

# Growth inhibitory effect of an injectable hyaluronic acid-tyramine hydrogels incorporating human natural interferon- $\alpha$ and sorafenib on renal cell carcinoma cells

腎細胞癌細胞における天然型IFN- $\alpha$ 含有ヒアルロン酸-チラミンハイドロゲルと sorafenibを用いた増殖抑制効果について

植田 浩介

## 【Background】

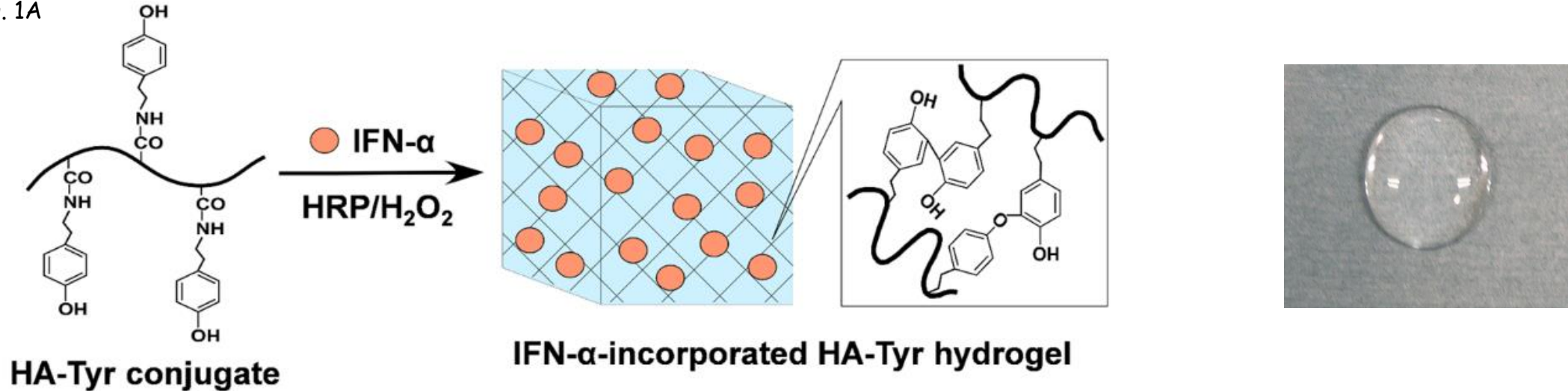
- ✓ IFN- $\alpha$ を含む免疫療法は転移性腎細胞癌の治療に用いられているが、奏効率は15-20%程度と言われている。
- ✓ しかし、肺転移のみの症例、特に日本人においては有効であることも示されており、分子標的時代においても治療オプションの一つとなっている。
- ✓ IFNは不安定で血中半減期は3~8時間と短く、24時間後には検出感度以下となるため、頻回の注射を必要とする。そのため、患者のQOLやコンプライアンスの低下を引き起こしやすい。また、IFN血中濃度の上昇・下降を繰り返すため発熱・悪寒・頭痛・倦怠感などの副作用をきたしやすい。

✓ **現在、本邦で腎癌治療においては天然型(natural type)IFN-aである Sumiferonのみが承認されている。**

✓ **遺伝子組換え型(recombinant)IFNはPEG化は可能であるが、天然型IFNのPEG化は困難と言われている。**

# Hyaluronic acid-Tyramine (HA-Tyr) hydrogel

Fig. 1A



Hyaluronic acid-tyramine (HA-Tyr) hydrogel



✓ **ハイドロゲル**は触媒として**ホースラティッシュペルオキシダーゼ(HRP)**および**過酸化水素水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**の存在下で、**フェノール含有ポリマー**から、例えば**HA-Tyr 結合体**から形成される。

✓ **ゲル化速度**は**HRP**の濃度により調節され、**メッシュサイズ(架橋密度・硬度)**は**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**の濃度を変化させることにより調節することができる。

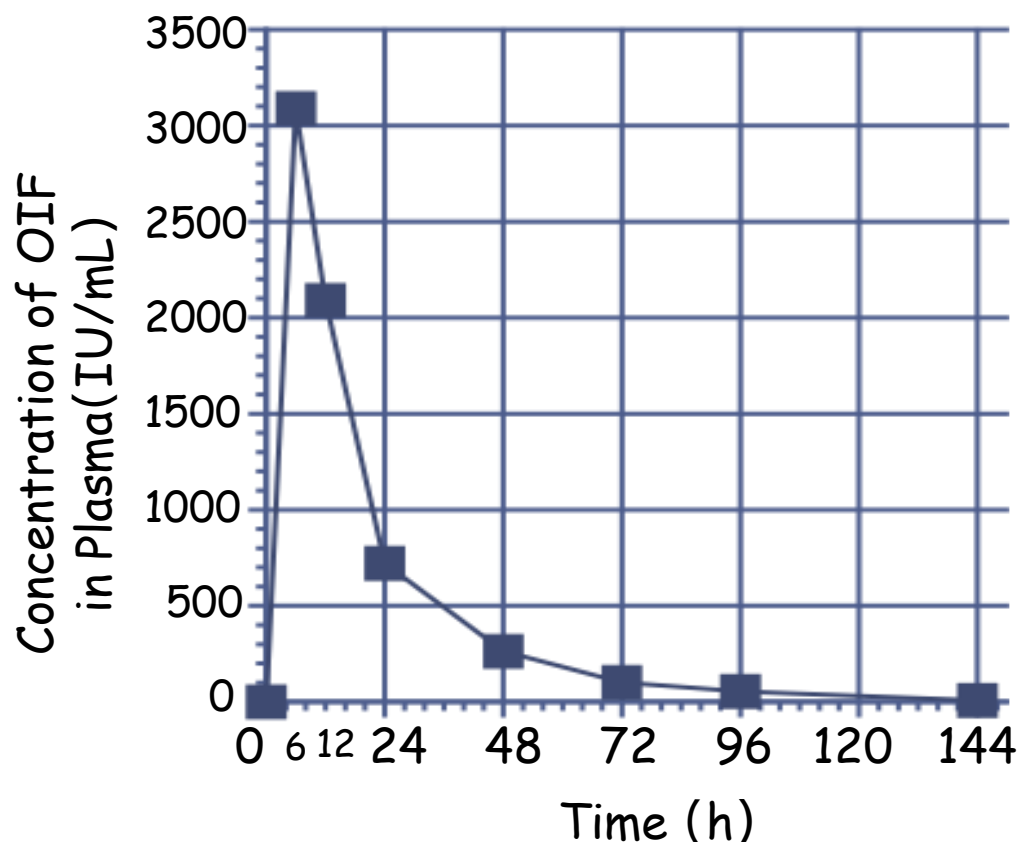


これらの濃度を調節することにより**ハイドロゲル**からの**薬物放出速度・率**を調節することができる。

# Half-life of OIF alone in plasma injected to humans subcutaneously vs HA-Tyr-OIF hydrogels in plasma of nude mice : 5.7 hours vs **18.6 hours**

Medical-supplies interview form, Otsuka Pharma Co. Ltd.

Yano H, et al. unpublished data



■ Concentration of OIF in plasma of nude mice treated with the mixture solution of HA-Tyr conjugate, HRP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5%) and OIF (1.0 × 10<sup>6</sup> IU/mL).

✓ 以前のOIFを用いた検討ではHA-Tyr hydrogelを用いることで約**3倍**の血中半減期の延長を認めた。

# Treatment with the HA-Tyr-soft-IFN hydrogel reduced the tumor size more than IFN- $\alpha$ 2a alone on a HCC cell line.

Keming, X. et al. *J Control Rel.* 166: 203-210, 2013.

**Table 1**  
Characterization of IFN- $\alpha$ 2a-incorporated HA-Tyr hydrogels<sup>a</sup>.

Sample	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ( $\mu$ M)	G' (Pa)	Q <sub>M</sub>	Q <sub>V</sub>	$\nu_e$ ( $10^{-5}$ mol/cm <sup>3</sup> )	$\epsilon$ (nm)
HA-Tyr-soft	437	990 $\pm$ 49	46.1 $\pm$ 0.5	56.4 $\pm$ 0.7	1.8 $\pm$ 0.04	5468 $\pm$ 7.6
HA-Tyr-soft-IFN	437	898 $\pm$ 122 <sup>b</sup>	48.3 $\pm$ 2.5	59.1 $\pm$ 3.0	1.7 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	5768 $\pm$ 34.6 <sup>d</sup>
HA-Tyr-stiff	728	3078 $\pm$ 184	39.3 $\pm$ 1.5	48.1 $\pm$ 1.9	2.4 $\pm$ 0.2	4532 $\pm$ 20.7
HA-Tyr-stiff-IFN	728	3028 $\pm$ 199 <sup>b</sup>	35.8 $\pm$ 2.3	43.8 $\pm$ 2.8	2.8 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>	4065 $\pm$ 30.5 <sup>d</sup>

Note. Results are shown as the mean values  $\pm$  standard deviation ( $n=3$ ). Abbreviations: storage modulus ( $G'$ ), mass swelling ratio ( $Q_M$ ), volumetric swelling ratio ( $Q_V$ ), effective crosslink density ( $\nu_e$ ), mesh size ( $\epsilon$ ).

<sup>a</sup> All hydrogels were formed with 1.75 wt.% of HA-Tyr conjugate and 0.124 units/ml of HRP with or without  $2.5 \times 10^5$  IU/ml of IFN- $\alpha$ 2a.

<sup>b</sup>  $G'$ ,  $\nu_e$  and  $\epsilon$  of HA-Tyr hydrogels with IFN- $\alpha$ 2a were not significantly different from those of HA-Tyr hydrogels without IFN- $\alpha$ 2a ( $P>0.05$ ).

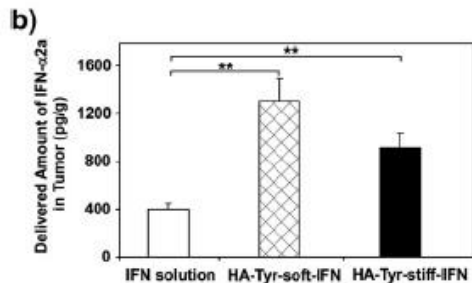
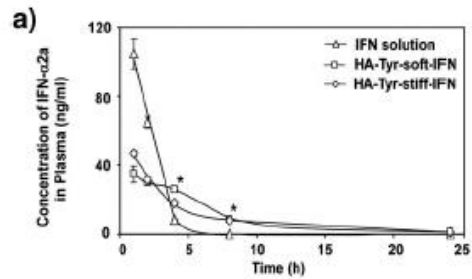
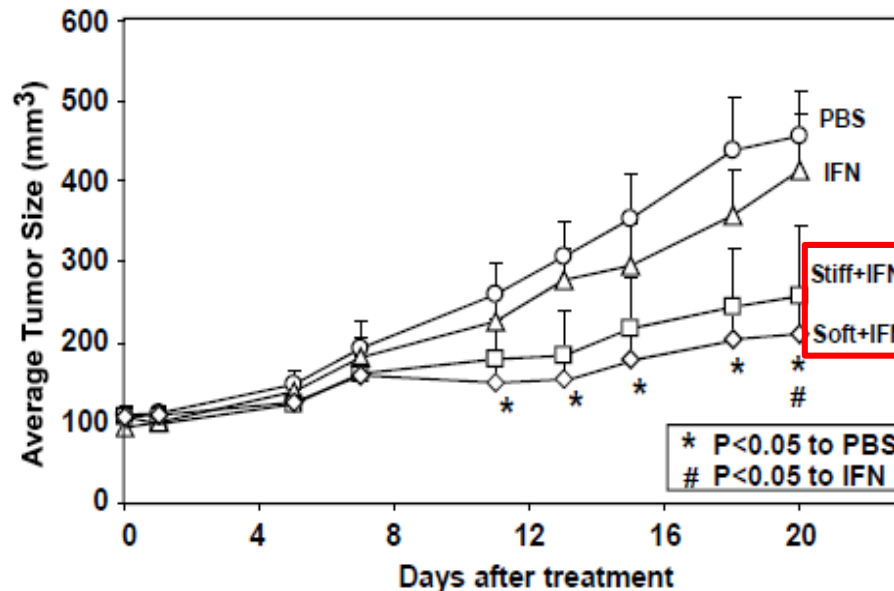
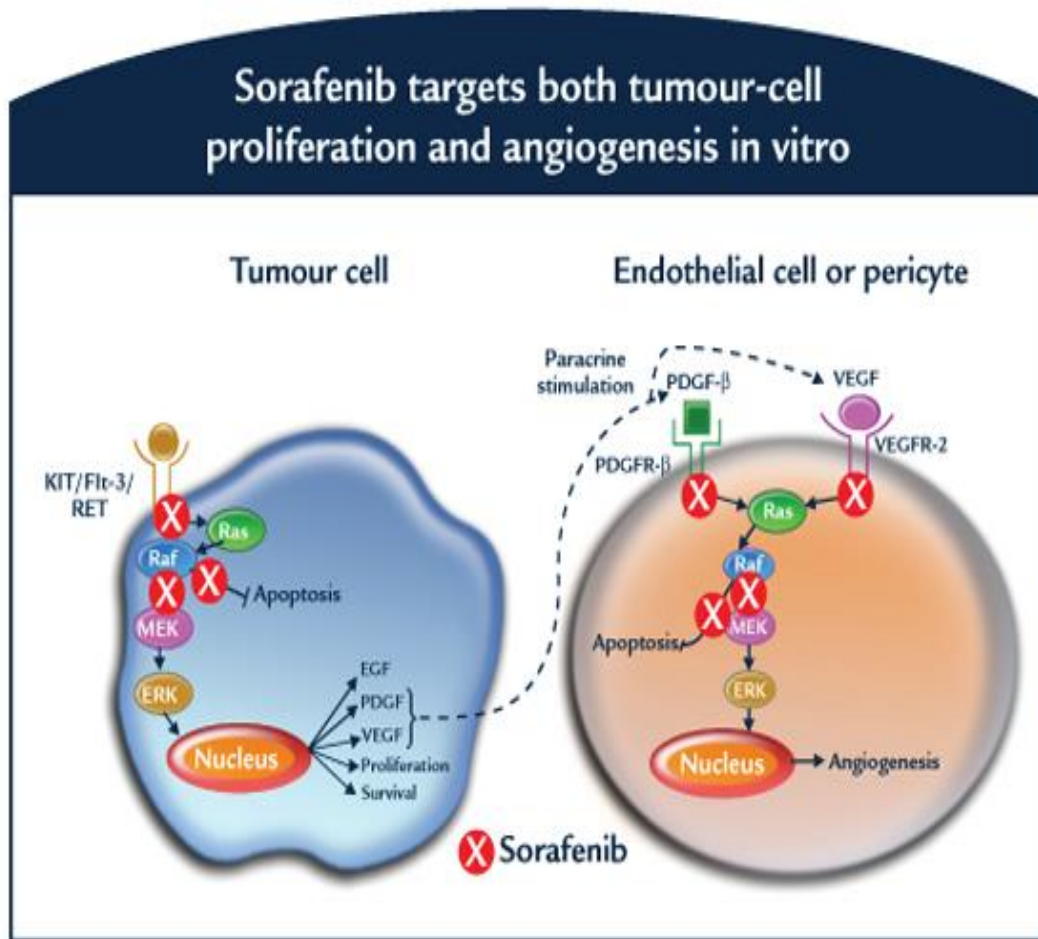


Fig. 5. (a) Pharmacokinetics of IFN- $\alpha$ 2a in the plasma of Balb/c nude mice ( $n=3$ , mean  $\pm$  standard error of the mean). \*:  $P<0.05$ . (b) Amount of IFN- $\alpha$ 2a delivered to tumor tissues of HAK-1B inoculated Balb/c nude mice. The amount of IFN- $\alpha$ 2a (pg) delivered at the tumor tissue was normalized with the weight of the tumor (g) ( $n=4$ , mean  $\pm$  standard error of the mean). \*\*:  $P<0.01$ .



✓ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の濃度を変化させた2種類の硬度のHA-Tyr hydrogelを用いた検討では、437 $\mu$ MのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を使用したsoft hydrogelにおいて腫瘍へ到達するIFN濃度も高く、より強い抗腫瘍効果を呈することが示された。

# Anti-tumor effect of Sorafenib (Nexavar®)



Multi-kinase inhibitor

- ✓ Phase II trial showing the combination of Sorafenib plus IFN- $\alpha$ 2b has substantial activity in patients with metastatic renal cell carcinoma

Gollob, GA, et al. J Clin Oncol 25: 2007.

- ✓ Mechanism of Synergistic Antitumor Effect of Sorafenib and Interferon- $\alpha$  on Treatment of Renal cell carcinoma

Takeuchi, A, et al. J Urol 184: 2010.

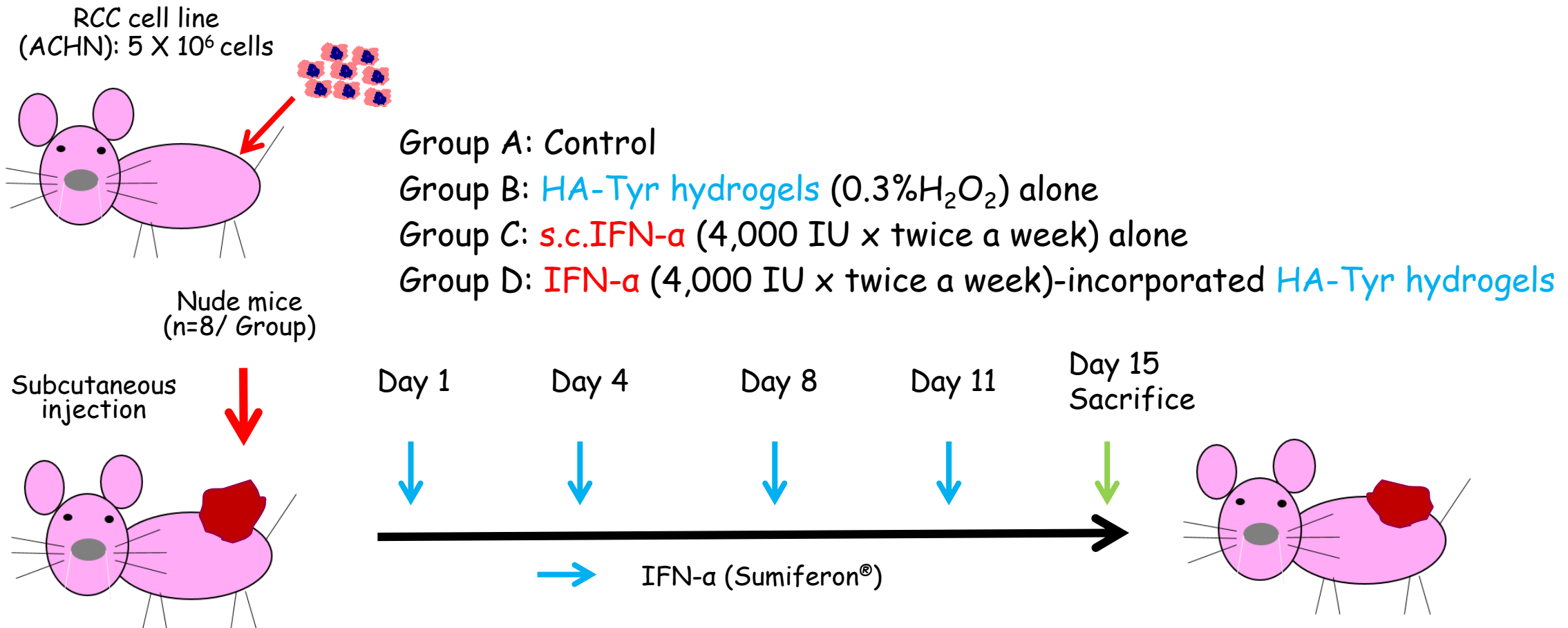
- ✓ **これまでの様々な検討において IFN- $\alpha$ とsorafenibの併用効果**  
**が示されている。**

## 【Aims】

- ✓ 腎細胞癌細胞における**天然型IFN- $\alpha$**  (Sumiferon)含有**HA-Tyr hydrogels**の抗腫瘍効果につき検討する。
- ✓ さらに、**天然型IFN- $\alpha$**  (Sumiferon)含有**HA-Tyr hydrogels**と**sorafenib**の併用による効果につき検討する。



# Experimental design to examine anticancer effects of IFN- $\alpha$ -incorporated HA-Tyr hydrogels on human RCC cells *in vivo*



# Anticancer effect of IFN- $\alpha$ -incorporated HA-Tyr hydrogels on tumor xenografted in nude mice.

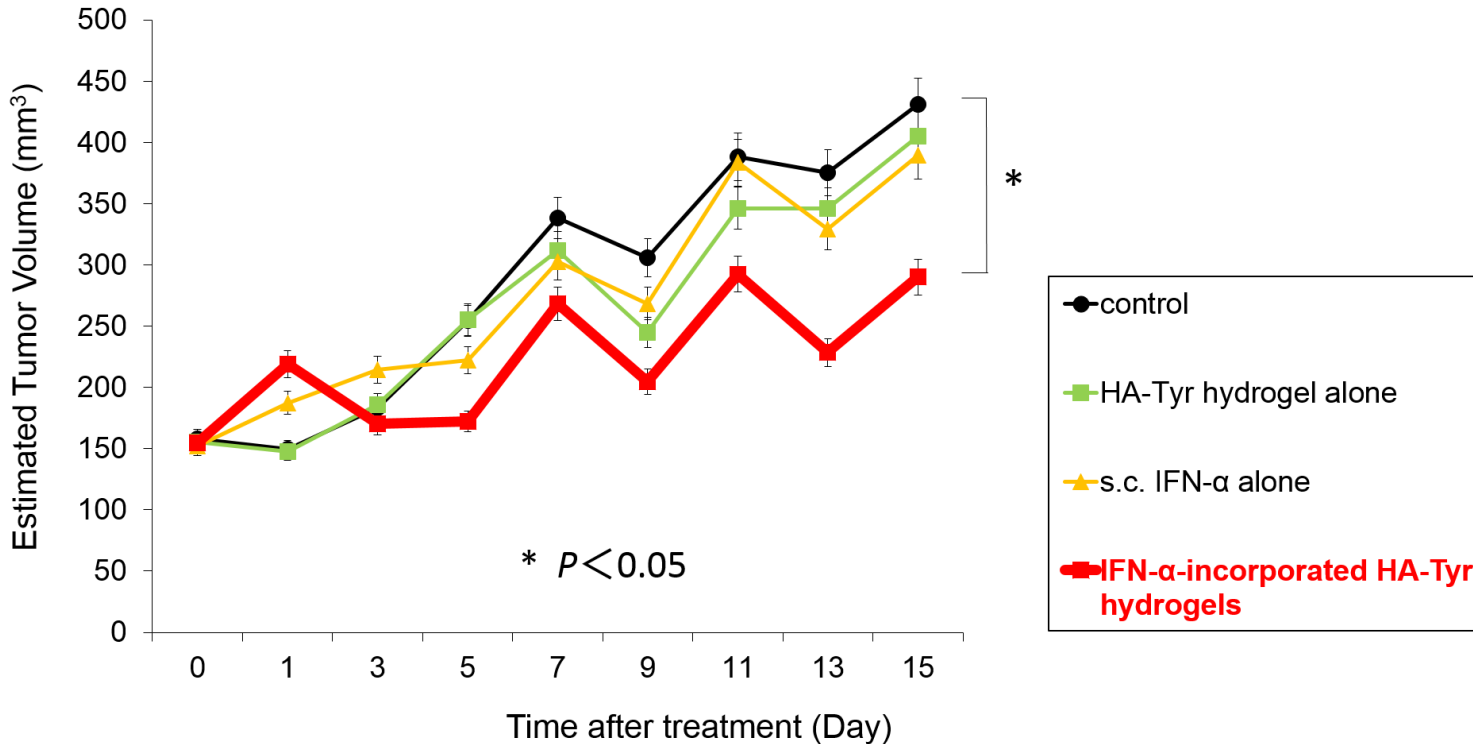
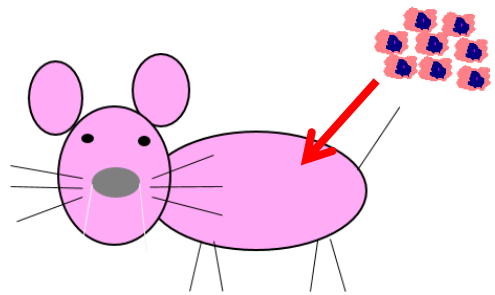


Fig. 3: Time-course changes in estimated tumor volumes of subcutaneously xenografted human renal cell carcinoma tumors treated with IFN- $\alpha$ -incorporated HA-Tyr hydrogels in nude mice. Tumor regression study of ACHN inoculated BALB/c nude mice treated with saline (control), HA-Tyr hydrogels alone, IFN- $\alpha$  alone or IFN- $\alpha$ -incorporated HA-Tyr hydrogels (n=8, mean  $\pm$  SD of the mean).

- ✓ HA-Tyr hydrogel 単独では抗腫瘍効果は認められなかった。
- ✓ IFN- $\alpha$  含有 HA-Tyr hydrogels 群においては最も高い抗腫瘍効果が示された。

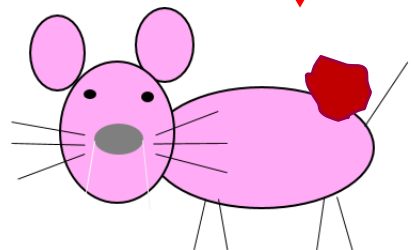
# Experimental design to examine anticancer effects of IFN- $\alpha$ -incorporated HA-Tyr hydrogels + sorafenib on human RCC cells *in vivo*

RCC cell line  
(ACHN):  $5 \times 10^6$  cells



Nude mice  
(n=8/ Group)

Subcutaneous  
injection



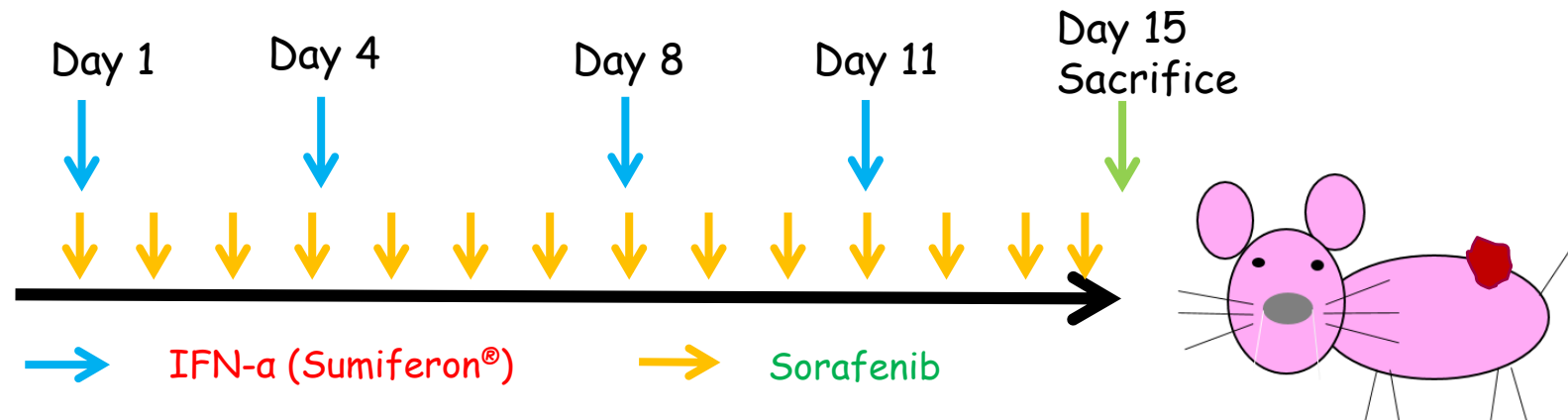
Group A: Control

Group B: **s.c. IFN- $\alpha$**  (4,000 IU x twice a week) alone

Group C: **sorafenib** (200 $\mu$ g/day x everyday) alone

Group D: **s.c. IFN- $\alpha$**  (4,000 IU x twice a week) + **sorafenib** (200 $\mu$ g/day x everyday)

Group E: **IFN- $\alpha$**  (4,000 IU x twice a week)-incorporated **HA-Tyr hydrogels** + **sorafenib** (200 $\mu$ g/day x everyday)



# Anticancer effect of IFN $\alpha$ -incorporated HA-Tyr hydrogels + sorafenib on tumor xenografted in nude mice.

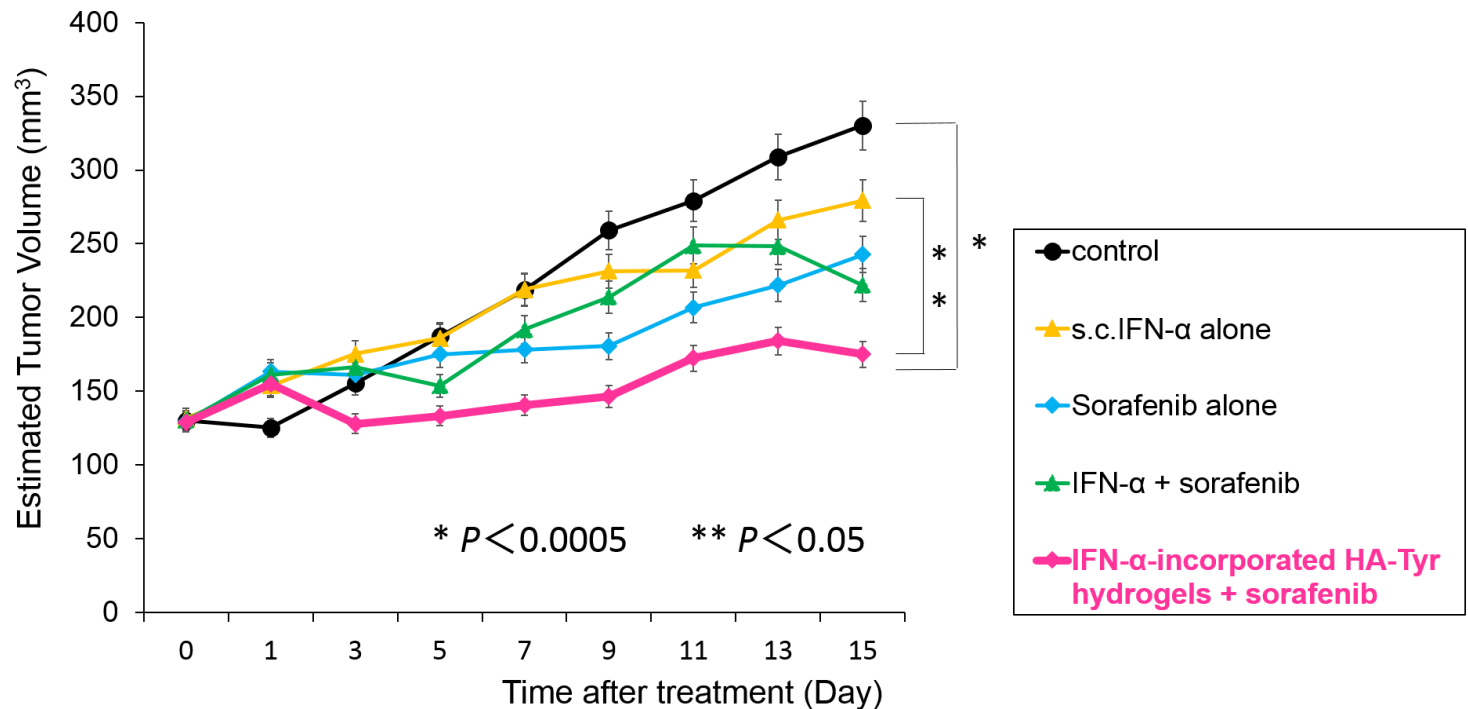


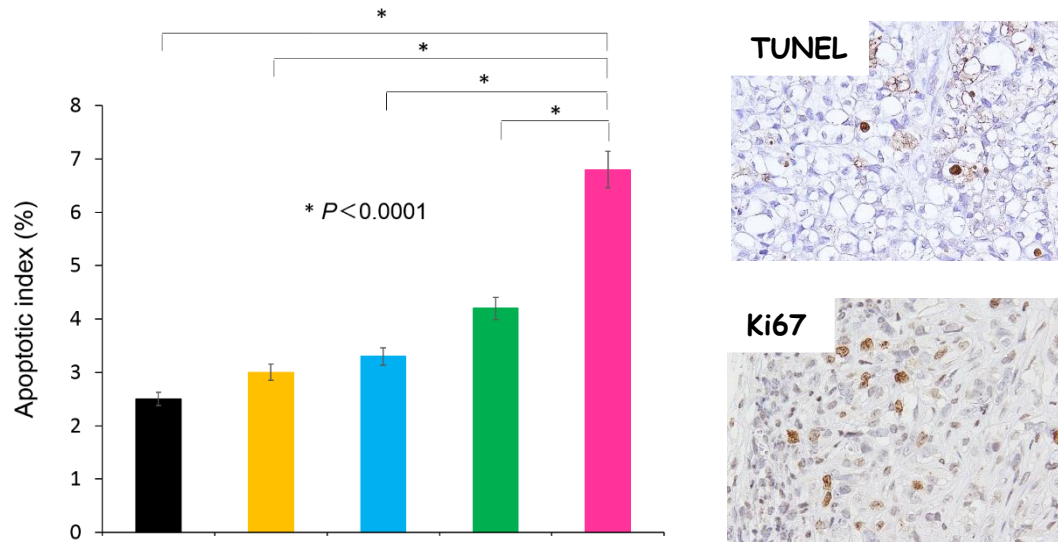
Fig. 4A: Time-course changes in estimated tumor volumes of subcutaneously xenografted human renal cell carcinoma tumors treated with IFN- $\alpha$ -incorporated HA-Tyr hydrogels + sorafenib in nude mice. Tumor regression study of ACHN inoculated BALB/c nude mice treated with saline (control), IFN- $\alpha$  alone, sorafenib alone, IFN- $\alpha$  + sorafenib, or IFN- $\alpha$ -incorporated HA-Tyr hydrogels + sorafenib (n=8, mean  $\pm$  standard error of the mean).

✓ **IFN- $\alpha$ 含有HA-Tyr hydrogels + sorafenib**群において最も高い抗腫瘍効果を認めた。

\* **しかし、sorafenib単独群、IFN- $\alpha$  + sorafenib群とIFN- $\alpha$ 含有HA-Tyr hydrogels + sorafenib群においては有意な差は見られなかった。**

# The ratio of apoptotic cells and Ki-67 positive cells in human RCC tumors subcutaneously transplanted in nude mice.

The ratio of **apoptotic cells** in nude mice



The ratio of **Ki-67 positive cells** in nude mice.

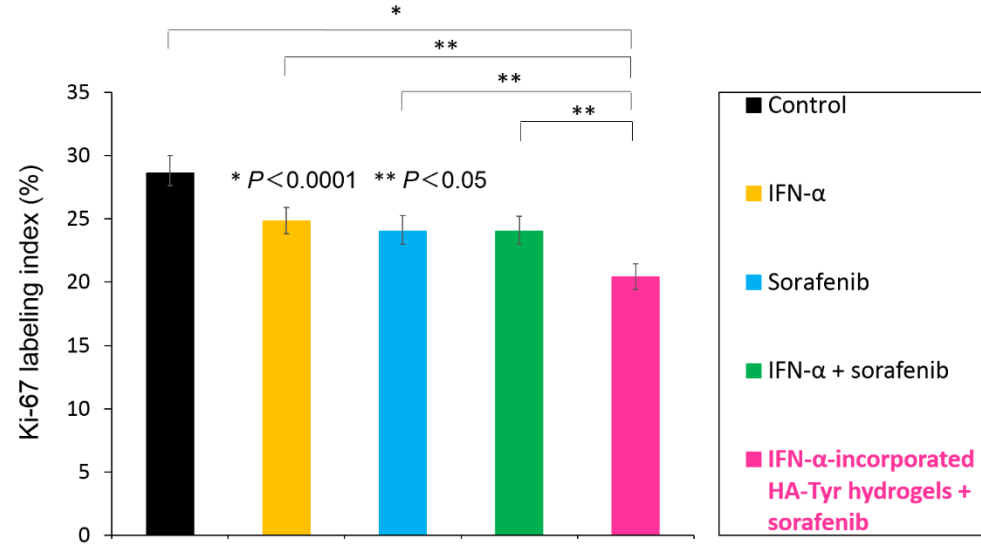


Fig. 6: The ratio of apoptotic cells and Ki-67 positive cells in human RCC tumors subcutaneously transplanted in nude mice. The number of apoptotic cells and Ki-67 positive cells was counted 5 random fields ( $\times 200$ ) in a blinded manner. Each bar represents the "apoptosis index" and "Ki-67 labeling index", expressed as mean  $\pm$  SD.

✓ **IFN- $\alpha$ 含有HA-Tyr hydrogels + sorafenib**群においては、他の群と比較し、アポトーシスを起こした細胞が多くみられ、Ki67陽性を呈する細胞が減少していた。



✓ これらの結果は**IFN- $\alpha$ 含有HA-Tyr hydrogels + sorafenib**群は最も強くアポトーシスを誘導し、増殖を抑制していることを示している。

# The ratio of the microvessel number in human RCC tumors subcutaneously transplanted in nude mice.

## The **microvessel number** in nude mice

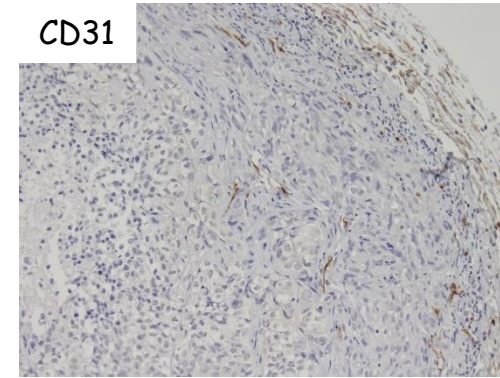
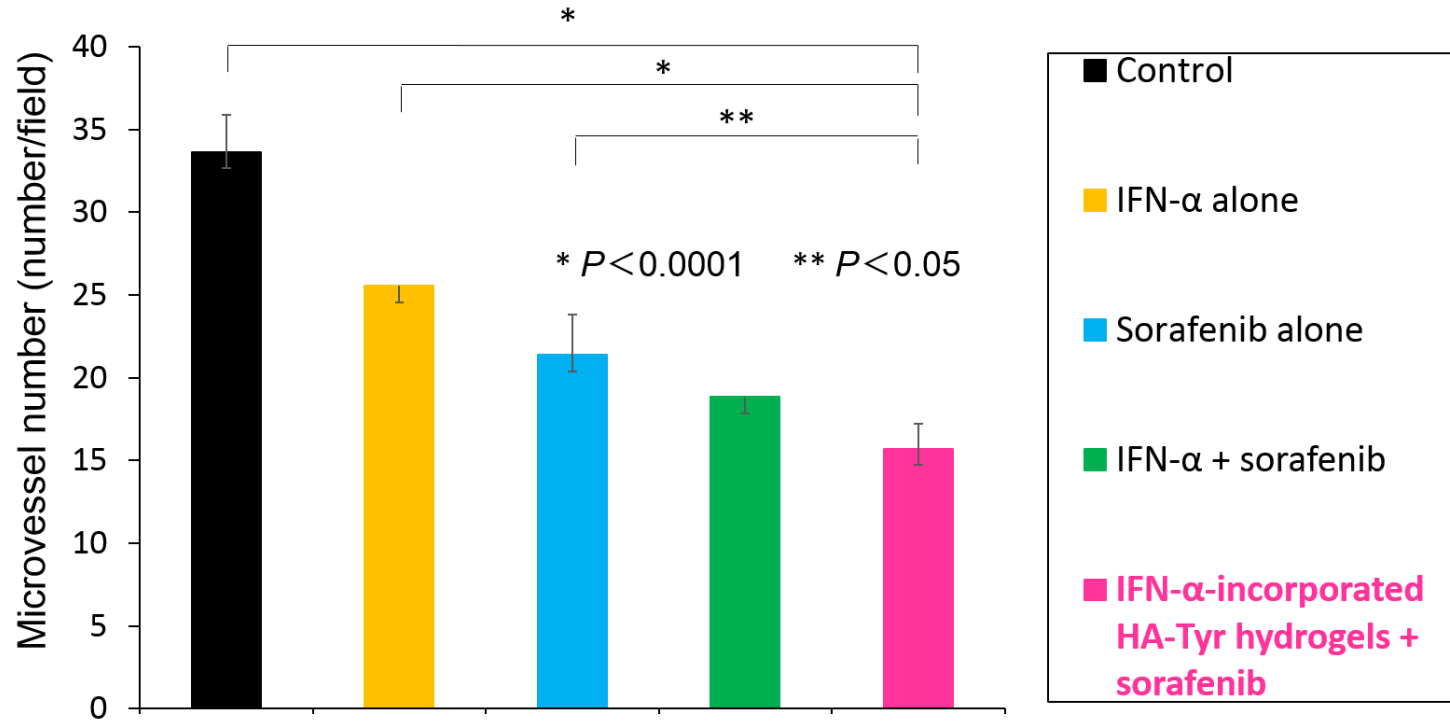
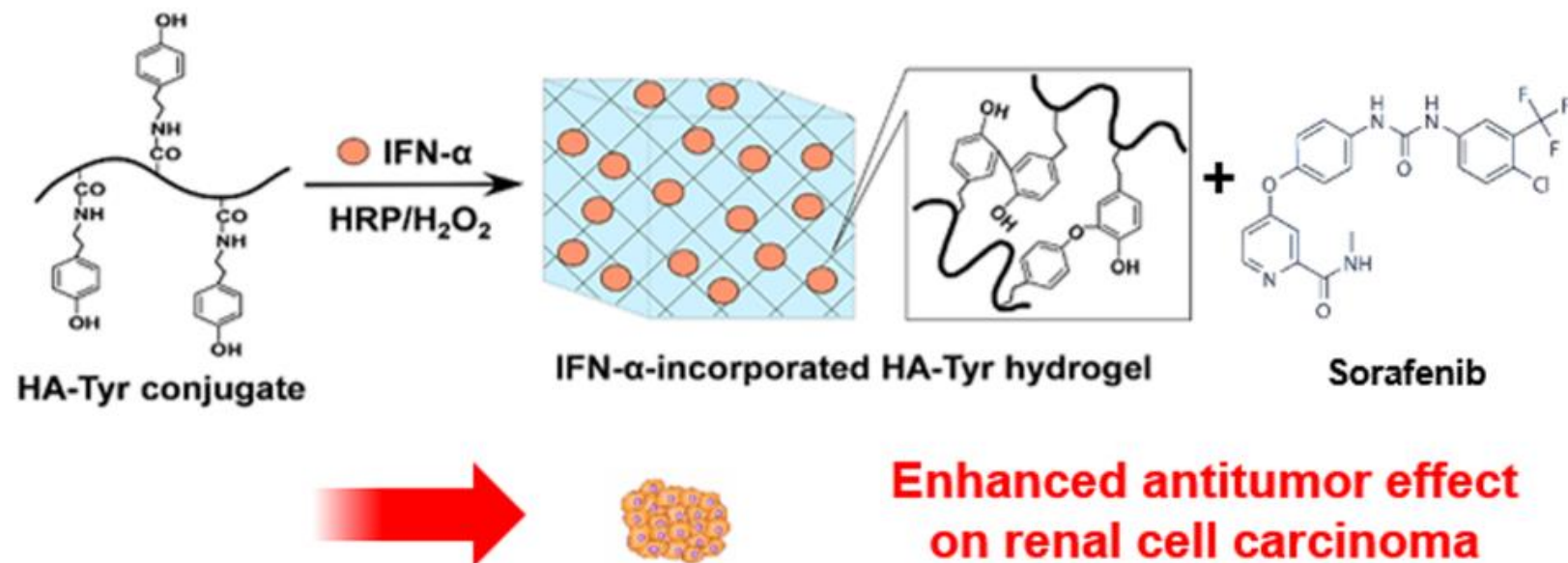


Fig. 7: **Microvessel number in human RCC tumors subcutaneously transplanted in nude mice.** Microvessel numbers of tumor sections were counted at high power field (x200). The microvessel number was apparently small in number in the tumors of mice treated with IFN- $\alpha$ -incorporated HA-Tyr hydrogels + sorafenib. Each bar represents the average microvessel number for each group, expressed as mean  $\pm$  SD.

✓ **IFN- $\alpha$ 含有HA-Tyr hydrogels + sorafenib**群において最も強く、血管新生が抑制されていた。

# 【 Summary 】



◆ **IFN- $\alpha$** 含有**HA-Tyr hydrogels** + **sorafenib**群はヒト腎細胞癌細胞株移植マウスにおいて、最も高い抗腫瘍効果を認めた。

◆ **IFN- $\alpha$** 含有**HA-Tyr hydrogels** + **sorafenib**はアポトーシスを誘導し、血管新生を抑制することで腫瘍の増殖を抑制していると考えられる。

## 【 Conclusion 】

- ✓ Our results suggest a possibility that HA-Tyr hydrogel drug delivery system prolongs the biological half-life of natural human IFN- $\alpha$  and enhances its anticancer effects on human RCC cells.

**HA-Tyr hydrogel drug delivery systemは、天然型IFN- $\alpha$ の生物学的半減期を延長させ、腎細胞癌における抗腫瘍効果を増強させる可能性がある。**