

Hoofd-halskanker omvat voornamelijk tumoren die uitgaan van de slijmvliezen van de bovenste lucht- en voedselwegen, met name de mondholte, de keelholte en het strottenhoofd. Meer dan 90% van alle maligniteiten in het hoofd-halsgebied betreft een plaveiselcelcarcinoom, en deze groep tumoren vormt daarmee ongeveer 5% van alle maligniteiten die voorkomen in de westerse wereld. Wereldwijd wordt de diagnose hoofd-halskanker meer dan een half miljoen keer per jaar gesteld. In Nederland ontwikkelen jaarlijks meer dan 2500 mensen deze ziekte, en ruim 800 mensen sterven hieraan.

Tweederde van de mensen bij wie hoofd-halskanker wordt gediagnosticeerd, heeft reeds een vergevorderd stadium van de ziekte, en hun prognose is slecht. In de afgelopen drie decennia is een duidelijke vooruitgang geboekt bij de lokale en regionale behandeling van hoofd-halskanker, maar helaas heeft dit vooralsnog niet geleid tot een verlenging van de overlevingsduur. Dit komt in de eerste plaats omdat deze patiënten regelmatig recidieven en metastasen op afstand krijgen, en in de tweede plaats omdat deze patiënten regelmatig tweede primaire tumoren ontwikkelen. Behandeling na eerdere uitgebreide behandeling in het hoofd-halsgebied is niet altijd mogelijk. Daarom moeten meer specifieke ‘gerichte’ therapieën (‘targeted therapies’) ontwikkeld worden voor de locoregionale behandeling van tumoren, met als doel maligne weefsel selectief te vernietigen en gelijktijdig gezond weefsel te sparen. Daarnaast moeten adjuvante systemische strategieën worden ontwikkeld om occulte afstandsmetastasen en kleine achtergebleven tumorresten te vernietigen. Zulke ‘targeted therapies’ zijn noodzakelijk om zowel de locoregionale als systemische behandeling van hoofd-halskanker te verbeteren. Hierbij dient de nadruk te liggen op behoud van orgaanfunctie en kwaliteit van leven. Deze ‘targeted therapies’ kunnen ingezet worden als monotherapie en als combinatietherapie samen met radiotherapie en chemotherapie. Idealiter hebben deze therapieën een synergistisch effect. Het gebruik van ‘multi-targeting strategieën’ (een tumor aanvallen op meerdere aangrijpingspunten) in plaats van ‘mono-targeting strategieën’ zou een positief effect moeten geven op de effectiviteit van behandelingen van tumoren en op het voorkomen van therapieresistentie.

De afgelopen decennia zijn verschillende locoregionale behandelmodaliteiten beschikbaar gekomen, die gericht zijn op effectieve vernietiging van tumoren, waarbij gelijktijdig het behoud van orgaanfuncties, symptoombestrijding en het vermijden van bijwerkingen centraal staan. Bleomycine elektroporatietherapie is één van deze nieuwe behandelvormen voor solide tumoren, die ontwikkeld is als alternatief voor chirurgische therapieën, of als aanvulling hierop. Deze behandeling leidt tot een selectieve vernietiging van kankercellen, waarbij cosmetische en functionele problemen beperkt blijven. In **hoofdstuk 2** wordt een klinische fase IV studie beschreven met bleomycine elektroporatietherapie. Patiënten met maligniteiten uitgaande van het hoofd-halsgebied, die niet langer behandeld konden worden middels een operatie of radiotherapie, werden behandeld met bleomycine elektroporatietherapie. Bij deze behandeling wordt het cytostaticum bleomycine rechtstreeks in de tumor geïnjecteerd, waarna met behulp van

naaldelektrodes elektrische pulsen worden toegediend aan de tumor. Deze elektrische pulsen zorgen er voor dat de bleomycine beter in de tumorcel komt waar het zijn werking heeft. Veertien patiënten met in totaal vierentwintig tumoren ondergingen deze selectieve locoregionale behandeling. Bij tien tumoren van drie verschillende patiënten was na twee jaar nog steeds sprake van lokale tumorcontrole. In alle gevallen bleven de orgaanfuncties bewaard, en werd een esthetisch acceptabel resultaat bereikt. Bleomycine elektroporatietherapie bleek een eenvoudig uit te voeren behandeling met weinig nadelige effecten voor de patiënt, en is in potentie effectief bij de behandeling van patiënten met tumoren in het hoofd-halsgebied. De procedure neemt normaal gesproken minder dan een uur in beslag. De behandeling kan in principe poliklinisch plaatsvinden, maar in onze kliniek werden alle patiënten enkele dagen opgenomen op de verpleegafdeling.

Ondanks het feit dat het startpunt van deze studie een flinke uitdaging vormde (patiënten die reeds uitgebreide behandelingen ondergaan hadden, en niet meer aanvullend behandeld konden worden middels chirurgie of radiotherapie), zijn de resultaten van bleomycine elektroporatietherapie bemoedigend in termen van weefselpreservatie en tumorcontrole. Een mogelijke beperking bij de toepassing van bleomycine elektroporatietherapie is een slechte bereikbaarheid van de tumor voor injectie van bleomycine en/of het inbrengen van de applicator. Om effectief te kunnen zijn is het noodzakelijk dat de gehele tumor, evenals het ogenschijnlijk normale weefsel binnen een marge van 0,5 cm rondom de tumor, behandeld worden. Een andere beperking kan zijn dat veel patiënten al radiotherapie ondergaan hebben tijdens eerdere behandelingen, waarbij DNA schade in zowel tumorcellen als omringend weefsel is ontstaan. Bleomycine geeft een soortgelijke DNA schade. Hoewel normaal, niet-bestraald weefsel deze schade kan herstellen (in tegenstelling tot tumorcellen), treedt in eerder bestraalde gebieden regelmatig een vertraagde wondgenezing op na bleomycine toediening. Sommige patiënten hadden al onbehandelbare afstandsmetastasen op het moment van therapie, en bij deze patiënten werd wel palliatie bereikt, maar geen levensverlenging gezien. Toch zijn de resultaten van deze studie hoopvol.

Bleomycine elektroporatietherapie bleek tot dusver het meest effectief als primaire behandeling bij patiënten met vroege stadia van hoofd-halskanker. Complete remissie werd bereikt bij 83% van de behandelde laesies binnen 4 weken na de behandeling (1). Maar ook in verder gevorderde stadia van ziekte leidde deze behandeling tot partiële (32%) en complete (25%) responsen bij 57% van de behandelde laesies. Eén jaar na de behandeling was nog 30% van de patiënten in leven. Dit getal komt overeen met de getallen die bekend zijn voor patiënten met vergevorderde stadia van ziekte. De in deze studie gevonden verbeterde lokale controle van hoofd-halstumoren had geen positief effect op de overleving. Wel bleek de kwaliteit van leven flink verbeterd door de lokale tumorcontrole (2). De huidige standaardbehandeling voor primaire mondholtcarcinomen in een vroeg stadium is chirurgie, leidend tot een vijfjaars overall overleving van 70-80%. Derhalve is er geen

harde indicatie om deze behandelstrategie te vervangen door bleomycine elektroporatietherapie. Een vergevorderd stadium wordt meestal behandeld met chirurgie en/of radiotherapie met of zonder chemotherapie. In geval van het optreden van lokale recidieven, tweede primaire tumoren of afstandsmetastasen, is de prognose slechter, en zijn standaardbehandelingen niet altijd voorhanden. Bleomycine elektroporatietherapie blijkt een waardevolle aanvulling te zijn op de standaardbehandelingen. Wij denken dat bleomycine elektroporatietherapie een eenvoudig uit te voeren behandeling is, die potentieel effectief is bij geselecteerde groepen van patiënten met tumoren in het hoofd-halsgebied, zelfs bij patiënten met een vergevorderd stadium van ziekte, met recidieven of afstandsmetastasen. Een belangrijk voordeel van bleomycine elektroporatietherapie in vergelijking met een andere opkomende selectieve behandelingsmodaliteit, fotodynamische therapie (3), is de afwezigheid van fotosensitiviteit, waarbij patiënten enkele weken na behandeling rekening moeten houden met zonexpositie. Een behandeling zonder al te veel belasting voor de patiënt is met name belangrijk in een palliatieve setting, bij patiënten met een beperkte levensverwachting. Daarnaast is bleomycine elektroporatietherapie toepasbaar bij meerdere typen van kanker, niet alleen bij plaveiselcelcarcinomen van de slijmvliezen en de huid, maar ook bij maligne tumoren van de speekselklieren, basaalcelcarcinomen, melanomen, adenocarcinomen, Merkelcelcarcinomen, sarcomen, cutane lymfomen, huidmetastasen en overige primaire huidtumoren. Ook grotere tumoren met invasiedieptes tot 2,5 cm kunnen behandeld worden met deze therapie.

Op dit moment zijn meerdere groepen over de hele wereld bezig met het optimaliseren van elektroporatiesystemen. Combinaties van elektroporatie met andere cytostatica worden momenteel onderzocht, bijvoorbeeld de combinatie met systemische cisplatinumtherapie (4-6). Elektroporatie in combinatie met simultane chemoradiatie met cisplatinum om de lokale tumoropname te verhogen en zodoende de lokale tumorcontrole te verbeteren is een interessant idee, dat verder onderzocht dient te worden.

De laatste jaren zijn systemische selectieve therapieën steeds belangrijker geworden om kleine achtergebleven tumorresten en occulte afstandsmetastasen te bestrijden. Deze adjuvante strategieën zijn essentieel om de algehele overleving van hoofd-halskanker te verbeteren. Monoklonale antilichamen (mAbs) of antilichaamfragmenten zijn moleculen die selectief aan tumorcellen kunnen binden, selectief een toxische stof kunnen afleveren aan tumoren, of selectief kritische cellulaire processen die essentieel zijn voor tumorgroei en overleving kunnen neutraliseren of blokkeren. Normaal weefsel, dat geen specifieke bindingsplaats (antigeen) tot expressie brengt, zal niet worden aangevallen door deze mAbs. Het gehumaniseerde mAb bivatuzumab is gericht tegen het CD44v6-antigeen, dat voornamelijk tot expressie komt op plaveiselcelcarcinomen. In eerdere studies werden bemoedigende resultaten geboekt bij de ontwikkeling van bivatuzumab en andere anti-CD44v6 mAbs, met name in radioimmunoscintigrafiestudies als voorbereiding op radioimmunotherapie (RIT) studies bij patiënten met hoofd-halskanker (7,8). Binding van

deze mAbs aan het target-antigeen resulteert in internalisatie van het antilichaam (9). De fase I dosis escalatie RIT studies lieten veelbelovende anti-tumor effecten zien, met consequent stabilisatie van tumorgroei bij hogere dosis radioactiviteit. Beenmergtoxiciteit, veroorzaakt door circulerend radioimmunoconjugaat, bleek de dosisbeperkende factor te zijn. Daarnaast werd bij slechts enkele patiënten een milde mucositis van de mond gezien (10-12). Deze patiënten hadden overigens bij eerdere externe bestraling tijdens radiotherapie een zeker zo ernstige mucositis ontwikkeld. Deze data toonden aan dat kruisreactiviteit van anti-CD44v6 mAbs met normale mucosa niet direct een beperking hoeft te zijn voor therapeutisch toepassing van dergelijke mAbs. Het gebruik van radioimmunoconjugaten voor therapie is in het algemeen gecompliceerd in verband met logistieke en stralingsveiligheidsaspecten. Daarom werd besloten om de radioactiviteit weg te laten, en in plaats daarvan aan het anti-CD44v6 antilichaam een zeer toxische stof te koppelen. Dergelijke conjugaten zijn met name interessant omdat ze naar verwachting minder beenmergtoxiciteit veroorzaken, en ze daarom wellicht gecombineerd kunnen worden met conventionele chemotherapie. Bivatuzumab mertansine is een zogenaamd tumor-geactiveerd pro-drug conjugaat, dat bestaat uit het supertoxische anti-microtubuli geneesmiddel mertansine (DM1), covalent gebonden aan bivatuzumab. Na binding aan CD44v6 wordt het conjugaat geïnternaliseerd, en komen de mertansine moleculen intracellulair vrij door verbreking van de disulfide bindingen. Normaal weefsel, dat geen CD44v6-expressie vertoont, wordt niet aangevallen door bivatuzumab mertansine. In **hoofdstuk 3** wordt een klinische fase I dosis escalatiestudie met bivatuzumab mertansine beschreven. De veiligheid, maximaal tolerabele dosis (MTD) en eerste anti-tumor effecten van bivatuzumab mertansine werden onderzocht, en de farmacokinetiek en immunogeniteit werden vastgesteld na drie wekelijkse intraveneuze toedieningen van het conjugaat.

In deze studie werd geen mertansine toxiciteit gezien ten gevolge van het voortijdig vrijkomen van het geneesmiddel in de bloedbaan, en er was geen sprake van opname van het conjugaat door cellen zonder expressie van het CD44v6 antigeen. De belangrijkste toxiciteit werd gezien in de huid, waarschijnlijk door CD44v6-expressie in dit orgaan (kruisreactiviteit). Het grootste gedeelte van de huidreacties ging vanzelf weer over, maar er trad ook één fatale bijwerking op die gerelateerd was aan het geïnjecteerde antilichaamconjugaat. Een zogenaamde toxische epidermale necrolyse (TEN) trad op bij één patiënt die tweemaal een dosis had ontvangen van 140 mg/m^2 . Het meest waarschijnlijk is, dat deze toxiciteit uitgelokt is door kruisreactiviteit in de keratinocyten in de huid. Er zijn geen aanwijzingen gevonden voor een relatie tussen de conjugaat dosis en de toxiciteit, en daarom is het moeilijk te voorspellen wanneer deze ernstige huidtoxiciteit zal gaan optreden (13).

In een studie die parallel liep aan de hierboven beschreven studie, kregen eenendertig patiënten met hoofd-halskanker een éénmalige dosering bivatuzumab mertansine toegediend, variërend van $25\text{-}325 \text{ mg/m}^2$. Dertien van deze patiënten kregen

drie weken later een tweede toediening. De MTD werd vastgesteld op 300 mg/m², met huidtoxiciteit als dosislimiterende factor. Bij geen enkele patiënt werd een immuunrespons gericht tegen het toegediende antilichaamconjugaat vastgesteld. De voornaamste toxische effecten waren maculo-papuleus exantheem, blaarvorming en schilfering van de huid. Drie patiënten toonden een partiële respons bij doses van 200, 275 en 325 mg/m² (14-16). Twee patiënten die behandeld werden op dit laatste dosisniveau ontwikkelden dosislimiterende toxiciteiten met tekenen van epidermolysen, maar deze toxiciteiten bleken geheel reversibel te zijn. De dosis van 300 mg/m², die hieraan vooraf ging, werd goed verdragen.

In een andere parallelle studie met bivatuzumab mertansine bij patiënten met een CD44v6-positief, gemetastaseerd mammacarcinoom, werden vierentwintig patiënten behandeld op acht verschillende dosis niveaus (25-200 mg/m²). Zeven van hen kregen meer dan één toediening van bivatuzumab mertansine. Twee dosislimiterende toxiciteiten traden op: één patiënte die behandeld werd met een dosis van 125 mg/m² ontwikkelde ernstige passagère leverenzymstijgingen (graad 4); een andere patiënte die behandeld werd met 175 mg/m² ontwikkelde ernstige klachten van braken (graad 3). Zij overleed aan de gevolgen van nierfalen, die wellicht veroorzaakt werden door verergering van pre-existente nierinsufficiëntie. De meest voorkomende toxiciteit was een passagère en milde huidafwijking die optrad bij 75% van de patiënten. Er werden geen objectieve responsen waargenomen. Stabilisering van de ziekte werd bereikt bij 50% van de patiënten, onafhankelijk van het dosisniveau (17).

De in hoofdstuk 3 beschreven patiënt die een TEN ontwikkelde, had slechts twee wekelijkse giften van 140 mg/m² ontvangen. In totaal werden 70 patiënten behandeld in verschillende centra, waarbij vijf dosislimiterende toxiciteiten optraden. TEN is een zeldzame aandoening, die gekenmerkt wordt door uitgebreid afsterven van de epidermis, en veroorzaakt wordt door een karakteristieke geneesmiddelreactie, zonder dat er sprake is van een dosis-toxiciteitsrelatie. De mortaliteit van TEN is hoog, en er is geen specifieke behandeling beschreven. Omdat niet te voorspellen is welke patiënt gevaar loopt een TEN te ontwikkelen, werd het bivatuzumab mertansine conjugaat als onveilig geclassificeerd, en werd de verdere klinische ontwikkeling gestaakt nog voordat de MTD vastgesteld kon worden.

Uit deze studie kan geconcludeerd worden dat een strikte tumorselectieve expressie van het specifieke target-antigeen vereist is, wanneer dergelijke supertoxische antilichaamconjugaten gebruikt worden voor therapie. De expressie van CD44v6 was blijikbaar niet selectief genoeg. Dit kan consequenties hebben voor de ontwikkeling van andere antilichaam-mertansine conjugaten, zoals trastuzumab-mertansine (T-DM1 = herceptin-DM1), een conjugaat dat momenteel getest wordt bij patiënten met vergevorderd stadium van HER2-positief mammacarcinoom (18). Overexpressie van de receptor tyrosine kinase HER2 (erbB2) is gecorreleerd met een slechte prognose bij mamma- en ovariumcarcinoom. Behandeling met het anti-HER2 mAb trastuzumab verhoogt de

overleving bij patiënten met HER2-positief mammacarcinoom, maar deze behandeling kan tevens cardiomyopathie veroorzaken (19,20). Anthracycline-trastuzumab gebaseerde behandelingen worden beperkt door een onacceptabel hoge mate van cardiotoxiciteit, met name bij gelijktijdige toediening. Trastuzumab verhoogt het risico op anthracycline-geïnduceerde cardiotoxiciteit (21). Myocardiale HER2-expressie lijkt tijdelijk verhoogd te worden als compensatiemechanisme ten gevolge van cardiale stress (22). Hoewel fase I en II klinische trials met T-DM1 tot nu toe geen specifieke cardiale toxiciteit laten zien, tonen de resultaten van onze studie aan dat voorzichtigheid geboden is, in het bijzonder bij patiënten die in het verleden behandeld zijn geweest met anthracyclines (23,24).

De selectieve aanval op de bloedvaten van tumoren is een volgende interessante therapeutische strategie. Bloedvatvorming (angiogenese) is een vereiste voor tumorprogressie en metastasering, en het voorkómen van dit proces en de vernietiging van tumorbloedvatjes is een belangrijk aandachtspunt geworden binnen het klinisch onderzoek. Het mAb-fragment L19-SIP is gericht tegen het extra-domein B (ED-B) van fibronectine, dat verhoogd tot expressie komt in de nabijheid van nieuwgevormde bloedvaten. **Hoofdstuk 4** beschrijft de biodistributie van L19-SIP en de mogelijkheden voor RIT bij naakte muizen, die in beide flanken de humane hoofd-halskanker lijnen FaDu of HNX-OE droegen. L19-SIP liet een hoge en selectieve tumoropname zien bij beide geteste hoofd-halskanker lijnen. De tumor-bloedopname ratio varieerde van 4.4 ± 1.8 tot 21.4 ± 1.8 , respectievelijk 24 uur en 72 uur na injectie voor de FaDu lijn. De opname ratio tussen tumor en normale weefsels was in het algemeen minstens net zo hoog, wat zeer bemoedigend is, aangezien L19-SIP in principe ook kan binden aan de ED-B variant van de muis. RIT met ^{131}I -L19-SIP op het MTD niveau van 74 MBq leidde tot een significante groeivertraging en een verbeterde overleving in beide tumorlijnen. De effectiviteit werd verhoogd door ^{131}I -L19-SIP RIT te combineren met het anti-EGFR mAb cetuximab, zonder dat er sprake was van een toename in toxiciteit. Wanneer tumor-dragende muizen behandeld werden met deze combinatietherapie, werden complete responsen waargenomen bij twee van de acht FaDu tumoren en bij vijf van de acht HNX-OE tumoren, zonder dat hergroei gedurende de daaropvolgende observatieperiode van 3-4 maanden plaatsvond.

De selectieve aanval op tumorbloedvaten kan toegepast worden bij bijna alle tumortypen, aangezien verhoogde ED-B expressie gevonden wordt in de meeste tumoren (25,26). Recent toonde een klinische RIT studie met ^{131}I -L19-SIP bij patiënten met lymfomen veelbelovende resultaten. ED-B expressie werd vastgesteld in tumorbiopten van meer dan 200 patiënten met Hodgkin en non-Hodgkin lymfomen van bijna alle entiteiten, alsook in biopten van patiënten met myeloproliferatieve aandoeningen. Daarentegen was de ED-B expressie bijna afwezig in normale lymfeklieren ($n = 10$) en beenmergbiopten ($n = 9$). De mate van ED-B expressie in lymfoomweefsel toonde een positieve correlatie met de maligniteitsgraad. De in vivo toegankelijkheid van ED-B voor ^{131}I -L19-SIP werd bevestigd bij drie lymfoompatiënten, bij wie de lymfoomhaarden in beeld gebracht konden worden

middels SPECT scanning. Bij deze patiënten hadden meerdere voorafgaande therapieën niet geleid tot een complete remissie, en zij presenteerden zich met recidieven die aangetoond waren middels ^{18}F FDG PET-CT scans. Gebaseerd op de selectieve opname in tumorlaesies en op acceptabele beenmergdosimetrie, kregen twee patiënten een therapeutische dosis ^{131}I -L19-SIP van 5.55 GBq (150 mCi), en één patiënt een dosis van 3.7 GBq (100 mCi). ‘Whole-body’ en SPECT-CT scans werden 8-12 dagen na toediening van het conjugaat gemaakt om de specifieke tumoropname van ^{131}I -L19-SIP te bevestigen. Bij twee patiënten met gerecidiveerd Hodgkin lymfoom leidde ^{131}I -L19-SIP RIT tot een aanhoudende partiële respons. Op basis van deze resultaten mag ED-B een veelbelovend ‘target’ voor antilichaamtherapie genoemd worden (27). Daarnaast rechtvaardigen deze resultaten de verdere ontwikkeling van RIT met ^{131}I -L19-SIP bij geselecteerde patiënten met solide tumoren, zoals hoofd-halskanker. Bij eerder uitgebreid immunohistochemisch onderzoek werd ED-B expressie bij het merendeel van de hoofd-halstumoren aangetoond, met daarbij de hoogste expressie bij de meest agressieve tumoren (28). Deze variabiliteit in expressie duidt er op dat beeldvorming voorafgaand aan therapie met L19-SIP gewenst is, om op die manier de meest geschikte kandidaten voor RIT te kunnen selecteren. Voor het verkrijgen van hoge resolutie beeldvorming en voor accurate kwantificering van de L19-SIP distributie, is PET een aantrekkelijkere optie dan de op dit moment veel gebruikte SPECT procedure (29,30).

De eerder genoemde bemoedigende preklinische en klinische resultaten van RIT met ^{131}I -L19-SIP vormde de basis voor de ontwikkeling van een pre-therapie ‘scouting’ procedure, waarbij de biodistributie van L19-SIP eerst met een PET-camera vastgesteld wordt om te kijken of de betreffende patiënt in aanmerking komt voor RIT. Hiertoe wordt ^{124}I -L19-SIP gebruikt als de PET-tracer. Moleculaire beeldvorming van tumorbloedvaten biedt klinische perspectieven voor detectie van laesies en voor patiëntselectie, maar ook voor de ontwikkeling en validatie van nieuwe geneesmiddelen, respons-evaluatie, en dosisoptimalisatie (31). In **hoofdstuk 5** hebben we ons gericht op de ontwikkeling van ^{124}I -L19-SIP immuno-PET, niet alleen voor beeldvorming van tumorangiogenese, maar ook als scouting procedure voorafgaand aan klinische ^{131}I -L19-SIP RIT, om zodoende selectieve ‘tumortargeting’ te bevestigen en dosimetrie mogelijk te maken. Beeldvorming van ED-B-expressie kan van belang zijn voor het stellen van de diagnose ‘kanker’ en voor het monitoren van de effectiviteit van antikankertherapieën.

Als uitgangspunt voor de ontwikkeling van ^{124}I -L19-SIP immuno-PET, werden de infrastructuur en procedures ontwikkeld voor een efficiënte productie volgens GMP (‘Good Manufacturing Practice’) richtlijnen van grote batches ^{124}I (> 2 GBq) met een hoge radionuclidische ($>99.5\%$) en radiochemische ($>95\%$ als jodide) zuiverheid en een laag tellurium- (<1 $\mu\text{g/ml}$) en pyrogeengehalte (<5 EU/ml). Het resultaat is dat farmaceutische kwaliteit ^{124}I beschikbaar is gekomen voor wereldwijde distributie, niet alleen voor

immuno-PET toepassingen, maar ook bijvoorbeeld voor de selectie van patiënten met schildklierkanker voor ^{131}I -therapie (figuur 1).

L19-SIP liet na koppeling van ^{124}I een optimale integriteit en immunoreactiviteit zien, en vertoonde hetzelfde farmacokinetische gedrag als het overeenkomstige ^{131}I conjugaat. Biodistributiestudies toonden hoge en selectieve tumortargeting, resulterend in tumor-bloed ratio's variërend van 6.0 tot 45.9, respectievelijk 24 uur en 72 uur na injectie. Het resultaat was ook dat er hoge tumor-normaal weefsel ratio's werden verkregen met ^{124}I -L19-SIP, resulterend in duidelijke visualisatie van tumoren middels PET-beeldvorming, zelfs wanneer het zeer kleine tumoren betrof ($\sim 50 \text{ mm}^3$). Immuno-PET met ^{124}I -L19-SIP bleek geschikt voor gevoelige beeldvorming van nieuwe tumorbloedvatjes en voor het voorspellen van de ^{131}I -L19-SIP biodistributie. Dit resultaat maakt de weg vrij voor het gebruik van ^{124}I -L19-SIP immuno-PET bij de selectie van patiënten, die op basis van adequate 'tumortargeting' en dosimetrie (gepersonaliseerde therapie), het meest kans op baat hebben bij ^{131}I -L19-SIP RIT.

Op dit moment, zijn negen mAbs goedgekeurd voor de behandeling van kanker, en dit zijn allemaal intacte mAbs. Vijf van deze mAbs zijn geregistreerd voor de behandeling van hematologische tumoren: rituximab, gemtuzumab ozogamicin, alemtuzumab, ibritumomab tiuxetan, en tositumomab. De vier mAbs trastuzumab (anti-HER2), cetuximab (anti-EGFR), panitumumab (anti-EGFR) en bevacizumab (anti-VEGF) zijn geregistreerd voor de behandeling van solide tumoren. Cetuximab is onder andere geregistreerd voor de behandeling van hoofd-halskanker. Ondanks verschillende klinische successen, is het reëel om te stellen dat de effectiviteit van de huidige mAbs toch beperkt is, met voordelen voor slechts een beperkte groep patiënten, terwijl de kosten van mAb-therapie excessief zijn.

Omdat kankercellen de eigenschap hebben verschillende groeistimuleringsroutes te gebruiken voor groei en overleving, proliferatie, angiogenese en invasie en metastasering, kan selectieve 'targeting' van slechts één enkel 'tumortarget' wel eens onvoldoende blijken voor het bereiken van een bevredigend therapeutisch resultaat. De resistentie die in tumoren kan ontstaan als gevolg van anti-EGFR therapie kan daarbij als voorbeeld dienen. Bij dergelijke tumoren wordt de c-Met signaalroute van groter belang voor overleving (32). Deze inzichten hebben de aanzet gegeven tot het ontwikkelen van strategieën waarbij meerdere kritische tumortargets simultaan geblokkeerd worden. Er zijn o.a. studies gestart waarin combinaties van reeds geregistreerde mAbs worden gebruikt, bijvoorbeeld één mAb gericht tegen EGFR en een ander mAb gericht tegen VEGF (33). Enkele farmaceutische bedrijven zijn zelfs gestart met de klinische ontwikkeling van mAb cocktails. Omdat mAbs beschouwd worden als 'dure medicijnen', vormt de introductie van gecombineerde mAb therapie een enorme uitdaging, zeker voor wat betreft de economische aspecten.

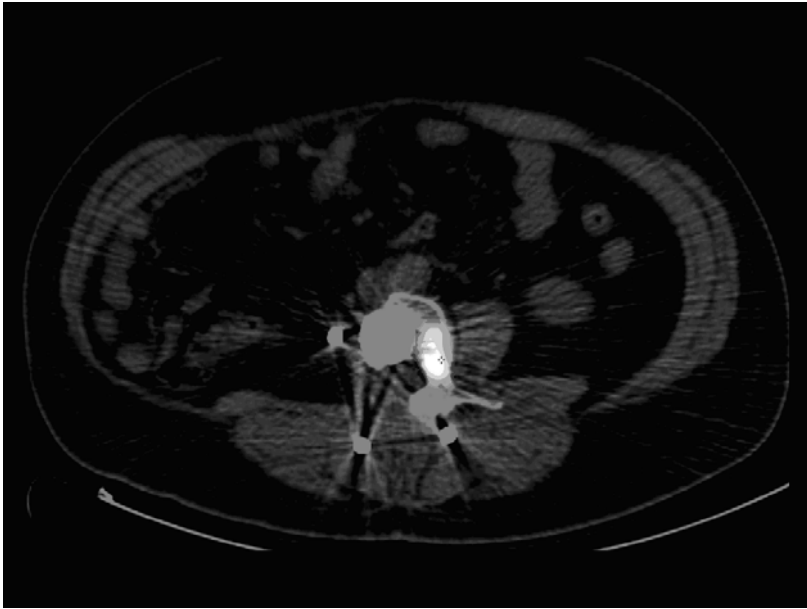
In dit proefschrift introduceren we het gebruik van nanobodies voor de remming van signaaltransductieroutes die aanzetten tot tumorgroei en overleving. In eerste instantie staat vooral de EGFR gemedieerde route centraal, omdat die een belangrijke rol speelt bij

hoofd-halskanker (34). Nanobodies worden verkregen uit een uniek antilichaamformaat, dat voorkomt in species van de familie van Camelidae, de kameelachtigen. Deze familie omvat lama's, kamelen en dromedarissen. Terwijl mensen en de meeste andere dieren voor hun afweer antilichamen gebruiken die bestaan uit 2 zware en 2 lichte ketens, hebben deze dieren tevens antilichamen die uitsluitend uit zware ketens bestaan. Het antigeenbindend gedeelte van deze 'zware keten antilichamen' wordt nanobody genoemd, en deze nanobodies van 15 kDa kunnen uitstekend als bouwstenen gebruikt worden voor de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen. Vooral aantrekkelijk is de flexibiliteit van geneesmiddelsamenstelling, waarbij het relatief eenvoudig is om multivalente en/of multi-specifieke geneesmiddelen samen te stellen, met meerdere bindingsdomeinen binnen één molecuul. De productie van deze geneesmiddelen kan op een relatief goedkope manier met behulp van bacteriën of gist. Op deze manier kan een enkelvoudig kralensnoerachtig molecuul verkregen worden, bestaande uit verschillende 15 kDa bouwstenen, die gericht kunnen zijn tegen hetzelfde target of verschillende targets. Van groot belang voor de toekomst van deze modulaire mAb technologie is de vraag of deze bouwstenen hun bindingsaffiniteit en specificiteit behouden, wanneer ze achter elkaar geplaatst worden binnen een dergelijke kralensnoerstructuur. In **hoofdstuk 6** zijn we de uitdaging aangegaan om deze vraag te beantwoorden, door moleculen te construeren bestaande uit anti-EGFR (α EGFR) en/of anti-albumine (α Alb) bouwstenen. In vitro bindingsstudies en in vivo biodistributiestudies werden uitgevoerd bij tumordragende muizen om te testen of beide bouwstenen hun volledige functionaliteit behouden wanneer ze gekoppeld zijn. Een α EGFR- α EGFR nanobody toonde snelle klaring uit het bloed, zeer hoge tumor-normaal weefsel ratio's (behalve voor de nieren), maar slechts een matig niveau van tumoropname (5.0 ± 1.4 %ID/g, 6 uur na injectie), dat tevens in de loop van de tijd snel afnam. Snelle klaring van dit ~35 kDa construct was te verwachten, aangezien moleculen kleiner dan 60-70 kDa in het algemeen zeer snel via de nieren uitgescheiden worden. Een totaal andere biodistributieprofiel werd gevonden wanneer een α Alb bouwsteen werd toegevoegd aan het α EGFR- α EGFR construct. Het op deze manier verkregen ~50 kDa α EGFR- α EGFR- α Alb molecuul toonde: (a) snelle, hoge (tot 35.2 ± 7.5 %ID/g), en selectieve tumorophoping, die vergelijkbaar was met die van het 150 kDa anti-EGFR referentie-mAb cetuximab; (b) een langere verblijftijd in het bloed en in de tumor; (c) homogene verdeling binnen de tumor, homogener dan cetuximab, en (d) ogenschijnlijke verzadiging van EGFR wanneer het toegediend werd in een relatief hoge dosering. Deze gegevens duiden er op dat met nanobodies optimale EGFR-targeting mogelijk is. Daarnaast tonen deze data aan dat de afzonderlijke bouwstenen elk hun bindingseigenschappen behouden, zelfs wanneer ze in een kralensnoerstructuur gerangschikt zijn. Terwijl de aanwezigheid van α EGFR-units resulteerde in selectieve tumortargeting van tumoren met EGFR-expressie, veroorzaakte de binding van de α Alb-unit aan serumalbumine een verlenging van de verblijftijd in het bloed. Sterker nog, de farmacokinetiek van α EGFR- α EGFR- α Alb bleek precies overeen te

komen met die van muize-serumalbumine. Deze resultaten rechtvaardigen de verdere toepassing van nanobody technologie, bijvoorbeeld voor de ontwikkeling van biparatopische (twee verschillende epitopen op hetzelfde targetantigeen) (35) of multi-specifieke nanobody-constructen bestaande uit één molecuul. Met betrekking tot dit laatste komt de gelijktijdige targeting van twee of meer kritische tumortargets, zoals bijvoorbeeld EGFR en VEGF, met één enkel nanobody-molecuul (in dit geval α EGFR- α VEGF- α Alb) binnen handbereik. Tot nu toe kunnen nanobody-constructen bestaande uit maximaal vijf bouwstenen worden geproduceerd. Of alle units dan nog hun volledige bindingscapaciteit behouden, zal moeten worden onderzocht.

Op dit moment worden drie nanobodies getest in klinische studies. Twee therapeutische nanobodies zijn gericht tegen de Von Willebrandfactor, waarbij het risico van thrombose bij patiënten met het acuut coronair syndroom en thrombotische thrombocytopenische purpura verkleind moet worden. Een derde nanobody is gericht tegen de tumor necrosis factor alpha (TNF- α), die een sleutelrol speelt bij ontstekingsgerelateerde ziekten als reumatoïde artritis. Op dit moment zijn er nog geen klinische studies gestart met nanobodies gericht tegen kanker. Een belangrijke vraag die gesteld kan worden bij klinische toepassing is of humane-anti-lama antilichamen gevormd zullen worden. Een dergelijke immunologische respons zou een belemmering kunnen vormen voor effectieve targeting. Dit is vooral van belang voor de constructen die een α Alb unit bevatten, en daardoor een langzame kinetiek vertonen.

Conclusie: de resultaten van de studies beschreven in dit proefschrift bemoedigen een verdere ontwikkeling van targeted therapies voor de locoregionale en systemische behandeling van hoofd-halskanker. Bleomycine elektroporatietherapie bleek een waardevolle aanvulling te zijn op de standaardbehandelingen bij patiënten die niet meer behandeld kunnen worden met chirurgie of radiotherapie. De combinatie van elektroporatie met systemische chemotherapie is interessant, en zal verder onderzocht moeten worden. Verder dient aandacht besteed te worden aan de selectie van target-antigenen met strikt tumorselectieve expressie, om therapeutische toepassing van antilichaam-cytostaticaconjugaten mogelijk te maken. De nadruk zou daarbij moeten liggen op het voorkomen van onacceptabele bijwerkingen, die kunnen ontstaan door kruisreactiviteit. De resultaten van de radioimmunotherapiestudies voor de selectieve aanval op bloedvaten van tumoren maken de weg vrij voor klinische studies. Accurate informatie over tumortargeting en dosimetrie kan daarbij verkregen worden door toepassing van moleculaire beeldvorming middels immuno-PET, voorafgaand aan radioimmunotherapie. De ontwikkeling van nieuwe, multivalente of multi-specifieke antilichaamfragmenten opent nieuwe wegen voor het blokkeren van meerdere kritische tumortargets tegelijkertijd.



Figuur 1. Patiënt met een gemetastaseerd schildkliercarcinoom. Na uitgebreide chirurgie van de wervelkolom en verschillende behandelingen met ^{131}I , was het onduidelijk of er nog vitaal tumorweefsel resteerde. ^{124}I -PET-CT toont duidelijk opname van jodium (een indicatie voor vitale tumor) aan de linkerkant van de wervel. Op basis van deze bevinding werd een adjuvante hoge dosis ^{131}I therapie geadviseerd voor deze patiënt.

Referenties

1. Burian M, Formanek M, Regele H. Electroporation therapy in head and neck cancer. *Acta Otolaryngol.* 2003;123:264-268.
2. Bloom DC, Goldfarb PM. The role of intratumor therapy with electroporation and bleomycin in the management of advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Surg Oncol.* 2005;31:1029-1035.
3. Copper MP, Triesscheijn M, Tan IB, Ruevekamp MC, Stewart FA. Photodynamic therapy in the treatment of multiple primary tumours in the head and neck, located to the oral cavity and oropharynx. *Clin Otolaryngol.* 2007;32:185-189.
4. Sersa G, Stabuc B, Cemazar M, Jancar B, Miklavcic D, Rudolf Z. Electrochemotherapy with cisplatin: potentiation of local cisplatin antitumour effectiveness by application of electric pulses in cancer patients. *Eur J Cancer.* 1998;34:1213-1218.
5. Fulimoto T, Maeda H, Kubo K, et al. Enhanced anti-tumour effect of cisplatin with low-voltage electrochemotherapy in hamster oral fibrosarcoma. *J Int Med Res.* 2005;33:507-512.
6. Byrne CM, Thompson JF. Role of electrochemotherapy in the treatment of metastatic melanoma and other metastatic and primary skin tumors. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2006;6:671-678.
7. De Bree R, Roos JC, Quak JJ, Den Hollander W, Snow GB, and Van Dongen GAMS. Radioimmunosciintigraphy and biodistribution of ^{99m}Tc-labeled monoclonal antibody U36 in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 1995;1:591-598.
8. Stroomer JW, Roos JC, Sproll M, et al. Safety and biodistribution of ^{99m}Technetium-labeled anti-CD44v6 monoclonal antibody BIWA 1 in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2000;6:3046-3055.
9. Vrouwenraets MB, Visser GWM, Stigter M, Oppelaar H, Snow GB, van Dongen GAMS. Comparison of aluminium (III) phthalocyanine tetrasulfonate- and meta-tetrahydroxyphenylchlorin-monooclonal antibody conjugates for their efficacy in photodynamic therapy in vitro. *Int J Cancer.* 2002;98:793-798.
10. Colnot DR, Quak JJ, Roos JC, et al. Phase I therapy study of ¹⁸⁶Re-labeled chimeric monoclonal antibody U36 in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Nucl Med.* 2000;41:1999-2010.
11. Colnot DR, Ossenkoppele GJ, Roos JC, et al. Reinfusion of unprocessed, granulocyte colony-stimulating factor-stimulated whole blood allows dose escalation of ¹⁸⁶Re-labeled chimeric monoclonal antibody U36

- radioimmunotherapy in a Phase I dose escalation study. *Clin Cancer Res.* 2002;8:3401-3406.
12. Börjesson PKE, Postema EJ, Roos JC, et al. Phase I therapy study with ¹⁸⁶Re-labeled humanized monoclonal antibody BIWA 4 (bivatuzumab) in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2003;9:3961s-3972s.
 13. Tijink BM, Buter J, de Bree R, et al. A phase I dose escalation study with anti-CD44v6 bivatuzumab mertansine in patients with incurable squamous cell carcinoma of the head and neck or esophagus. *Clin Cancer Res.* 2006;12:6064-6072.
 14. Riechelmann H, Sauter A, Golze W, et al. Phase I trial with the CD44v6-targeting immunoconjugate bivatuzumab mertansine in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2008;44:823-829.
 15. Sauter A, Kloft C, Gronau S, et al. Pharmacokinetics, immunogenicity and safety of bivatuzumab mertansine, a novel CD44v6-targeting immunoconjugate, in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int J Oncol.* 2007;30:927-935.
 16. Gronau S, Sauter A, Bogeschdorfer F, et al. Phase I trial with the CD44v6-targeting immunoconjugate bivatuzumab mertansine in squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCH&N). *Clin Cancer Res.* 2005;11(24 Suppl):897s-898s.
 17. Rupp U, Schoendorf-Holland E, Eichbaum M, et al. Safety and pharmacokinetics of bivatuzumab mertansine in patients with CD44v6-positive metastatic breast cancer: final results of a phase I study. *Anticancer Drugs.* 2007;18:477-485.
 18. Lewis Phillips GD, Li G, Dugger DL, et al. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res.* 2008;68:9280-9290.
 19. Gordon LI, Burke MA, Singh ATK, et al. Blockade of the erbB2 receptor induces cardiomyocyte death through mitochondrial and reactive oxygen species-dependent pathways. *J Biol Chem.* 2009;284:2080-2087.
 20. Fuchs IB, Landt S, Bueler H, et al. Analysis of HER2 and HER4 in human myocardium to clarify the cardiotoxicity of trastuzumab (Herceptin). *Breast Cancer Res Treat.* 2003;82:23-28.
 21. Rayson D, Richel D, Chia S, Jackisch C, van der Vegt S, Suter T. Anthracycline-trastuzumab regimens for HER2/neu-overexpressing breast cancer: current experience and future strategies. *Ann Oncol.* 2008;19:1530-1539.
 22. De Korte MA, de Vries EGE, Lub-de Hooge MN, et al. ¹¹¹Indium-trastuzumab visualises myocardial human epidermal growth factor receptor 2 expression shortly after anthracycline treatment but not during heart failure: a clue to uncover the mechanisms of trastuzumab-related cardiotoxicity. *Eur J Cancer.* 2007;43:2046-2051.

23. Holden SN, Beeram M, Krop IE, et al. A phase I study of trastuzumab-DM1 (T-DM1), a first-in-class HER2 antibody-drug conjugate (ADC), in patients (pts) with advanced HER2+ breast cancer (BC). *J Clin Oncol* 2008;26 (May 20 suppl; abstr 1029).
24. Vogel CL, Burris HA, Limentani S, et al. A phase II study of trastuzumab-DM1 (T-DM1), a HER2 antibody-drug conjugate (ADC), in patients (pts) with HER2+ metastatic breast cancer (MBC): Final results. *J Clin Oncol.* 2009;27:15s (suppl; abstr 1017).
25. Carnemolla B, Balza E, Siri A, et al. A tumor-associated fibronectin isoform generated by alternative splicing of messenger RNA precursors. *J Cell Biol.* 1989;108:1139-1148.
26. Castellani P, Viale G, Dorcaratto A, et al. The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: a marker of angiogenesis. *Int J Cancer.* 1994;59:612-618.
27. Sauer S, Erba PA, Petrini M, et al. Expression of the oncofetal ED-B-containing fibronectin isoform in hematologic tumors enables ED-B-targeted ¹³¹I-L19SIP radioimmunotherapy in Hodgkin lymphoma patients. *Blood.* 2009;113:2265-2274.
28. Birchler MT, Milisavljevic D, Pfaltz M, et al. Expression of the extra domain B of fibronectin, a marker of angiogenesis, in head and neck tumors. *Laryngoscope.* 2003;113:1231-1237.
29. Verel I, Visser GWM, van Dongen GAMS. The promise of immuno-PET in radioimmunotherapy. *J Nucl Med* 2005;46:Suppl 1:164S-171S.
30. Van Dongen GAMS, Visser GMW, Lub-de Hooge MN, De Vries EG, Perk LR. Immuno-PET: a navigator in monoclonal antibody development and applications. *Oncologist* 2007;12:1379-1389.
31. Cai W, Chen X. Multimodality molecular imaging of tumor angiogenesis. *J Nucl Med* 2008;48:113S-128S.
32. Peruzzi B, Bottaro DP. Targeting the c-Met signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12:3657-3660.
33. Ciardiello F, Troiani T, Bianco R, et al. Interaction between the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathways: a rational approach for multi-target anticancer therapy. *Ann Oncol.* 2006;17:vii109-114.
34. Roovers RC, van Dongen GAMS, van Bergen en Henegouwen PMP. Nanobodies in therapeutic applications. *Curr Opin Mol Ther.* 2007;9:327-335.
35. Neri D, Momo M, Prospero T, Winter G. High-affinity antigen binding by chelating recombinant antibodies (CRAbs). *J Mol Biol.* 1995;246:367-373.