

DISS ETH NO. 18309

**CHEMICAL PROTEOMICS FOR THE DISCOVERY OF
ACCESSIBLE MARKERS OF LIVER METASTASIS**

A dissertation submitted to

ETH ZÜRICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

BEATRICE BORGIA

Laurea in Biotechnologie Industriali

Università degli Studi di Torino

Born on 28th June 1980

Citizen of Italy

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Dario Neri, examiner

Prof. Dr. Michael Detmar, co-examiner

Prof. Dr. Raffaella Giavazzi, co-examiner

2009

1 Summary

1.1 Summary

A promising approach to cancer therapy consists in the use of monoclonal antibody derivatives for the selective delivery of bioactive agents (e.g., full immunoglobulins for Fc-mediated cell killing, drugs with cleavable linkers, radionuclides, photosensitizers, pro-coagulant factors, cytokines) to the tumor environment, thus sparing normal tissues (Thorpe, 2004; Neri and Bicknell, 2005). Since the majority of cancer-related deaths are caused by the metastatic spread of the disease, the identification of selective and accessible markers of tumor metastasis represents an essential requirement for the development of antibody-based pharmacodelivery strategies, capable of targeting disseminated lesions. Ligand-mediated pharmacodelivery options are particularly attractive in consideration of the fact that many conventional cytotoxic agents and therapeutic proteins typically exhibit a reduced uptake at the tumor site, compared to normal organs (Bosslet *et al.*, 1998).

Our group has developed a general chemical proteomics methodology for the identification of proteins which are readily accessible from the vasculature. The method relies on a covalent biotinylation of vascular proteins by the *in vivo* perfusion of laboratory animals (Rybak *et al.*, 2005) or the *ex vivo* perfusion of surgically resected organs from patients (Castronovo *et al.*, 2006; Conrotto *et al.*, 2008), using reactive ester derivatives of biotin. Biotinylated proteins can be efficiently recovered from normal tissues and pathologic specimens (e.g., tumors) by lysis in the presence of strong detergents, followed by capture on streptavidin-sepharose. On-resin tryptic digestion of biotinylated proteins, followed by nano-HPLC separation of eluted peptides and their identification and relative quantification in the presence of internal standards, allows the characterization of atlases of vascular proteins in normal organs and at sites of disease, thus facilitating the discovery of accessible markers of pathology.

In this thesis, we report the results of a perfusion-based chemical proteomics study performed on three different syngeneic mouse models of liver metastasis. M5076 is a murine reticulum sarcoma originating in the ovary of C57BL/6 mice and is highly invasive and metastatic. When M5076 is *s.c.* transplanted into mice, a solid tumor arises and spontaneously metastasizes to the liver (Hart *et al.*, 1981). Colon38 and SL4 are murine colon carcinomas metastasizing to the liver thereby mimicking the metastatic spread of colorectal cancer in humans. SL4 has a higher metastatic potential and was established by Morimoto *et al.* by means of repeated biological selections *in vivo* (Morimoto-Tomita *et al.*, 2005).

Among the 712 proteins identified with at least 2 peptides, 120 displayed a preferential expression in liver with metastasis. For 12/12 of these markers, which were over-expressed in at

least two different models of metastasis and for which antibodies were available, a preferential expression in metastatic lesions was confirmed by immunofluorescence analysis. Furthermore, radiolabeled preparations of monoclonal antibodies specific to periostin, to the extra-domain A (EDA) of fibronectin and to angiopoietin-like 2 protein, were shown to selectively target liver metastasis in vivo, following intravenous administration.

1.2 Riassunto

Una nuova strategia nel campo della cura del cancro consiste nell'uso di anticorpi monoclonali o derivati di essi per il trasporto selettivo di molecole bio-attive (ad esempio immunoglobuline per la citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente, farmaci, radionuclidi, fotosensitizzatori, fattori pro-coagulanti e citochine) in sede tumorale così da risparmiare i tessuti sani. Dal momento che la maggior parte delle morti associate ai tumori sono causate dalla metastatizzazione dello stesso, l'identificazione di molecole metastasi-specifiche rappresenta un requisito fondamentale per lo sviluppo di strategie legate all'uso di anticorpi monoclonali per il trasporto di farmaci in grado di raggiungere lesioni tumorali disseminate. Tali opzioni sono particolarmente affascinanti dal momento che chemoterapici e proteine terapeutiche comunemente usate nella pratica clinica mostrano un accumulo preferenziale nei tessuti sani rispetto al tumore.

Nel nostro gruppo è stata sviluppata una metodologia proteomica per l'identificazione di proteine che siano accessibili dalla vascolatura. Il metodo si basa sulla biotinilazione covalente delle proteine vascolari tramite perfusione *in vivo* di animali da laboratorio o perfusione *ex vivo* di organi di pazienti in seguito ad ablazione chirurgica con un derivato reattivo della biotina. Le proteine biotinite possono essere recuperate dai tessuti normali e patologici (ad esempio tumorali) tramite lisi in presenza di forti detergenti seguita dalla cattura su una resina funzionalizzata con streptavidina. La tripsinizzazione, fatta sulla resina, delle proteine biotinite, seguita da una separazione dei peptidi tramite nano-HPLC e la loro quantificazione relativa in presenza di standard interni, permette la caratterizzazione di atlanti di proteine vascolari in tessuti normali e patologici facilitando così la scoperta di nuovi bersagli (marker) specifici della patologia e accessibili dalla vascolatura.

In questa tesi, si riporta il risultato di uno studio proteomico basato sulla perfusione di tre diversi modelli murini singenici di metastasi epatiche. M5076 è un reticulosarcoma murino originato nell'ovaio di topi C57BL/6 estremamente invasivo e metastatico. Quando iniettato s.c. in topi, si sviluppa un tumore primario che spontaneamente metastatizza al fegato. Colo38 e SL4 sono colon carcinoma murini che danno metastasi al fegato mimando così la reale disseminazione del colon carcinoma negli uomini. SL4 presenta un potenziale metastatico superiore ed è stato stabilizzato da Morimoto et al. tramite cicli ripetuti di selezioni biologiche *in vivo*.

Tra le 712 proteine identificate da almeno due peptidi, 120 mostrano un'espressione preferenziale nel fegato metastatico. Per 12/12 di questi possibili bersagli, i quali appaiono maggiormente espressi in almeno due diversi modelli di metastasi e per i quali anticorpi

commerciali erano disponibili, l'espressione preferenziale nelle lesioni metastatiche è stata confermata da un'analisi di immunofluorescenza. Inoltre, preparazioni radiomarcate di anticorpi monoclonali specifici verso la periostina, l'extra dominio A (EDA) della fibronectina e verso la Angiopoeitin-related protein 2 hanno dimostrato di accumularsi efficacemente e specificamente nelle metastasi epatiche in seguito ad amministrazione endovenosa.