

Nanobody-fotosensibilisatorconjugaten voor gerichte fotodynamische therapie

Raimond Heukers^{ab*}, Paul M.P. van Bergen en Henegouwen^a en Sabrina Oliveira^a

^a Moleculaire oncologie, Universiteit Utrecht.

^b Moleculaire farmacologie, Vrije Universiteit Amsterdam.

* Correspondentie: r.heukers@vu.nl.

Kernpunten

- Ongerichte of met conventionele antilichamen gerichte fotosensibilisatoren zijn hydrofiel en worden gekenmerkt door een dagenlange circulatie van fotosensibilisator (PS) in bloed en weefsels, en een lange lichtgevoeligheid.
- De relatief hydrofiel en traceerbare fotosensibilisator IRDye700DX geconjugeerd aan een anti-EGFR-nanobody (nanobody-PS) is specifiek, potent (IC₅₀ < 1 nmol/L) en effectief (100% celdood).
- De specifieke fototoxiciteit van gerichte fotodynamische therapie wordt verhoogd door intracellulaire afgifte van PS door een biparatopisch nanobody-PS-conjugaat.

Inleiding

Bij fotodynamische therapie (PDT) wordt voor het induceren van celdood gebruikgemaakt van drie essentiële componenten: een fotosensibilisator (*photosensitizer*, PS), licht van een bepaalde golflengte en zuurstof. De eerste meldingen van PDT-geïnduceerde celdood verschenen aan het begin van de twintigste eeuw [1-3]. Sindsdien zijn er veel rapporten gepubliceerd over het gebruik van PDT voor de behandeling van onder meer blaas-, huid-, hoofd-hals- en eierstokkanker [4-7]. Over het algemeen wordt de PS intraveneus toegediend, waarna de tumor na enige tijd wordt bestraald met licht van een bepaalde golflengte om de PS te activeren. Deze activering leidt tot type-II-foto-oxidatieve reacties, waarbij PS met zuurstof reageert onder de vorming van het zeer toxische singlet-zuurstof (¹O₂) dat schadelijk is voor zowel lipiden, eiwitten als nucleïnezuren [8]. Er kunnen ook type-I-reacties plaatsvinden waarbij de PS reageert met andere substraten dan zuurstof. Ook bij deze reacties worden uiteindelijk reactieve zuurstofatomen gevormd. Aangezien de gevormde zuurstofradicalen zeer kort leven en bovendien slecht diffunderen [9], blijft hun toxische effect beperkt tot de plaats waar de PS zich op het moment van de belichting bevindt. De behandelde cellen sterven door necrose en/of apoptose. Verdere vernietiging van de tumor is het gevolg van microvasculaire schade en

ABSTRACT

Nanobody-photosensitizer conjugates for targeted photodynamic therapy

OBJECTIVE

To improve photodynamic therapy (PDT). This therapy induces cell death through light-activation of a photosensitizer (PS). Targeted delivery of PS via monoclonal antibodies has improved tumour selectivity, but these conjugates have long half-lives, leading to relatively long photosensitivity in patients.

DESIGN AND METHODS

In an attempt to target PS specifically to tumours and to accelerate PS clearance, we have developed new conjugates consisting of nanobodies (NB) targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR) and a traceable PS (IRDye700DX).

RESULTS

These fluorescent conjugates allow the distinction of cell lines with different expression levels of EGFR and specifically induce cell death of EGFR-overexpressing cells at low nanomolar concentrations, while PS alone or the NB-PS conjugates in absence of light induce no toxicity. Delivery of PS using internalizing biparatopic NB-PS conjugates results in even more pronounced phototoxicities.

CONCLUSION

Altogether, EGFR targeted NB-PS conjugates are specific and potent, enabling the combination of molecular imaging with cancer therapy.

Heukers R, van Bergen en Henegouwen PM, Oliveira S. Nanobody-fotosensibilisatorconjugaten voor gerichte fotodynamische therapie. PW Wetenschappelijk Platform. 2015;9:a1527.

Dit artikel is een vertaling van: Heukers R, van Bergen en Henegouwen PM, Oliveira S. Nanobody-photosensitizer conjugates for targeted photodynamic therapy. *Nanomedicine*. 2014 Oct;10(7):1441-51.

immuun- en ontstekingsreacties [4]. De huidige klinisch beschikbare PS-verbindingen zijn voor het merendeel derivaten van porfyriene (bijvoorbeeld Photofrin), chloor (bijvoorbeeld Foscan) en ftalocyanine (bijvoorbeeld Photosense) [6].

Door de relatief grote hydrofobie en het gebrek aan

specificiteit van de huidige PS-verbindingen treedt *off-target*-toxiciteit op en kent de behandeling praktische bezwaren: na toediening van de PS moet lang (twee tot vier dagen) worden gewacht tot de tumor kan worden belicht, en na de behandeling is er een vrij lange periode van fotosensitiviteit [6, 7]. Er zijn daarom pogingen gedaan om de PS hydrofieler en tumorgericht te maken door chemische modificaties, afleversystemen en doelzoekende moleculen [10-14]. Foto-immuuntherapie (*photoimmunotherapy*, PIT) maakt bijvoorbeeld gebruik van monoklonale antilichamen (mAb's) voor het specifiek richten van PS bij PDT [12]. Hoewel het gebruik van mAb-PS-conjugaten al veelbelovende resultaten heeft opgeleverd [15-18], hebben deze grote conjugaten lange halfwaardetijden. Een snellere accumulatie in de tumor en een snellere klaring van ongebonden conjugaten zou daarom een welkome verbetering bieden. Dit heeft geleid tot verschillende studies waarin kleinere antilichaamfragmenten worden gebruikt voor het specifiek richten van PS [19-23]. Met ditzelfde doel hebben wij conjugaten ontwikkeld die nanobodies met een PS combineren.

Nanobodies bestaan uit het variabele domein van het zogenoemde *heavy chain only*-antilichaam dat in 1993 voor het eerst werd ontdekt bij de dromedaris [24]. Nanobodies kunnen worden beschouwd als de kleinste natuurlijk voorkomende antilichaamdomeinen. Ze zijn een factor tien kleiner dan conventionele antilichamen (nanobodies: 15 kDa, 2,5 nm × 4 nm [25]; mAb's: 150 kDa, 14,2 nm × 8,5 nm × 3,8 nm [26]), maar kunnen ondanks dit kleine formaat zeer specifiek en stevig aan antigenen binden (laag-nanomolaire affiniteit). Een voorbeeld van zo'n antigeen is de epidermalegroefactorreceptor (EGFR), die in vele soorten menselijke tumoren tot overexpressie komt [27]. Eerder hebben we al de voordelen van nanobodies voor optische moleculaire beeldvorming van EGFR-positieve tumoren laten zien [28]. In vergelijking met een volledig anti-EGFR-antilichaam vertoonden de tegen EGFR gerichte nanobodies een snellere accumulatie en een homogener verdeling in de tumor. Ook vond snellere klaring van ongebonden moleculen plaats. Om nuttig gebruik te maken van deze eigenschappen bij PDT hebben we dezelfde monovalente anti-EGFR-nanobodies (7D12) met PS beladen. Bovendien hebben we, vergelijkbaar met wat mogelijk is gebleken voor internaliserende mAb's [29-31], geprobeerd de potentie van PDT nog verder te verhogen door intracellulaire afgifte van PS. Hiervoor hebben we een biparatopisch nanobody (7D12-9G8) gebruikt dat geïnternaliseerd wordt via clustering-geïnduceerde endocytose van EGFR [32].

Om de effectiviteit van PDT te verbeteren, hebben we in deze studie gebruikgemaakt van een PS dat zichtbaar is met optische beeldvorming. Dit maakt het mogelijk om op het geschiktste tijdstip en op een zeer nauwkeurig bepaalde plaats te belichten. Hoewel het idee van optische beeldvorming van PS in tumoren al dateert uit ongeveer 1920 [33], staat de uitvoering hiervan nog in de kinderschoenen. Dit

komt doordat de meeste PS-verbindingen slecht absorberen in het nabij-infrarode gebied van het lichtspectrum [34] en het juist deze golflengten zijn die goed in menselijke weefsels doordringen. De PS die in deze studie wordt gebruikt is het recentelijk beschreven nabij-infrarood fluorescerende IRDye700DX [35]. Dit siliciumftalocyaninederivaat is relatief hydrofiel, heeft de typische sterke absorptieband van ftalocyaninen in het rode gebied van het spectrum en bezit bovendien de flexibiliteit om aan eiwitten geconjugerd te worden [36]. Deze PS is voorheen al geconjugerd aan een anti-EGFR-mAb en bleek fototoxisch te zijn wanneer hij was gebonden op het celmembraan en na internalisatie. Bovendien zorgde dit conjugaat voor tumorspecifieke PDT, waarbij alleen krimp van tumoren werd waargenomen als er sprake was van EGFR-overexpressie.

In deze studie hebben we monovalente en biparatopische anti-EGFR-nanobodies geconjugerd aan de tracerbare PS IRDye700DX. We hebben deze conjugaten gekarakteriseerd en hun fototoxiciteit in vitro geëvalueerd. Dit type nanobody-PS-conjugaten, waarbij moleculaire beeldvorming wordt gecombineerd met therapie, kan een aanzienlijke impact hebben op de huidige aanpak van PDT.

Methoden

Aanvullende methoden zijn te vinden op de website van *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2013.12.007>.

De nanobodies 7D12, R2 en 7D12-9G8 zijn geproduceerd zoals beschreven in de aanvullende methoden.

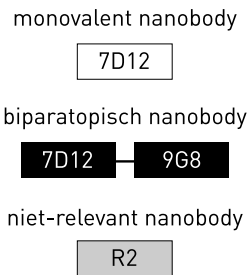
Het lichtgevoelige IRDye700DX (hier PS genaamd) werd als een *N*-hydroxysuccinimide-ester (NHS-ester) verkregen van LI-COR Biosciences (Lincoln, Verenigde Staten). De conjugatie van PS aan de nanobodies, de zuivering en de karakterisatie van de nanobody-PS-conjugaten is uitgevoerd zoals beschreven in de aanvullende methoden.

De muizenfibroblast-cel lijn NIH 3T3 2.2 (afgekort als 3T3 2.2) is elders beschreven [37]; de humane hoofd-halscarcinoom-cel lijn UM-SCC-14C is ter beschikking gesteld door prof. dr. T.E. Carey (Universiteit van Michigan, Verenigde Staten); de humane vulvacarcinoom-cel lijn A431 (CRL-1555) en de humane cervixcarcinoom-cel lijn HeLa (CCL-2) zijn verkregen van ATCC (LGC Standards, Wesel, Duitsland). Alle cellijnen zijn gekweekt zoals beschreven in de aanvullende methoden.

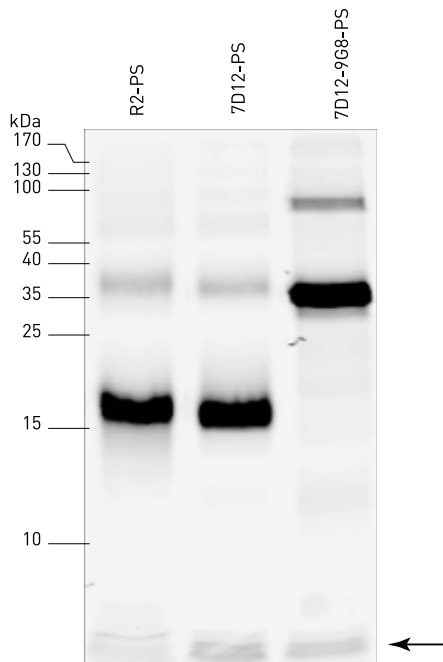
Bindingstudies zijn uitgevoerd op alle cellijnen, zoals beschreven in de aanvullende methoden. Voor evaluatie van de bindingsaffiniteit zijn 14C-cellen gedurende maximaal 30 minuten bij 37°C geïncubeerd met 25 nmol/L nanobody-PS. Daarna zijn de cellen twee keer gewassen met *binding medium* en zijn de fluorescentie-intensiteiten (FI) gedetecteerd met het 700 nm-kanaal van een infrarood-scanner van Odyssey.

Eén dag na het zaaien van 8000 cellen per well in een 96-wells plaat (Greiner Bio-One, Alphen a/d Rijn) werden de cellen gewassen met PDT-medium (DMEM zonder

Figuur 1 Schematische voorstelling van de tegen epidermalegroefactorreceptor gerichte nanobodies en het negatieve controle-nanobody



Figuur 2 Fluorescente nanobody-PS-conjugaten gescheiden door SDS-PAGE



Conjugaten worden aangegeven als R2-PS, 7D12-PS en 7D12-9G8-PS.

De vrije PS wordt in de gel aan het front waargenomen (pijl).

PS: fotosensibilisator; SDS-PAGE: natriumdodecylsulfaat-polyacrylamide-gelelektroforese.

fenolrood, met 8% foetaalkalfserum (v/v), 100 U/mL penicilline, 100 µg/mL streptomycine en 2 mmol/L L-glutamine). Vervolgens is gedurende 30 minuten bij 37°C een verdunningsreeks van de nanobody-PS-conjugaten (of een 1+1-mengsel van 7D12-9G8 en 7D12-9G8-PS) aan de cellen toegevoegd. Na de incubatie (puls genoemd) zijn de cellen tweemaal gewassen met PDT-medium.

Onmiddellijk daarna is de FI van de celgebonden en/of

geïnternaliseerde conjugaten gedetecteerd met de Odyssey-scanner en zijn de cellen, tenzij anders vermeld, direct belicht. Met behulp van 96 led-lampen (670 ± 10 nm, 1 led per well [38, 39]) werden de platen belicht met een lichtintensiteit van circa 4 mW/cm^2 (gemeten met een Orion Laser vermogen/energie-monitor, Ophir Optonics, Jeruzalem, Israël), uiteindelijk resulterend in lichtdoses van 10 of 5 J/cm^2 . Tenzij anders vermeld, zijn de platen na de belichting teruggeplaatst in de incubator. In alle experimenten is een aantal wells tijdens belichting bedekt, als interne negatieve controles. De experimenten zijn minstens tweemaal herhaald.

Na een overnachtincubatie van cellen die zijn behandeld zoals hierboven beschreven, zijn de cellen geïncubeerd met Alamar Blue volgens het protocol van de leverancier (AbD Serotech, Oxford, Verenigd Koninkrijk) en zoals beschreven in de aanvullende methoden. De resultaten zijn uitgezet als levensvatbaarheid in percentage (%) van de onbehandelde cellen en de half-maximaal inhiberende concentratie (IC50) is bepaald met behulp van de GraphPad Prism 5.02 software. Als alternatief zijn levende en dode cellen van elkaar onderscheiden met behulp van calceïne AM (Invitrogen) en kleuring met propidiumjodide (Invitrogen), zoals beschreven in de aanvullende methoden.

Cellen zijn gedurende de aangegeven perioden van maximaal 30 minuten bij 37°C in PDT-medium gepulseerd met 25 nmol/L nanobody-PS-conjugaten, waarna de cellen zijn gewassen en vers PDT-medium aan de cellen is toegevoegd. De FI van nanobody-PS-conjugaten is gedurende 210 minuten (tot het tijdstip van 240 minuten) bij 37°C gevolgd. Op elk tijdstip zijn de cellen tweemaal gewassen en is de totale FI bepaald met de infraroodscanner van Odyssey. Om de geïnternaliseerde fractie te bestuderen, is de oppervlaktegebonden nanobody-PS verwijderd in twee zure wasstappen bij een pH van 2,5 gedurende 10 minuten op ijs, waarna de resterende FI (van geïnternaliseerde nanobody-PS) is gemeten.

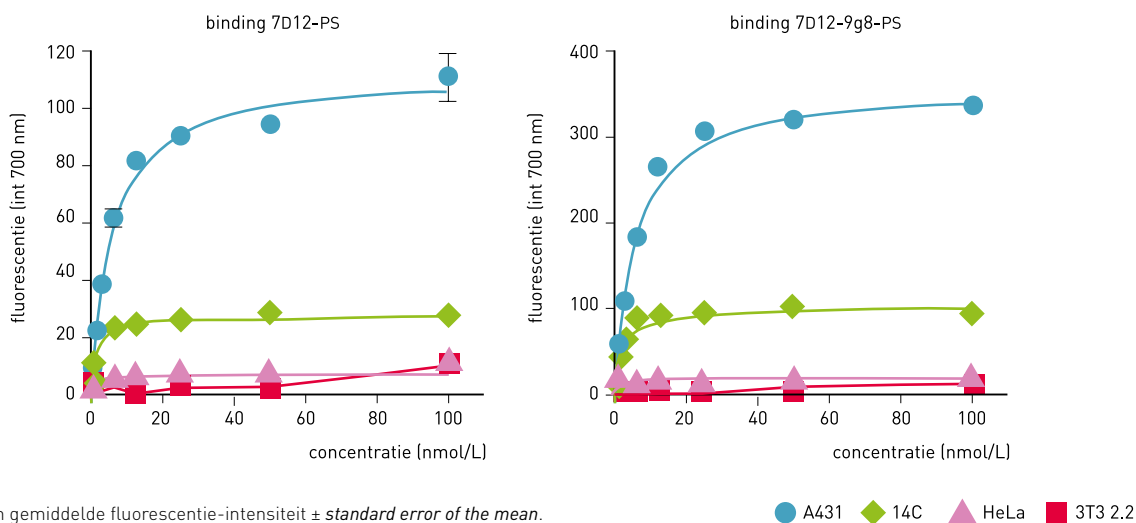
Een mengsel van 50% HeLa-cellen en 50% C14-cellen is in multititerplaat met 96-wells platen (Greiner) gezaaid, behandeld met 25 nmol/L nanobody-PS en daarna belicht met een dosis van 10 of 5 J/cm^2 . Onmiddellijk na de belichting of na de overnachtincubatie (circa 16 h) zijn de dode en levende cellen aangekleurd met propidiumjodide en calceïne AM (zoals beschreven in de aanvullende methoden).

De gegevens zijn statistisch geanalyseerd met GraphPad Prism 5.02 voor Windows (GraphPad Software, San Diego, Verenigde Staten). De significantie van de verschillen tussen gemeten waarden is bepaald met een ongepaarde t-test, waarbij $P < 0,05$ als significant is beschouwd.

Resultaten

Aanvullende resultaten (waaronder figuren met S-nummers) zijn te vinden op de website van *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2013.12.007>.

Figuur 3 Nanobody-PS-conjugaten binden aan de drie cellijnen afhankelijk van hun EGFR-expressieniveau (A431 > 14C > HeLa) en niet aan 3T3 2.2-cellen (geen EGFR)



Gegevens zijn gemiddelde fluorescentie-intensiteit \pm *standard error of the mean*.

EGFR: epidermalegroefactorreceptor; PS: fotosensibilisator.

● A431 ◆ 14C ▲ HeLa ■ 3T3 2.2

Productie en karakterisering van de nanobody-PS-conjugaten

Het nanobody 7D12 is gericht tegen de EGFR en wordt bij PDT gebruikt om de PS gericht af te leveren bij EGFR-producerende cellen. Het niet-relevante nanobody R2 wordt hierbij als negatieve controle gebruikt (figuur 1). Daarnaast wordt het internaliserende biparatopische nanobody 7D12-9G8 gebruikt om te onderzoeken of intracellulaire afgifte van PS de toxiciteit van deze conjugaten kan vergroten. Net als in onze vorige studie [28] zijn de nanobodies aan de PS (IRDye700DX) geconjugueerd via een NHS-gemedieerde conjugatie aan willekeurige lysinen. Na zuivering werd de koppeling van de fluorescerende PS aan de nanobodies geverifieerd met SDS-PAGE. Er waren slechts sporen van vrije PS waarneembaar aan het front van de gel (figuur 2). De mate van conjugatie (DOC) was gemiddeld 1,0, 0,5 en 1,5 moleculen PS per nanobody voor respectievelijk R2, 7D12 en 7D12-9G8. De productie van deze nanobody-PS-conjugaten was reproduceerbaar.

Nanobody-PS-conjugaten binden specifiek aan EGFR

Om te bevestigen dat de koppeling van de PS aan de nanobodies geen invloed heeft gehad op hun bindende eigenschappen, zijn er bindingstests uitgevoerd onder niet-internaliserende omstandigheden (4°C) met cellijnen met verschillende expressieniveaus van EGFR. Daarbij werd een duidelijke correlatie gevonden tussen de FI van de conjugaten en het EGFR-expressieniveau: A431 > 14C > HeLa > 3T3 2.2, waarbij 3T3 2.2 negatief is voor EGFR-expressie (figuur 3). Hieruit blijkt dat het met deze fluorescerende conjugaten mogelijk is cellijnen met verschillende EGFR-

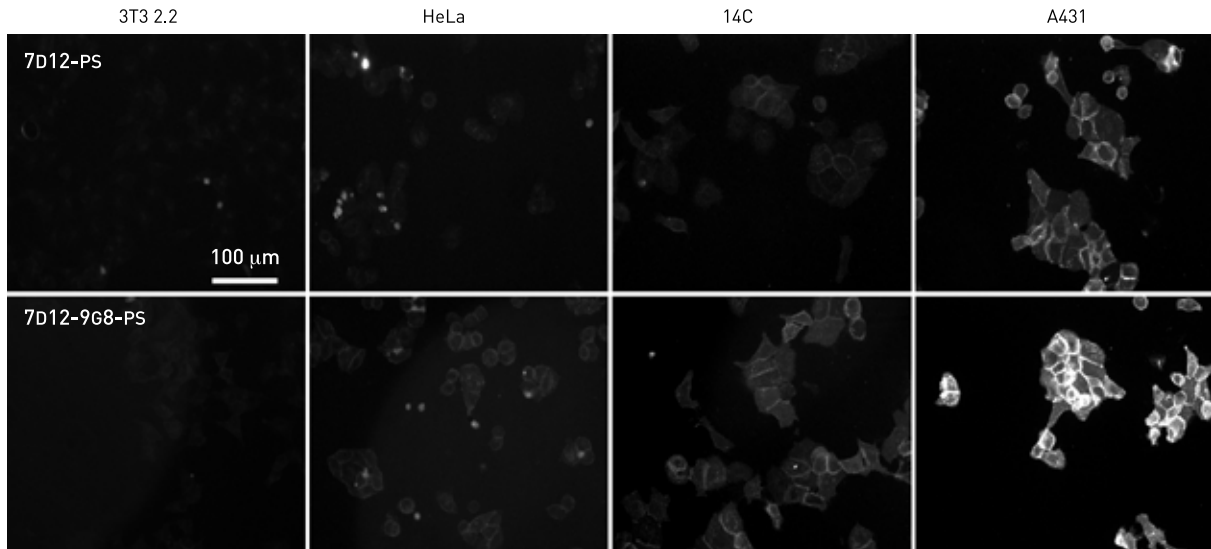
expressieniveaus te onderscheiden. Ook de verschillen in B_{max} tussen 7D12-PS en PS-7D12-9G8 correleerden goed met de verschillen in DOC.

Binding van de nanobody-PS-conjugaten werd tevens bestudeerd met fluorescentiemicroscopie, waarbij een vergelijkbare correlatie tussen het EGFR-expressieniveau en de FI op het celmembraan werd waargenomen (figuur 4). De schijnbare bindingsaffiniteit van de nanobodies was $1,4 \pm 0,7$ nmol/L voor 7D12-PS en $2,0 \pm 0,2$ nmol/L voor 7D12-9G8-PS. Dit is vergelijkbaar met eerder gepubliceerde affiniteitswaarden [28, 40].

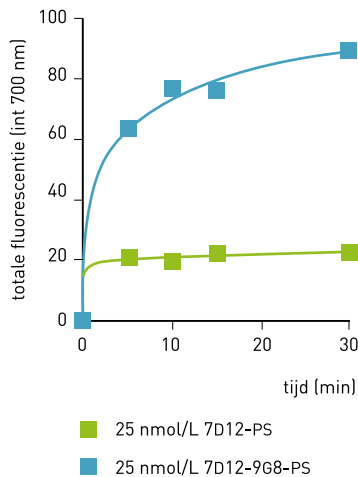
Nanobody-PS-conjugaten zijn een krachtig middel voor PDT

Om het potentieel van deze conjugaten voor PDT te bepalen, hebben we eerst onderzoek gedaan naar de kinetiek waarmee de fluorescerende conjugaten van PS met anti-EGFR-nanobody binden aan cellen met EGFR-overexpressie. Hieruit bleek dat de nanobody-PS-conjugaten zeer snel aan EGFR binden (figuur 5) en al snel verzadigde binding laten zien, vergelijkbaar met de verkregen waarden van de bindingstests bij 4°C (figuur 3, 14C-cellen).

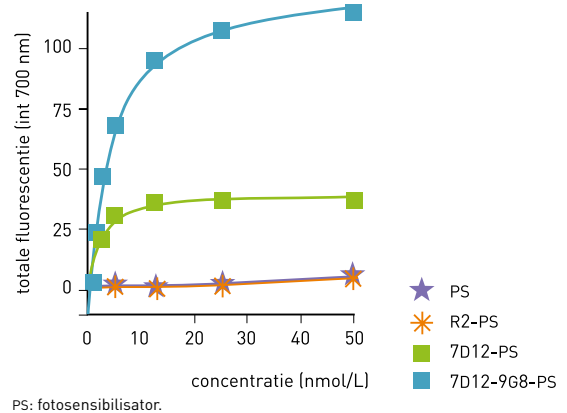
In de volgende experimenten werden cellen gedurende 30 minuten bij 37°C geïncubeerd met een concentratiereeks van de drie nanobody-PS-conjugaten of alleen PS (aangeduid als puls). Ook hier correleerde de gedetecteerde maximale FI voor celgebonden 7D12-PS en 7D12-9G8-PS goed met hun DOC (figuur 6). Een belangrijk gegeven is dat er geen binding van vrije PS of het controleconjugaat R2-PS aan 14C-cellen kon worden waargenomen. Dit geeft aan dat er bij afwezigheid van de anti-EGFR-nanobodies geen binding van de PS aan de cellen plaatsvindt.

Figuur 4 Fluorescentiemicroscopieafbeeldingen verkregen met een EVOS-microscop

PS: fotosensibilisator.

Figuur 5 Binding van anti-EGFR-nanobody-PS-conjugaten aan cellen in de tijd

EGFR: epidermalegroefactorreceptor; PS: fotosensibilisator.

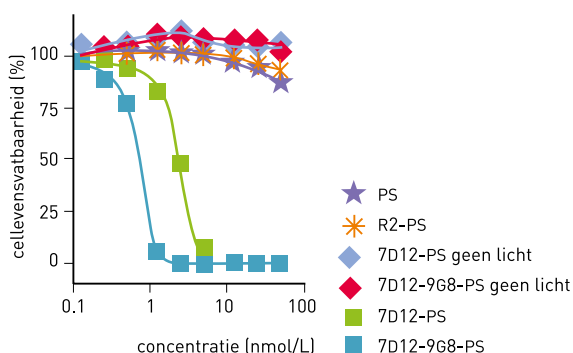
Figuur 6 Totale fluorescentie-intensiteit die aan 14C-cellen is gebonden na een puls van 30 minuten met een toenemende concentratie van de drie nanobody-PS-conjugaten en alleen PS

PS: fotosensibilisator.

Na de puls werden de cellen blootgesteld aan een lichtdosis van 10 J/cm² om fototoxiciteit te induceren, en de dag daarna werd de levensvatbaarheid van de cellen beoordeeld. De anti-EGFR-nanobody-PS-conjugaten bleken zeer potente middelen voor PDT te zijn, met IC₅₀-waarden van 2,3 ± 0,7 nmol/L voor 7D12-PS en 0,6 ± 0,1 nmol/L voor 7D12-9G8-PS (figuur 7), waarbij de potentie van het laatste conjugaat significant hoger is ($P < 0,001$). Belangrijk is ook dat vrije PS, R2-PS en onbelichte anti-EGFR-nanobody-PS-conjugaten geen invloed op de levensvatbaarheid van cellen hadden (IC₅₀-waarden konden niet worden bepaald), wat de specificiteit van deze aanpak onderstreept.

Licht-geïnduceerde toxiciteit werd ook gedetecteerd door fluorescentiemicroscopie, waarbij dode cellen, door een positieve kernkleuring met propidiumjodide, konden worden onderscheiden van levende cellen die kleuring vertoonden met calceïne AM. Alle met 7D12-9G8-PS behandelde cellen bleken al onmiddellijk na de belichting dood te zijn, terwijl dit voor de met 7D12-PS behandelde cellen pas op een later tijdstip gebeurde. Voor beide nanobody-PS-conjugaten werd zonder belichting na de puls geen celdood waargenomen (figuur 8).

Figuur 7 Percentage cellevensvatbaarheid na belichting met 10 J/cm², vergeleken met onbehandelde cellen



Gegevens zijn gemiddelde cellevensvatbaarheid ± *standard error of the mean*.

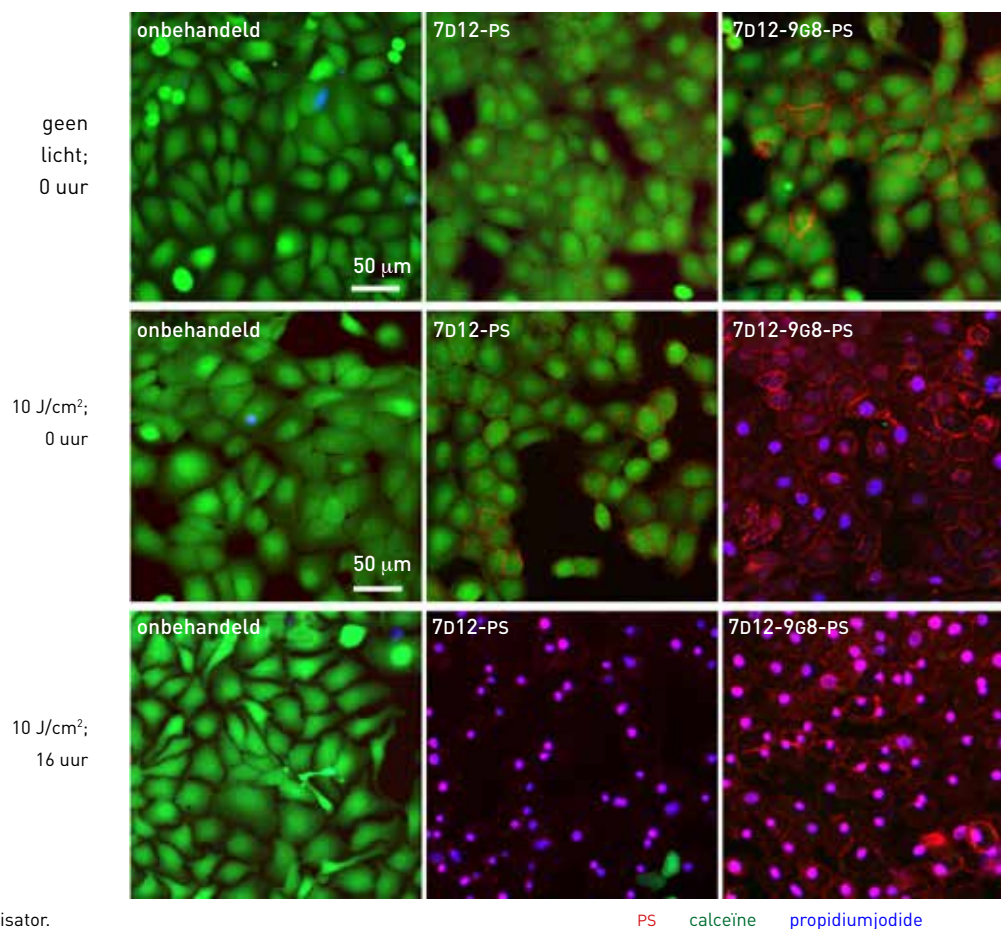
PS: fotosensibilisator.

Met biparatopische nanobody-PS-conjugaten is PDT effectiever

7D12-9G8 induceert internalisatie van de EGFR via receptorgemedieerde endocytose en wordt daardoor efficiënter door cellen opgenomen dan 7D12 (figuur S1) [32]. Dit betekent dat 7D12-9G8 PS effectiever intracellulair kan afgeven, wat zou kunnen resulteren in effectievere PDT (analoog aan de bevindingen van studies met internaliserende mAb's [29-31]). De werkzaamheid van PDT, gemeten als IC₅₀, correleerde goed met de hoeveelheid celgebonden PS op het moment van belichting (figuren 6 en 7), waarbij het biparatopische nanobody-PS-conjugaat de laagste IC₅₀-waarde (ofwel de hoogste toxiciteit) te zien gaf. De DOC (gemiddelde aantal PS-moleculen per nanobody) van 7D12-9G8-PS was echter hoger dan die van 7D12-PS.

Om de bijdrage van PS-internalisatie aan de toxiciteit van het biparatopische nanobody zorgvuldiger te bestuderen, hebben we daarom 7D12-PS vergeleken met een mengsel van 7D12-9G8 en 7D12-9G8-PS (7D12-9G8-mix). Bij deze aanpak vonden we voor beide nanobody-conjugaten een vergelijkbare hoeveelheid celgebonden fluo-

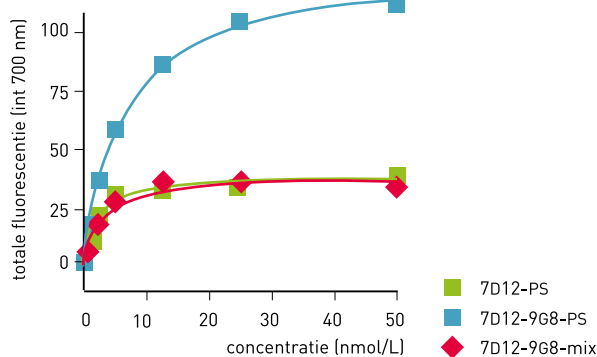
Figuur 8 Fluorescentiemicroscopie van nanobody-PS (rood), dode cellen gekleurd met propidiumjodide (blauw) en intacte cellen gekleurd met calceïne AM (groen)



PS: fotosensibilisator.

PS calceïne propidiumjodide

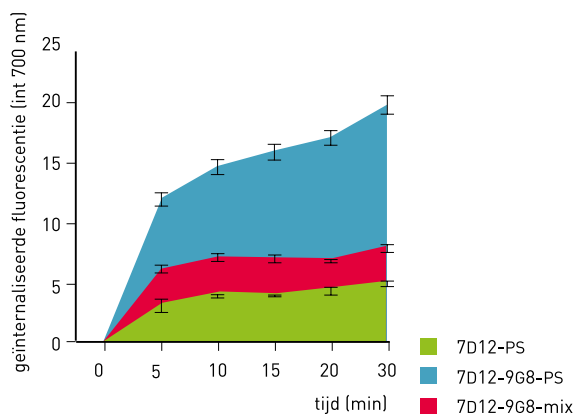
Figuur 9 Vergelijking tussen totaal nanobody-PS-conjugaat dat aan cellen is gebonden met 7D12-PS, 7D12-9G8-PS of een mengsel van 7D12-9G8-PS en ongeconjugeerd 7D12-9G8



Gegevens zijn gemiddelde fluorescentie-intensiteit \pm *standard error of the mean*.

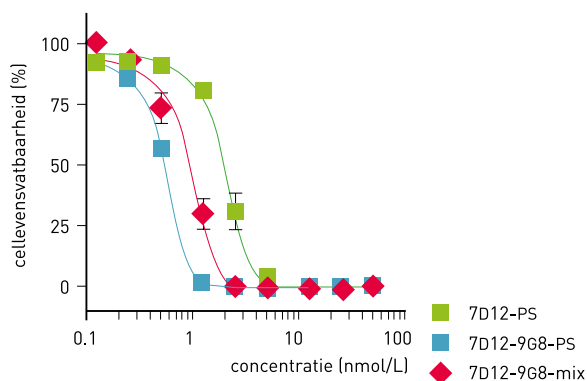
PS: fotosensibilisator.

Figuur 10 Geïnternaliseerde nanobody-PS-conjugaten gemeten op verschillende tijdstippen na een zure wasstap



PS: fotosensibilisator.

Figuur 11 Percentage cellevensvatbaarheid na belichting met 10 J/cm², vergeleken met onbehandelde cellen



Gegevens zijn gemiddelde cellevensvatbaarheid \pm *standard error of the mean*.

PS: fotosensibilisator.

rescerende PS (figuur 9). Vervolgens voerden we een zure wasstap uit om de FI van intracellulair gelokaliseerde PS te bepalen. Hieruit bleek dat de intracellulaire FI-waarden voor 7D12-9G8-mix hoger waren dan voor 7D12-PS (figuur 10), wat bevestigt dat 7D12-9G8-PS efficiënter wordt geïnternaliseerd dan 7D12-PS. Interessant genoeg bleek, ondanks de vergelijkbare hoeveelheid celgebonden PS, dat de biparatopische mix aanzienlijk toxischer was dan 7D12-PS (IC₅₀ respectievelijk 1,2 \pm 0,3 nmol/L en 2,3 \pm 0,7 nmol/L, P < 0,05). Voor ongemengd 7D12-9G8-PS, waarbij de hoeveelheid celgebonden en geïnternaliseerde

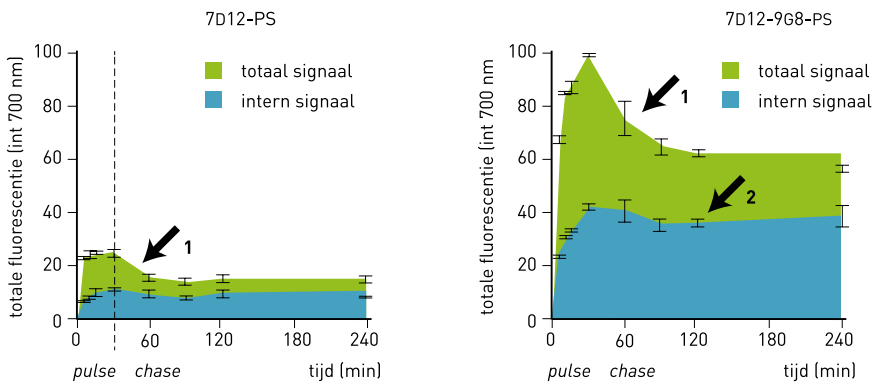
PS groter is dan bij 7D12-9G8-mix, was de toxiciteit nog hoger (IC₅₀ 0,6 \pm 0,06 nmol/L, P < 0,01) (figuur 11).

Belichting direct na incubatie leidt tot sterkere fototoxiciteit

De internalisatie van de nanobody-PS-conjugaten zou kunnen leiden tot een intracellulaire ophoping van de conjugaten. Aangezien dit van belang is voor de keuze van het optimale tijdstip van belichting, hebben we dit aspect nader onderzocht met een *pulse-chase*-experiment. Tijdens de *chase* nam voor beide conjugaten de hoeveelheid celgebonden PS af in de tijd (41 \pm 6% voor 7D12-PS en 43 \pm 2% voor 7D12-9G8-PS), terwijl de fractie geïnternaliseerd nanobody-PS-conjugaat constant bleef (figuur 12). Dit suggereert dat er geen recycling van de nanobodies optreedt en dat beide nanobody-PS-conjugaten in de cellen ophopen.

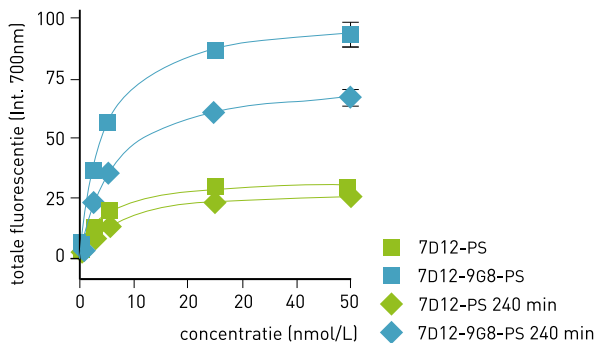
Om meer inzicht te krijgen in het lot van de nanobody-PS-conjugaten na internalisatie hebben we onderzocht of lysosomale afbraak optreedt. Na een puls van 30 minuten en een *chase* van 210 minuten werd vrije PS alleen waargenomen in de intracellulaire fractie en dit was significant meer voor 7D12-9G8-PS (20% \pm 3% van de geïnternaliseerde fractie) dan voor 7D12-PS (6% \pm 2%) (figuur S2A, P < 0,05). Het ontbreken van vrije PS geeft aan dat de conjugaten stabiel zijn in het kweekmedium. Verdere stabiliteitsstudies wezen uit dat nanobody-PS-conjugaat gedurende ten minste 4 uur stabiel is in onverdund humaan serum. Chloroquine verhinderde de afbraak van 7D12-9G8-PS, net zoals bij het controleconjugaat EGF-IRDye800CW (P < 0,01 en P < 0,001). Dit duidt erop dat het conjugaat wordt afgebroken in de lysosomen. Bovendien werd het intracellulaire transport naar de lysosomen bevestigd met

Figuur 12 Totale en interne fluorescentie van nanobody-PS-conjugaten gedurende een puls van 30 minuten en de daarop volgende 210 minuten *chase*. PS die vrijkomt van het celoppervlak (1) en opgehoopte PS (2) zijn aangegeven met pijlen.



PS: fotosensibilisator.

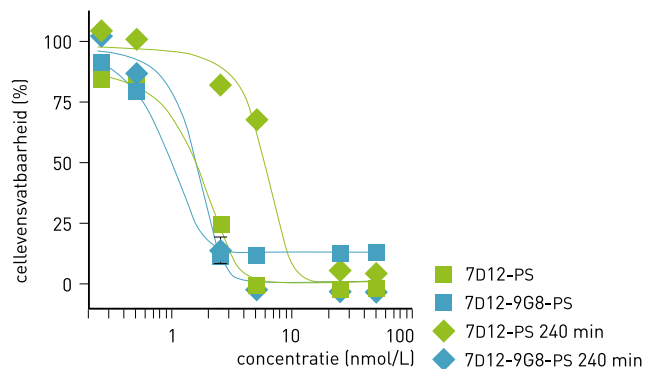
Figuur 13 Totale fluorescentie-intensiteit nadat 14C-cellen zijn gepulst met nanobody-PS-conjugaten of na nog een *chase* van 210 minuten (240 minuten)



Gegevens zijn gemiddelde fluorescentie-intensiteit \pm *standard error of the mean*.

PS: fotosensibilisator.

Figuur 14 Cellevensvatbaarheid na belichting met 10 J/cm^2 direct na puls of na de *chase*-periode



Gegevens zijn gemiddelde cellevensvatbaarheid \pm *standard error of the mean*.
PS: fotosensibilisator.

fluorescentiemicroscopie (figuur S2B). Behalve dat lysosomale afbraak van de nanobody-PS-conjugaten plaatsvindt, induceert het biparatopische nanobody ook de afbraak van EGFR (figuur S2C).

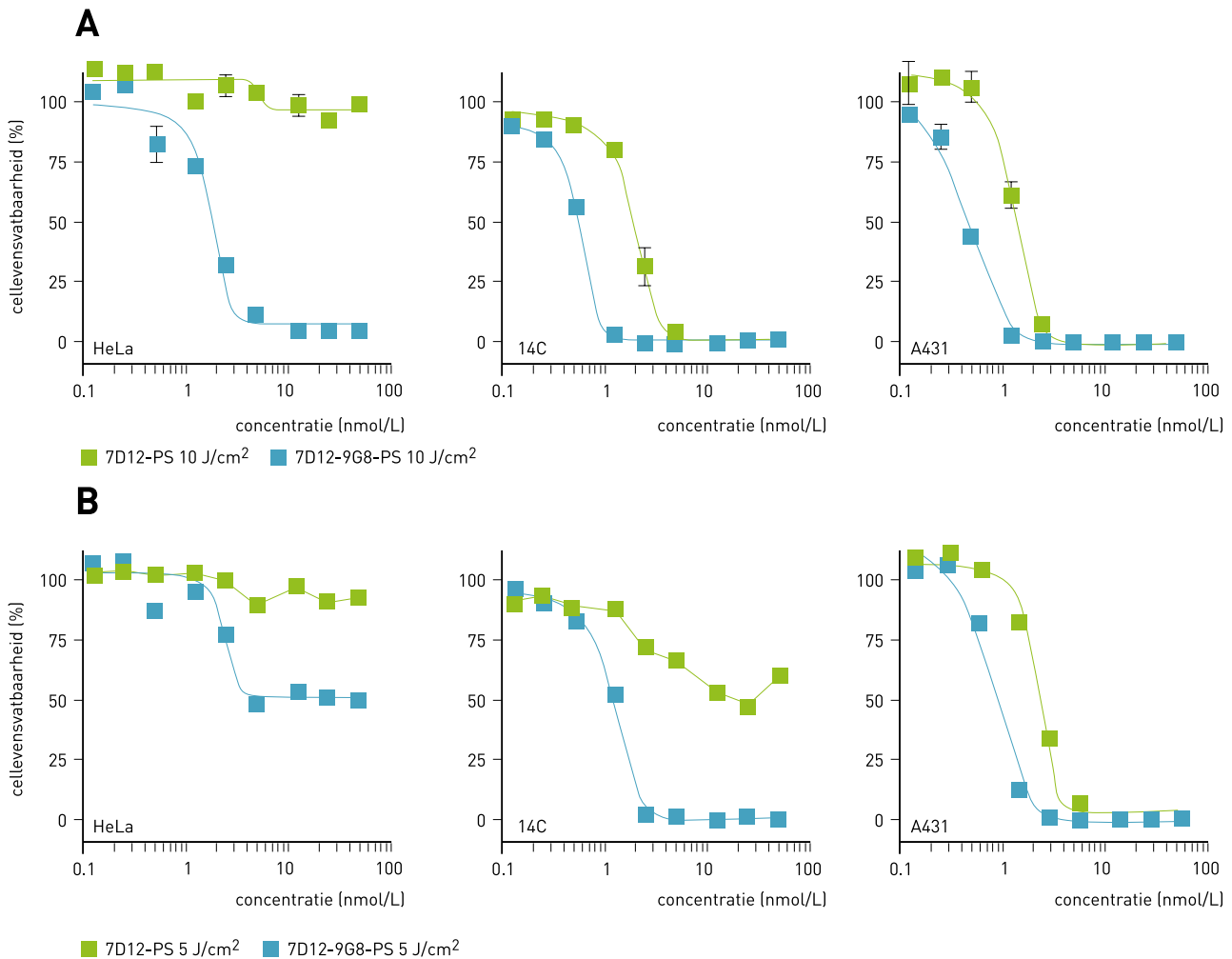
Om te onderzoeken hoe belichting op een later tijdstip de potentie van PDT kan beïnvloeden, werden 14C-cellen behandeld voor PDT zoals hierboven beschreven (figuur 13). Cellen werden hetzij direct na de puls van 30 minuten belicht, hetzij na een *chase*-periode van 210 minuten (op tijdstip 240 minuten). Na de *chase* werd voor beide nanobody-PS-conjugaten een significante afname in potentie gezien

(7D12-PS: $\text{IC}_{50} 10,1 \pm 4,4 \text{ nmol/L}$, $P < 0,001$; 7D12-9G8-PS: $\text{IC}_{50} 1,2 \pm 0,07 \text{ nmol/L}$, $P < 0,01$). 7D12-9G8-PS bleef echter toxisch in het laag-nanomolaire concentratiebereik (figuur 14).

Nanobody-PS-gemedieerde PDT is regelbaar voor tumorcellen met verschillend EGFR-expressieniveau

Om de selectiviteit van nanobody-PS-geïnduceerde PDT te bepalen, werd de PDT uitgevoerd met verschillende cellijnen met verschillende niveaus van EGFR-expressie. Vergelijkbaar met de correlatie die gevonden werd tussen

Figuur 15 Vergelijking van fotodynamische therapie op verschillende cellijnen gepulst met 7D12-PS of 7D12-9G8-PS en belicht met een lichtdosis van 10 J/cm² (A) of 5 J/cm² (B)



Gegevens zijn gemiddelde cellevensvatbaarheid \pm standard error of the mean.
PS: fotosensibilisator.

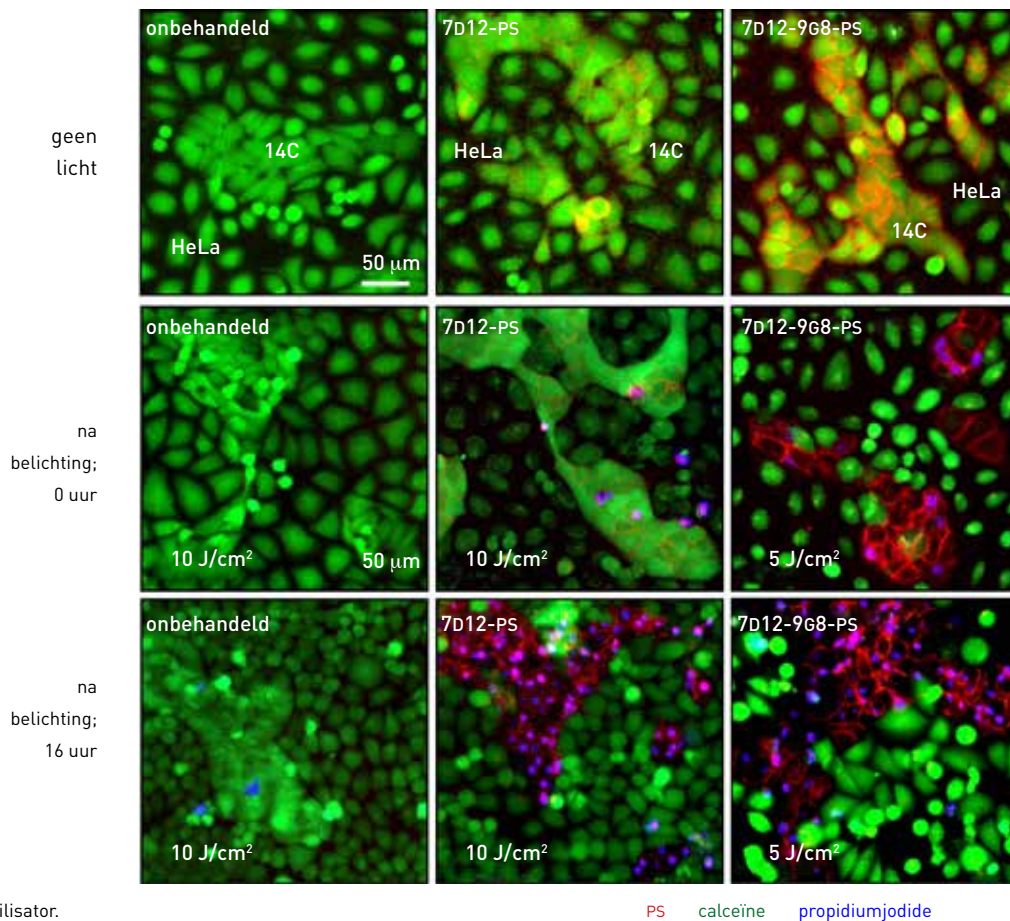
de mate van binding van de fluorescerende conjugaten en het EGFR-expressieniveau van deze cellen (figuur 3), was de toxiciteit van de conjugaten het hoogst (lagere IC₅₀) bij de cellijn met hogere EGFR-expressie: bij A431-cellen werd voor 7D12-PS een IC₅₀ van $1,3 \pm 0,06$ nmol/L gevonden en voor 7D12-9G8-PS een IC₅₀ van $0,52 \pm 0,10$ nmol/L, terwijl deze IC₅₀-waarden bij 14C-cellen respectievelijk $2,3 \pm 0,7$ en $0,6 \pm 0,06$ nmol/L waren. Belangrijk is dat bij de HeLa-cellen met lage EGFR-expressie de levensvatbaarheid van de cellen alleen werd beïnvloed door 7D12-9G8-PS (IC₅₀ $2,29 \pm 0,68$ nmol/L) (figuur 15A).

Om deze toxiciteit op de cellen met lage EGFR-expressie te verminderen, werden vergelijkbare PDT-assays uitgevoerd met slechts de halve lichtdosis (5 J/cm²). Dit resulteerde in een lagere toxiciteit bij alle drie de cellijnen, maar vooral voor HeLa-cellen, waar slechts een gering effect werd

waargenomen met 7D12-9G8-PS (IC₅₀ $22,8 \pm 7,5$ nmol/L) (figuur 15B). Voor de andere twee cellijnen resulteerde de verlaagde lichtdosis in de volgende IC₅₀'s: $39 \pm 14,5$ nmol/L voor 7D12-PS en $1,2 \pm 0,26$ nmol/L voor 7D12-9G8-PS bij 14C-cellen; $2,3 \pm 0,34$ nmol/L voor 7D12-PS en $1,1 \pm 0,47$ nmol/L voor 7D12-9G8-PS bij A431-cellen.

De selectiviteit van de nanobody-PS-conjugaten werd eveneens aangetoond in cocultuurexperimenten met de 14C-celijn met hoge EGFR-expressie en de HeLa-celijn met lage EGFR-expressie. Deze twee cellijnen zijn in coculturen van elkaar te onderscheiden door verschillen in morfologie en EGFR-expressie (figuur 16, boven), zoals werd bevestigd door de verschillen in fluorescentie-intensiteiten van celgebonden EGF-Alexa 555 en nanobody-PS-conjugaten (figuur S3). In het geval van 7D12-PS werd onmiddellijk na de lichtbehandeling met 10 J/cm² nog geen

Figuur 16 Fluorescentiemicroscopie van coculturen van HeLa- en 14C-cellen voor de detectie van nanobody-PS (rood), dode cellen gekleurd met propidiumjodide (blauw) en intacte cellen gekleurd met calceïne AM (groen)



PS: fotosensibilisator.

beschadiging van cellen waargenomen met fluorescentiemicroscopie. De volgende dag was er echter een duidelijke propidiumjodidekleuring van 14C-cellen zichtbaar, terwijl de HeLa-cellen nog intact waren (figuur 16, midden). Belangrijk is dat de PS (rode kleur) zeer goed overlapt met de door propidiumjodide gekleurde cellen, wat de selectieve celdood van 14C-cellen bevestigt. Deze waarnemingen suggereren dat het bij 7D12-PS-gemedieerde PDT enige tijd duurt voordat het effect waarneembaar is met fluorescentiemicroscopie (zie ook figuur 8). In het geval van 7D12-9G8-PS kon daarentegen onmiddellijk na de lichtbehandeling met 5 J/cm² bij 14C-cellen al celbeschadiging worden waargenomen met propidiumjodidekleuring, terwijl de HeLa-cellen nog intact waren en calceïne AM-kleuring vertoonden (figuur 16, rechts).

Beschouwing

Er zijn op het gebied van de fotodynamische therapie (PDT) vele pogingen ondernomen om fotosensibilisatoren (*photosensitizers*, PS) specifiek naar de plek van interesse, bijvoorbeeld de tumor [11-14], te richten. In de context

van foto-immuuntherapie (*photoimmunotherapy*, PIT) zijn hiervoor monoklonale antilichamen (mAb's) gebruikt. Deze conjugaten hebben echter lange halfwaardetijden, en voor een snellere en efficiëntere klaring van PS uit zowel bloed als gezond weefsel zijn daarom kleinere antilichaamfragmenten gebruikt. In deze studie hebben we een alternatief ontwikkeld dat het kleine formaat en de hoge bindingsaffiniteit van nanobodies combineert met een relatief hydrofiele en traceerbare PS.

De hier gebruikte nanobodies zijn robuust en hun bindingseigenschappen worden niet beïnvloed door conjugatie van PS op willekeurige plaatsen. Hoewel de conjugatiereactie voor elk nanobody hetzelfde werd uitgevoerd, werden als gevolg van verschillen in aminozuursequentie tussen de nanobodies toch verschillen in de mate van conjugatie (DOC) verkregen. Wanneer deze PS verkrijgbaar wordt met een reactieve maleïmidegroep, waardoor plaatsspecifieke conjugatie mogelijk wordt, zou dit verschil in DOC in de toekomst mogelijk vermeden kunnen worden, zoals onlangs is aangetoond met anti-HER2-nanobodies voor optische beeldvorming [41].

De PS die aan de nanobodies werd geconjugeerd is het siliciumftalocyaninederivaat IRDye700DX, dat hydrofieler is dan de meeste gebruikte PS-verbindingen en traceerbaar is met nabij-infrarood-fluorescentiebeeldvorming [35].

Hiermee is een eenvoudige conjugatie en zuivering mogelijk van deze nanobody-PS-conjugaten, terwijl tevens het testen in vitro wordt bevorderd doordat dit de detectie en kwantificatie van zowel celgebonden PS als intracellulair PS mogelijk maakt. Bovendien kunnen cellijnen met verschillende EGFR-expressieniveaus worden onderscheiden. Dit is voornamelijk van belang in vivo, omdat EGFR, hoewel in veel mindere mate dan in kankercellen, ook in normale weefsels tot expressie komt. De binding van de anti-EGFR-nanobody-PS-conjugaten aan de verschillende cellijnen en de resulterende toxiciteit correleerden goed met de EGFR-expressieniveaus.

Om in vivo cytotoxisch te zijn voor tumorcellen dienen de anti-EGFR-nanobody-PS-conjugaten specifiek aan tumorcellen te binden en in de tumor te blijven voordat ze door de nieren uit de bloedsomloop worden geklaard. Uit eerdere studies [28] is bekend dat de nanobody-concentratie in de bloedcirculatie het hoogst is tot 15-30 minuten na injectie. Het was daarom belangrijk de associatiekinetiek van deze conjugaten te bekijken (figuur 5). Dit tijdsbestek komt niet overeen met de incubatietijden die meestal worden aangehouden bij mAb-PS-conjugaten (bijvoorbeeld 6 uur, 12 uur, of langer [29-31]), omdat voor dergelijke grote conjugaten langere serumhalfwaardetijden worden verwacht. Een belangrijke waarneming is dat de hoeveelheid nanobody-PS die gedurende de puls van 30 minuten aan cellen bond, voldoende was voor een sterke toxiciteit na belichting, wat de selectiviteit en potentie van deze conjugaten voor PDT benadrukt (figuren 6 en 7).

Naast verschillende incubatietijden waarin cellen aan conjugaten worden blootgesteld, kunnen PDT-protocollen ook variëren in het tijdsinterval tussen blootstelling en belichting. We onderzochten ook het behoud van de conjugaten in en aan cellen in een *pulse-chase*-experiment in vitro, waaruit bleek dat de membraangebonden conjugaten in de tijd van de cellen dissocieerden. Als gevolg hiervan werd een geringere PDT waargenomen, waardoor de voorkeur uitgaat naar een zo vroeg mogelijke belichting. Desalniettemin werd de internalisatie en daarna de intracellulaire ophoping van de conjugaten duidelijk verbeterd door gebruik te maken van 7D12-9G8-PS. Hoewel de DOC tussen 7D12-PS en 7D12-9G8-PS verschilde, maakte ons experiment, waarbij een mengsel van 7D12-9G8 en 7D12-9G8-PS (7D12-9G8-mix) werd gebruikt, het mogelijk de twee formats met elkaar te vergelijken. We realiseren ons dat deze vergelijking niet helemaal eerlijk is, aangezien de PS-moleculen zeker verschillend worden verdeeld (intra-, intermoleculair/cellulair) als ze geconjugeerd zijn aan 7D12 of 7D12-9G8. Terwijl het internaliserende biparatopische nanobody een vergelijkbare hoeveelheid fluorescerende PS aan de cellen afleverde, induceerde het desalniettemin een

significant krachtiger PDT, wat in overeenstemming is met eerdere onderzoeken waarin internaliserende mAb's werden gebruikt voor PDT [29-31].

Opvallend is dat onze resultaten in tegenstelling zijn met die van Mitsunaga e.a., die geen additioneel effect van de internalisatie van een mAb-IRDye700DX-conjugaat constateerden [35]. In die studie werden echter geen details van de dosis-responscurven gepresenteerd, wat de reden zou kunnen zijn voor het missen van het extra effect van internalisatie. In ieder geval kan men ook een ander mechanisme van internalisatie verwachten tussen biparatopische nanobodies en een mAb. In tegenstelling tot een enkele mAb, induceren biparatopische nanobodies [32], net als een combinatie van verschillende mAb's [42], receptorclustering en hierdoor een hogere mate van endocytose. Deze clustering zou ook gevolgen kunnen hebben voor het daaropvolgende intracellulaire transport. De verbeterde werkzaamheid en snellere celdood, geïnduceerd door de internaliserende nanobodies, zouden het gevolg kunnen zijn van de vernietiging van vitale structuren of organellen in de cel. Het is nog onduidelijk of het mechanisme waarmee nanobody-PS-conjugaten celdood induceren alleen bestaat uit de vorming van singletzuurstofmoleculen of ontstaat door een combinatie met fothermische activiteit, zoals voorgesteld door Mitsunaga e.a. Voorlopige gegevens bevestigen echter de productie van singletzuurstof na belichting van PS. De propidiumjodidekleuring en de afwezigheid van annexine-V-kleuring na belichting van nanobody-PS duiden normaal gesproken op celdood door necrose (figuur S4). Hoewel necrose niet aangeduid wordt als het belangrijkste werkingsmechanisme van andere siliciumftalocyaninen [43-45], denken wij dat de inductie van celdood afhankelijk is van de hoeveelheid en de plaats waar het singletzuurstof wordt gevormd (de locatie van PS). In het geval van ons nanobody-PS, met het relatief hydrofiel IRDye700DX, wordt de plaats van de PS bepaald door het nanobody.

Nanobodies verschillen voornamelijk van mAb's door de afwezigheid van het Fc-domein en het onvermogen om antilichaamafhankelijke cytotoxiciteit te veroorzaken. Toch induceert 7D12-9G8-PS lysosomaal transport en afbraak van zowel het nanobody als de EGFR. Dit komt goed overeen met het natuurlijke negatieve feedbackmechanisme waarvan het natuurlijke ligand van de EGFR, EGF, ook gebruikmaakt (gereviewed in [46]), en is ook in overeenstemming met eerdere studies die remming van endosomale recycling door antilichaamgeïnduceerde internalisatie van EGFR suggereren [42, 47]. Belangrijk is dat de PS, ondanks de lysosomale afbraak, in de cel aanwezig blijft waardoor de werkzaamheid, in het bijzonder in het geval van 7D12-9G8-PS, niet drastisch zal afnemen als het moment van belichting moet worden uitgesteld.

De nanobody-PS-conjugaten zullen in vivo moeten worden geëvalueerd. We kunnen echter op basis van eerdere moleculaire beeldvormingsstudies [28, 41, 48] verwach-

ten dat deze nanobody-PS-conjugaten zich snel en homogeen in weefsels zullen verspreiden en stevig aan de EGFR op tumorcellen zullen binden, terwijl de niet-gebonden conjugaten snel door de nieren zullen worden geklaard. Als dit inderdaad het geval is, kunnen deze nanobody-PS-conjugaten een belangrijke bijdrage leveren op het gebied van gerichte PDT. Maar voordat dit kan plaatsvinden, is niet alleen de specifieke afgifte van PS belangrijk, maar ook een effect van de belichting. Het belangrijkste voordeel van PDT is dat de belichting kan worden beperkt tot de gebieden van interesse, waarbij dus in vergelijking met de omringende weefsels de tumorcellen de hoogste dosis licht zullen ontvangen. Om meer inzicht te krijgen in een situatie waarbij kankercellen die EGFR tot overexpressie brengen dicht bij (normale) cellen met lage EGFR-expressie zitten, werden cocultuurexperimenten uitgevoerd met de 14C-cellijn en de HeLa-cellijn. Deze cocultuurstudies laten zien dat door de lichtdosis aan te passen, de behandeling 100% specifiek voor EGFR overexpresserende 14C-cellen kan zijn en veilig voor de HeLa-cellen met een lage EGFR-expressie. Deze gegevens zijn in overeenstemming met het concept van de drempeldosis, dat veronderstelt dat een minimale concentratie van het fototoxische product (bijvoorbeeld 1O_2) noodzakelijk is om cellen of weefsels te vernietigen [49, 50]. In vivo zal de uitdaging liggen in het bepalen van de juiste parameters om deze drempeldosis uitsluitend in de weefsels van interesse (zoals eierstoktumoren of hoofd-halstumoren) te overschrijden. Het is bekend dat de penetratie van licht door weefsels beperkt wordt door de optische eigenschappen van weefsels, wat in dit geval tot gevolg heeft dat PDT veiliger is voor (diepere) normale weefsels. In het geval van een operatie kunnen deze traceerbare nanobody-PS-conjugaten in eerste instantie worden gebruikt voor beeldvorming en vervolgens om resectie van de tumor te begeleiden (beeldgestuurde chirurgie). Daarna kan een bepaalde dosis licht worden gebruikt rond het weggesneden gebied voor PDT van de overgebleven tumorcellen. Het is waarschijnlijk dat deze aanpak zal leiden tot een grondiger verwijdering van tumoren.

Samenvattend hebben we in deze studie aangetoond dat nanobodies geconjugeerd aan een PS gebruikt kunnen worden voor een specifieke en gerichte PDT in vitro. Daarnaast is aangetoond dat de werkzaamheid van PDT wordt versterkt door de intracellulaire afgifte van PS door een biparatopisch nanobody. De volgende stap is om deze nieuwe conjugaten in vivo te evalueren en om te bepalen wat het effect en de bijdrage is van deze nanobody-PS-conjugaten op het gebied van de gerichte PDT, waarin moleculaire beeldvorming van tumoren wordt gecombineerd met een behandeling.

R. Heukers werd ondersteund door het Focus & Massa-programma van de Universiteit Utrecht en een bijdrage van arGEN-X (Gent, België). S. Oliveira werd ondersteund door Veni-beurs 11878 van STW-NWO.

Literatuur

- 1 Raab O. Ueber die Wirkung fluorescirender Stoffe auf Infusorien. *Z Biol.* 1900;39:524-46.
- 2 von Tappeiner H, Jesionek A. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Munch Med Wochenschr.* 1903;50:2042-4.
- 3 von Tappeiner H, Jodlbauer A. Die sensibilisierende Wirkung fluorescierender Substanzen. Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung. Leipzig: FCW Vogel; 1907.
- 4 Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Jun 17;90(12):889-905.
- 5 Ackroyd R, Kely C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2001 Nov;74(5):656-69.
- 6 Allison RR, Sibata CH. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2010 Jun;7(2):61-75.
- 7 Agostinis P, Berg K, Cengel KA, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin.* 2011 Jul-Aug;61(4):250-81.
- 8 Moan J, Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol.* 1991 Apr;53(4):549-53.
- 9 O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2009 Sep-Oct;85(5):1053-74.
- 10 Gomer CJ. Preclinical examination of first and second generation photosensitizers used in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 1991 Dec;54(6):1093-107.
- 11 Derycke AS, de Witte PA. Liposomes for photodynamic therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004 Jan 13;56(1):17-30.
- 12 van Dongen GA, Visser GW, Vroenenraets MB. Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004 Jan 13;56(1):31-52.
- 13 Sibani SA, McCarron PA, Woolfson AD, Donnelly RF. Photosensitizer delivery for photodynamic therapy. Part 2: systemic carrier platforms. *Expert Opin Drug Deliv.* 2008 Nov;5(11):1241-54.
- 14 Sharman WM, van Lier JE, Allen CM. Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004 Jan 13;56(1):53-76.
- 15 Vroenenraets MB, Visser GW, Stewart FA, et al. Development of meta-tetrahydroxyphenylchlorin-monoclonal antibody conjugates for photoimmunotherapy. *Cancer Res.* 1999 Apr 15;59(7):1505-13.
- 16 Carcenac M, Larroque C, Langlois R, van Lier JE, Artus JC, Pèlerin A. Preparation, phototoxicity and biodistribution studies of anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibody-phthalocyanine conjugates. *Photochem Photobiol.* 1999 Dec;70(6):930-6.
- 17 Soukos NS, Hamblin MR, Keel S, Fabian RL, Deutsch TF, Hasan T. Epidermal growth factor receptor-targeted immunophotodiagnosis and photoimmunotherapy of oral precancer in vivo. *Cancer Res.* 2001 Jun 1;61(11):4490-6.
- 18 Abu-Yousif AO, Moor AC, Zheng X, et al. Epidermal growth factor receptor-targeted photosensitizer selectively inhibits EGFR signaling and induces targeted phototoxicity in ovarian cancer cells. *Cancer Lett.* 2012 Aug 28;321(2):120-7.
- 19 Duska LR, Hamblin MR, Bamberg MP, Hasan T. Biodistribution of charged F(ab')₂ photoimmunoconjugates in a xenograft model of ovarian cancer. *Br J Cancer.* 1997;75(6):837-44.

- 20 Kuimova MK, Bhatti M, Deonarain M, et al. Fluorescence characterisation of multiply-loaded anti-HER2 single chain Fv-photosensitizer conjugates suitable for photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci*. 2007 Sep;6(9):933-9.
- 21 Staneloudi C, Smith KA, Hudson R, et al. Development and characterization of novel photosensitizer: scFv conjugates for use in photodynamic therapy of cancer. *Immunology*. 2007 Apr;120(4):512-7.
- 23 Milgrom LR. Towards recombinant antibody-fragment targeted photodynamic therapy. *Sci Prog*. 2008;91(Pt 3):241-63.
- 24 Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. 1993 Jun 3;363(6428):446-8.
- 25 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.
- 26 Sarma VR, Silverton EW, Davies DR, Terry WD. The three-dimensional structure at 6 Å resolution of a human gamma G1 immunoglobulin molecule. *J Biol Chem*. 1971 Jun 10;246(11):3753-9.
- 27 Vecchione L, Jacobs B, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. EGFR-targeted therapy. *Exp Cell Res*. 2011 Nov 15;317(19):2765-71.
- 28 Oliveira S, van Dongen GA, Stigter-van Walsum M, et al. Rapid visualization of human tumor xenografts through optical imaging with a near-infrared fluorescent anti-epidermal growth factor receptor nanobody. *Mol Imaging*. 2012 Feb;11(1):33-46.
- 29 Mew D, Wat CK, Towers GH, Levy JG. Photoimmunotherapy: treatment of animal tumors with tumor-specific monoclonal antibody-hematoporphyrin conjugates. *J Immunol*. 1983 Mar;130(3):1473-7.
- 30 Carcenac M, Dorvillius M, Garambois V, et al. Internalisation enhances photo-induced cytotoxicity of monoclonal antibody-phthalocyanine conjugates. *Br J Cancer*. 2001 Nov 30;85(11):1787-93.
- 31 Vrouenraets MB, Visser GW, Stigter M, Oppelaar H, Snow GB, van Dongen GA. Targeting of aluminum (III) phthalocyanine tetrasulfonate by use of internalizing monoclonal antibodies: improved efficacy in photodynamic therapy. *Cancer Res*. 2001 Mar 1;61(5):1970-5.
- 32 Heukers R, Vermeulen JF, Fereidouni F, et al. Endocytosis of EGFR requires its kinase activity and N-terminal transmembrane dimerization motif. *J Cell Sci*. 2013 Nov 1;126(Pt 21):4900-12.
- 33 Policard A. Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinée à la lumière de Wood. *C R Soc Biol*. 1924;91:1423-8.
- 34 Celli JP, Spring BQ, Rizvi I, et al. Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization. *Chem Rev*. 2010 May 12;110(5):2795-838.
- 35 Mitsunaga M, Ogawa M, Kosaka N, Rosenblum LT, Choyke PL, Kobayashi H. Cancer cell-selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules. *Nat Med*. 2011 Nov 6;17(12):1685-91.
- 36 Lukyanets EA. Phthalocyanines as photosensitizers in photodynamic therapy of cancer. *J Porphyrins Phthalocyanines*. 1999;3(6-7):424-32.
- 37 Honegger AM, Szapary D, Schmidt A, et al. A mutant epidermal growth factor receptor with defective protein tyrosine kinase is unable to stimulate proto-oncogene expression and DNA synthesis. *Mol Cell Biol*. 1987 Dec;7(12):4568-71.
- 38 Rijcken CJ, Hofman JW, van Zeeland F, Hennink WE, van Nostrum CF. Photosensitizer-loaded biodegradable polymeric micelles: preparation, characterisation and in vitro PDT efficacy. *J Control Release*. 2007 Dec 20;124(3):144-53.
- 39 Hofman JW, Carstens MG, van Zeeland F, et al. Photocytotoxicity of mTHPC (temoporfin) loaded polymeric micelles mediated by lipase catalyzed degradation. *Pharm Res*. 2008 Sep;25(9):2065-73.
- 40 Roovers RC, Vosjan MJ, Laeremans T, et al. A biparatopic anti-EGFR nanobody efficiently inhibits solid tumour growth. *Int J Cancer*. 2011 Oct 15;129(8):2013-24.
- 41 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 Oct;40(11):1718-29.
- 42 Spangler JB, Neil JR, Abramovitch S, et al. Combination antibody treatment down-regulates epidermal growth factor receptor by inhibiting endosomal recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jul 27;107(30):13252-7.
- 43 Colussi VC, Feyes DK, Mulvihill JW, et al. Phthalocyanine 4 (Pc 4) photodynamic therapy of human OVCAR-3 tumor xenografts. *Photochem Photobiol*. 1999 Feb;69(2):236-41.
- 44 Whitacre CM, Feyes DK, Satoh T, et al. Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4 of SW480 human colon cancer xenografts in athymic mice. *Clin Cancer Res*. 2000 May;6(5):2021-7.
- 45 Miller JD, Baron ED, Scull H, et al. Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: the case experience with preclinical mechanistic and early clinical-translational studies. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007 Nov 1;224(3):290-9.
- 46 Sorkin A, Goh LK. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp Cell Res*. 2008 Oct 15;314(17):3093-106.
- 47 Boersma YL, Chao G, Steiner D, Wittrup KD, Plückthun A. Bispecific designed ankyrin repeat proteins (DARPs) targeting epidermal growth factor receptor inhibit A431 cell proliferation and receptor recycling. *J Biol Chem*. 2011 Dec 2;286(48):41273-85.
- 48 Gaikam LO, Huang L, Caveliers V, et al. Comparison of the biodistribution and tumor targeting of two ^{99m}Tc-labeled anti-EGFR nanobodies in mice, using pinhole SPECT/micro-CT. *J Nucl Med*. 2008 May;49(5):788-95.
- 49 Patterson MS, Wilson BC, Graff R. In vivo tests of the concept of photodynamic threshold dose in normal rat liver photosensitized by aluminum chlorosulfonated phthalocyanine. *Photochem Photobiol*. 1990 Mar;51(3):343-9.
- 50 Farrell TJ, Wilson BC, Patterson MS, Olivo MC. Comparison of the in vivo photodynamic threshold dose for photofrin, mono- and tetrasulfonated aluminum phthalocyanine using a rat liver model. *Photochem Photobiol*. 1998 Sep;68(3):394-9.