

Tumorgerichte *nanobullets* voor kankertherapie

R. van der Meel

Departement Farmaceutische Wetenschappen, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences (UIPS), Faculteit Bètawetenschappen, Universiteit Utrecht; Laboratorium Klinische Chemie en Haematologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht.

Correspondentie: R.vanderMeel@umcutrecht.nl.

Kernpunten

- Oncolytische nanomedicijnen leveren meer geneesmiddel af in de tumor dan dezelfde dosis gegeven als vrij geneesmiddel; tegelijkertijd verlagen ze de blootstelling van gezonde weefsels aan het geneesmiddel.
- *Nanobullets* zijn tumorgerichte nanomedicijnen, bestaande uit liposomen die zijn geladen met een kinaseremmer en uitgerust met *nanobodies* als doelzoekende liganden met intrinsieke oncolytische werking.
- *Nanobullets* blokkeren meerdere cellulaire signaalroutes voor overleving en proliferatie, met als gevolg remming van tumorgroei.

Moleculaire behandeling van kanker

Kanker is een verzamelnaam voor aandoeningen die zich onderscheiden door ongereguleerde of abnormale celgroei. Kanker is sinds 2008 doodsoorzaak nummer één in Nederland, verantwoordelijk voor meer dan 30% van alle sterfgevallen in 2012 [1, 2]. Het ontstaan van een kwaadaardige tumor wordt getypeerd door een serie processen die generiek zijn voor alle tumoren en die het gevolg zijn van genetische instabiliteit van tumorcellen en de inflammatoire status van de tumor [3]. Deze processen bestaan uit voortdurende transductie van groeifactorignalen, herprogrammering van het energiemetabolisme, omzeilen van groeionderdrukking en van het immuunsysteem, ontsnapping aan apoptose, ongelimiteerde replicatie, activering van angiogenese, invasief gedrag en metastasering [3].

Hoewel door onderzoek steeds duidelijker wordt welke factoren een rol spelen bij de transformatie van een gezonde cel naar een kankercel, blijft het lastig te voorspellen wanneer dit gebeurt. De behandeling van kanker is erop gericht kankercellen effectief te doden en tegelijkertijd zo min mogelijk schade aan te richten in gezonde weefsels van het lichaam. De effectiviteit van hedendaagse kankertherapie hangt grotendeels af van het stadium van de ziekte ten tijde van de diagnose en bestaat uit (combinaties van) chirurgische verwijdering van de tumor, radiotherapie en chemotherapie.

Chemotherapie remt DNA-replicatie of mitose en heeft vooral effect op sneldelende cellen zoals tumorcellen. Maar

ABSTRACT

Tumour-targeted nanobullets for cancer treatment

Current cancer treatment is hampered by dose-limiting toxicities. Colloidal carrier systems can be used for encapsulating anti-cancer drugs to form nanomedicines. Nanomedicines are able to deliver more drug to tumours than the same dose administered as a free drug, while simultaneously reducing exposure of healthy tissues to the drug. We have pursued a nanomedicine approach to block multiple survival and proliferation signal transduction pathways in tumour cells at the same time. The nanomedicine termed *nanobullet* consisted of liposomes that are loaded with an IGF-1R kinase inhibitor and are equipped with anti-EGFR nanobodies as targeting ligands. In this manner, the *nanobullets* can interact with EGFR-positive tumour cells and block two cellular signalling routes that are essential for tumour proliferation to induce additive or synergistic therapeutic effects. The *nanobullets* interacted specifically with EGFR-positive cells and blocked both EGFR and IGF-1R signalling. In responsive cell lines, this resulted in inhibition of survival and proliferation signalling in tumour cells, and subsequently in anti-tumour effects *in vitro* and *in vivo*.

van der Meel R. Tumorgerichte nanobullets voor kankertherapie. PW Wetenschappelijk Platform. 2014;8:a1421.

doordat het geneesmiddel zich over het gehele lichaam kan verdelen, worden ook andere sneldelende cellen aangevallen, zoals haarfollikels, cellen in het darmstelsel en in het beenmerg. Dit zorgt voor ernstige bijwerkingen die de toepasbaarheid van chemotherapie beperken.

In de afgelopen decennia is de kennis over de processen die een rol spelen bij de ontwikkeling van een tumor enorm toegenomen, wat geleid heeft tot de ontdekking van specifieke moleculaire aangrijpingspunten. Moleculair gerichte geneesmiddelen zoals kinaseremmers en monoklonale antilichamen (mabs) zijn relatief nieuwe klassen van medicijnen, die tumorcellen selectiever aanvallen dan conventionele therapieën [4, 5]. Door hun selectiviteit hebben moleculair gerichte oncolytica een betere therapeutische index, wat heeft geleid tot routinematig gebruik van kinaseremmers en mabs in de afgelopen vijftien jaar.

Signaaltransductie en angiogenese

De voornaamste doelen van de huidige moleculaire oncolytica zijn de directe remming van signaaltransductieroutes die in tumorcellen van belang zijn voor overleving en proliferatie, en de remming van tumorangiogenese. Tumorangiogenese is het ontstaan van nieuwe bloedvaten uit

bestaande vaten, die de tumor voorzien van de benodigde zuurstof en voedingsstoffen om groter te worden dan 1-2 mm³. Remming van tumorangiogenese is een aantrekkelijke oncolytische strategie omdat hij toepasbaar is op meerdere typen solide tumoren [6, 7].

De ErbB- of HER-familie van receptortyrosinekinases is een van de best bestudeerde cellulaire signaalnetwerken die bijdragen aan ontwikkeling en groei van bepaalde tumoren. De afgelopen jaren zijn verschillende remmers ontwikkeld die aangrijpen in dit signaalnetwerk, zoals de mabs cetuximab, panitumumab (beide gericht tegen de *epidermal growth factor receptor*, EGFR) en trastuzumab (tegen de *human epidermal growth factor receptor 2*, HER2), en de kinaseremmers erlotinib, gefitinib (beide tegen EGFR) en lapatinib (tegen EGFR/HER2), terwijl nog meer remmers momenteel ontwikkeld worden [8].

Een belangrijk signaalnetwerk dat een rol speelt in tumorangiogenese is de VEGF-familie van receptortyrosinekinases (VEGF: *vascular endothelial growth factor*). Voorbeelden van angiogeneseremmers die aangrijpen op VEGF-gemedieerde signaalroutes, zijn het mab bevacizumab (tegen VEGF) en de kinaseremmers sorafenib en sunitinib (meerder aangrijpingspunten, waaronder VEGF-receptoren) [9].

Ondanks de verhoogde specificiteit en de gunstige therapeutische index kunnen moleculair gerichte geneesmiddelen verbeterd worden door het verschuiven van hun weefselverdelingsprofiel. Door de concentratie geneesmiddel in het doelweefsel te verhogen en tegelijkertijd de blootstelling van gezonde weefsels aan het geneesmiddel te verlagen, kan de toepasbaarheid van moleculair gerichte geneesmiddelen worden vergroot.

Doelgerichte aflevering

Doelgerichte aflevering van geneesmiddelen is een strategie die gebruikmaakt van colloïdale dragersystemen om de farmacokinetische parameters en de weefselverdeling van (therapeutische) moleculen te verbeteren. Moleculen kunnen worden opgelost, ingekapseld of gedispergeerd in dragersystemen, of covalent worden gebonden via afbrekbare of niet-afbrekbare moleculaire bruggen [10]. Dit resulteert in zeer kleine deeltjes met afmetingen van 50-400 nm. Dragere systemen geladen met geneesmiddelen die zijn ontwikkeld om het therapeutisch effect te verhogen en de bijwerkingen te verminderen, worden nanomedicijnen genoemd. Er zijn veel verschillende afleversystemen benut voor het ontwikkelen van nanomedicijnen, zoals liposomen, conjugaten van geneesmiddelen en wateroplosbare polymeren of mabs, micellen en nanodeeltjes op basis van polymeren, dendrimeren en albumine-nanodeeltjes [11].

Nanomedicijnen bieden veel potentiële voordelen voor het afleveren van oncolytica [12-15]:

- verbetering van het farmacokinetisch profiel en de weefsellokalisatie in het lichaam;
- verhoging van de therapeutische index door selectievere aflevering van geneesmiddelen in het zieke doelweefsel

(tumor) en/of verlaging van de blootstelling van gezonde weefsels aan het geneesmiddel;

- vermindering van interacties met plasma-eiwitten om de circulatietijd te verbeteren, door de samenstelling en het oppervlak van nanomedicijnen aan te passen;
- vergroting van de specificiteit voor doelweefsel en/of doelcel door nanomedicijnen uit te rusten met doelzoekende liganden (*targeting ligands*) die eiwitten op het oppervlak van tumorcellen herkennen;
- mogelijkheid om meerdere geneesmiddelen tegelijkertijd af te leveren voor optimale combinatietherapie;
- ontwikkeling van afleversystemen geladen met een geneesmiddel en een contraststof voor het volgen van het nanomedicijn met beeldvormende technieken (*theranostics*).

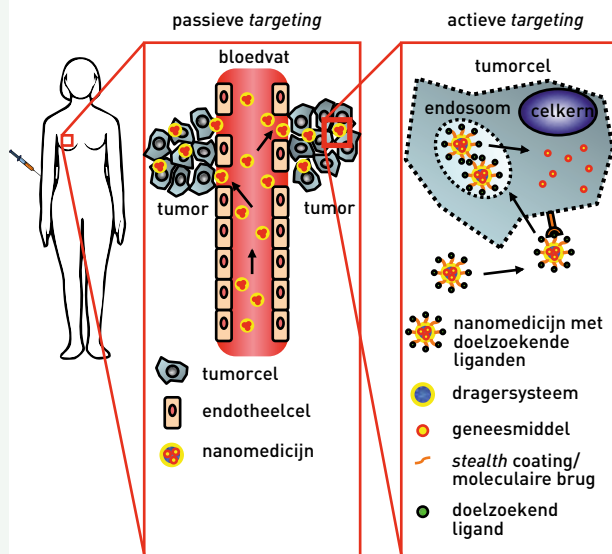
Drie strategieën

Er zijn drie verschillende strategieën voor het gericht afleveren van geneesmiddelen aan tumoren.

De eerste strategie maakt gebruik van nanomedicijnen zonder doelzoekende liganden (passieve *targeting*). Deze nanomedicijnen danken hun verhoogde tumoraccumulatie aan hun fysisch-chemische kenmerken en aan (patho)fysiologische processen in de circulatie en in de tumor (figuur 1). Inkapseling van oncolytica in dragersystemen kan hun oplosbaarheid en stabiliteit vergroten, terwijl het coaten van het oppervlak van een dragersysteem met hydrofiele polymeren (zoals polyethyleenglycol) zorgt voor *stealth*-eigenschappen door verminderde interacties met eiwitten in de circulatie. Deze *stealth*-eigenschappen remmen opsonisatie en daarmee klaring van het nanomedicijn, waardoor een langere circulatietijd kan worden bereikt [17]. Nanomedicijnen worden meestal intraveneus toegediend en kunnen in de bloedbaan circuleren doordat de vaatwand van gezonde weefsels deeltjes van deze grootte niet doorlaat. Tegelijkertijd worden de bloedvaten van solide tumoren juist gekenmerkt door een verhoogde doorlatendheid, waardoor nanomedicijnen uit de circulatie kunnen extravaseren, zich kunnen ophopen in de tumor en het oncolyticum aan de tumorcellen kunnen afgeven. Het lymfatisch systeem in tumoren is daarnaast meestal slecht ontwikkeld, waardoor de in een tumor opgehoopte nanomedicijnen niet effectief afgevoerd kunnen worden. Dit fenomeen wordt *enhanced permeability and retention* (EPR) genoemd en is een van de belangrijkste factoren in het gericht afleveren van geneesmiddelen in tumoren [18, 19].

In de tweede strategie worden nanomedicijnen uitgerust met doelzoekende liganden (actieve *targeting* of *ligand targeting*). De doelzoekende liganden op het oppervlak van het nanomedicijn herkennen eiwitten op het oppervlak van tumorcellen en kunnen celspecificiteit, hechting en opname van het nanomedicijn verbeteren (figuur 1). Nanomedicijnen met en zonder doelzoekende liganden zijn vaak vergelijkbaar wat betreft farmacokinetisch profiel en weefselverdeling, waardoor de ophoping in de tumor voor beide typen nanomedicijnen ongeveer gelijk is. De voordelen van

Figuur 1 Doelgerichte geneesmiddelaflivering aan tumoren



Passieve *targeting* berust op de lange circulatietijd van nanomedicijnen in combinatie met de doorlatendheid van het bloedvatstelsel in de tumor en een ineffectief lymfatisch systeem, waardoor nanomedicijnen zich kunnen ophopen in de tumor en het geneesmiddel kunnen afgeven aan tumorcellen. Actieve *targeting* wordt gerealiseerd door nanomedicijnen uit te rusten met doelzoekende liganden. Deze doelzoekende liganden hechten zich aan eiwitten op het oppervlak van de tumorcel en kunnen worden opgenomen via receptorgemedieerde endocytose. Op deze manier kunnen specificiteit en effectiviteit van een nanomedicijn verder worden verbeterd.

Figuur aangepast met toestemming en afkomstig uit [16].

doelzoekende liganden, zoals verhoogde celopname en verbeterde tumorretentie, worden vooral duidelijk als het nanomedicijn de tumor bereikt heeft [20, 21]. Actieve targeting kan ook toegepast worden voor het afleveren van moleculen die zelf niet in staat zijn celmembranen te passeren (zoals nucleïnezuren), voor het verhogen van de concentratie van geneesmiddelen bij verminderd gevoelige (resistente) tumoren, voor het afleveren van geneesmiddelen aan het bloedvatstelsel van de tumor en voor het ontwikkelen van nanomedicijnen die de bloed-hersenbarrière kunnen passeren [22].

Een derde strategie maakt gebruik van stimuli-afhankelijke nanomedicijnen die hun actieve lading afgeven na een interne of externe prikkel, zoals pH, warmte of licht [23].

Het eerste oncolytische nanomedicijn (Doxil/Caelyx) werd twintig jaar geleden goedgekeurd voor therapie en

wordt sindsdien gebruikt in de kliniek. Het verpakken van doxorubicine in een lang circulerend dragersysteem zorgde voor gelijke en soms verbeterde therapeutische activiteit in vergelijking met dezelfde dosis toegediend als vrij geneesmiddel. Bovendien werd de cardiale toxiciteit, een ongewenste bijwerking van doxorubicine, flink verminderd door het toe te dienen als nanomedicijn [24]. Sindsdien zijn verschillende oncolytische nanomedicijnen goedgekeurd voor klinisch gebruik. Met uitzondering van mab-geneesmiddel-conjugaten [25] is geen van de goedgekeurde oncolytische nanomedicijnen uitgerust met doelzoekende liganden. Momenteel worden enkele nanomedicijnen van dit type in klinische studies geëvalueerd [22] en er wordt geschat dat er ongeveer 250 nanomedicijnen in verschillende stadia van ontwikkeling zijn, waarvan verreweg de meeste voor de behandeling van kanker [26, 27].

Overeenkomst EGFR en IGF-1R

De belangrijke rol van EGFR-siginaaltransductie bij de proliferatie van verschillende typen tumoren heeft geleid tot de ontwikkeling en goedkeuring van verschillende EGFR-gerichte mabs en kinaseremmers, zoals hierboven is beschreven [8]. Het blokkeren van EGFR-siginaaltransductie bij kanker kan zeer effectief zijn terwijl in veel gevallen moleculaire remmers minder bijwerkingen geven dan conventionele oncolytische therapieën. Zo blijkt uit recente meta-analyses dat patiënten die lijden aan niet-kleincellig longcarcinoom met EGFR-mutaties, meer baat hebben bij een behandeling met de kinaseremmers erlotinib en gefitinib dan bij chemotherapie [28, 29]. Desondanks blijkt dat na verloop van tijd de tumor ongevoelig wordt voor behandeling en verder groeit. Dit kan komen door secundaire (EGFR-)mutaties waardoor de moleculaire remmer ineffectief wordt, of door activering van alternatieve signaalroutes die niet afhankelijk zijn van EGFR-activering [30].

Een regelmatig in de literatuur gerapporteerde 'omleidingsroute' is siginaaltransductie door de *insulin-like growth factor 1 receptor* (IGF-1R). IGF-1R-siginaaltransductie is voor de proliferatie van bepaalde typen tumoren net zo belangrijk als EGFR-siginaaltransductie, wat heeft geleid tot de ontwikkeling van IGF-1R-remmers. Fase-III-studies met IGF-1R-mabs bij patiënten met kanker lieten echter weinig therapeutische effectiviteit zien, wat aangeeft dat het blokkeren van IGF-1R-siginaaltransductie niet genoeg is om een krachtig oncolytisch effect te bewerkstelligen [31, 32].

EGFR en IGF-1R zijn allebei receptortyrosinekinases en vertonen homologie in hun structuur en in de *downstream*-siginaaltransductie. Kruissignalering tussen beide signaalroutes kan ervoor zorgen dat het blokkeren van EGFR of IGF-1R afzonderlijk ineffectief is, waardoor de tumor toch verder kan groeien [33]. Verschillende studies hebben laten zien dat het tegelijkertijd blokkeren van EGFR en IGF-1R synergistische antitumoreffecten kan hebben, terwijl andere studies hebben getoond dat tumorresistentie tegen EGFR-gerichte therapie opgeheven kan worden door het blokkeren van

IGF-1R [34-37]. Deze studies wijzen op kruissignaleringsmechanismen tussen EGFR- en IGF-1R-sigtaaltransductie en impliceren dat een gecombineerde blokkade van beide signaalroutes een effectieve strategie is om de groei van bepaalde tumoren te remmen.

Tumorgerichte *nanobullets*

Om signaaltransductie via EGFR en IGF-1R effectief te kunnen remmen, hebben wij gebruikgemaakt van actieve *targeting*. Hiervoor hebben wij liposomen geladen met een IGF-1R-kinaseremmer en uitgerust met *nanobodies* gericht op EGFR die fungeren als doelzoekende liganden en tevens over intrinsieke antitumoractiviteit beschikken.

Nanobodies zijn kleine antigeenbindende fragmenten afkomstig van het variabele domein van *heavy chain only*-antilichamen die van nature voorkomen in het bloed van kameelachtigen [38]. *Nanobodies* bezitten gunstige eigenschappen vergeleken met mabs, zoals een kleiner molecuulgewicht (15 tegen 150 kDa), betere oplosbaarheid en stabiliteit, relatief eenvoudige recombinante productie en vergelijkbare specificiteit en affiniteit. Hierdoor zijn *nanobodies* zeer geschikt voor therapeutische doeleinden, bijvoorbeeld als doelzoekende liganden of voor moleculaire beeldvorming [39].

Het anti-EGFR-*nanobody* (EGa1) dat is gebruikt in onze studies, heeft intrinsieke antagonistische eigenschappen en zorgt tevens voor interacties van het nanomedicijn met EGFR-positieve tumorcellen [40, 41]. Tevens vermindert inkapseling van de IGF-1R-kinaseremmer (AG538) in liposomen de blootstelling van gezonde weefsels. Ook worden zo twee moleculaire remmers (kinaseremmer en *nanobody*) gelijktijdig afgeleverd, wat optimale condities oplevert voor additieve of synergistische therapeutische effecten.

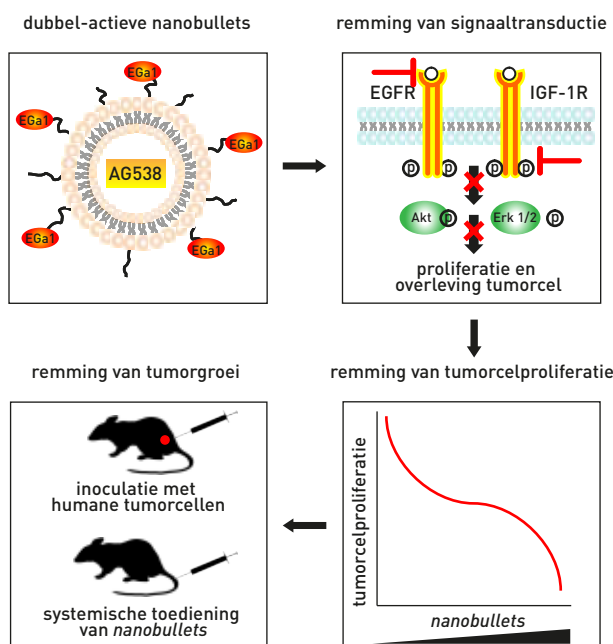
De doeltreffendheid van de *nanobody*-liposomen of *nanobullets* is onderzocht door te kijken naar interacties met tumorcellen, remming van relevante moleculaire signaalroutes, tumorcelproliferatie en antitumoreffecten in vivo (figuur 2).

Uit een voorgaande studie was gebleken dat het koppelen van EGa1-*nanobodies* aan liposomen zorgde voor herkenning van EGFR-positieve tumorcellen. Verder bleek dat EGa1-liposomen de proliferatie van EGFR-positieve tumorcellen remden door de intrinsieke antagonistische eigenschappen van EGa1 in combinatie met downregulatie van EGFR. De (lege) EGa1-liposomen waren echter niet in staat tumorgroei bij muizen te remmen, wat aangeeft dat het blokkeren van één enkele signaalroute niet genoeg is voor een sterk antitumoreffect [43].

Opname *nanobullets* in tumorcellen

Om het therapeutische effect te verbeteren zijn de EGa1-liposomen geladen met de IGF-1R-kinaseremmer AG538. Naast de *nanobullets* (EGa1-AG538-L) zijn verschillende controleformuleringen bereid, zoals lege controleliposomen (L), liposomen geladen met AG538 (AG538-L),

Figuur 2 Werkingsmechanisme *nanobullets*



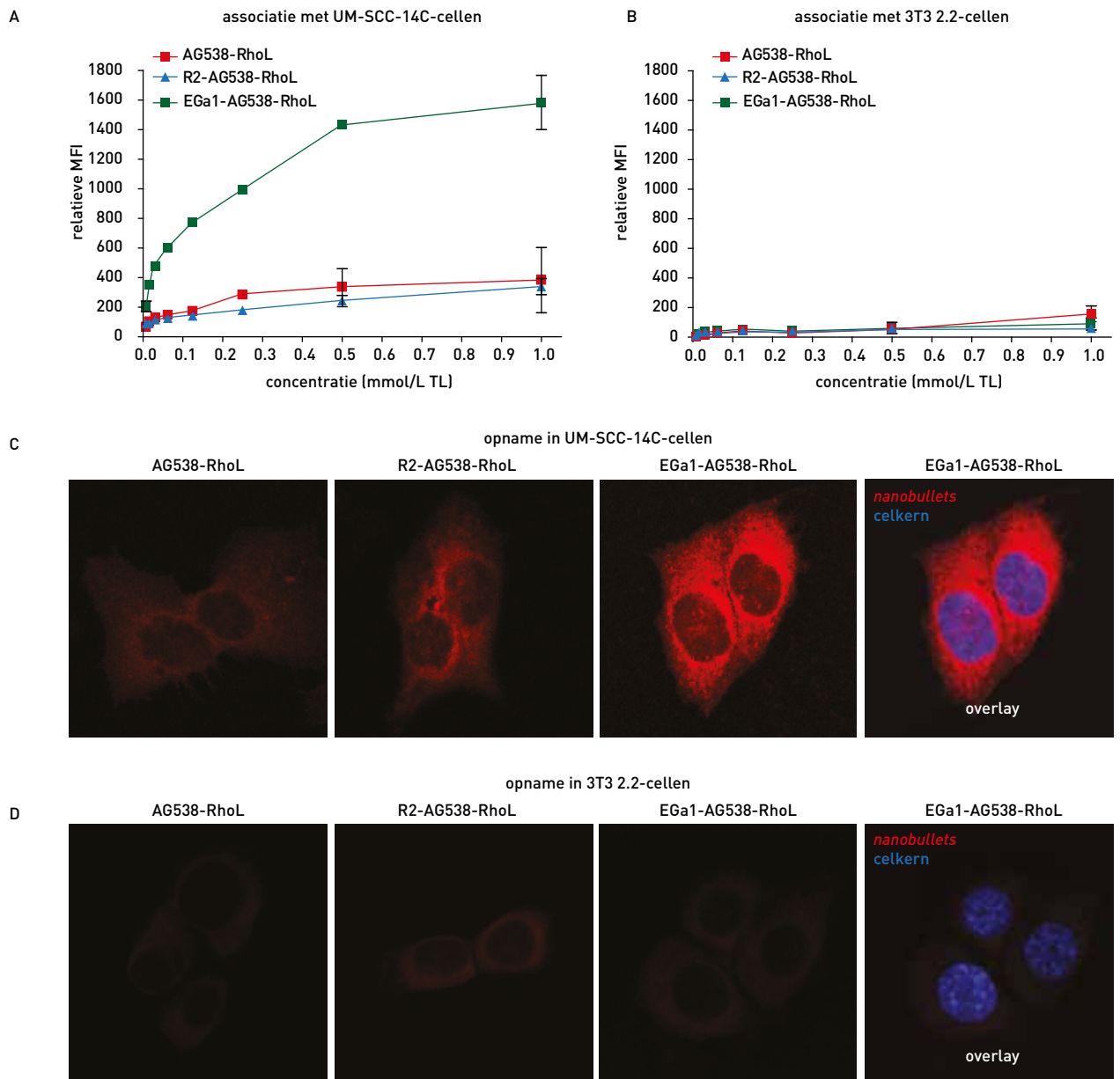
De dubbel-actieve *nanobullets* zijn lang circulerende nanomedicijnen. Ze bestaan uit liposomen die zijn geladen met IGF-1R-kinaseremmer (AG538) en uitgerust met *nanobodies* (EGa1) als doelzoekende liganden die EGFR-positieve tumorcellen herkennen. Naast het vergroten van de specificiteit hebben de gekoppelde *nanobodies* ook een EGFR-remmende functie. Gelijktijdige remming van EGFR en IGF-1R zorgt voor een effectieve blokkade van signaalroutes voor proliferatie en overleving in bepaalde tumorcellen. Dit resulteert in remming van tumorcelproliferatie in vitro en van tumorgroei bij muizen.

Figuur aangepast met toestemming en afkomstig uit [42].

Akt: proteïne kinase B; EGFR: epidermal growth factor receptor; Erk: extracellular signal-regulated kinase; IGF-1R: insulin-like growth factor 1 receptor; p: gefosforyleerd.

lege *nanobody*-liposomen (EGa1-L) en AG538-geladen liposomen uitgerust met een controle-*nanobody* (R2-AG538-L). De samenstelling van de liposomen, de hoeveelheid geladen AG538 en de hoeveelheid gekoppelde EGa1 zijn eerst geoptimaliseerd. De fysisch-chemische eigenschappen van de *nanobullets* zoals deeltjesgrootte, oppervlaktelading en inkapselingsefficiëntie zijn vervolgens geanalyseerd. Hieruit bleek dat de *nanobullets*, afhankelijk van de samenstelling, tussen 100 en 140 nm groot waren, zeer efficiënt geladen konden worden en een vrijwel neutrale oppervlaktelading hadden, wat geschikt is om te kunnen profiteren van het EPR-effect.

Figuur 3 Associatie en opname van *nanobullets*



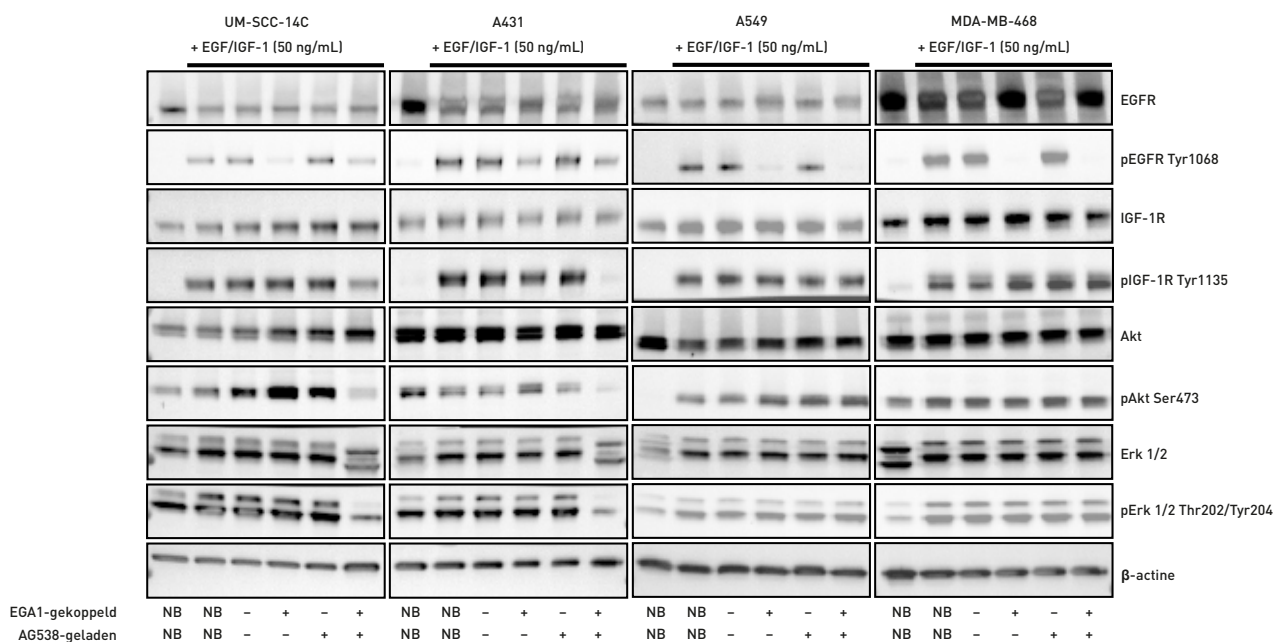
A en B: EGFR-positieve tumorcellen (A) en EGFR-negatieve cellen (B) werden 1 uur op 4°C blootgesteld aan fluorescente *nanobullets* (EGa1-AG538-RhoL, ■), aan liposomen zonder *nanobodies* (AG538-RhoL, ■) en aan liposomen met controle-*nanobodies* (R2-AG538-RhoL, ▲). Associatie van liposomen met cellen is bepaald met *flow*-cytometrie door het meten van de fluorescentie-intensiteit (MFI) van de cellen na incubatie. Gegevens zijn weergegeven als gemiddelde ± SEM van één representatief experiment dat is uitgevoerd in tweevoud.

C en D: opnamen met confocale microscopie van EGFR-positieve tumorcellen (C) en EGFR-negatieve cellen (D) na vier uur blootstelling op 37°C aan *nanobullets* en aan controleformuleringen. De rode kleur geeft de fluorescente liposomen weer en de blauwe kleur geeft de celkernen weer.

Figuur aangepast met toestemming en afkomstig uit [44].

EGFR: *epidermal growth factor receptor*; MFI: *mean fluorescence intensity*; SEM: *standard error of the mean*; TL: totaal lipide; UM-SCC-14C: EGFR-positieve tumorcellijn; 3T3 2.2: EGFR-negatieve cellijn.

Figuur 4 Remming van signaalroutes door *nanobullets*



Tumorcellen van de typen UM-SCC-14C, A431, A549 en MDA-MB-468 werden blootgesteld aan lege controleliposomen, aan *nanobody*-liposomen (EGa1-gekoppeld), aan liposomen geladen met AG538 (AG538-geladen) of aan *nanobullets*. Na vier uur blootstelling volgde activering met EGF en IGF-1. Cellysaten werden verzameld en onderworpen aan SDS-PAGE. Hoeveelheden totaal EGFR, gefosforyleerd EGFR (pEGFR Tyr1068), totaal IGF-1R, gefosforyleerd IGF-1R (pIGF-1R Tyr1135), totaal Akt, gefosforyleerd Akt (pAkt Ser473), totaal Erk 1/2, gefosforyleerd Erk 1/2 (pErk 1/2 Thr202/Tyr204) en β -actine als controle zijn gedetecteerd met *western blotting*.

Figuur aangepast met toestemming en afkomstig uit [42].

Akt: proteïnekinase B; EGF: *epidermal growth factor*; EGFR: *epidermal growth factor receptor*; Erk: *extracellular signal-regulated kinase*; IGF-1: *insulin-like growth factor 1*; IGF-1R: *insulin-like growth factor 1 receptor*; NB: niet behandeld. SDS-PAGE: natriumdodecylsulfaat-polyacrylamide-gelelektroforese.

Een combinatie van *flow*-cytometrie en confocale microscopie is gebruikt om de interactie van de *nanobullets* met EGFR-positieve tumorcellen te onderzoeken (figuur 3). De *nanobullets* associeerden met EGFR-positieve tumorcellen op een dosisafhankelijke manier, wat niet het geval was bij formuleringen zonder *nanobodies* (AG538-L) of bij controle-*nanobodies* (R2-AG538-L). De *nanobullets* lieten ongeveer vier keer zo veel celassociatie zien als de controleformuleringen (figuur 3A). Noch de *nanobullets* noch de controleformuleringen associeerden met EGFR-negatieve cellen (figuur 3B). Deze resultaten werden bevestigd door confocale microscopie van dezelfde cellen na langere blootstelling aan de *nanobullets*. Controleformuleringen werden nauwelijks opgenomen in EGFR-positieve tumorcellen, terwijl de *nanobullets* aanzienlijk beter werden opgenomen (figuur 3C). Ook kon er een kenmerkend stippelpatroon worden waargenomen, wat duidt op opname van de *nanobullets* via receptorgemedieerde endocytose (figuur 3C). Geen van de formuleringen werd opgenomen door EGFR-negatieve cellen (figuur 3D). Deze resultaten impliceren dat de interacties

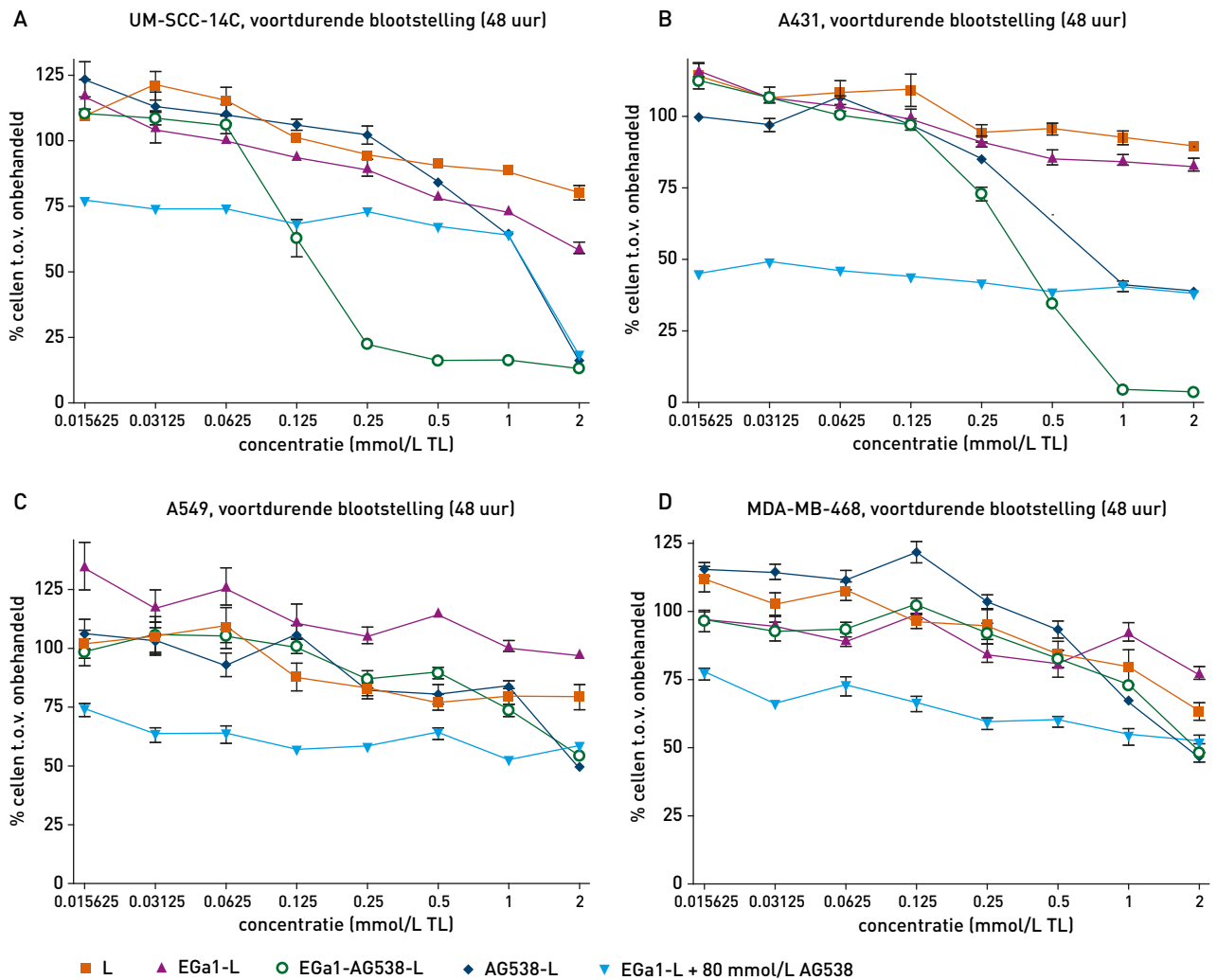
van de *nanobullets* met cellen worden veroorzaakt door het binden van EGa1 aan EGFR.

Naast een functie als doelzoekend ligand heeft EGa1 intrinsieke antagonistische eigenschappen die de activering van EGFR kunnen blokkeren. Binding van EGa1 aan EGFR voorkomt dat de receptor een actieve conformatie kan aannemen die nodig is voor het vormen van dimere die *epidermal growth factor* (EGF) kunnen binden [41]. Het binden van EGF aan EGFR zorgt voor fosforylering van de receptor, waarna *downstream* signaaltransductie plaatsvindt.

In verschillende tumorcellijnen waren zowel lege EGa1-liposomen als *nanobullets* in staat de fosforylering van EGFR te remmen (figuur 4, pEGFR Tyr1068), wat aantoont dat de antagonistische eigenschappen van EGa1 behouden blijven na koppeling aan de liposomen.

Terwijl de interactie van EGa1 met EGFR extracellulair plaatsvindt, speelt de remming van IGF-1R door de kinasremmer AG538 zich intracellulair af. Dit houdt in dat de *nanobullets* moeten worden opgenomen door de cel en vervolgens AG538 in het cytoplasma moeten afleveren. Alleen

Figuur 5 Remming van tumorcelgroei door *nanobullets*



Tumorcellen van de typen UM-SCC-14C (A), A431 (B), A549 (C) en MDA-MB-468 (D) werden 48 uur lang blootgesteld aan lege controleliposomen (L), aan *nanobody*-liposomen (EGa1-L), aan liposomen geladen met AG538 (AG538-L), aan *nanobody*-liposomen in combinatie met vrije kinaseremmer (EGa1-L + 80 mM AG538), en aan *nanobullets* (EGa1-AG538-L). Het totaal aantal cellen is bepaald met de sulforhodamine-B-assay. Uitkomsten zijn weergegeven als gemiddelde ± SEM van één representatief experiment dat is uitgevoerd in zesvoud.

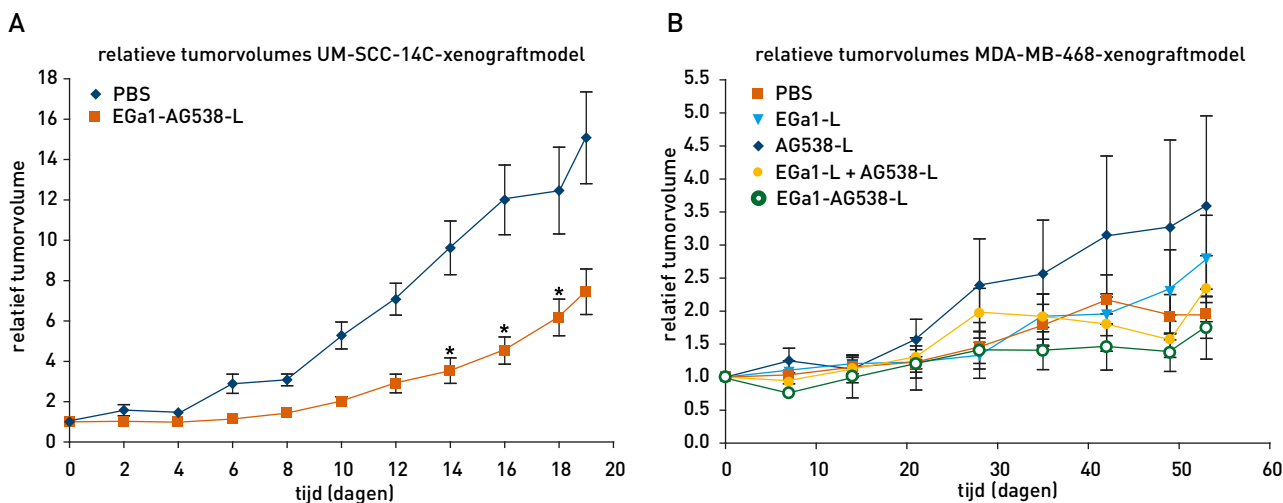
Figuur aangepast met toestemming en afkomstig uit [42].
 SEM: *standard error of the mean*; TL: totaal lipide.

de *nanobullets* en geen van de controleformuleringen waren in staat IGF-1R-fosforylering te remmen, wat aangeeft dat EGa1 zorgt voor een efficiënte opname in de cel, waarna AG538 afgeleverd kan worden in het cytoplasma (figuur 4, pIGF-1R Tyr1135). Dit werd echter alleen waargenomen in UM-SCC-14C-cellen (plaveiselcelcarcinoom in het hoofd-hals-gebied) en A431-cellen (carcinoom van de vulva-epidermis), maar niet in A549-cellen (longepitheelcarcinoom) en MDA-MB-468-cellen (borstadenocarcinoom).

Het is mogelijk dat er te weinig *nanobullets* worden opgenomen in A549-cellen, omdat dit celtype minder EGFR heeft dan UM-SCC-14C en A431. MDA-MB-468-cellen hebben op het oppervlak echter hoeveelheden EGFR in dezelfde orde als UM-SCC-14C-cellen en A431-cellen. Het kan zijn dat de *nanobullets* in deze cellen via een andere cellulaire route worden afgebroken en niet in staat zijn AG538 in het cytoplasma af te leveren.

In dezelfde cellen is ook gekeken naar de effecten van de

Figuur 6 Remming van tumorgroei in muizen door *nanobullets*



A: relatieve groei van UM-SCC-14C-xenografttumoren in muizen na behandeling met *nanobullets*.

Tumordragende muizen werden om de dag behandeld met intraveneuze injecties bestaande uit PBS (n = 11) of *nanobullets* (EGa1-AG538-L; n = 9) met een maximum van 10 injecties. Uitkomsten zijn weergegeven als gemiddelde \pm SEM. Gegevens zijn geanalyseerd door tweezijdige ANOVA met Bonferroni-post-test. *: P < 0,01 (EGa1-AG538-L versus PBS).

B: relatieve groei van MDA-MB-468-xenografttumoren in muizen na behandeling met *nanobullets*.

Tumordragende muizen werden om de dag behandeld met intraveneuze injecties bestaande uit PBS (n = 7), *nanobody*-liposomen (EGa1-L; n = 6), liposomen geladen met AG538 (AG538-L; n = 6), een combinatie van EGa1-L en AG538-L (n = 6) of *nanobullets* (EGa1-AG538-L; n = 7) met een maximum van 10 injecties. Uitkomsten zijn weergegeven als gemiddelde \pm SEM.

Figuur aangepast met toestemming en afkomstig uit [42].

ANOVA: analysis of variance; PBS: phosphate buffered saline; SEM: standard error of the mean.

nanobullets op belangrijke cellulaire schakels proteïne kinase B (Akt) en *extracellular signal-regulated kinase* (Erk) 1/2, *downstream* van EGFR en IGF-1R. De *nanobullets* remden de activering van Akt en Erk 1/2 in UM-SCC-14C-cellen en A431-cellen maar, net zoals het geval was bij IGF-1R, niet in A549-cellen en MDA-MB-468-cellen (figuur 4, pAkt Ser473 en pErk 1/2 Thr202/Tyr204). Deze resultaten laten zien dat het noodzakelijk is in UM-SCC-14C-cellen en A431-cellen zowel EGFR en IGF-1R te onderdrukken om *downstream* signaalroutes voor overleving en proliferatie te blokkeren. Het onderdrukken van alleen EGFR door EGa1-L was niet voldoende voor blokkerende effecten *downstream*. Dit geeft aan dat de tumor monotherapie met een EGFR-remmer kan omzeilen door gebruik te maken van andere signaalroutes, zoals IGF-1R.

De effecten van de *nanobullets* op de groei van tumorcellen is onderzocht in dezelfde cellijnen. De *nanobullets* waren in staat de groei van UM-SCC-14C-cellen (figuur 5A) en A431-cellen (figuur 5B) te onderdrukken op een dosisafhankelijke manier, in tegenstelling tot controleformuleringen. Tegelijkertijd zorgde blootstelling aan *nanobullets* alleen

voor een gedeeltelijke respons in A549-cellen (figuur 5C) en MDA-MB-468-cellen (figuur 5D). Deze resultaten corresponderen met het vermogen van de *nanobullets* om signaalroutes voor overleving en proliferatie effectief te remmen in de onderzochte cellijnen. Het laat opnieuw zien dat het niet afdoende is één enkele signaalroute te remmen voor een effectieve remming van tumorgroei.

Ten slotte werden zowel UM-SCC-14C-cellen als MDA-MB-468-cellen in muizen geïmplant om de antitumoreffecten van de *nanobullets* in vivo te kunnen onderzoeken. In het snelgroeiende UM-SCC-14C-model, representatief voor een sterke in-vitro-respons, zorgde behandeling met *nanobullets* voor een significante remming van de tumorgroei ten opzichte van behandeling met PBS (figuur 6A). In het langzaam groeiende MDA-MB-468-model, representatief voor een gedeeltelijke in-vitro-respons, resulteerde behandeling met *nanobullets* niet in een significante remming van de tumorgroei (figuur 6B). Hieruit blijkt dat het remmen van belangrijke signaalroutes voor overleving en proliferatie door *nanobullets* in de onderzochte cellijnen voorspellend was voor het antitumoreffect in vitro en in vivo.

Therapeutische perspectieven

Onze studies laten de haalbaarheid zien van het ontwikkelen van een actief gericht nanomedicijn dat meerdere essentiële signaaltransductieroutes in tumorcellen blokkeert, waardoor tumorgroei geremd wordt. Hoewel de *nanobullets* in staat waren tumorgroei te remmen in een responsief model, zouden deze effecten nog verbeterd kunnen worden door de dosis van de kinaseremmer in de *nanobullets* te verhogen. Ook zou gekozen kunnen worden voor een kinaseremmer die meerdere signaalroutes remt, zoals sunitinib.

Onze studies laten ook de relevantie zien van moleculaire kankerdiagnostiek. Het is niet mogelijk om slechts op basis van het expressieniveau van het doeleiwit op tumorcellen de efficiëntie te voorspellen van moleculair gerichte therapieën. UM-SCC-14C- en MDA-MB-468-cellen hebben vergelijkbare EGFR-expressieniveaus, maar reageerden verschillend op behandeling met *nanobullets*. Het bepalen van de mutatiestatus van de tumor voor aanvang van de behandeling zou dit aanzienlijk kunnen verbeteren [45].

Nanobullets zijn veelzijdige nanomedicijnen die eenvoudig kunnen worden aangepast aan de toepassing. Door gebruik te maken van intrinsiek actieve *nanobodies* die worden ingezet als doelzoekend ligand, in combinatie met de inkapseling van een geneesmiddel in een lang circulerend dragersysteem, zijn *nanobullets* uitstekend toepasbaar voor oncolytische therapie.

De veelzijdigheid wordt onderstreept door de ontwikkeling van *nanobodies* tegen belangrijke aangrijpingspunten op de tumoren, zoals HER2 [46], VEGFR-2 [47] en c-Met [48]. Ook worden andere dragersystemen ingezet voor de ontwikkeling van *nanobullets*, zoals albumine-nanodeeltjes [49], polymere micellen [50], polymere somen [51] en goud-nanodeeltjes [52].

De toepasbaarheid van actief gerichte nanomedicijnen, zoals *nanobullets*, zal uiteindelijk worden bepaald door de balans tussen therapeutische effecten en de kosteneffectiviteit van het productieproces [53]. Recente investeringen in bedrijven zoals Ablynx (ontwikkeling van *nanobodies*) [54] en BIND Therapeutics (ontwikkeling van actief gerichte nanomedicijnen) [55] illustreren de mogelijkheden om klinisch toepasbare *nanobullets* te ontwikkelen.

In de toekomst zouden combinaties van intrinsiek actieve doelzoekende liganden en oncolytica de basis kunnen vormen voor een persoonlijke oncolytische behandeling waaraan de specifieke moleculaire samenstelling van de tumor ten grondslag ligt.

Dit artikel is gebaseerd op het proefschrift van de auteur [16] en op de publicaties [42] en [44]. R. van der Meel is tijdens zijn promotieonderzoek begeleid door promotors prof. dr. ir. W.E. Hennink en prof. dr. G. Storm en co-promotors dr. R.J. Kok en dr. R.M. Schiffelers. Dit promotieonderzoek is ondersteund door het Focus en Massa programma *Nanobullets: The next generation in drug targeting* van de Universiteit Utrecht. Nanobody® is een geregistreerde merknaam van Ablynx N.V.

Literatuur

- 1 Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 10. Lyon: International Agency for Research on Cancer. <http://globocan.iarc.fr>. Geraadpleegd 2013 nov.
- 2 Doodsoorzaken. Den Haag/Heerlen: Centraal Bureau voor de Statistiek. <http://statline.cbs.nl/statweb>. Geraadpleegd 2013 nov.
- 3 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 mrt 4;144(5):646-74.
- 4 Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012 mrt 22;12(4):278-87.
- 5 Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2009 jan;9(1):28-39.
- 6 Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med*. 2011 nov 7;17(11):1359-70.
- 7 Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011 mei 19;473(7347):298-307.
- 8 Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer*. 2012 jul 12;12(8):553-63.
- 9 Sennino B, McDonald DM. Controlling escape from angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2012 okt;12(10):699-709.
- 10 Petros RA, DeSimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 aug;9(8):615-27.
- 11 Duncan R, Gaspar R. Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol Pharm*. 2011 dec 5;8(6):2101-41.
- 12 Jain RK, Stylianopoulos T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010 nov;7(11):653-64.
- 13 Davis ME, Chen ZG, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2008 sep;7(9):771-82.
- 14 Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol*. 2007 dec;2(12):751-60.
- 15 Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014 feb;66C:2-25.
- 16 van der Meel R. Targeted inhibition of tumor growth and angiogenesis [dissertatie]. Utrecht: Universiteit Utrecht; 2013.
- 17 Knop K, Hoogenboom R, Fischer D, Schubert US. Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010 aug 23;49(36):6288-308.
- 18 Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011 mrt 18;63(3):136-51.
- 19 Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res*. 1986 dec;46(12 Pt 1):6387-92.
- 20 Lammers T, Kiessling F, Hennink WE, Storm G. Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *J Control Release*. 2012 jul 20;161(2):175-87.
- 21 Bae YH, Park K. Targeted drug delivery to tumors: myths, reality and possibility. *J Control Release*. 2011 aug 10;153(3):198-205.
- 22 van der Meel R, Vehmeijer LJ, Kok RJ, Storm G, van Gaal EV. Ligand-targeted particulate nanomedicines undergoing clinical evaluation: current status. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013 okt 15;65(10):1284-98.
- 23 Ganta S, Devalapally H, Shahiwala A, Amiji M. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. *J Control Release*. 2008 mrt 20;126(3):187-204.
- 24 Barenholz Y. Doxil® – the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release*. 2012 jun 10;160(2):117-34.
- 25 Sievers EL, Senter PD. Antibody-drug conjugates in cancer therapy. *Annu Rev Med*. 2013;64:15-29.

- 26 Svenson S. Clinical translation of nanomedicines. *Curr Opin Solid State Mater Sci*. 2012 dec;16(6):287-94.
- 27 Etheridge ML, Campbell SA, Erdman AG, Haynes CL, Wolf SM, McCullough J. The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine*. 2013 jan;9(1):1-14.
- 28 Petrelli F, Borgonovo K, Cabiddu M, Barni S. Efficacy of EGFR tyrosine kinase inhibitors in patients with EGFR-mutated non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of 13 randomized trials. *Clin Lung Cancer*. 2012 mrt;13(2):107-14.
- 29 Gao G, Ren S, Li A, Xu J, Xu Q, Su C, et al. Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor therapy is effective as first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer with mutated EGFR: a meta-analysis from six phase III randomized controlled trials. *Int J Cancer*. 2012 sep 1;131(5):E822-9.
- 30 Wheeler DL, Dunn EF, Harari PM. Understanding resistance to EGFR inhibitors – impact on future treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010 sep;7(9):493-507.
- 31 Pollak M. The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nat Rev Cancer*. 2012 feb 16;12(3):159-69.
- 32 Yee D. Insulin-like growth factor receptor inhibitors: baby or the bathwater? *J Natl Cancer Inst*. 2012 jul 3;104(13):975-81.
- 33 van der Veeken J, Oliveira S, Schiffelers RM, Storm G, van Bergen En Henegouwen PM, Roovers RC. Crosstalk between epidermal growth factor receptor- and insulin-like growth factor-1 receptor signaling: implications for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2009 sep;9(6):748-60.
- 34 Cortot AB, Repellin CE, Shimamura T, et al. Resistance to irreversible EGF receptor tyrosine kinase inhibitors through a multistep mechanism involving the IGF1R pathway. *Cancer Res*. 2013 jan 15;73(2):834-43.
- 35 Morgillo F, Kim WY, Kim ES, Ciardiello F, Hong WK, Lee HY. Implication of the insulin-like growth factor-1R pathway in the resistance of non-small cell lung cancer cells to treatment with gefitinib. *Clin Cancer Res*. 2007 mei 1;13(9):2795-803.
- 36 Shaw PH, Maughan TS, Clarke AR. Dual inhibition of epidermal growth factor and insulin-like 1 growth factor receptors reduce intestinal adenoma burden in the Apc(min/+) mouse. *Br J Cancer*. 2011 aug 23;105(5):649-57.
- 37 Buck E, Eyzaguirre A, Rosenfeld-Franklin M, et al. Feedback mechanisms promote cooperativity for small molecule inhibitors of epidermal and insulin-like growth factor receptors. *Cancer Res*. 2008 okt 15;68(20):8322-32.
- 38 Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. 1993 jun 3;363(6428):446-8.
- 39 Oliveira S, Heukers R, Sornkom J, Kok RJ, van Bergen En Henegouwen PM. Targeting tumors with nanobodies for cancer imaging and therapy. *J Control Release*. 2013 dec 28;172(3):607-17.
- 40 Hofman EG, Ruonala MO, Bader AN, et al. EGF induces coalescence of different lipid rafts. *J Cell Sci*. 2008 aug 1;121(Pt 15):2519-28.
- 41 Schmitz KR, Bagchi A, Roovers RC, van Bergen en Henegouwen PM, Ferguson KM. Structural evaluation of EGFR inhibition mechanisms for nanobodies/VHH domains. *Structure*. 2013 jul 2;21(7):1214-24.
- 42 van der Meel R, Oliveira S, Altintas I, et al. Inhibition of tumor growth by targeted anti-EGFR/IGF-1R nanobullets depends on efficient blocking of cell survival pathways. *Mol Pharm*. 2013 okt 7;10(10):3717-27.
- 43 Oliveira S, Schiffelers RM, van der Veeken J, et al. Downregulation of EGFR by a novel multivalent nanobody-liposome platform. *J Control Release*. 2010 jul 14;145(2):165-75.
- 44 van der Meel R, Oliveira S, Altintas I, et al. Tumor-targeted Nanobullets: anti-EGFR nanobody-liposomes loaded with anti-IGF-1R kinase inhibitor for cancer treatment. *J Control Release*. 2012 apr 30;159(2):281-9.
- 45 van't Veer LJ, Bernards R. Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns. *Nature*. 2008 apr 3;452(7187):564-70.
- 46 Kijanka M, Warnders FJ, El Khattabi M, et al. Rapid optical imaging of human breast tumour xenografts using anti-HER2 VHHs site-directly conjugated to IRDye 800CW for image-guided surgery. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2013 okt;40(11):1718-29.
- 47 Behdani M, Zeinali S, Khanahmad H, et al. Generation and characterization of a functional Nanobody against the vascular endothelial growth factor receptor-2; angiogenesis cell receptor. *Mol Immunol*. 2012 feb;50(1-2):35-41.
- 48 Heukers R, Altintas I, Raghoeath S, et al. Targeting hepatocyte growth factor receptor (Met) positive tumor cells using internalizing nanobody-decorated albumin nanoparticles. *Biomaterials*. 2014 jan;35(1):601-10.
- 49 Altintas I, Heukers R, van der Meel R, et al. Nanobody-albumin nanoparticles (NANAPs) for the delivery of a multikinase inhibitor 17864 to EGFR overexpressing tumor cells. *J Control Release*. 2013 jan 28;165(2):110-8.
- 50 Talelli M, Oliveira S, Rijcken CJ, et al. Intrinsically active nanobody-modified polymeric micelles for tumor-targeted combination therapy. *Biomaterials*. 2013 jan;34(4):1255-60.
- 51 Debets MF, Leenders WP, Verrijp K, et al. Nanobody-functionalized polymersomes for tumor-vessel targeting. *Macromol Biosci*. 2013 jul;13(7):938-45.
- 52 Van de Broek B, Devoogdt N, D'Hollander A, et al. Specific cell targeting with nanobody conjugated branched gold nanoparticles for photothermal therapy. *ACS Nano*. 2011 jun 28;5(6):4319-28.
- 53 Cheng Z, Al Zaki A, Hui JZ, Muzykantov VR, Tsourkas A. Multifunctional nanoparticles: cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities. *Science*. 2012 nov 16;338(6109):903-10.
- 54 Williams SC. Small nanobody drugs win big backing from pharma. *Nat Med*. 2013 nov;19(11):1355-6.
- 55 Press releases. Cambridge MA: BIND Therapeutics. <http://ir.bindtherapeutics.com/releases.cfm>. Geraadpleegd 2013 nov.