5, 10, 20 kDa)


4 or 25°C
15 min

ゲルろ過FPLCで分取

SDS-PAGE

kDa	K90R						5 μg /lane
	(-)	5k	10k	10k	20k	20k	
100							
75							
50							
37							
25							
20							
15							
10							

修飾PEGの分子量に応じたバンドのシフトを確認



TNF(K90R) 三量体

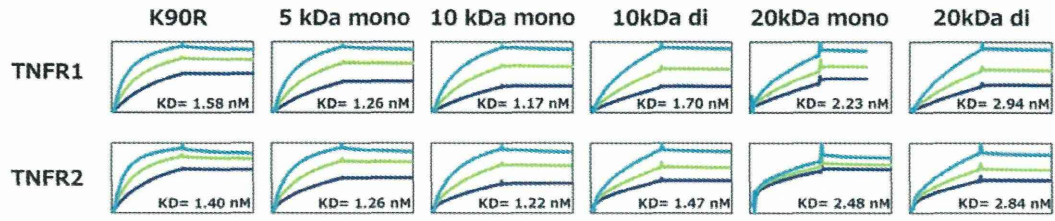
※計画書に記載の40 kDaPEGでは均一なPEG化体を分取できなかった。

5 kDa~20 kDaの分子量の異なるPEGによるK90R修飾体の創製に成功

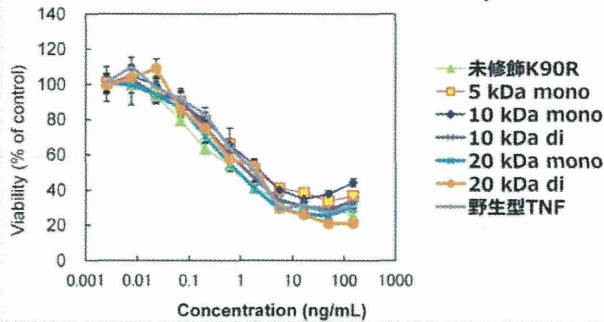
図3：PEG修飾による親和性・生物活性への影響評価 2

結合性評価 (BIAcore)

※濃度は順に200, 100, 50 nM、縦軸RU、横軸sec



TNFR1を介した生物活性 (L-M assay)



結合性評価 (BIAcore)

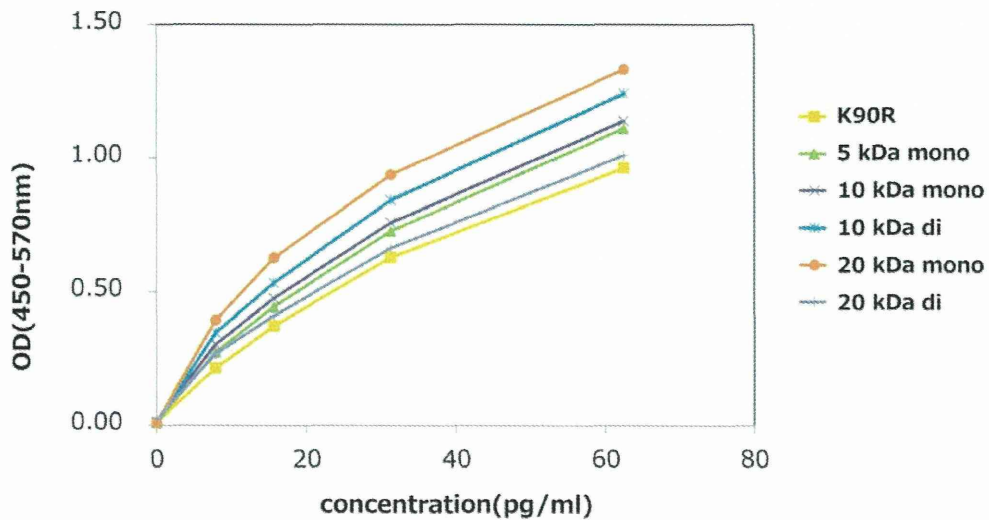
TNFR1: K90R 1.58 nMに対し、
最も低いもので2.94 nM
TNFR2: K90R 1.40 nMに対し、
最も低いもので2.80 nM

生物活性

K90RのIC50 :0.32 ng/mlに対し、
最も低いもので0.62 ng/ml
(野生型 TNFはIC50:0.72 ng/ml)

PEG化K90Rは、親和性・生物活性共に未修飾体の50%以上を保持 (PEG-IFNでは、数%まで減弱)。PEG化体でありながら野生型より高活性。

図4：血中濃度測定のためのELISA系の構築 3



研究成果の刊行に関する一覧表

・論文発表

1. Nagano K, Kanasaki S, Yamashita T, Maeda Y, Inoue M, Higashisaka K, Yoshioka Y, Abe Y, **Mukai Y**, Kamada H, Tsutsumi Y, Tsunoda S. Expression of Eph receptor A10 is correlated with lymph node metastasis and stage progression in breast cancer patients. *Cancer Med.* 2013;2(6):972-7.
2. Yoshikawa M, ***Mukai Y(CA)**, Okada Y, Tsumori Y, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Aird WC, Yoshioka Y, Okada N, Doi T, *Nakagawa S(CA)., Robo4 is an effective tumor endothelial marker for antibody-drug conjugates based on the rapid isolation of the anti-Robo4 cell-internalizing antibody., *Blood.* 2013;121(14):2804-13.
3. Seino S, Shibata Y, Yamanaka M, Nakagawa T, **Mukai Y**, Nakagawa S, Yamamoto TA., Design of Au/SPIO composite nanoparticle for facile and biocompatible surface functionalization via Au-S bond., *J Nanopart Res.*, 2013;15(1):1-8.
4. Morishige T, Yoshioka Y, Narimatsu S, Ikemizu S, Tsunoda S, Tsutsumi Y, **Mukai Y**, Okada N, Nakagawa S., Mutants of lymphotoxin- α with augmented cytotoxic activity via TNFR1 for use in cancer therapy. *Cytokine.* 2013;61(2):578-84.

・総説、著書

5. 向 洋平、中川 晋作：細胞内侵入抗体による腫瘍血管へのドラッグデリバリー., *Drug Delivery System.*, 2013; 28(5):430-438.
6. 向 洋平：がんのサイトカイン療法とその医薬品化のための DDS., *応用が広がる DDS*, 2013; 344-348.
7. 向 洋平、中川 晋作：ポリ γ グルタミン酸ナノ粒子による ER-endosome fusion に基づく抗原の効率的なクロスプレゼンテーション., *臨床免疫・アレルギー科*, 2013;59(3):379-385.

SHORT REPORT

Expression of Eph receptor A10 is correlated with lymph node metastasis and stage progression in breast cancer patients

Kazuya Nagano¹, So-ichiro Kanasaki^{1,2}, Takuya Yamashita^{1,2}, Yuka Maeda^{1,2}, Masaki Inoue¹, Kazuma Higashisaka^{1,2}, Yasuo Yoshioka^{1,2,3}, Yasuhiro Abe¹, Yohei Mukai¹, Haruhiko Kamada^{1,3}, Yasuo Tsutsumi^{1,2,3} & Shin-ichi Tsunoda^{1,2,3}

¹Laboratory of Biopharmaceutical Research, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan

²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

³The Center for Advanced Medical Engineering and informatics, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Keywords

Breast cancer, Eph receptor A10, lymph node metastasis

Correspondence

Shin-ichi Tsunoda, Laboratory of Biopharmaceutical Research, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan. Tel: +81-72-641-9814; Fax: +81-72-641-9817; E-mail: tsunoda@nibio.go.jp

Funding Information

This study was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research and Project for Development of Innovative Research on Cancer Therapeutics from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan. This study was also supported in part by Health Labor Sciences Research Grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

Received: 30 July 2013; Revised: 30 September 2013; Accepted: 4 October 2013

Cancer Medicine 2013; 2(6): 972–977

doi: 10.1002/cam4.156

Abstract

Eph receptor A10 (EphA10) is a valuable breast cancer marker that is highly expressed in breast cancer tissues by comparison with normal breast tissues, as we previously reported. However, the role of EphA10 expression in breast cancer is not well understood. Here, we have analyzed the expression of EphA10 at the mRNA- and protein-level in clinical breast cancer tissues and then evaluated the relationship with clinicopathological parameters for each sample. EphA10 mRNA expression was quantified by real-time polymerase chain reaction using complimentary DNA (cDNA) samples derived from breast cancer patients. Lymph node (LN) metastasis and stage progression were significantly correlated with EphA10 expression at the mRNA level ($P = 0.0091$ and $P = 0.034$, respectively). Furthermore, immunohistochemistry (IHC) staining of breast cancer tissue microarrays (TMAs) revealed that EphA10 expression at the protein level was also associated with LN metastasis and stage progression ($P = 0.016$ and $P = 0.011$, respectively). These results indicate that EphA10 expression might play a role in tumor progression and metastasis. Our findings will help elucidate the role of EphA10 in clinical breast cancer progression.

Introduction

Eph receptors comprise the largest subgroup of the receptor tyrosine kinase family of proteins. Currently, nine type-A (EphA1–A8, EphA10) and five type-B (EphB1–B4, EphB6) molecules are known in mammals. Eph family receptors play important roles in physiological

development such as neural development [1] and glucose homeostasis [2]. In addition, several Eph family receptors were implicated in various aspects of the tumor malignancy, including tumorigenesis [3, 4], proliferation [5, 6], vasculogenesis [7, 8] or metastasis [9–11]. Indeed, EphA2 is highly expressed in several kinds of tumor, and this enhanced expression is thought to

be related to tumor progression [3, 5, 9, 10]. Currently, clinical trials of a EphA2-targeting drug are ongoing [12]. Therefore, the expression profiles, function, and targeting therapy for Eph family receptors are directly related to cancer biology and drug development.

EphA10 is a novel breast cancer marker that was originally discovered by ourselves using a proteomics approach [13]. Prior to this discovery, EphA10 was only known to be expressed in the testis at the mRNA level [14]. Our group has developed an “antibody proteomics system”, which facilitates the validation of biomarker candidates identified from proteome analyses [13]. Using this method, we previously revealed that EphA10 is expressed in many breast cancer tissues compared to normal tissues [13]. However, the function of EphA10 has not been fully analyzed. Consequently, the relationship between EphA10 and clinical tumor progression is poorly understood.

Here, we first analyzed the statistical relationship between EphA10 mRNA expression in clinical tumor tissues and their clinicopathological parameters. Next, we evaluated the correlation with EphA10 expression at the protein level, which is important to fulfill the EphA10 function. This data will help elucidate the role of EphA10 in clinical breast cancer progression.

Material and Methods

Analysis of EphA10 mRNA expression by real-time polymerase chain reaction

Complimentary DNAs (cDNA) derived from human breast tumors were purchased from OriGene Technologies (Rockville, MD). The 20 μ L polymerase chain reaction (PCR) mixture included 1 μ L of cDNA template, 10 μ L of TaqMan Gene Expression Master Mix, and 1 μ L of TaqMan probe (EphA10:Hs01017018_m1 or actin-beta:Hs9999903_m1) (Life Technologies, Carlsbad, CA). Reactions were performed according to the manufacturer's instructions. The threshold cycles were determined using the default settings. EphA10 mRNA expression levels were normalized against actin-beta. Cases with greater or less than the median value were classified into a high or low expression group, respectively (Table 1). In Figure 1, we display the EphA10 mRNA expression level as the ratio against the median.

Analysis of EphA10 protein expression by immunohistochemistry staining

Breast cancer tissue microarrays (TMAs) (US Biomax, Rockville, MD) were deparaffinated in xylene and rehydrated in ethanol. Epitope retrieval was performed by

maintaining the Target Retrieval Solution (Dako, Glostrup, Denmark) according to the manufacturer's instructions. After treatment, endogenous peroxidase was blocked with 0.3% H₂O₂ for 5 min. The slides were then incubated with anti-human EphA10 polyclonal antibody (Abgent, San Diego, CA) for 30 min. After washing three times, the slides were incubated for 30 min with Envision+Dual Link (Dako, Glostrup, Denmark). Finally, the slides were washed three times and treated in 3,3'-diaminobenzidine and counterstained with hematoxylin. For statistical analysis, study samples were divided into high and low expression groups based on the following two criteria. In terms of distribution, the percentage of positive cells in all tumor cells was scored as 0 (0%), 1 (1–50%), and 2 (51–100%). In terms of quantity, the signal intensity was scored as 0 (no signal), 1 (weak), 2 (moderate), or 3

Table 1. Correlation between EphA10 mRNA expression and clinicopathological characteristics.

Characteristics	n	EphA10 mRNA expression		P value	
		High n (%)	Low n (%)	χ^2	Mann-Whitney
Age					
<45	5	2 (40.0)	3 (60.0)	1.00	–
≥45	30	15 (50.0)	15 (50.0)		
Gender					
Male	0	0 (0.0)	0 (0.0)	–	–
Female	35	17 (48.6)	18 (51.4)		
Histological classification					
Invasive ductal carcinoma	32	15 (46.9)	17 (53.1)	0.21	–
Invasive lobular carcinoma	2	2 (100.0)	0 (0.0)		
Squamous cell carcinoma	1	0 (0.0)	1 (100.0)		
pT					
T1	13	6 (46.2)	7 (53.8)	0.23	0.25
T2	18	8 (44.4)	10 (55.6)		
T3	3	3 (100.0)	0 (0.0)		
T4	1	1 (100.0)	0 (0.0)		
pN					
N0	17	5 (29.4)	12 (70.6)	0.045	0.0091
N1	9	6 (66.7)	3 (33.3)		
N2	5	3 (60.0)	2 (40.0)		
N3	4	4 (100.0)	0 (0.0)		
pStage					
I	10	4 (40.0)	6 (60.0)	0.022	0.034
II	13	4 (30.8)	9 (69.2)		
III	12	10 (83.3)	2 (16.7)		

Indication of each pathological parameter is as follows: pT, degree of size of the primary tumor; pN, degree of spread to regional lymph nodes; pStage, degree of cancer progression.

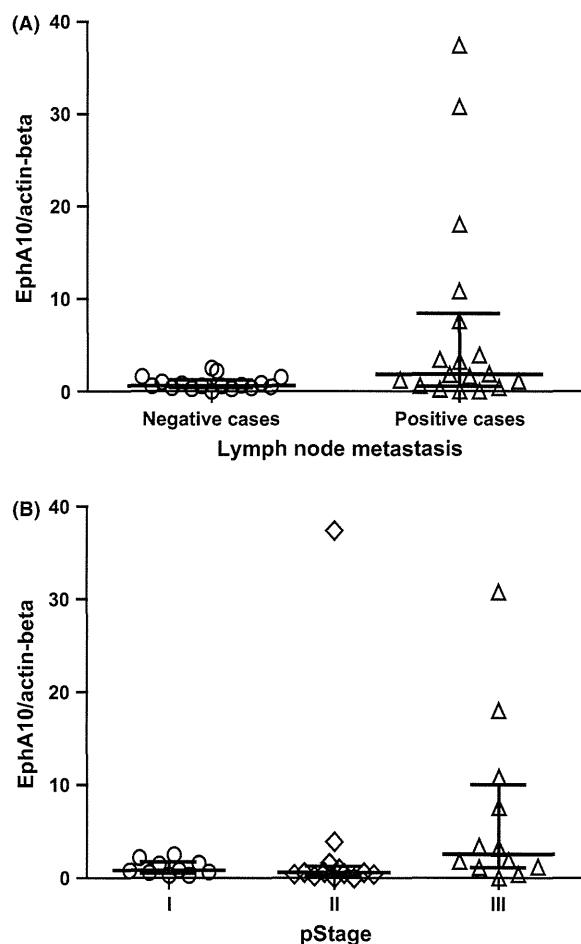


Figure 1. EphA10 mRNA expression level analysis in lymph node (LN)-positive and -negative cases, or stage I, II, and III. EphA10 mRNA expression level in each case was normalized to that of actin-beta. The ratio of EphA10 mRNA expression level against median value was plotted for LN-positive and -negative cases (A), or stage I, II, and III, respectively (B). Differences were evaluated using the Mann–Whitney test ($P = 0.025$) (A) and Kruskal–Wallis test ($P = 0.044$) (B). Bar and range show the median with interquartile range in each group.

(marked). Cases with a total score of ≥ 3 were classified into the high expression group.

Statistical methods

All analyses were performed using GraphPad Prism 5 version (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Chi-square or Fisher's exact test were used to compare the categorical variables. Differences between two or three groups were analyzed by the Mann–Whitney or Kruskal–Wallis test, respectively. All hypothesis testing was two-tailed with a significant level of 0.05.

Table 2. Correlation between EphA10 protein expression and clinicopathological characteristics.

Characteristics	n	EphA10 protein expression		P value	
		High n (%)	Low n (%)	χ^2	Mann–Whitney
Age					
<45	103	61 (59.2)	42 (40.8)	0.19	–
≥ 45	199	133 (66.8)	66 (33.2)		
Gender					
Male	2	2 (100.0)	0 (0.0)	0.54	–
Female	300	192 (64.0)	108 (36.0)		
Histological classification					
Invasive ductal carcinoma	272	177 (65.1)	95 (34.9)	0.59	–
Invasive lobular carcinoma	10	5 (50.0)	5 (50.0)		
Invasive papillary carcinoma	6	5 (83.3)	1 (16.7)		
Mucinous carcinoma	2	1 (50.0)	1 (50.0)		
Medullary carcinoma	2	2 (100.0)	0 (0.0)		
Carcinosarcoma	1	1 (100.0)	0 (0.0)		
pT					
T1	21	15 (71.4)	6 (28.6)	0.35	0.96
T2	200	127 (63.5)	73 (36.5)		
T3	46	26 (56.5)	20 (43.5)		
T4	35	26 (74.3)	9 (25.7)		
pN					
N0	154	90 (58.4)	64 (41.6)	0.044	0.016
N1	116	80 (69.0)	36 (31.0)		
N2	26	22 (84.6)	4 (15.4)		
N3	6	3 (50.0)	3 (50.0)		
pStage					
I	9	4 (44.4)	5 (55.6)	0.037	0.011
II	232	143 (61.6)	89 (38.4)		
III	61	47 (77.0)	14 (23.0)		

Indication of each pathological parameter is as follows: pT, degree of size of the primary tumor; pN, degree of spread to regional lymph nodes; pStage, degree of cancer progression.

Results and Discussion

In order to analyze the contribution of EphA10 to clinical breast cancer progression, we evaluated a possible correlation between EphA10 mRNA expression in the clinical tumor tissues and clinicopathological parameters such as primary tumor size (pT), lymph node (LN) metastasis (pN) and stage grouping as indicators of cancer progression (Table 1). Statistical analysis showed that EphA10 expression was independent of age, histological classification, and pT indexes. Nonetheless, EphA10 mRNA expression was positively associated with the progression

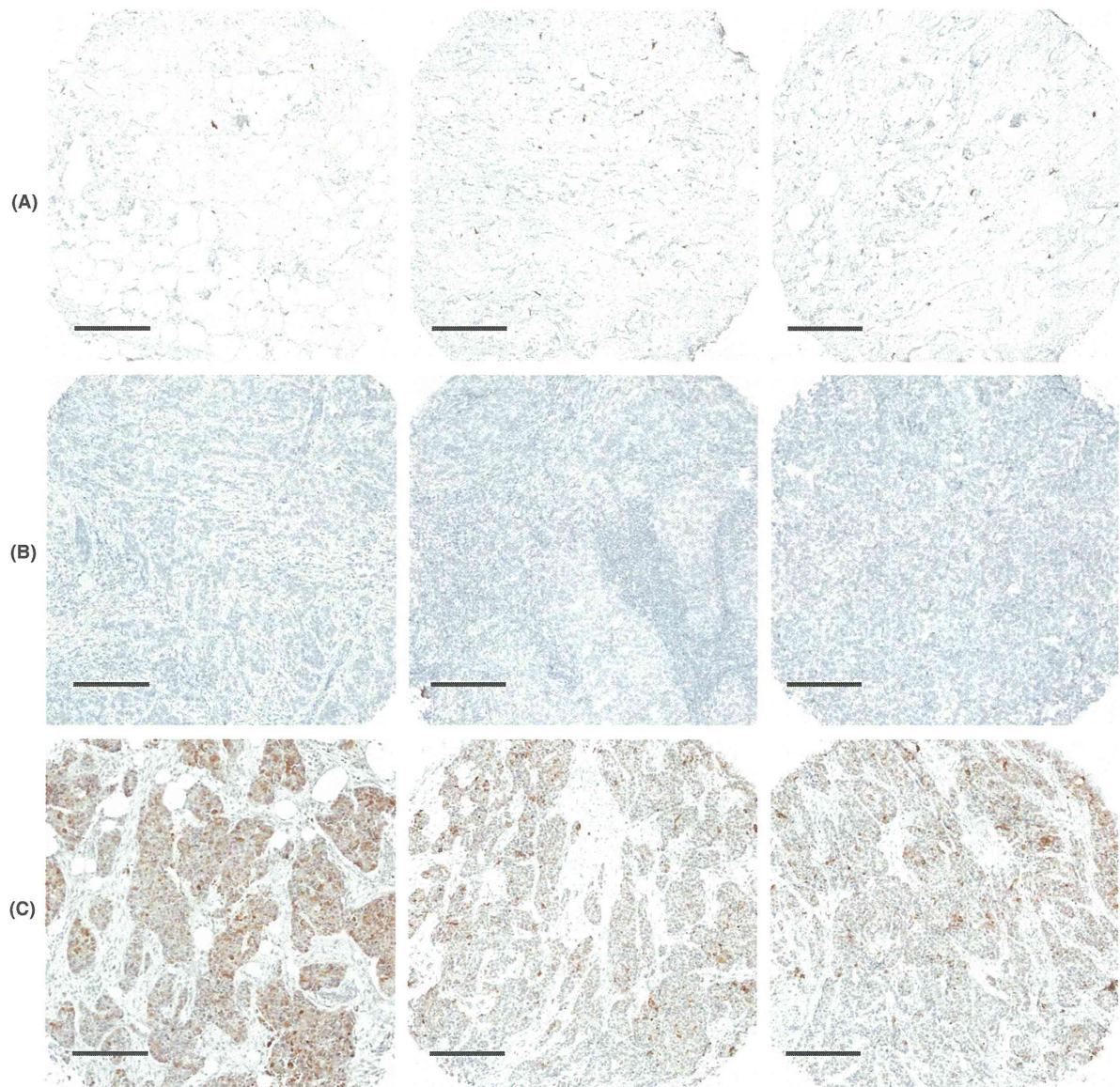


Figure 2. Immunohistochemical staining images in tissue microarray (TMA) with breast tumor and normal tissues. TMAs with breast tumor and normal tissues were stained using anti-EphA10 antibody. Representative images of normal breast tissue (A), EphA10 negative breast cancer tissue (B), and EphA10 positive breast cancer tissues (C) are shown. Scale bar: 200 μ m.

of the stage, which strongly supports our previous TMA-based analysis [13]. Furthermore, we found that EphA10 expression was also positively correlated with LN metastasis. Given that a combination of pT and pN values in each case defines stage I–III, these data suggest a significant correlation with LN metastasis might contribute to that with stage progression.

For detailed evaluation of the contribution of EphA10 expression to LN metastasis, we divided all the cases into

LN metastasis positive and negative, and then plotted the EphA10 expression levels for the two groups. Figure 1A indicates that patients with elevated levels of EphA10 expression in tumor tissues were positive for LN metastasis. Indeed, a significant difference between LN-positive and -negative cases was observed. Moreover, we similarly analyzed for pStage. Figure 1B indicated that, with the exception of one outlier observed in stage II, EphA10 expression also displayed a significant positive correlation

with stage progression. Taken together, these data suggest that the level of EphA10 expression partly contributes to breast cancer progression.

Next, we evaluated the relationship between EphA10 protein expression and clinicopathological characteristics. Immunohistochemistry (IHC) staining of TMAs showed that EphA10 was expressed in approximately 60% of breast tumor tissues, but not in normal breast tissues, which is consistent with our previous studies [13] (Fig. 2).

Statistical analysis revealed that EphA10 expression at the protein level was also independent of age, gender, histological classification and pT indexes. However, EphA10 protein expression was positively associated LN metastasis and stage progression (Table 2). Moreover, in order to validate this correlation, we also performed an analysis using a different anti-EphA10 antibody that we had isolated from a naïve phage antibody library, which gave similar results (data not shown). In addition, we also analyzed the possible correlation between EphA10 protein level and LN metastasis or stage progression, using the IHC staining total score as an indicator of the protein expression level. As shown to Figure S1, the total score is significantly associated with LN metastasis, but not stage progression. Taken together, our findings indicate that EphA10 expression is related to LN metastasis as well as stage progression in breast cancer, although improved quantitative analysis of protein expression level by mass spectrometry is needed.

Other Eph receptors such as EphA2 or EphB3 have invasive, migrating and anoikis-inhibiting abilities, so that EphA2- or EphB3-expressing cancer cells promote metastasis [3, 9–11]. Thus, EphA10 could also elicit a similar biological effect on disease progression, although further investigations are needed to elucidate the mechanism by which EphA10 expression is correlated with LN metastasis. Moreover, aiming for LN metastasis prediction, we should set up the criteria by more sample analyses and evaluate LN metastasis prospectively.

In conclusion, we demonstrated that EphA10 expression at both the gene and protein level in clinical breast cancer tissues is significantly associated with LN metastasis as well as stage progression. We believe that the data will help elucidate the biological function of EphA10 and facilitate the development of novel breast cancer drugs.

Acknowledgments

This study was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research and Project for Development of Innovative Research on Cancer Therapeutics from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan. This study was also supported in part by Health

Labor Sciences Research Grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

Conflict of Interest

None declared.

References

1. Yamaguchi, Y., and E. B. Pasquale. 2004. Eph receptors in the adult brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14:288–296.
2. Konstantinova, I., G. Nikolova, M. Ohara-Imaizumi, P. Meda, T. Kucera, K. Zarbalis, et al. 2007. EphA-Ephrin-A-mediated beta cell communication regulates insulin secretion from pancreatic islets. *Cell* 129:359–370.
3. Brantley-Sieders, D. M., G. Zhuang, D. Hicks, W. B. Fang, Y. Hwang, J. M. Cates, et al. 2008. The receptor tyrosine kinase EphA2 promotes mammary adenocarcinoma tumorigenesis and metastatic progression in mice by amplifying ErbB2 signaling. *J. Clin. Invest.* 118:64–78.
4. Munarini, N., R. Jager, S. Abderhalden, G. Zuercher, V. Rohrbach, S. Loercher, et al. 2002. Altered mammary epithelial development, pattern formation and involution in transgenic mice expressing the EphB4 receptor tyrosine kinase. *J. Cell Sci.* 115:25–37.
5. Mohammed, K. A., X. Wang, E. P. Goldberg, V. B. Antony, and N. Nasreen. 2011. Silencing receptor EphA2 induces apoptosis and attenuates tumor growth in malignant mesothelioma. *Am. J. Cancer Res.* 1:419–431.
6. Kumar, S. R., J. Singh, G. Xia, V. Krasnoperov, L. Hassanieh, E. J. Ley, et al. 2006. Receptor tyrosine kinase EphB4 is a survival factor in breast cancer. *Am. J. Pathol.* 169:279–293.
7. Sawamiphak, S., S. Seidel, C. L. Essmann, G. A. Wilkinson, M. E. Pitulescu, T. Acker, et al. 2010. Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis. *Nature* 465:487–491.
8. Noren, N. K., M. Lu, A. L. Freeman, M. Koolpe, and E. B. Pasquale. 2004. Interplay between EphB4 on tumor cells and vascular ephrin-B2 regulates tumor growth. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101:5583–5588.
9. Brantley-Sieders, D. M., W. B. Fang, D. J. Hicks, G. Zhuang, Y. Shyr, and J. Chen. 2005. Impaired tumor microenvironment in EphA2-deficient mice inhibits tumor angiogenesis and metastatic progression. *FASEB J.* 19:1884–1886.
10. Duxbury, M. S., H. Ito, M. J. Zinner, S. W. Ashley, and E. E. Whang. 2004. EphA2: a determinant of malignant cellular behavior and a potential therapeutic target in pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene* 23:1448–1456.
11. Ji, X. D., G. Li, Y. X. Feng, J. S. Zhao, J. J. Li, Z. J. Sun, et al. 2011. EphB3 is overexpressed in

- non-small-cell lung cancer and promotes tumor metastasis by enhancing cell survival and migration. *Cancer Res.* 71:1156–1166.
12. Annunziata, C. M., E. C. Kohn, P. Lorusso, N. D. Houston, R. L. Coleman, M. Buzoianu, et al. 2013. Phase 1, open-label study of MEDI-547 in patients with relapsed or refractory solid tumors. *Invest. New Drugs* 31:77–84.
 13. Imai, S., K. Nagano, Y. Yoshida, T. Okamura, T. Yamashita, Y. Abe, et al. 2011. Development of an antibody proteomics system using a phage antibody library for efficient screening of biomarker proteins. *Biomaterials* 32:162–169.
 14. Aasheim, H. C., S. Patzke, H. S. Hjorthaug, and E. F. Finne. 2005. Characterization of a novel Eph receptor tyrosine kinase, EphA10, expressed in testis. *Biochim. Biophys. Acta* 1723:1–7.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. EphA10 protein expression level analysis in LN-positive and -negative cases, or stage I, II, and III.

VASCULAR BIOLOGY

Robo4 is an effective tumor endothelial marker for antibody-drug conjugates based on the rapid isolation of the anti-Robo4 cell-internalizing antibody

Mai Yoshikawa,¹ Yohei Mukai,^{1,2} Yoshiaki Okada,¹ Yuki Tsumori,¹ Shin-ichi Tsunoda,² Yasuo Tsutsumi,^{1,2} William C. Aird,³ Yasuo Yoshioka,¹ Naoki Okada,¹ Takefumi Doi,¹ and Shinsaku Nakagawa¹

¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka, Japan, ²Laboratory of Biopharmaceutical Research, National Institute of Biomedical Innovation (NiBio), Osaka, Japan, ³Center for Vascular Biology Research and Division of Molecular and Vascular Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA

Key Points

- First therapeutic application that targets Robo4 on the tumor blood vasculature
- High-throughput screening system to isolate cell-internalizing monoclonal antibodies useful to develop effective antibody-drug conjugates

Monoclonal antibodies (mAbs) that are internalized into cells are a current focus in the development of antibody-drug conjugates (ADCs). We describe a phage display–based high-throughput screening system to rapidly isolate cell-internalizing mAbs. We simultaneously examined the cell-internalizing activities of several hundred independent mAbs and successfully isolated cell-internalizing mAbs against the tumor endothelial markers Roundabout homolog 4 (Robo4) and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2). Tumor accumulation of mAbs with high cell-internalizing activity was significantly higher than that of mAbs with low cell-internalizing activity. Furthermore, the antitumor effects of ADCs of mAbs with high cell-internalizing activity were significantly stronger than those of mAbs with low cell-internalizing activity. Although anti-VEGFR2 therapy caused a significant loss of body weight, anti-Robo4 therapy did not. These findings indicate that cell-internalizing activity plays an important role in the biodistribution

and therapeutic effects of ADCs. Further, Robo4 can be an effective marker for tumor vascular targeting. (*Blood*. 2013;121(14):2804-2813)

Introduction

Antibody drug conjugates (ADCs), ie, monoclonal antibodies (mAbs) labeled with certain anticancer agents, are currently the focus of antibody-based drug discovery. ADCs have mAb-derived specificity and allow for targeted delivery of cytotoxic drugs to a tumor, which is expected to significantly enhance the antitumor activity of mAbs.¹ Trastuzumab emtansine (T-DM1)² for human epidermal growth factor receptor 2 (Her-2)–positive breast cancer and brentuximab vedotin (SGN-35)³ for relapsed or refractory CD30-positive lymphoproliferative disorders are now in phase 3 clinical trials as effective ADCs.⁴ ADCs will have an important role in overcoming some types of refractory cancers and will contribute to the field of tumor vascular targeting.⁵

An essential property of ADCs is that the mAb should be efficiently internalized into the cell where the cytotoxic effects of anticancer drugs occur.¹ The isolation of mAbs with high cell-internalizing activity (cell-internalizing mAbs) is a limiting factor in the development of ADCs. The discovery of potent cell-internalizing mAbs, however, requires labor-intensive screening of a massive number of candidates, and therefore the development of phage display–based methods to identify these candidates is highly desirable.^{6,7} In the phage display–based method, a phage antibody

library is added to the desired cells and then phages bound to the cell surface are removed. Only internalized phages are rescued from the intracellular compartment. Even with this method, however, the internalizing activities of individual antibody candidates must be assessed, because the concentrated phage pool comprises a “polyclonal” population. To address this issue, we used high-throughput screening methods to estimate “monoclonal” cell-internalization activities using a protein synthesis inhibitory factor (PSIF),⁸ which provided a breakthrough in reducing the time-consuming screening of the cell-internalizing activity.

PSIF is a fragment of a bacterial exotoxin derived from *Pseudomonas aeruginosa*.⁹ PSIF lacks its cell binding domain, and its cytotoxic portion is used in a recombinant immunotoxin.¹⁰ Upon entry into the cell, PSIF has strong cytotoxicity by inducing ADP-ribosylation of elongation factor-2, which is essential for protein synthesis.¹¹ Our group previously accelerated the identification of cell-internalizing novel protein transduction domains (PTDs) by expressing PTD-PSIF fusion proteins in the supernatant of *Escherichia coli*.⁸ Using this system, we successfully discovered superior HIV-Tat PTD mutants by simultaneously estimating

Submitted December 3, 2012; accepted January 22, 2013. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, January 30, 2013; DOI 10.1182/blood-2012-12-468363.

M.Y. and Y.M. contributed equally to this study.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked “advertisement” in accordance with 18 USC section 1734.

© 2013 by The American Society of Hematology