

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ゲーションの最適化

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ゲーション（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)、ovalbumin(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、一晚4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を用い、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 の致命的問題点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., HUPO 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 HUPO 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., HUPO 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ィ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コンjug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

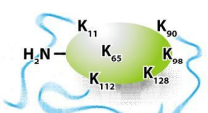
しかし、
現在もTNFの医薬品化は有望視

- 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。

高分子バイオコンjugーション：TNFの全身性副作用を軽減

野生型 TNF

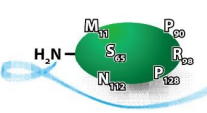


活性に重要なリジン残基へのランダム PEG 修飾

著しい活性低下

Nat Biotech 2003, Clin Can Res 2004

リジン欠損 TNF 変異体



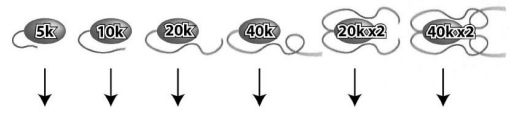
活性増強 K90R

N 末端への部位特異的 PEG 修飾

高比活性保持

部位特異的バイオコンjug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。

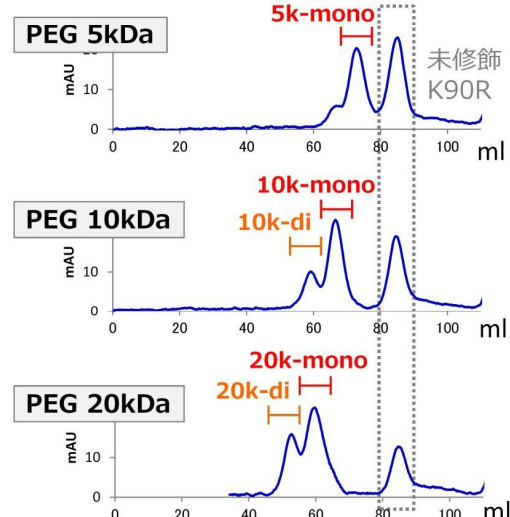
図2：分子量の異なるPEG修飾体の創製¹

$\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CO}-\text{N}$ + K90R

PEG-NHS (5, 10, 20 kDa)

4 or 25°C, 15 min

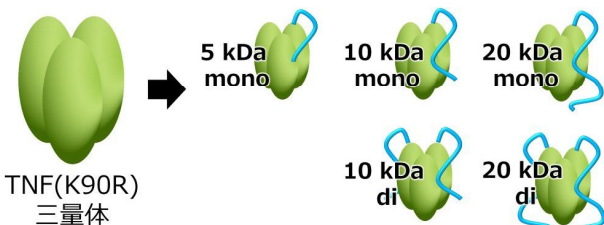
ゲルろ過FPLCで分取



SDS-PAGE

		K90R						5 μg /lane
		(-)	5k	10k	10k	20k	20k	
kDa		(-)	mono	mono	di	mono	di	
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

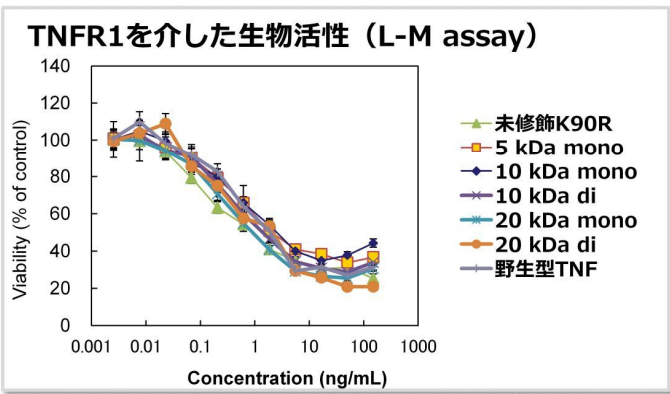
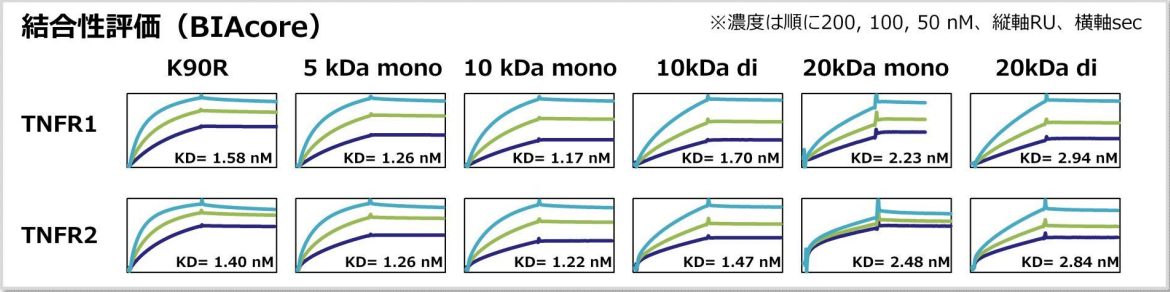


TNF(K90R) 三量体

※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

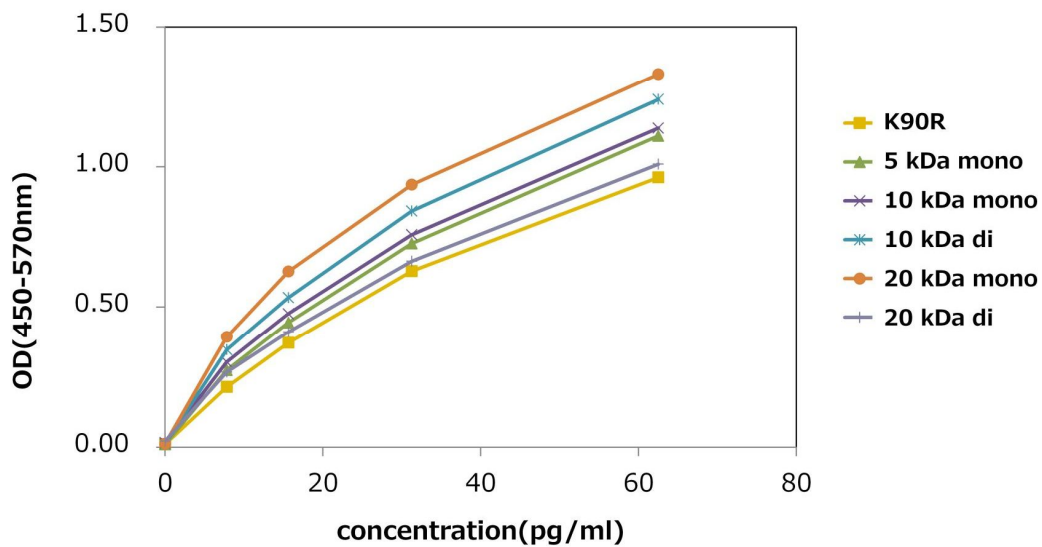


結合性評価 (BIAcore)
 TNFR1: K90R 1.58 nMに対し、最も低いもので2.94 nM
 TNFR2: K90R 1.40 nMに対し、最も低いもので2.80 nM

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.