

NEDERLANDSE SAMENVATTING

In dit proefschrift worden nieuwe methoden voor enkelvoudige en dubbellabeling van monoklonale antilichamen (mAbs) beschreven, waardoor mAbs en mAb-conjugaten *in vivo* met behulp van beeldvorming gevolgd en gekwantificeerd kunnen worden. Zo kunnen deze complexe moleculen efficiënter ontwikkeld worden voor klinische toepassingen. Beeldvorming betreft enerzijds detectie met Positron Emission Tomografie (PET), nadat een mAb met een radioactieve stof (positron emitter) gelabeld is, en anderzijds detectie met behulp van licht, ook wel optische imaging genoemd, nadat een mAb met een fluorescente stof gelabeld is. Deze labelingsmethoden zijn van grote waarde bij de ontwikkeling en *in vivo*-karakterisatie van zeer potente therapeutische mAbs om selectieve binding aan tumoren en individuele tumorcellen te bevestigen. De kracht van de dubbellabeling wordt met name geïllustreerd aan de hand van de ontwikkeling van antilichaam-drug conjugaten (ADCs) die het zeer toxische tubulysine als werkzaam geneesmiddel bevatten. Tubulysines zijn nooit eerder in ADC toepassingen gebruikt. Het is een vereiste dat dergelijke ADCs in bloed stabiel zijn, omdat de vrijgelaten drug onacceptabele toxiciteit kan veroorzaken in de verschillende organen. Bovendien is het belangrijk dat het mAb na koppeling van het geneesmiddel nog steeds selectief in de tumor ophoopt en de opname in de gezonde organen minimaal blijft. Zoals aangetoond in dit proefschrift kan deze cruciale informatie verkregen worden in preklinische studies met tumor-dragende naakte muizen, maar vooral ook in toekomstige klinische studies waarbij kruisreactiviteit met gezonde weefsels een grotere rol speelt dan in de muis en de binding aan de tumor nogal kan variëren tussen patiënten. Om deze klinische toepassing mogelijk te maken, moeten labelingsmethoden voor mAbs volgens Good Manufacturing Practices (GMP)-procedures uitgevoerd worden. In dit proefschrift beschrijven we de mAb-koppeling van ⁸⁹Zr en/of IRDye800CW volgens GMP-procedures, om mAbs en mAb-conjugaten in het lichaam te volgen door middel van PET en/of optische beeldvorming.

In de introductie van dit proefschrift (**Hoofdstuk 1**) wordt de geschiedenis besproken van de ontwikkeling van antilichamen en de toepassingen in de oncologie, inclusief mijlpalen in de technologische mogelijkheden en toepassingen. MAbs werden oorspronkelijk ontwikkeld als 'naakte' - ongeconjugeerde - therapeutica, voornamelijk voor de selectieve remming van receptor tyrosine kinases of om andere belangrijke membraaneiwitten te beïnvloeden of te blokkeren. De veiligheid en het therapeutische succes van deze eerste generatie mAbs heeft de ontwikkeling gestimuleerd van de volgende generatie mAbs, die gekenmerkt wordt door het feit dat ze een nog grotere potentie hebben en vaak worden toegepast als conjugaat,

de eerder genoemde ADCs. Samen met de mAbs die zogenaamde “immuun checkpoints” kunnen opheffen die de antitumor werking van het immuunsysteem blokkeren, trekken ADCs op dit moment de meeste aandacht. In het laatste decennium heeft de ontwikkeling in ADCs geleid tot 2 nieuwe FDA-goedgekeurde ADCs en er worden nu meer dan 30 ADCs in klinische studies getest¹.

ADCs bestaan uit een zeer toxische stof, de ‘drug’, een koppelgedeelte, de ‘linker’, en een mAb. Alle drie componenten van een ADC hebben hun eigen cruciale vereisten qua bijdrage aan de therapeutische potentie en de klinische waarde. Het mAb dient zeer specifiek gericht te zijn tegen een tumorantigeen, dat bij voorkeur slechts op tumorcellen tot over-expressie komt en na binding van het mAb-conjugaat internaliseert. De linker dient volledig stabiel te zijn in de bloed-circulatie, zodat de toxische stof niet voortijdig loslaat met als gevolg ophoping van de toxische stof in de gewone organen. De toxische stof mag alleen in de tumorcel vrijgemaakt worden. Ook dient de “drug” zonder verlies van zijn toxische potentie gekoppeld en vrijgemaakt te kunnen worden van het mAb.

Ondanks het grote aantal klinisch geteste ADCs zijn er slechts vijf verschillende soorten toxische moleculen gebruikt in deze ADCs: maytansinoiden, auristatines, calichaemicines, duocarmicines en daunorubicines. Driekwart van de ADCs bevat echter maytansinoiden of auristatines². Een logische verklaring voor het beperkt aantal toxische moleculen in klinische studies is dat het erg lastig is om een toxisch molecuul te vinden dat én toxisch is bij een nanomolaire concentratie én geconjugeerd kan worden aan een mAb in een waterige oplossing. De koppeling in waterige oplossing is noodzakelijk om de activiteit van het mAb te behouden. Bovendien moet een chemische synthese route voor grootschalige productie van het ADC ontwikkeld worden om klinische toepassingen te kunnen garanderen. Daarbij is er met name voor een nieuw ADC met een nieuwe toxische stof een volledige karakterisatie in preklinische studies vereist voordat klinische studies gestart mogen worden. De ontwikkeling van ADCs met nieuwe toxische moleculen is daarom uitdagend, vereist veel preklinisch werk, maar kan wel veelbelovende nieuwe therapeutica opleveren.

Tubulysine is een zeer toxisch molecuul gericht tegen tubuline. In **Hoofdstuk 2** worden chemische varianten van tubulysine gebruikt voor de ontwikkeling van nieuwe ADCs. Het in de natuur voorkomende tubulysine kan sinds kort namelijk ook chemisch gesynthetiseerd worden, waardoor de ontwikkeling van varianten met verschillende toxiciteit en chemische eigenschappen mogelijk werd. In ons onderzoek dienden we allereerst een methode te ontwikkelen om tubulysines aan een mAb te koppelen, en vervolgens was het doel van de studies om inzicht te krijgen in het *in vivo* gedrag van het resulterende complete ADC. Betreffende data wilden we voor zowel het mAb als voor het gekoppelde toxische molecuul

verzamelen, omdat gegevens van beide moleculen belangrijke informatie zou opleveren over de tumorbinding en de mogelijk te verwachten bijwerkingen bij het behandelen van patiënten. Om deze redenen zijn als 'drug' molecuul TUB-OH ($IC_{50} > 100$ nmol/L) en TUB-OMOM (IC_{50} 0.4-6 nmol/L) geselecteerd voor de studies: beide moleculen bevatten een fenolgroep waardoor labeling met radioactief jodium via een elektrofiële substitutiëreactie op de fenolgroep mogelijk is. Het mAb geselecteerd voor deze studie, trastuzumab, werd gelabeld met ^{89}Zr , waardoor karakterisatie van de verschillende componenten van het complete ADC, mAb en toxisch molecuul, mogelijk werd. Wij hebben als eerste stap een methode ontwikkeld om de tubulysine moleculen met ^{131}I te labelen en ze vervolgens om te zetten in actieve NHS-esters. Deze esters werden gebruikt voor de succesvolle koppeling met ongelabeld of ^{89}Zr -gelabeld trastuzumab door middel van directe conjugatie aan de lysine- NH_2 -groep. In deze eerste tubulysine ADCs is geen linker gebruikt omdat de op dit moment beschikbare linkers in theorie minder stabiele ADCs opleveren dan de directe conjugatie via de lysines van het mAb. Na zuivering van het product was de radiochemische zuiverheid van de ADCs tussen de 96% en 98%. Ongeveer 2-4% van de niet-geconjugeerde tubulysines co-elueerden met het ADC. Dit is ongewenst omdat niet-geconjugeerde tubulysines na injectie waarschijnlijk vrij komen en ongewenste toxiciteit kunnen veroorzaken. De niet optimale zuivering is waarschijnlijk te wijten aan de lipofiliciteit van de in deze studie gebruikte tubulysines, waardoor ze in de driedimensionale structuur van het mAb ingesloten raken. Biodistributie studies met het dubbel-gelabelde conjugaat leverden waardevolle informatie op over de stabiliteit van het ADC en over selectieve tumoropname. Bloedkinetiek van ^{131}I -TUB-OMOM- ^{89}Zr -trastuzumab liet geen significante verschillen zien tussen het ^{131}I signaal en het ^{89}Zr signaal, hetgeen een sterke aanwijzing is dat het ADC *in vivo* stabiel blijft. Bovendien liet het ^{89}Zr -signaal geen significante verschillen zien tussen het dubbel-gelabelde ADC en ^{89}Zr -trastuzumab voor wat betreft bloed- en tumoropname. Dit wijst erop dat het koppelen van TUB-OMOM aan trastuzumab de farmacokinetiek en de tumoropname van trastuzumab niet verandert. Deze bevindingen rechtvaardigen de conclusie dat TUB-OMOM, zonder biochemische schade aan een van beide moleculen, gekoppeld kan worden aan trastuzumab. De biodistributie studies toonden wel een verhoogde opname van ^{131}I ten opzichte van ^{89}Zr aan in de inhoud van de dikke- en dunne darm. Dit is mogelijk het gevolg van de fractie vrije tubulysine in het injectiepreparaat (zie eerder), omdat toediening van vrije ^{131}I -TUB-OMOM aan muizen zonder tumor ook resulteerde in opname in voornamelijk de inhoud van dikke- en dunne darm.

Om het anti-tumor effect van het ADC te testen zijn effectiviteitsstudies uitgevoerd met een enkelvoudige dosis TUB-OMOM-trastuzumab in muizen met

trastuzumab-gevoelige tumoren (N87) en trastuzumab-resistente tumoren (J1MT). Dosisafhankelijke anti-tumor effecten, inclusief de volledige verdwijning van sommige tumoren, werden waargenomen bij muizen met trastuzumab-gevoelige tumoren. Dit betekent ook dat het niet noodzakelijk is om een conjugaat met een linker te gebruiken voor het behouden c.q. verkrijgen van het therapeutisch effect, wat de klinische toepassing vereenvoudigt. TUB-OMOM-trastuzumab (60 mg/kg) vertoonde een vergelijkbare effectiviteit als ado-trastuzumab emtansine (15 mg/kg) en een betere effectiviteit dan trastuzumab alleen. TUB-OMOM-trastuzumab en ado-trastuzumab emtansine gaven geen van beiden tumor-remmende effecten in muizen met trastuzumab-resistente J1MT-tumoren, ondanks het feit dat TUB-OMOM-trastuzumab een vergelijkbare tumor-binding geeft bij J1MT en N87, zoals werd aangetoond in de biodistributie studies.

Het labelen van zowel de toxische stof als het mAb van het ADC heeft bijgedragen aan kennis van de efficiency en het zonder biochemische schade conjugeren van tubulysine aan het mAb, de stabiliteit van het ADC *in vitro* en *in vivo*, de opname van het ADC in de normale weefsels, de binding aan de tumor en de uitscheidingsroute van tubulysine. Zonder het gebruik van radioactiviteit zou het gebruik van massaspectrometrie-methoden noodzakelijk geweest zijn om de integriteit van het ADC te bepalen. Dit is bepaald niet eenvoudig in weefselbiopten en levert bovendien geen accurate kwantitatieve informatie op over de totale opname in de verschillende weefsels.

Ondanks de veelbelovende therapeutische resultaten van het ADC TUB-OMOM-trastuzumab is er nog ruimte voor verbetering. Ten eerste toonde de SDS-PAGE analyse van het radioactief gelabelde product een klein percentage vrij tubulysine in het gezuiverde conjugaat, wat voor klinische toepassingen onacceptabel is. De meest ideale oplossing voor dit probleem zou zijn om een goed additief te vinden om het zwakgebonden vrije tubulysine uit de driedimensionale structuur van het mAb te verwijderen voor de zuivering. In dat geval zou onze koppelingsmethode, waarbij een sterke en *in vivo* stabiele peptidebinding gegenereerd wordt, waarschijnlijk favoriet zijn voor klinische toepassingen, temeer omdat de koppelingsmethode zeer robuust bleek. Een andere mogelijkheid om dit probleem op te lossen is om toch over te stappen op een andere koppelingsmethode. Zo werd bijvoorbeeld onlangs een innovatieve linker technologie beschreven voor het koppelen van supertoxische drugs aan mAbs door het gebruiken van platinum(II) als bifunctionele linker ("Lx" linker technologie genoemd)³. Door de lading van de linker wordt het "Lx"-drug molecuul beter wateroplosbaar dan de drug zelf, waardoor optimale zuivering van het mAb-Lx-drug product eenvoudiger zou kunnen zijn, omdat opname in de driedimensionale structuur van het mAb belemmerd wordt. Deze linker technologie lijkt ook bruikbaar voor het koppelen van tubulysines aan mAbs.

Een tweede verbeterpunt betreft de toename van de ADC effectiviteit. Het in onze studie gebruikte TUB-OMOM-trastuzumab ADC was niet effectiever dan het referentie ADC ado-trastuzumab emtansine in muizen met N87 tumoren en beiden waren ineffectief in muizen met JIMT tumoren. Er zijn nu echter tubulysinevarianten beschikbaar die 10 tot 100 keer toxischer zijn dan TUB-OMOM, zodat verhoging van de nu gevonden ADC-effectiviteit zonder meer verwacht mag worden. Bij het ontwikkelen van dergelijke verbeterde conjugaten kan de dubbellabeling uiteraard wederom zeer waardevol zijn.

Hoewel de dubbellabeling procedure met name waardevolle informatie kan geven in preklinische studies met nieuwe ADCs, verwachten wij dat ook in de klinische toepassing radiolabeling van het mAb-construct zijn waarde zal bewijzen: immuno-PET kan de ideale dosering van het mAb voor optimale tumorophoping vaststellen (bv. verzadiging van receptoren), maar ook bijvoorbeeld de opname in kritische organen laten zien op grond waarvan bijverschijnselen voorspeld zouden kunnen worden. Tevens kan de variatie tussen patiënten in kaart worden gebracht met betrekking tot farmacokinetiek en tumorbinding.

Beeldvorming is niet alleen belangrijk om selectieve tumorophoping vast te stellen van mAbs en mAb-conjugaten in het hele lichaam. Voor sommige mAbs is het bijvoorbeeld ook essentieel om te weten hoe de extravasatie en tumorpenetratie plaatsvindt en aan welke subgroepen van cellen de mAbs binden. Beoordeling van tumorpenetratie is relevant om homogene verdeling van het mAb in de tumor te verifiëren, wat mogelijk een vereiste is voor een efficiënte werking van het mAb. Dergelijke analyses zijn in de mens, door de introductie van humane mAbs, technisch steeds moeilijker geworden, omdat humane mAbs niet meer selectief aan te kleuren zijn in weefselbiopten. Kennis van de binding aan subgroepen van cellen is met name waardevol voor mAbs die specifiek binden aan een bepaald celtype, bijvoorbeeld mAbs gericht tegen de endotheelcellen van de bloedvaten in een tumor, checkpoint antigenen op immuuncellen in of buiten de tumor, of de tumorstamcellen. De combinatie van immuno-PET met nabij-infrarood (NIR) beeldvorming kan het in kaart brengen van mAbs en ADCs transformeren naar een "immunohistochemie van het hele lichaam".

NIR moleculen zijn veelbelovende kandidaten voor optische beeldvorming, een technologie die klinisch complementair zou kunnen zijn aan immuno-PET. Ten eerste maken ze hoge resolutie, real-time, dynamische beeldvorming van oppervlakkige weefsellagen mogelijk. Bindingspecificiteit op cellulair niveau kan ook *ex vivo* bevestigd worden door het nemen van biopten. Verder kunnen NIR moleculen ideaal zijn voor de detectie van kankercellen bij bevolkingsonderzoek, tijdens een operatieve ingreep, of vroegdiagnostiek in geval van terug-

kerende ziekte. Dit zou een nieuw aspect aan de klinische toepassing van mAbs toevoegen.

Onder de kandidaten voor optische beeldvorming is IRDye800CW het meest veelbelovende NIR-molecuul. Het heeft de meest gunstige fluorescentie-eigenschappen, terwijl het van een NHS of maleimide groep voorzien kan worden zodat koppeling met een mAb mogelijk is. Bemoedigende resultaten met IRDye800CW-mAb-conjugaten zijn beschreven in preklinische imaging studies⁴⁻⁸. Een belangrijk aspect bij conjugatie van een NIR-fluorofoor aan een mAb is, net als bij ADCs, dat het een lipofiel molecuul is dat geconjugerd wordt aan een hydrofiel mAb. Dit houdt in dat complete karakterisatie van het IRDye800CW-mAb conjugaat uitgevoerd moet worden alvorens te starten met klinische studies. Er dient bijvoorbeeld vastgesteld te worden dat de bindingseigenschappen, farmacokinetiek en de farmacodynamiek van het mAb niet veranderen na koppelen van de NIR-fluorofoor aan het mAb.

In **Hoofdstuk 3** karakteriseren we NIR-fluorofoor IRDye800CW, gekoppeld aan twee FDA-goedgekeurde mAbs: bevacizumab en cetuximab. Voor kwantitatieve vergelijking van bindings- en biodistributiegegevens zijn de conjugaten tevens gelabeld met ⁸⁹Zr en werden ⁸⁹Zr-gelabelde mAbs als referentie gebruikt. Zowel de stabiliteit, de bindingskarakteristieken als de *in vivo* biodistributie van PET-tracers kunnen eenvoudig en accuraat op een kwantitatieve manier geanalyseerd worden met behulp van radioactiviteit. Er is voor gekozen om gemiddeld 0.5 chelatorgroep per mAb molecuul te koppelen voor ⁸⁹Zr-labeling, om zo het totaal aantal gekoppelde groepen beperkt te houden. Maximaal vijf groepen IRDye800CW werden gekoppeld aan de lysines van de ⁸⁹Zr-mAbs, waarna zuivering door middel van gelpermeatie conjugaten opleverde die meer dan 99% zuiver waren voor zowel ⁸⁹Zr als IRDye800CW, en waarbij HPLC-analyse liet zien dat de integriteit van de mAbs volledig bewaard was gebleven. De immunoreactiviteit en stabiliteit van de ⁸⁹Zr-mAb-IRDye800CW conjugaten veranderde niet tijdens het bewaren gedurende enkele dagen in 0.9% NaCl bij 4°C. Ook langdurige opslag in PBS en in humaan serum bij 37°C voor tenminste 96 uur had geen effect op de stabiliteit. Daarentegen toonden de biodistributie studies aan dat de bloedklaring versneld was en de leveropname verhoogd, wanneer meer dan 1 groep IRDye800CW gekoppeld werd. Dit gold zowel voor ⁸⁹Zr-cetuximab als ⁸⁹Zr-bevacizumab. Deze bevinding suggereert dat voor klinische studies niet meer dan 1 IRDye800CW groep aan een mAb molecuul gekoppeld dient te worden, zelfs wanneer de additionele dubbellabeling met ⁸⁹Zr achterwege wordt gelaten. We verwachten dat dit geen beperkingen zal opleveren voor de optische prestaties van het conjugaat, omdat mAbs met gemiddeld 1 groep IRDye800CW per mAb molecuul prima geschikt zouden moeten zijn voor het in beeld brengen van tumoren. In eerdere preklini-

sche studies met dubbelgelabelde mAb conjugaten met IRDye800CW en een PET/SPECT tracer werd het radioactieve signaal met het fluorescente signaal vergeleken om zo conclusies te kunnen trekken over de stabiliteit van het conjugaat. Echter, wij tonen aan dat vergelijkbare signalen nog geen direct bewijs vormen dat de labeling het mAb onaangestast heeft gelaten. Na de publicatie van de resultaten uit dit hoofdstuk zijn in de meeste vervolgstudies waarbij IRDye800CW-mAb conjugaten gebruikt werden onze bevindingen ter harte genomen, en werd er gemiddeld 1 groep van de fluorescente stof gekoppeld aan het mAb⁹⁻¹¹. Hoewel het chemisch onaangestast blijven van het dubbelgelabelde conjugaat door ons vastgesteld is voor twee FDA-goedgekeurde mAbs, is voorzichtigheid geboden bij extrapolatie van de resultaten naar andere mAbs. Elk mAb heeft andere eigenschappen en daarom zouden stabiliteits- en farmacokinetiek studies bij elk nieuw mAb uitgevoerd moeten worden om het chemisch intact blijven tijdens de labeling te bevestigen.

Op dit moment is het niet duidelijk waarom het koppelen van slechts enkele IRDye800CW moleculen aan lysines van een mAb zo'n dramatisch effect heeft op de farmacokinetiek. In eerdere studies werd bij het koppelen van ^{99m}Tc/⁹⁹Tc-MAG3 of ¹⁸⁶Re-MAG3 groepen aan lysines een vergelijkbaar effect op de farmacokinetiek waargenomen, maar pas wanneer 8 of meer groepen gekoppeld waren, terwijl de immunoreactiviteit slechts minimaal verminderde bij het koppelen van meer dan 12 groepen¹². Ook hier werden verschillende mAbs in verschillende mate aangestast, waarbij de relatie met het 'iso-electrisch punt' van het mAb belangrijk leek te zijn. Vergelijkbare effecten als met IRDye800CW werden waargenomen bij het koppelen van de fotosensitizer meta-tetrahydroxyphenyl chlorine (mTHPC) aan mAbs via de lysines. Hierbij werd de verandering van de farmacokinetiek ook bij lage molaire ratio's (~1) waargenomen¹³, maar deze fotosensitizer is veel hydrofobischer dan IRDye800CW. Deze studies tonen duidelijk aan dat verandering in hydrofobiciteit, lading of conformatie kan optreden, afhankelijk van het mAb en het type en/of aantal groepen chelatoren of fluoroforen die gekoppeld worden. Dit kan leiden tot een afwijkend gedrag *in vivo* van de mAb-conjugaten. Vanuit dit oogpunt zou het interessant zijn om te zien hoe regio-specifieke labeling, zoals bv. alleen aan het Fc gedeelte van het mAb, de mAb karakteristieken beïnvloedt bij koppeling met IRDye800CW.

Hoofdstuk 4 bevat een laboratorium protocol voor het dubbellabelen van mAbs met IRDye800CW en ⁸⁹Zr naar huidige GMP standaarden. IRDye800CW en ⁸⁹Zr kunnen zonder biochemische schade gekoppeld worden, dus zonder dat dit tot veranderingen in de immunoreactiviteit en farmacokinetiek van het mAb leidt. Het protocol is in drie delen opgesplitst, waardoor het mogelijk is om conjugaten voor enkelvoudige toepassing te maken (PET of optisch) of voor tweevoudige klinische imaging (PET en optisch). In het protocol zijn ook de kritische synthese stappen

aangegeven en wordt een “tips en tricks” gegeven om eventuele problemen op te lossen.

Optische beeldvormende moleculen, zoals IRDye800CW-mAb conjugaten, zijn bij uitstek geschikt voor kwalitatieve imaging van oppervlakkig gelegen tumoren of voor intra-operatieve beeldvorming. Om informatie te verkrijgen over de selectiviteit van het conjugaat om de tumor te bereiken en de specifieke hoeveelheid ophoping in de tumor zou het wenselijk zijn om een methode te hebben die nauwkeurige kwantitatieve informatie geeft over het conjugaat, uitgedrukt in percentage geïnjecteerde dosis per gram weefsel (%ID/g), zoals ook verkregen met radioactief gelabelde conjugaten. Schattingen van orgaan- en tumorverdeling van IRDye800CW-mAb conjugaten zijn gedaan met intacte organen *ex vivo*, of met beeldvormend onderzoek van weefselsecties waarbij dezelfde methodes gebruikt zijn als voor het niet-invasief beeldvormend onderzoek van muizen. Kwantitatieve biodistributie van fluoroforen is erg lastig, omdat de mogelijkheid van uitdoving van de fluorescentie bestaat bij een te hoge concentratie NIR-moleculen. Dit komt door de verstrooiing van de fotonen en absorptie door weefsels. In **Hoofdstuk 5** wordt een nieuwe methode beschreven voor de *ex vivo* kwantificatie van IRDye800CW-fluorescentie in weefsels. Om de methode voor bepaling van IRDye800CW opname in weefsels te valideren, is deze vergeleken met biodistributie studies met ^{89}Zr -gelabeld mAb of dubbelgelabeld ^{89}Zr -mAb-IRDye800CW, om eerder genoemde redenen. Dubbelgelabeld cetuximab, ^{89}Zr -cetuximab-IRDye800CW, werd gemaakt volgens het protocol beschreven in **Hoofdstuk 4**, met gemiddeld 0.5 moleculen chelator en 0.9 fluorofoorgroepen per mAb molecuul. Na gelpermeatiechromatografie was het dubbelgelabelde cetuximab meer dan 99% zuiver voor zowel ^{89}Zr als IRDye800CW. Voor de beeldvormende studies werd een mengsel van ^{89}Zr -cetuximab + cetuximab-IRDye800CW gebruikt, omdat PET een hogere radioactieve dosis vereist dan biodistributie studies. PET en optische imaging werden 24 uur na injectie gedaan om de overeenkomst van de biodistributie met behulp van beeldvorming te bevestigen. In de biodistributie studies werden de organen en tumoren 24 uur na injectie uitgenomen en verzameld, en werden ze elk in tweeën gesneden. De ene helft werd gebruikt om de opname van het conjugaat te bepalen met behulp van radioactiviteit. De andere helft werd gehomogeniseerd, waarna de hoeveelheid fluorescente stof werd bepaald aan de hand van een kalibratiecurve van het conjugaat. Vergelijkbare resultaten werden verkregen, ongeacht of de opname van het conjugaat in de tumoren, lever, longen, maag, huid en ingewanden/darmkanaal was bepaald op basis van het radioactieve signaal of het fluorescentie signaal. Significante verschillen werden waargenomen voor het bloed, de milt, het sternum en de spier, waarbij hogere waarden gevonden werden voor het ^{89}Zr -signaal, terwijl de nieren een hogere waarde lieten zien voor het

NIR-fluorescentie signaal. Omdat controlestudies de stabiliteit van het conjugaat in serum hebben aangetoond, en het bekend is dat zowel ^{89}Zr als IRDye800CW intracellulair achterblijven na receptor-gemedieerde internalisatie van cetuximab, zijn deze variaties zeer waarschijnlijk het gevolg van afbraak door de lever. In het algemeen kan gesteld worden dat de resultaten die verkregen zijn met NIR-fluorescentie kwantificatie vergelijkbaar zijn met de resultaten die verkregen zijn met de referentiemethode voor radioactief gelabelde conjugaten. Deze methode voor het kwantificeren van fluoroforen is zeer waarschijnlijk ook toepasbaar voor andere NIR-fluorescente conjugaten, hoewel het intracellulair achterblijven van het fluorofoor en de stabiliteit van het conjugaat in serum wel eerst bevestigd moet worden, omdat elk mAb zich anders kan gedragen.

De resultaten verkregen in **Hoofdstukken 2-5** laten de kracht zien van mAb-labeling en moleculaire beeldvorming in het ontwerp, de chemische ontwikkeling, de preklinische evaluatie en de klinische toepassing van mAbs en mAb-conjugaten. Dit zijn slechts voorbeelden, verkregen met algemene labeling en beeldvormende technieken die in elke fase van de mAb ontwikkeling toegepast kunnen worden. Deze hulpmiddelen kunnen bijdragen aan het komen tot precisie medicijnen: efficiënte ontwikkeling van het juiste medicijn voor de juiste patiënt, waarbij langdurige en kostbare procedures van medicijnontwikkeling met betrokkenheid van vele patiënten in de studies vermeden kan worden.

REFERENTIES

1. Mullard A. Maturing antibody-drug conjugate pipeline hits 30. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12:329-32.
2. Hamilton GS. Antibody-drug conjugates for cancer therapy: The technological and regulatory challenges of developing drug-biologic hybrids. *Biologicals* 2015.
3. Waalboer DC, Muns JA, Sijbrandi NJ, Schasfoort RB, Haselberg R, Somsen GW, et al. Platinum(II) as bifunctional linker in antibody-drug conjugate formation: coupling of a 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole fluorophore to trastuzumab as a model. *ChemMedChem* 2015;10:797-803.
4. Yang Y, Zhang Y, Hong H, Liu G, Leigh BR, Cai W. In vivo near-infrared fluorescence imaging of CD105 expression during tumor angiogenesis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011;38:2066-76.
5. Vermeulen JF, van Brussel AS, Adams A, Mali WP, van der Wall E, van Diest PJ, Derksen PW. Near-infrared fluorescence molecular imaging of ductal carcinoma in situ with CD44v6-specific antibodies in mice: a preclinical study. *Mol Imaging Biol* 2013;15:290-8.
6. Day KE, Sweeny L, Kulbersh B, Zinn KR, Rosenthal EL. Preclinical comparison of near-infrared-labeled cetuximab and panitumumab for optical imaging of head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Imaging Biol* 2013;15:722-9.
7. Bhattacharyya S, Patel N, Wei L, Riffle LA, Kalen JD, Hill GC, et al. Synthesis and biological evaluation of panitumumab-IRDye800 conjugate as a fluorescence imaging probe for EGFR-expressing cancers. *Medchemcomm* 2014;5:1337-46.
8. Korb ML, Hartman YE, Kovar J, Zinn KR, Bland KI, Rosenthal EL. Use of monoclonal antibody-IRDye800CW bioconjugates in the resection of breast cancer. *J Surg Res* 2014;188:119-28.
9. Zhang Y, Hong H, Severin GW, Engle JW, Yang Y, Goel S, et al. ImmunoPET and near-infrared fluorescence imaging of CD105 expression using a monoclonal antibody dual-labeled with (89)Zr and IRDye 800CW. *Am J Transl Res* 2012;4:333-46.
10. Zhang Y, Hong H, Orbay H, Valdovinos HF, Nayak TR, Theuer CP, et al. PET imaging of CD105/endoglin expression with a ^{61/64}Cu-labeled Fab antibody fragment. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2013;40:759-67.
11. Lütje S, Rijpkema M, Franssen GM, Fracasso G, Helfrich W, Eek A, et al. Dual-Modality Image-Guided Surgery of Prostate Cancer with a Radiolabeled Fluorescent Anti-PSMA Monoclonal Antibody. *J Nucl Med* 2014;55:995-1001.
12. van Gog FB, Visser GW, Klok R, van der Schors R, Snow GB, van Dongen GA. Monoclonal antibodies labeled with rhenium-186 using the MAG3 chelate: relationship between the number of chelated groups and biodistribution characteristics. *J Nucl Med* 1996;37:352-62.
13. Vrouenraets MB, Visser GW, Stewart FA, Stigter M, Oppelaar H, Postmus PE, et al. Development of meta-tetrahydroxyphenylchlorin-monooclonal antibody conjugates for photoimmunotherapy. *Cancer Res* 1999;59:1505-13.