

# De ontwikkeling van een vaccin dat aangrijpt op de tumorangiogenese

E.J.M. Huijbers

Assistent in opleiding/onderzoeker in opleiding, Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala University, Uppsala, Zweden.

Correspondentie: else.huijbers@imbim.uu.se.

## KERNPUNTEN

- Tumorangiogenese kan worden geremd door doelgericht aangrijpen op (tumor)bloedvatantigenen, zoals het extra domein B (ED-B) van fibronectine.
- Om endogene antilichamen tegen lichaamseigen eiwitten te produceren moet de immuuntolerantie worden doorbroken. Dit kan met behulp van een fusie-eiwit en een krachtig, voor humaan gebruik geschikt adjuvans.
- Preklinische studies tonen aan dat een vaccin tegen ED-B in de toekomst ingezet zou kunnen worden bij de behandeling van kanker.

## Antiangiogene therapie bij kanker

De meeste bloedvaten in het lichaam ontstaan *de novo* tijdens de ontwikkeling van het vaatstelsel in het embryo, de vasculogenese [1, 2]. Bloedvaten kunnen zich tevens ontwikkelen vanuit bestaande vaten; dit proces noemt men angiogenese. In een gezonde volwassene treedt angiogenese alleen op tijdens uitzonderlijke fysiologische omstandigheden zoals wondheling of de groei van het endometrium tijdens de vrouwelijke menstruele cyclus [2]. Sommige ziektebeelden worden echter gekenmerkt door overmatige of onvoldoende aanmaak van nieuwe bloedvaten. Voorbeelden van ziekten met een overmatige angiogenese zijn ontstekingsreacties (bijvoorbeeld reumatoïde artritis), kanker en diabetische retinopathie. Bij ischemie daarentegen is er onvoldoende angiogenese, wat mogelijk is gerelateerd aan het ontstaan van ulcera en aan infertiliteit [2].

Kanker wordt getypeerd door overmatige angiogenese. De meeste tumoren volgroeien echter nooit maar blijven 'slapend' (grootte 1-2 mm<sup>3</sup>). In 1971 postuleerde Judah Folkman dat zonder de aanwezigheid van bloedvaten een tumor, wegens het gebrek aan zuurstof en voedingsstoffen, slechts tot een bepaalde grootte kan groeien [3]. Voor tumorprogressie is de zogenaamde angiogene omslag van groot belang. De oorzaak van deze omslag is tot op heden onbekend maar men gaat ervan uit dat er in de balans tussen pro- en antiangiogene factoren een verstoring optreedt in het voordeel van de proangiogene factoren. Dit kan komen doordat de tumor meer proangiogene factoren gaat aanmaken of doordat antiangiogene factoren, zoals trombospodine, endostatine of tumstatine, in het lichaam minder tot expressie komen [4-6].

## ABSTRACT

*Development of a vaccine targeting tumour angiogenesis*

For development of a vaccine targeting tumour angiogenesis a validated and disease-specific target molecule is required. Tumour vascular antigens, such as the extra domain B (ED-B) of fibronectin, are excellent target molecules due to their specific expression around angiogenic vasculature in many solid tumours. Additionally, the vaccine needs to overcome tolerance, since it has to induce antibodies against a self-molecule. This can be achieved with the help of an effective vaccination technology and a potent adjuvant safe for human use. Preclinical studies showed that an ED-B vaccine, consisting of a fusion protein and a non-toxic and biodegradable adjuvant, was able to induce antibodies against the self-antigen ED-B in mice and rats. Moreover, the vaccine inhibited tumour growth, which was accompanied by an attack of the tumour vasculature by the immune system. These preclinical data demonstrate that a vaccine against ED-B is a promising new approach for cancer treatment.

*Huijbers EJM. De ontwikkeling van een vaccin dat aangrijpt op de tumorangiogenese. PW Wetenschappelijk Platform. 2012;6:a1224.*

*Dit artikel is gebaseerd op:*

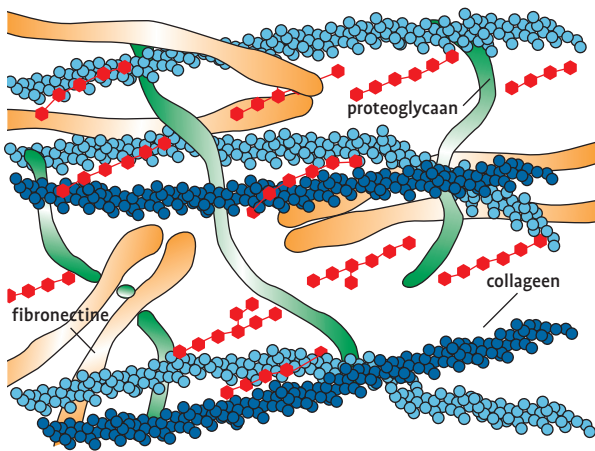
- Huijbers EJ, Ringvall M, Femel J, Kalamajski S, Lukinius A, Abrink M, Hellman L, Olsson AK. Vaccination against the extra domain-B of fibronectin as a novel tumor therapy. *FASEB J.* 2010;24(11):4535-44.
- Ringvall M, Huijbers EJ, Ahooghalandari P, Alekseeva L, Andronova T, Olsson AK, Hellman L. Identification of potent biodegradable adjuvants that efficiently break self-tolerance – a key issue in the development of therapeutic vaccines. *Vaccine.* 2009;28(1):48-52.
- Huijbers EJ, Femel J, Andersson K, Björkelund H, Hellman L, Olsson AK. The non-toxic and biodegradable adjuvant Montanide ISA 720/CpG can replace Freund's in a cancer vaccine targeting ED-B – a prerequisite for clinical development. *Vaccine.* 2012;30(2):225-30.

Bekende proangiogene groeifactoren zijn de *vascular endothelial growth factor* (VEGF), de *platelet-derived growth factor* (PDGF), de *fibroblast growth factor* (FGF) en de *placental growth factor* (PlGF) [6-10].

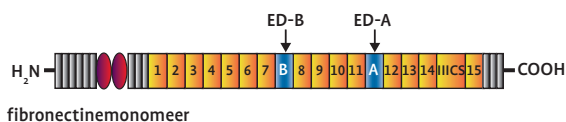
Een ontwikkeling van de laatste decennia bij de behandeling van kanker is het aangrijpen op de tumorangiogenese met als doel de bloedtoevoer naar de tumor te stoppen en de tumorgroei te remmen. Dat deze strategie tot op zekere hoogte effectief is, blijkt uit het feit dat enkele succesvolle klinische studies hebben geleid tot registratie van vijf antiangiogene geneesmiddelen, die allemaal

FIGUUR 1

## Fibronectine en de extracellulaire matrix



a: Model van een extracellulaire matrix, waarin de belangrijkste matrixmoleculen zijn weergegeven.



b: Structuur van een fibronectinemonomeer (molecuulgewicht 220-250 kDa) met de extra domeinen A en B [29]. Ieder fibronectinemonomeer bestaat uit drie typen homologe, zich herhalende domeinen. ED-A en ED-B behoren tot de *type III repeats* [40-42].

aangrijpen op het signaalpad van VEGF. Tot de angiogeneseremmers behoren onder andere de tyrosinekinaseremmers, waarvan sorafenib (Nexavar) en sunitinib (Sutent) de bekendste zijn. Het werkingsmechanisme van deze middelen bestaat in de blokkade van verschillende tyrosinekinasen (waaronder groeifactorreceptoren zoals VEGF-receptor 2 op bloedvaten) in tumorcellen en tumorbloedvaten die betrokken zijn bij tumorgroei en tumorangiogenese [1, 11-18].

De afgelopen tien jaar zijn verschillende monoklonale antilichamen (*monoclonal antibodies*, mabs) op de markt gekomen voor de behandeling van kanker. Een voorbeeld is bevacizumab (Avastin), een antilichaam dat bindt aan VEGF en zo op de angiogenese aangrijpt [19-21]. Monotherapie met bevacizumab is echter ineffectief gebleken en alleen in combinatie met conventionele chemotherapie kan een toename van de totale overleving worden bereikt bij patiënten met darm-, long- of nierkanker [2, 14, 22-26]. Een verklaring voor dit fenomeen is dat anti-VEGF-therapie de bloedtoevoer naar de tumor niet stopt maar in plaats daarvan de tumorbloedvaten normaliseert. Dit leidt tot een verbeterde afgifte van de chemotherapeutica aan het tumorweefsel en een groter remmend effect op de tumorgroei [27, 28].

## Therapeutische vaccinatie

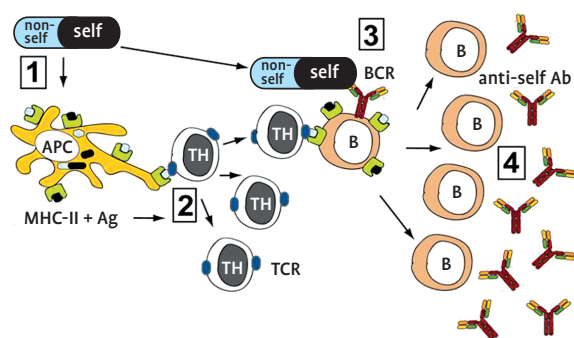
Therapeutische vaccinatie is de inductie van een immuunreactie tegen een lichaamseigen ziektespecifiek antigeen, bijvoorbeeld een (tumor)bloedvatantigeen. Dit staat in tegenstelling tot reguliere vaccins, die vaak preventief worden ingezet en altijd gericht zijn tegen een lichaamsvreemd molecuul. Aangrijpen op (tumor)bloedvatantigenen door middel van vaccinatie onderscheidt zich van de huidige antiangiogene therapieën, zoals inzet van monoklonale antilichamen tegen VEGF, doordat het lichaam ertoe wordt aangezet zelf de antilichamen tegen het doeleiwit te produceren. Op deze manier kan het immuunsysteem op de tumorbloedvaten worden gericht, wat zal leiden tot destructie van de bloedvaten en resulteert in een remming van de tumorgroei [29]. De productiekosten van monoklonale antilichamen zijn aanzienlijk, waardoor de behandeling duur is. Een voordeel van een vaccin is dat het lagere doses vergt omdat het lichaam zelf de antilichamen zal produceren die zich richten tegen het ingespoten eiwit. Het therapeutisch effect van een vaccin zal bovendien langer aanhouden, omdat het lichaam zelf in staat is nieuwe antilichamen aan te maken. Monoklonale antilichamen daarentegen moeten regelmatig worden toegediend (iedere 2-3 weken) vanwege hun halfwaardetijd van circa 20 dagen [30]. Bovendien is de door het vaccin geïnduceerde immuunrespons reversibel, wat inhoudt dat er niet levenslang antilichamen tegen het lichaamseigen antigeen aanwezig zullen zijn [31-33].

Aan welke eisen moet een therapeutisch vaccin voldoen? Ten eerste is er een gevalideerd doelmolecuul nodig en ten tweede moet de immuuntolerantie worden doorbroken [31, 34]. Immuuntolerantie houdt in dat het lichaam mechanismen heeft ontwikkeld om te voorkomen dat het immuunsysteem reageert op lichaamseigen antigenen. Doorbreking hiervan is mogelijk met een effectieve vaccinatietechnologie en een krachtig adjuvans [32, 35].

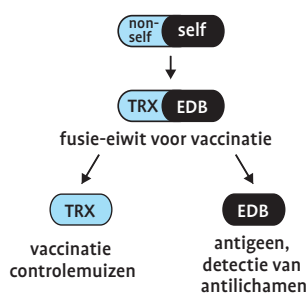
## Doelmoleculen

Geschikte doelmoleculen voor therapeutische vaccinatie zijn (tumor)bloedvatantigenen. Dit zijn lichaamseigen eiwitvarianten die tijdens de (tumor)angiogenese tot expressie komen [36]. Een voordeel van aangrijpen op de tumorbloedvaten is dat deze genetisch stabiel zijn, waardoor ze waarschijnlijk beter door het immuunsysteem herkend worden dan tumorcellen [2, 37, 38]. Tumorcellen zijn namelijk getransformeerd en hebben mechanismen ontwikkeld om herkenning door het immuunsysteem te voorkomen [39]. Voorbeelden van (tumor)bloedvatantigenen zijn het extra domein B (ED-B) en het extra domein A (ED-A) van het extracellulairmatrixeiwit fibronectine (figuur 1). Beide domeinen worden gereguleerd door alternatieve *splicing* van fibronectine-mRNA en komen tot expressie tijdens de embryogenese en tijdens uitzonderlijke fysiologische processen zoals wondheling of de groei van het endometrium tijdens de vrouwelijke menstruele cyclus [40, 43-48]. Bovendien komen deze eiwitdomeinen tot (her)expressie in tumorweefsel [49-52]. De expressie van ED-A en ED-B is specifiek dan die van de VEGFR-2, waarop de tyrosinekinaseremmers aangrijpen. VEGFR-2 is namelijk aanwezig op alle endotheelcellen in het lichaam en is nodig voor bloedvathomeostase [53]. De functie van ED-A en ED-B is onbekend maar er zijn aanwijzingen dat zij een rol spelen bij celadhesie en noodzakelijk zijn voor bloedvatmorphoge-

**FIGUUR 2**  
**Vaccinatietechnologie**



a: Overzicht van het vaccinatiemechanisme dat nodig is om de immuuntolerantie tegen een lichaamseigen antigeen te doorbreken [29, 31]. 1) Antigeenpresenterende cellen (APC's) nemen het fusie-eiwit (TRX-EDB) op en presenteren lichaamsvreemde (TRX) en lichaamseigen (EDB) peptiden. 2) T-cellen (TH) herkennen lichaamsvreemde peptiden en worden daardoor geactiveerd. Lichaamseigen peptiden worden niet herkend door T-cellen omdat er geen autoreactieve T-cellen in het lichaam aanwezig zijn. 3) Autoreactieve B-cellen herkennen het lichaamseigen deel (EDB) van het fusie-eiwit en presenteren peptiden van het lichaamseigen en het lichaamsvreemde deel. De eerder door het lichaamsvreemde deel van het fusie-eiwit geactiveerde T-cellen zullen de autoreactieve B-cellen activeren omdat deze eveneens lichaamsvreemde peptiden (TRX) presenteren. 4) De autoreactieve B-cellen prolifereren en produceren antilichamen tegen het lichaamseigen antigeen ED-B.



b: Schematische weergave van de voor de verschillende doeleinden gebruikte eiwitten.

non-self: lichaamsvreemd deel; self: lichaamseigen deel; anti-self Ab: antilichaam tegen een lichaamseigen antigeen; BCR: B-celreceptor; EDB: eiwit gebruikt als antigeen ter detectie van antilichamen tegen ED-B in ELISA; MHC-II + Ag: *major histocompatibility complex class II* + antigeen; TCR: T-celreceptor; TRX: controle-eiwit ter vaccinatie van controlemuizen (thioredoxine); TRX-EDB: fusie-eiwit gebruikt voor de vaccinatie.

nese [40, 54-58]. ED-A bestaat uit 90 aminozuren en ED-B uit 91 aminozuren. ED-B is identiek in muis, rat, konijn, hond, aap, mens en verscheidene andere species [34, 59, 60]. Muizen- en hu- maan ED-A zijn voor 98% identiek, wat overeenkomt met een verschil van twee aminozuren [40, 57].

#### Doorbreking van immuuntolerantie

Hoe kan het lichaam ertoe aangezet worden antilichamen tegen een lichaamseigen molecuul te produceren (figuur 2a)? Het principe van de techniek is een recombinant fusie-eiwit waarbij het li- chaamseigen deel (bijvoorbeeld ED-B) is gekoppeld aan een lichaamsvreemd molecuul [29, 31]. Dit fusie-eiwit wordt samen met een adjuvans subcutaan geïnjecteerd, wat leidt tot opname ervan in antigeenpresenterende cellen (APC's). Deze breken het eiwit af en presenteren vervolgens peptiden van zowel het lichaamseigen deel als het lichaamsvreemde deel via het *major histocompatibility complex class II* (MHC II). De lichaamsvreemde peptiden worden herkend door T-helpercellen, die dan worden geactiveerd en prolifere- ren. De lichaamseigen peptiden, in dit geval dus ED-B, zullen niet worden herkend door de T-cellen omdat alle autoreactieve T-cellen worden geëlimineerd in de thymus gedurende de ontwikkeling. Daarentegen zijn er wel autoreactieve B-cellen aanwezig in het lichaam. Deze veroorzaken normaal gesproken geen schade omdat zij geen hulp krijgen van (autoreactieve) T-cellen; deze zijn immers geëlimineerd. De autoreactieve B-cellen zullen het lichaamseigen deel (ED-B) van het fusie-eiwit herkennen via hun B-celreceptor. De B-cellen nemen het fusie-eiwit op, breken het af en presenteren vervolgens peptiden van het lichaamseigen deel en het lichaamsvreemde deel (via MHC II). De lichaamsvreemde peptiden worden op hun beurt herkend door de eerder geactiveerde T-cellen en deze zullen worden misleid om de B-cellen te activeren. Dit leidt tot proliferatie van de autoreactieve B-cellen en voorts tot productie van antilichamen tegen het lichaamseigen eiwit, in dit geval dus tegen ED-B. Een oplosbaar doelmolecuul zal met antilichamen worden bedekt en worden gefagocyteerd door neutrofielen en macrofagen [61]. Wanneer echter het doeleiwit matrixgebonden is (zoals geldt voor ED-B) zullen de macrofagen en neutrofielen niet in staat zijn het in zich op te nemen, maar in plaats daarvan de toxi- sche inhoud van de granula afgeven aan hun omgeving. Dit wordt gefrustreerde fagocytose genoemd en leidt uiteindelijk tot weefsel- schade [62].

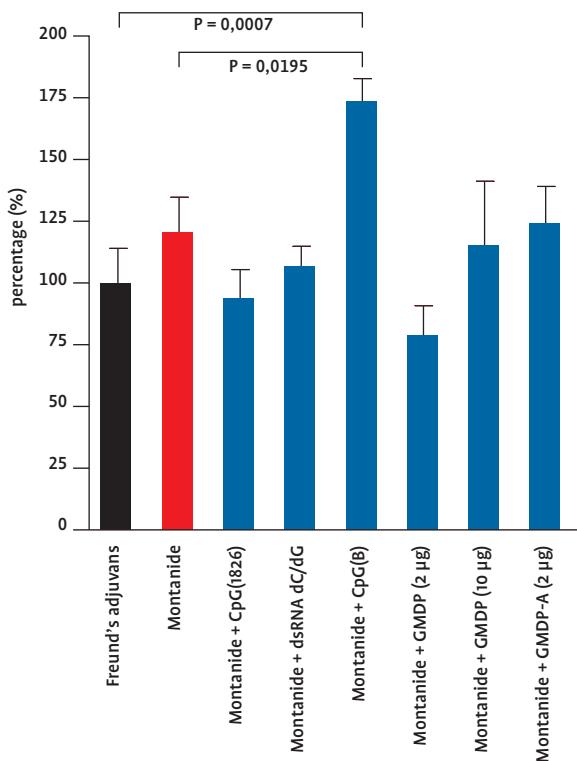
#### Preklinisch onderzoek met antilichamen tegen ED-B

De beschreven vaccinatietechnologie maakt het mogelijk dat het lichaam antilichamen produceert tegen het lichaamseigen mole- cuul ED-B [29]. Dit achtte men onmogelijk en de antilichamen tegen ED-B die op dit moment worden getest in klinische studies, zijn dan ook in bacteriofagen (bacterievirussen) geproduceerd via *phage display*. De in bacteriofagen geproduceerde monoklonale antilichamen zijn op zichzelf onvoldoende om een immuunrespons op te wekken. Om een klinisch effect te verkrijgen moeten hieraan dan ook effectormoleculen worden gekoppeld zoals interleukine 2 (een cytokine dat *natural killer cells* en macrofagen aantrekt) of radioactief jodium (<sup>131</sup>I) [63-66]. In tegenstelling hiermee is een vaccin tegen ED-B in staat het immuunsysteem tegen een lichaam- seigen antigeen te richten [29].

FIGUUR 3

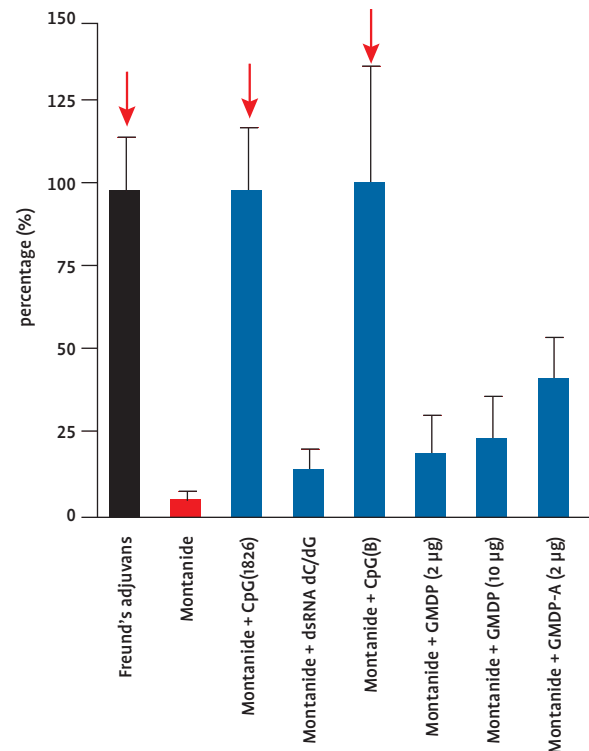
Het adjuvans MN720/CpG kan de immuuntolerantie doorbreken [69]

## lichaamsvreemd antigeen



a: Antilichaaamtiteren gemeten tegen een lichaamsvreemd antigeen. Montanide ISA 720 alleen of in combinatie met CpG oligo (een agonist van *toll-like receptor 9*), met dsRNA (dubbelstrengs RNA, bestanddeel van het virale genoom, agonist van *toll-like receptor 3*) en met GMDP (muramyldipeptide, bestanddeel van het bacteriële peptidoglycaan in de celwand, agonist van receptor NOD2). Gegevens zijn vergeleken met Freund's adjuvans (antilichaaamtiteren 100%) en weergegeven als gemiddelde  $\pm$  SEM. Alle gescreende adjuvantia zijn ongeveer even effectief in het induceren van een immuunrespons tegen een lichaamsvreemd antigeen.

## lichaamseigen antigeen



b: Antilichaaamtiteren gemeten tegen een lichaamseigen antigeen. Alleen montanide in combinatie met CpG oligo was net zo effectief als Freund's adjuvans in het opwekken van een immuunrespons tegen een lichaamseigen antigeen (balken gemarkeerd met pijlen).

## Adjuvans

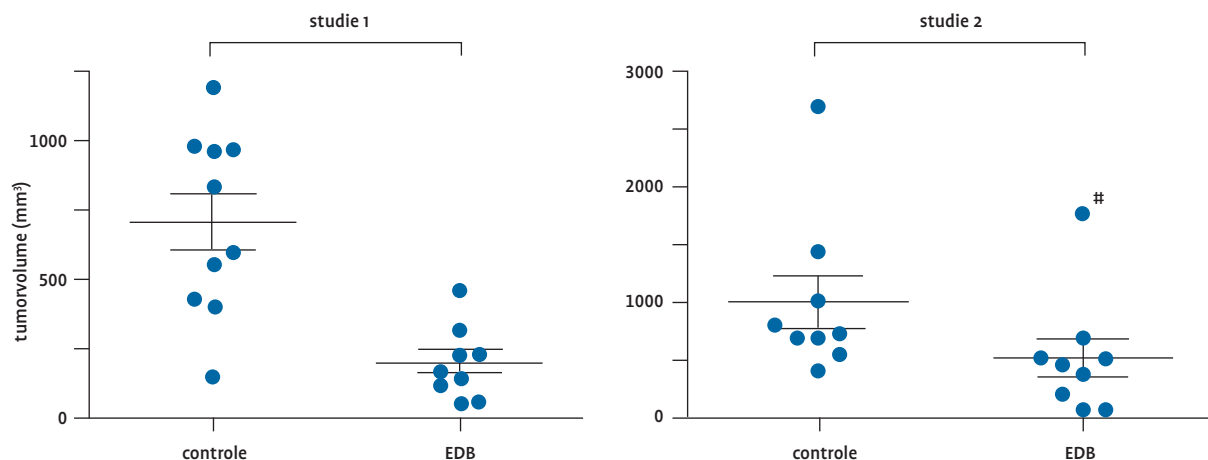
Om de vaccinatiestrategie in de kliniek toe te kunnen passen, is tevens een krachtig en voor humaan gebruik geschikt adjuvans nodig. De huidige gouden standaard in de preklinische ontwikkeling is Freund's adjuvans, een combinatie van minerale olie en *Mycobacterium tuberculosis* [67, 68]. Dit adjuvans is echter vanwege zijn toxiciteit niet geregistreerd voor klinisch gebruik. In een preklinische studie zijn daarom verschillende adjuvantia die zijn gebaseerd op het van squalen afgeleide, biologisch afbreekbare en niet-toxische adjuvans montanide ISA 720 (MN720) [68], bij ratten gescreend tegen zowel lichaamseigen als lichaamsvreemde antigenen [69].

Het volgens GMP geproduceerde MN720 bleek even effectief als Freund's adjuvans in het induceren van een immuunrespons tegen een lichaamsvreemd antigeen (figuur 3a) [69]. De meeste adjuvan-

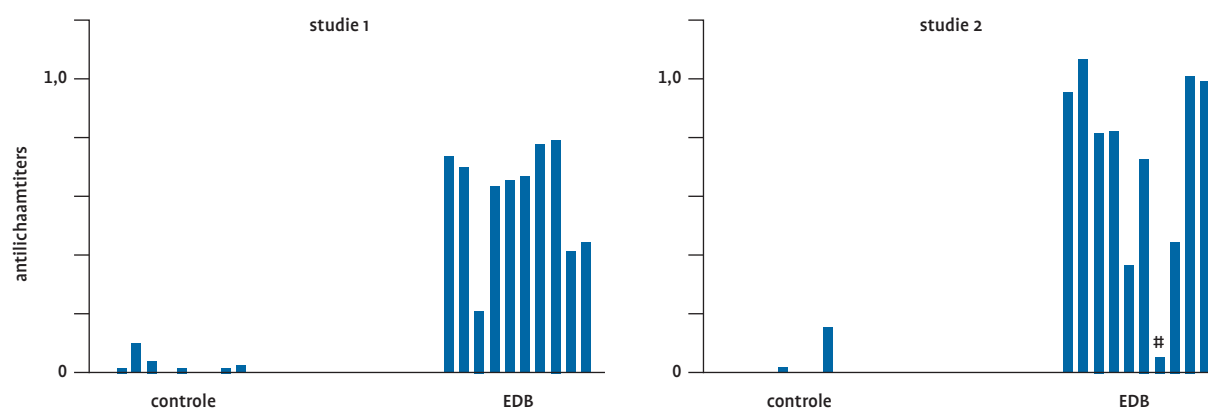
tia zijn echter niet krachtig genoeg om een immuunrespons tegen een lichaamseigen antigeen op te wekken (ofwel de immuuntolerantie te doorbreken). MN720 alleen was dan ook matig effectief. In combinatie met CpG oligo (repetitief ongemethyleerd CG-DNA van bacteriën en virussen; humaan DNA is gemethyleerd), een agonist van de toll-like receptor 9 (TLR9) [61, 70-73], was het echter sterk genoeg om bij ratten en muizen een immuunrespons te induceren tegen een lichaamseigen antigeen (figuur 3b) [69, 74]. MN720+CpG gaf tevens een langer aanhoudende immuunrespons (gemiddeld vijf maanden langer) tegen het lichaamseigen antigeen ED-B dan Freund's adjuvans. De antilichamen tegen ED-B blijven niet levenslang aanwezig en afhankelijk van het gebruikte adjuvans waren de antilichamen gemiddeld tot twaalf maanden na de laatste immunisatie aantoonbaar [74].

FIGUUR 4

Antilichamen tegen ED-B remmen de tumorgroei in een muismodel [29]



a: Met TRX-EDB gevaccineerde muizen hadden significant kleinere tumoren dan de controlemuizen in twee onafhankelijke studies: studie 1,  $P = 0,0007$ ; studie 2,  $P = 0,0188$ . Iedere punt geeft het tumorvolume per muis aan. De balken geven het gemiddelde  $\pm$  SEM aan. De muis zonder antilichamen tegen ED-B is gekenmerkt met een hekje (#; zie ook b, studie 2).



b: Antilichamen tegen ED-B gemeten in serum van controlemuizen en met TRX-EDB gevaccineerde muizen (EDB). Iedere balk geeft de antilichaamtiter per muis weer. De muis zonder meetbare antilichamen tegen ED-B is gekenmerkt met een hekje (#).

#### Vaccinatie in een muismodel

In een preklinische studie naar het effect van vaccinatie tegen ED-B zijn drie eiwitten gemaakt (figuur 2b): TRX-EDB, TRX en EDB. TRX-EDB is gebruikt voor de vaccinatie. In dit fusie-eiwit is het lichaamseigen ED-B gekoppeld aan een lichaamsvreemd deel, het bacteriële thioredoxine (TRX). Beide delen zijn tevens afzonderlijk geproduceerd: TRX als controle-eiwit ter vaccinatie van controlemuizen en ED-B om antilichamen tegen ED-B te meten met *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) [29]. Alle muizen werden drie keer geïmmuniseerd met het fusie-eiwit en het adjuvans om de productie van antilichamen te induceren. Hierna werden subcutaan T241-fibrosarcomcellen geïnjecteerd, een tumortype dat ED-B tot expressie brengt; drie weken later werd de studie beëin-

digd en werden de tumorvolumes vergeleken. De met TRX-EDB gevaccineerde muizen hadden significant kleinere tumoren ( $P = 0,0007$ ; figuur 4a, studie 1) dan de controlemuizen [29]. In een tweede, onafhankelijke studie kon de verminderde tumorgroei in met TRX-EDB gevaccineerde muizen worden bevestigd ( $P = 0,0188$ ; figuur 4a, studie 2) [29]. Tevens konden in beide experimenten antilichamen tegen ED-B worden aangetoond bij de met TRX-EDB gevaccineerde muizen (figuur 4b). Interessant is dat de muis die (om welke reden dan ook) geen antilichamen tegen ED-B heeft aangemaakt (figuur 4b, studie 2, #) de grootste tumor ontwikkelde in de TRX-EDB-groep (figuur 4a, studie 2, #). De tumoren waren gemiddeld 70% kleiner wanneer antilichamen tegen ED-B aantoonbaar waren [29].



In de tumoren van muizen met antilichamen tegen ED-B (ED-B-tumoren) konden met behulp van immunofluorescentiemicroscopie meer infiltrerende neutrofielen worden gemeten dan in de controletumoren. Bovendien toonde kleuring van endotheelcellen en fibrinogeen aan dat vanuit de bloedvaten in de ED-B-tumoren een verhoogde lekkage van fibrinogeen optrad, wat duidt op een beschadiging van de tumorbloedvaten. Onder de elektronenmicroscopie konden in de ED-B-tumoren macrofagen worden gezien die de bloedvaten probeerden te fagocyteren, en zagen de bloedvaten er anders uit dan in de controletumoren [29]. De veranderingen in het tumorweefsel duiden op een verminderde functie van de bloedvaten in de tumoren van de met het ED-B-vaccin behandelde muizen. Er is dus een duidelijk antiangiogeen effect te zien, dat hoogstwaarschijnlijk wordt veroorzaakt door aangrijpen van het immuunsysteem op de tumorbloedvaten.

## Beschouwing

De angiogenese in een tumor blijkt gevoelig voor remming met een vaccin dat een immuunrespons oproept tegen antigenen die zich bevinden op of rond tumorbloedvaten. Voor een succesvolle toepassing is een ziektespecifiek doelmolecuul nodig en moet de immuuntolerantie worden doorbroken met behulp van een fusie-eiwit en een krachtig adjuvans dat geschikt is voor humaan gebruik.

Met een vaccin bestaande uit een fusie-eiwit en een adjuvans op basis van MN720, konden preklinisch bij muizen en ratten antilichamen worden geïnduceerd tegen het lichaamseigen (tumor)-bloedvatantigeen ED-B. Het vaccin remde de tumorgroei in een muismodel doordat het immuunsysteem werd geprikkeld om aan te grijpen op de tumorbloedvaten.

Mogelijk kan een vaccin tegen ED-B in de toekomst als antitumortherapie worden toegepast of ter preventie van (micro)metastasen na resectie van de primaire tumor. Tot dusver is de methode van vaccinatie tegen (tumor)bloedvatantigenen een nieuwe methode die nog niet op mensen is getest. Om deze stap te kunnen nemen is uitgebreider preklinisch onderzoek nodig.

Dit artikel is gebaseerd op promotieonderzoek van E.J.M. Huijbers in de onderzoeksgroep van dr. Anna-Karin Olsson aan het Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Universiteit van Uppsala, Zweden. Het onderzoek is mogelijk gemaakt door The Swedish Research Council, The Swedish Cancer Society, The Swedish Society of Medicine, Jeansson's Foundation en de Åke Wiberg Foundation. Dank is verschuldigd aan dr. Elise Langenkamp en aan Jacqueline Huijbers voor commentaren en opmerkingen/kritisch lezen van de tekst.

## LITERATUUR

- Eichmann A, Bouvrée K, Pardanaud L. Vasculogenesis and angiogenesis in development. In: Marmé D, Fusenig N, red. Tumor angiogenesis. Basic mechanisms and cancer therapy. Berlin: Springer; 2007. p. 31-45.
- Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005;438(7070):932-6.
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971;285(21):1182-6.
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*. 1997;88(2):277-85.
- Sund M, Hamano Y, Sugimoto H, et al. Function of endogenous inhibitors of angiogenesis as endothelium-specific tumor suppressors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(8):2934-9.
- Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res*. 2005;65(10):3967-79.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9(6):669-76.
- Hellberg C, Ostman A, Heldin CH. PDGF and vessel maturation. *Recent Results Cancer Res*. 2010;180:103-14.
- Nissen LJ, Cao R, Hedlund EM, et al. Angiogenic factors FGF2 and PDGF-BB synergistically promote murine tumor neovascularization and metastasis. *J Clin Invest*. 2007;117(10):2766-77.
- Cao Y, Cao R, Hedlund EM. Regulation of tumor angiogenesis and metastasis by FGF and PDGF signaling pathways. *J Mol Med (Berl)*. 2008;86(7):785-9.
- Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signaling – in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(5):359-71.
- Cohen MM Jr. Vascular update: morphogenesis, tumors, malformations, and molecular dimensions. *Am J Med Genet A*. 2006;140(19):2013-38.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 2004;25(4):581-611.
- Ferrara N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. *EXS*. 2005;(94):209-31.
- Demetri GD, van Oosterom AT, Garrett CR, et al. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2006;368(9544):1329-38.
- Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, et al. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(10):3129-40.
- FDA approval for sorafenib tosylate. Bethesda: National Cancer Institute. [www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-sorafenib-tosylate](http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-sorafenib-tosylate). Geraadpleegd 2011 november 25.
- FDA approval for sunitinib malate. Bethesda: National Cancer Institute. [www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-sunitinib-malate](http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-sunitinib-malate). Geraadpleegd 2011 november 25.
- Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 2005;438(7070):967-74.
- FDA approval for bevacizumab. Bethesda: National Cancer Institute. [www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-bevacizumab](http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-bevacizumab). Geraadpleegd 2011 november 25.
- Avastin bevacizumab. South San Francisco: Genentech. [www.avastin.com/avastin/patient/](http://www.avastin.com/avastin/patient/). Geraadpleegd 2011 november 25.
- Jonasch E, Lal LS, Atkinson BJ, et al. Treatment of metastatic renal carcinoma patients with the combination of gemcitabine, capecitabine and bevacizumab at a tertiary cancer centre. *BJU Int*. 2011;107(5):741-7.
- Planchard D. Bevacizumab in non-small-cell lung cancer: a review. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2011;11(8):1163-79.
- Ready NE, Dudek AZ, Pang HH, et al. Cisplatin, irinotecan, and bevacizumab for untreated extensive-stage small-cell lung cancer: CALGB 30306, a phase II study. *J Clin Oncol*. 2011;29(33):4436-41.
- Los M, Roodhart JM, Voest EE. Target practice: lessons from phase III trials with bevacizumab and vatalanib in the treatment of advanced colorectal cancer. *Oncologist*. 2007;12(4):443-50.
- Sandler A, Gray R, Perry MC, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2006;355(24):2542-50.
- Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, et al. Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(8):610-22.
- Jain RK. Taming vessels to treat cancer. *Sci Am*. 2008;298(1):56-63.
- Huijbers EJ, Ringvall M, Femel J, et al. Vaccination against the extra domain-B of fibronectin as a novel tumor therapy. *FASEB J*. 2010;24(11):4535-44.
- Sitsen JMA, red. Farmacotherapeutisch Kompas 2011. Diemen: College voor Zorgverzekeringen; 2011. [www.fk.cvz.nl](http://www.fk.cvz.nl). Geraadpleegd 2011 juli 27.
- Hellman L. Therapeutic vaccines against IgE-mediated allergies. *Expert Rev Vaccines*. 2008;7(2):193-208.

- 32 Vernersson M, Ledin A, Johansson J, Hellman L. Generation of therapeutic antibody responses against IgE through vaccination. *FASEB J*. 2002;16(8):875-7.
- 33 Ma Y, HayGlass KT, Becker AB, et al. Novel recombinant interleukin-13 peptide-based vaccine reduces airway allergic inflammatory responses in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(5):439-45.
- 34 Neri D, Bicknell R. Tumour vascular targeting. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(6):436-46.
- 35 Hellman L. Profound reduction in allergen sensitivity following treatment with a novel allergy vaccine. *Eur J Immunol*. 1994;24(2):415-20.
- 36 Ruoslahti E. Specialization of tumour vasculature. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(2):83-90.
- 37 Lollini PL, Cavallo F, Nanni P, Forni G. Vaccines for tumour prevention. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(3):204-16.
- 38 Hida K, Hida Y, Shindoh M. Understanding tumor endothelial cell abnormalities to develop ideal anti-angiogenic therapies. *Cancer Sci*. 2008;99(3):459-66.
- 39 Ridolfi L, Petrini M, Fiammenghi L, et al. Human embryo immune escape mechanisms rediscovered by the tumor. *Immunobiology*. 2009;214(1):61-76.
- 40 White ES, Baralle FE, Muro AF. New insights into form and function of fibronectin splice variants. *J Pathol*. 2008;216(1):1-14.
- 41 Ffrench-Constant C. Alternative splicing of fibronectin—many different proteins but few different functions. *Exp Cell Res*. 1995;221(2):261-71.
- 42 Kornblihtt AR, Pesce CG, Alonso CR, et al. The fibronectin gene as a model for splicing and transcription studies. *FASEB J*. 1996;10(2):248-57.
- 43 Castellani P, Viale G, Dorcaratto A, et al. The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: a marker of angiogenesis. *Int J Cancer*. 1994;59(5):612-8.
- 44 Peters JH, Chen GE, Hynes RO. Fibronectin isoform distribution in the mouse. II. Differential distribution of the alternatively spliced EIIIB, EIIIA, and V segments in the adult mouse. *Cell Adhes Commun*. 1996;4(2):127-48.
- 45 Astrof S, Crowley D, George EL, et al. Direct test of potential roles of EIIIA and EIIIB alternatively spliced segments of fibronectin in physiological and tumor angiogenesis. *Mol Cell Biol*. 2004;24(19):8662-70.
- 46 Villa A, Trachsel E, Kaspar M, et al. A high-affinity human monoclonal antibody specific to the alternatively spliced EDA domain of fibronectin efficiently targets tumor neo-vasculature in vivo. *Int J Cancer*. 2008;122(11):2405-13.
- 47 Kosmehl H, Berndt A, Katenkamp D. Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects. *Virchows Arch*. 1996;429(6):311-22.
- 48 Ffrench-Constant C, Van de Water L, Dvorak HF, Hynes RO. Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound healing in the adult rat. *J Cell Biol*. 1989;109(2):903-14.
- 49 Rybak JN, Roesli C, Kaspar M, et al. The extra-domain A of fibronectin is a vascular marker of solid tumors and metastases. *Cancer Res*. 2007;67(22):10948-57.
- 50 Kaczmarek J, Castellani P, Nicolo G, et al. Distribution of oncofetal fibronectin isoforms in normal, hyperplastic and neoplastic human breast tissues. *Int J Cancer*. 1994;59(1):11-6.
- 51 Oyama F, Hirohashi S, Shimosato Y, et al. Oncodevelopmental regulation of the alternative splicing of fibronectin pre-messenger RNA in human lung tissues. *Cancer Res*. 1990;50(4):1075-8.
- 52 Oyama F, Hirohashi S, Shimosato Y, et al. Deregulation of alternative splicing of fibronectin pre-mRNA in malignant human liver tumors. *J Biol Chem*. 1989;264(18):10331-4.
- 53 Lee S, Chen TT, Barber CL, et al. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell*. 2007;130(4):691-703.
- 54 Carnemolla B, Leprini A, Allemanni G, et al. The inclusion of the type III repeat ED-B in the fibronectin molecule generates conformational modifications that unmask a cryptic sequence. *J Biol Chem*. 1992;267(34):24689-92.
- 55 Manabe R, Ohe N, Maeda T, et al. Modulation of cell-adhesive activity of fibronectin by the alternatively spliced EDA segment. *J Cell Biol*. 1997;139(1):295-307.
- 56 Astrof S, Hynes RO. Fibronectins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis*. 2009;12(2):165-75.
- 57 Liao YF, Wieder KG, Classen JM, Van De Water L. Identification of two amino acids within the EIIIA (ED-A) segment of fibronectin constituting the epitope for two function-blocking monoclonal antibodies. *J Biol Chem*. 1999;274(25):17876-84.
- 58 Singh P, Reimer CL, Peters JH, et al. The spatial and temporal expression patterns of integrin alpha9beta1 and one of its ligands, the EIIIA segment of fibronectin, in cutaneous wound healing. *J Invest Dermatol*. 2004;123(6):1176-81.
- 59 Hynes RO. *Fibronectins*. New York: Springer; 1990.
- 60 Scheuermann J. Isolation of binding molecules to the EDB domain of fibronectin, a marker of angiogenesis [dissertation]. Zürich: ETH Zürich; 2002. p. 14-5.
- 61 Murphy K, Travers P, Walport M. *Innate immunity*. In: Janeway's immunobiology. 7e ed. New York: Taylor & Francis Group; 2008. p. 56-7.
- 62 van der Meer J, Stehouwer CDA. *Immunopathologie*. In: Interne geneeskunde. 13e ed. Houten: Bohn Stafleu van Loghum; 2005. p. 99.
- 63 Carnemolla B, Borsi L, Balza E, et al. Enhancement of the antitumor properties of interleukin-2 by its targeted delivery to the tumor blood vessel extracellular matrix. *Blood*. 2002;99(5):1659-65.
- 64 Wagner K, Schulz P, Scholz A, et al. The targeted immunocytokine L19-IL2 efficiently inhibits the growth of orthotopic pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(15):4951-60.
- 65 Vascular targeting. *Sovicille: Philogen*. www.philogen.com. Geraadpleegd 2011 juli 27.
- 66 Sauer S, Erba PA, Petrini M, et al. Expression of the oncofetal ED-B-containing fibronectin isoform in hematologic tumors enables ED-B-targeted 131I-L19SIP radioimmunotherapy in Hodgkin lymphoma patients. *Blood*. 2009;113(10):2265-74.
- 67 Opie EL, Freund J. An experimental study of protective inoculation with heat killed tubercle bacilli. *J Exp Med*. 1937;66(6):761-88.
- 68 Lindblad EB. Freund's adjuvants. In: O'Hagan DT, red. *Vaccine adjuvants: preparation methods and research protocols*. Totowa: Humana Press; 2000. p. 43-63.
- 69 Ringvall M, Huijbers EJ, Ahooghalandari P, et al. Identification of potent biodegradable adjuvants that efficiently break self-tolerance – a key issue in the development of therapeutic vaccines. *Vaccine*. 2009;28(1):48-52.
- 70 Krieg AM, Yi AK, Matson S, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. 1995;374(6522):546-9.
- 71 Davis HL, Weeratna R, Waldschmidt TJ, et al. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol*. 1998;160(2):870-6.
- 72 Speiser E, Krieg AM. Stimulation of toll-like receptor 9 for enhancing vaccination. In: Orentas R, Hodge JW, Johnson BD. *Cancer vaccines and tumor immunity*. Hoboken: John Wiley & Sons; 2008. p. 43-66.
- 73 Rankin R, Pontarollo R, Ioannou X, et al. CpG motif identification for veterinary and laboratory species demonstrates that sequence recognition is highly conserved. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 2001;11(5):333-40.
- 74 Huijbers EJ, Femel J, Andersson K, et al. The non-toxic and biodegradable adjuvant Montanide ISA 720/CpG can replace Freund's in a cancer vaccine targeting ED-B-a prerequisite for clinical development. *Vaccine*. 2012;30(2):225-30.