

VU Research Portal

Nanobody based approaches for the therapeutic targeting of conserved T cell subsets in cancer

de Bruin, R.C.G.

2017

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

de Bruin, R. C. G. (2017). *Nanobody based approaches for the therapeutic targeting of conserved T cell subsets in cancer*.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Nederlandse samenvatting

Nederlandse samenvatting

Immuuncellen, ook wel witte bloedcellen genoemd, bieden een beschermende functie in het lichaam tegen ziekteverwekkers en bepaalde abnormaliteiten zoals tumorcellen. Tumoren zijn dan ook vaak geïnfiltrerd met diverse typen immuuncellen zoals T-cellen, dendritische cellen (DC), myeloïde suppressor cellen (MDSC), macrofagen en een beperkt aantal NK-cellen. Deze cellen, en de cytokinen die zij produceren, spelen een cruciale rol in de ontwikkeling en bestrijding van kanker en kunnen, individueel en collectief, ofwel tumorgroei stimuleren (immuun regulerend) ofwel tumorprogressie belemmeren (pro-inflammatoir). Echter, tumorcellen en de micro-omgeving van de tumor kunnen ook de functie van specifieke immuuncellen beïnvloeden.¹⁻⁴ De progressie van kanker is dan ook vaak gerelateerd aan het type immuuncellen en het evenwicht tussen immuun regulerende en pro-inflammatoire immuuncellen in de tumor micro-omgeving.^{5,6}

Dit proefschrift richt zich hoofdzakelijk op 2 typen unieke immuuncellen; de invariante natural killer cellen (iNKT) cellen en de $V\gamma 9V\delta 2$ -T cellen. Van oudsher werden immuunresponsen strikt ingedeeld in twee soorten; het aangeboren immuunsysteem met een snelle en specifieke reactie, en het verworven immuunsysteem welke meer tijd vereist maar diverse functies bezit en “geheugen” kan creëren. Met de kennis van nu en de identificatie van nieuwe immuuncel subtypen, wordt deze scheiding echter minder strikt. De T-cel subtypen iNKT en $V\gamma 9V\delta 2$ -T cellen bijvoorbeeld combineren de functies van pro-inflammatoire cellen van het verworven immuunsysteem met de reactiesnelheid van het aangeboren immuunsysteem.^{7,8}

Verder zijn zowel iNKT als $V\gamma 9V\delta 2$ -T cellen uniek in de wijze waarop ze abnormaal materiaal (antigenen) herkennen. T-cellen kenmerken zich door de expressie van een T-celreceptor (TCR) op het celoppervlak waarmee ze antigenen herkennen. Een voorwaarde voor het herkennen van antigenen is dat deze worden gepresenteerd door zogenoemde antigeen presenterende (MHC-) moleculen op het celoppervlak van antigeen presenterende cellen. Echter, in tegenstelling tot conventionele T cellen, zijn iNKT en $V\gamma 9V\delta 2$ -T cellen voor hun activatie en functionaliteit niet afhankelijk van de presentatie van antigenen door MHC-moleculen, welke per individu verschillend zijn. Dit vergemakkelijkt de mogelijkheid om een persoonsonafhankelijke therapie te ontwikkelen om deze pro-inflammatoire T-cel subsets in te zetten voor het opruimen van tumorcellen in het lichaam.^{7,9,10} Beide immuuncel subtypen worden hieronder in meer detail beschreven.

Humane iNKT cellen kenmerken zich door de expressie van een $V\alpha 24V\beta 11$ -T cell receptor en raken geactiveerd door de herkenning van glycolipide antigenen gepresenteerd door het MHC-klasse I-achtige molecuul CD1d en kunnen, deels afhankelijk van de co-stimulerende signalen en de cytokinen aanwezig in het micromilieu, een immuun regulerende of pro-

inflammatoire immuunrespons induceren. Het prototypische antigen α -galactosylceramide (α -GalCer) is uitgebreid bestudeerd wegens zijn vermogen om een pro-inflammatoir gemedieerde immuunrespons van iNKT cellen te induceren. Hierbij worden geactiveerde iNKT cellen giftig (cytotoxisch) tegen doelwitcellen en stimuleren ze bovendien de activering van andere immuuncellen via de sterke productie van het cytokine IFN- γ .¹¹⁻¹³

Het merendeel van humane T cellen brengt een TCR tot expressie op het celoppervlak bestaande uit een α - en een β -keten. Echter, een klein deel van alle T-cellen heeft een TCR bestaande uit een γ - en een δ -keten en worden $\gamma\delta$ -T cellen genoemd. $V\gamma9V\delta2$ -T cellen zijn de belangrijkste $\gamma\delta$ -T cel subset in humaan bloed en worden geactiveerd door de opname van niet-peptide fosfoantigenen welke in hoge mate aanwezig zijn in “veranderde” cellen als gevolg van bacteriële infectie, stress of kanker. $V\gamma9V\delta2$ -T cel activatie kan versterkt worden door de interactie van stress gerelateerde liganden met NKG2D op het celoppervlak van $V\gamma9V\delta2$ -T cellen. Geactiveerde $V\gamma9V\delta2$ -T cellen zijn cytotoxisch tegen tumorcellen van verschillende herkomst, stimuleren de rijping van dendritische cellen (DC) en presenteren antigenen aan T-cellen met een $\alpha\beta$ -TCR.¹⁴⁻¹⁶

Dit proefschrift

In dit proefschrift beschrijven we de rol die iNKT en $V\gamma9V\delta2$ -T cellen kunnen spelen in tumor immuuntherapie en hoe we deze geconserveerde immunologische routes kunnen inzetten met behulp van variabele domeinen van zware keten antilichamen (VHHs of Nanobodies). Volledige antilichamen bestaan uit meerdere gedeelten (domeinen) welke allen afzonderlijk van elkaar gevouwen zijn. Omdat een VHH slechts uit één domein bestaat biedt dit meerdere voordelen ten opzichte van conventionele antilichamen b.v. verbeterde weefsel/tumorpenetratie, verhoogde stabiliteit, verbeterde oplosbaarheid, een sterk vermogen om te hervouwen, een lage potentie om ongewenste afweerreacties te veroorzaken die gericht zijn tegen het VHH zelf (immunogeniciteit), eenvoudige constructie naar multimere moleculen én de mogelijkheid functionele moleculen in *E. coli* of gist te produceren wat tijd- en kostenbesparend werkt.¹⁷⁻¹⁹

Voor zowel $V\gamma9V\delta2$ -T als iNKT cellen zijn functionele en numerieke afwijkingen waargenomen bij kankerpatiënten.^{15,20} In **hoofdstuk 2** rapporteren we een geactualiseerde analyse van de klinische uitkomst van 47 patiënten met hoofd-halskanker (HNSCC) bij wie het iNKT celniveau is bepaald voorafgaand aan een op-genezing-gerichte radiotherapie. De patiënten werden gestratificeerd op basis van hun iNKT celniveau één dag voorafgaand aan de radiotherapie. Totale overleving (OS), ziekte specifieke overleving (DSS), locoregionale controle (LRC) en de ontwikkeling van metastasen op afstand (DM) werden vervolgens geregistreerd, startend vanaf het begin van de behandeling tot het tijdstip van de eerste

recidief manifestatie van HNSCC of de laatste opvolging (indien er geen recidief werd waargenomen), met een mediane opvolgperiode van 8,7 jaar. Hieruit bleek dat patiënten met een laag iNKT celniveau in vergelijking met patiënten zonder deze tekortkoming, een opvallend ongunstige klinische uitkomst hadden. Aangezien de humaan papillomavirus-status (HPV) een sterke, onafhankelijke prognostische factor voor de overleving van orofaryngeale kanker (keelkanker) is²¹, werd een mogelijke correlatie tussen de HPV-status en het iNKT celniveau onderzocht. Echter, alle orofaryngeale kankerpatiënten met een gemiddeld tot hoog iNKT celniveau bleken negatief te zijn voor HPV-infectie. Dit impliceert dat de overleving in de groep patiënten met een gemiddeld tot hoog iNKT celniveau niet gecorreleerd is aan de HPV-status van de patiënt. Aangezien ook een direct verband tussen lage intratumorale iNKT aantallen en een slechte prognose in neuroblastoom en colorectale kanker is gevonden^{22,23}, kan de voorspellende waarde van iNKT cellen een algemeen fenomeen zijn en benadrukt dit de relevantie van deze kleine immuun subpopulatie in antitumor immuniteit.

De interacties tussen iNKT en CD1d expresserende DC zijn belangrijk voor de wederzijdse activering van zowel iNKT en DC. De activatie van DC kan, in ieder geval deels, worden nagebootst met behulp van antilichamen specifiek gericht tegen CD1d (anti-CD1d mAbs).²⁴ Daarnaast kunnen anti-CD1d mAbs ook een geprogrammeerde celdood (apoptose) induceren van verschillende leukemische tumorcellen zoals B-lymfoblastische en multipel myeloom cellijnen, en eveneens in multipel myeloom geïsoleerd uit patiënten.²⁵ In **hoofdstuk 3** is beschreven dat door ons gegenereerde anti-CD1d VHHs vergelijkbare functionele eigenschappen hebben als beschreven voor anti-CD1d mAbs. Uit een panel van 21 specifieke anti-CD1d VHH klonen, konden specifieke klonen worden gelinkt aan drie specifieke functies. Ten eerste werden twee klonen gevonden die de rijping en cytokine productie van monocyt-afgeleide DC induceren en daarmee mogelijk immuunreacties richting een pro-inflammatoir karakter sturen, in de afwezigheid van andere costimulerende signalen (bijvoorbeeld TLR- en CD40-signalering). Aangezien de binding en activatie van CD40 de activatie van DC verder kan stimuleren ten behoeve van CD4+ en CD8+ T-cel activatie²⁶, kan een bispecifiek VHH dat zowel gericht is op CD1d en CD40, of gefuseerd aan een tumor-geassocieerd antigeen (TAA), een krachtig middel zijn voor vaccinatie doeleinden. Van belang is dat de grootte van het lymfecompartiment van de lymfeklieren beperkend is (<70 kDa) en hiermee toegang van pathogenen blokkeert²⁷ maar wel gemakkelijk toegang zal bieden voor (bi-) specifieke VHHs (~ 30 kDa). Op deze manier kan een bispecifiek VHH een surrogaat signaal bieden en mogelijk iNKT hulp nabootsen om optimale DC activatie te induceren. Ten tweede, bleek een van de CD1d-specifieke VHH klonen een verhoogde binding van annexine V te induceren op CD1d expresserende tumorcellen zoals B-lymfoblastische en multipel myeloom cellen, wat een indicatie is voor een vroeg stadium van apoptose. Ten derde, werd een CD1d-specifieke VHH geïdentificeerd welke effectief de

herkenning van het CD1d- α -GalCer complex door iNKT cellen kon remmen met als gevolg de inhibitie van iNKT cel activering en de remming van cytokinen productie. Dit VHH kan nuttig zijn onder andere bij iNKT cel gemedieerde ontstekingsprocessen in bijvoorbeeld de longen, en bij autoimmuun aandoeningen. De kleine omvang en stabiliteit van VHHs maakt hen in het bijzonder interessant om te evalueren voor hun therapeutische waarde via aerosole toedieningswijzen. Samen bieden deze anti-CD1d VHHs nieuwe methoden welke nuttig kunnen zijn bij het overwegen van immuuntherapeutische toepassingen gericht op het blokkeren van CD1d, DC activatie ten behoeve van vaccinatie, of de inductie van apoptose in CD1d expresserende tumorcellen.

iNKT activatie via het α -GalCer-CD1d complex induceert een snelle cytokinen storm welke leidt tot de activatie van NK cellen, $\alpha\beta$ -T cellen, B cellen, neutrofielen, macrofagen en de DC met welke zij een interactie aan gaan.²⁸⁻³⁰ In **hoofdstuk 4** is het stimulerende effect van iNKT cellen op V γ 9V δ 2-T cel activatie en cytoxiciteit bepaald. Hierbij bleek dat geactiveerde iNKT cellen een inducerend en versterkend effect hebben op de activatie van V γ 9V δ 2-T cellen, hun IFN- γ productie en de lysis van tumor cellen. Dit effect was onafhankelijk van direct celcontact en met behulp van neutraliserende antilichamen tegen verscheidene cytokinen is bepaald dat dit gereguleerd wordt door het cytokine TNF- α . Het stimulerende effect van iNKT cellen op de effector functies van V γ 9V δ 2-T cellen kan ingezet worden om toekomstige op V γ 9V δ 2-T cel gebaseerde immuuntherapeutische toepassingen te versterken, bijvoorbeeld door simultane presentatie van α -GalCer en fosfoantigenen door monocyt-afgeleide DC met als doel antitumor immuun reacties te bewerkstelligen.

Door de combinatie van krachtige antitumor effectorfuncties en de MHC-onafhankelijke herkenning van antigenen van hoofdzakelijk gestresste of kwaadaardige cellen, zijn V γ 9V δ 2-T cellen een zeer interessant immuuncel subtype om in te zetten voor immuuntherapie.^{8,9} In **hoofdstuk 5** beschrijven we de generatie en karakterisatie van 20 verschillende door ons gegenereerde anti-V γ 9V δ 2-TCR VHHs. De VHHs binden zeer specifiek aan de V γ 9V δ 2-TCR en hebben een hoge affiniteit voor de V γ 9- of de V δ 2-TCR keten. De anti V γ 9- en V δ 2-TCR VHHs met de hoogste affiniteit zijn gedetailleerder gekarakteriseerd en hiervan is vastgesteld dat deze nuttig kunnen zijn als reagentia voor gebruik in diverse technieken zoals flow cytometrie, de immunocytochemische detectie van V γ 9V δ 2-T cellen en een efficiënte V γ 9V δ 2-T cel verrijking uit witte bloedcellen met behulp van magnetisch-geactiveerde celsortering (MACS). In het panel van V γ 9V δ 2-TCR VHHs hebben we zowel activerende als niet-activerende V γ 9V δ 2-TCR VHHs gevonden. Deze kunnen ingezet worden voor de verdere ontwikkeling van toekomstige op V γ 9V δ 2-T cel gebaseerde immuuntherapeutische toepassingen.

Ondanks de belangrijke rol die V γ 9V δ 2-T cellen spelen in antitumorale en antimicrobiële bescherming, zijn er ook bepaalde situaties waarin V γ 9V δ 2-T cel activatie ongunstig uitpakt. Patiënten behandeld met aminobisfosfonaten (NBP) voor hypercalciëmie, botontkalking of uitzaaingen naar het bot, ondervinden hiervan vaak hinderlijke bijwerkingen welke sterk lijken op een acute-fase reactie met symptomen als hoge koorts, rillingen en misselijkheid.³¹⁻³³ Waarschijnlijk is dit het gevolg van een grote hoeveelheid pro-inflammatoire cytokinen geproduceerd door geactiveerde V γ 9V δ 2-T cellen als gevolg van inhibitie van het mevalonaat metabolisme en de daarmee samenhangende ophoping van fosfoantigenen. Momenteel zijn er geen middelen beschikbaar welke klinisch succesvol V γ 9V δ 2-T cel activatie kunnen inhiberen.^{8,33-36} In **hoofdstuk 6** zijn de niet-activerende anti-V γ 9V δ 2-TCR specifieke VHHs verder onderzocht met betrekking tothun vermogen de V γ 9V δ 2-TCR te blokkeren. Het VHH met de sterkste neutraliserende eigenschappen was VHH kloon 5E7. Dit VHH kon significant de activatie en productie van pro-inflammatoire cytokinen blokkeren van aan NBP-blootgestelde V γ 9V δ 2-T cellen van verschillende gezonde volwassenen, zowel in gegenereerde cellijnen als in een pool van vers geïsoleerde witte bloedcellen. VHH 5E7 was ook in staat om V γ 9V δ 2-T cel activatie te voorkomen geïnduceerd door tumorcellen waarvan bekend is dat ze V γ 9V δ 2-T cellen kunnen activeren als gevolg van een overactief mevalonaat metabolisme. Voorheen is gerapporteerd dat deze tumorcellen langdurig vrij hoge fosfoantigeen levels kunnen produceren welke, in combinatie met de afwezigheid van co-stimulatie door het cytokine IL-2, tot een afname van V γ 9V δ 2-T cel reactiviteit en “vermoeidheid” kan leiden bij bijvoorbeeld chronische lymfatische leukemie (CLL) en mogelijk bij recidiverend / refractair low-grade non-Hodgkin lymfoom en multipel myeloom. Het voorkomen van deze aanhoudende V γ 9V δ 2-T cel activatie, door bijvoorbeeld VHH 5E7, kan mogelijk V γ 9V δ 2-T cel vermoeidheid en uitputting voorkomen en daarmee de antitumor reactiviteit verbeteren; dit behoeft echter verder onderzoek.³⁶⁻³⁸ We hebben bepaald dat VHH 5E7 V γ 9V δ 2-T cel activatie door het activerende anti-BTN3A1 monoklonale antilichaam 20.1 kan blokkeren. Tot nu toe is het nog deels onduidelijk hoe de V γ 9V δ 2-TCR veranderingen in BTN3A1 zelf of in zijn celmembraan organisatie waarneemt ten gevolge van verhoogde fosfoantigeen niveaus welke leiden tot V γ 9V δ 2-TCR activatie.³⁹ Zowel bindingsanalyses in het laboratorium als computersimuleerd, geven aan dat VHH 5E7 voornamelijk aan de V δ 2-keten van de V γ 9V δ 2-TCR bindt en dat de voorspelde bindingsplaatsen van het VHH en BTN3A1 aanzienlijk met elkaar overlappen. Bij elkaar genomen wijzen deze data sterk in de richting van een directe interactie tussen BTN3A1 en de V γ 9V δ 2-TCR. Samenvattend, kan dit V γ 9V δ 2-T cel specifieke VHH met hoge affiniteit en stabiliteit én welke fosfoantigeen-afhankelijke en -onafhankelijke activatie van V γ 9V δ 2-T cellen kan blokkeren, veelbelovend zijn voor de ontwikkeling van een immuuntherapeutische aanpak gericht op de voorkoming van ongewenste V γ 9V δ 2-T cel activatie bij patiënten die behandeld gaan worden met NBP en mogelijk bij patiënten met een niet-reactieve V γ 9V δ 2-T cel populatie als gevolg van aanhoudende fosfoantigeen stimulatie door tumorcellen.

Meerdere klinische studies hebben gepoogd om V γ 9V δ 2-T cellen in te zetten voor de ontwikkeling van nieuwe tumor immuuntherapieën, bijvoorbeeld door de toediening van buiten-het-lichaam vermenigvuldigde V γ 9V δ 2-T cellen (adoptive transfer), of door toediening van aminobisfosfonaten of synthetische gegenereerde fosfoantigenen ten behoeve van V γ 9V δ 2-T cel activatie, zowel in af- of aanwezigheid van IL-2.^{40,41} Hoewel deze methoden goed verdragen werden en in verschillende gevallen in staat waren relevante klinische antitumor resultaten te laten zien, zijn de resultaten over het algemeen niet consistent te noemen. Mogelijk is dit een gevolg van het feit dat al deze therapieën leiden tot een systemische activatie van V γ 9V δ 2-T cellen en niet noodzakelijkerwijs aanzetten tot een benodigde verplaatsing van deze cellen naar de tumoromgeving. In **hoofdstuk 7** hebben we de generatie van een bispecifiek VHH beschreven. In dit bispecifieke VHH is een activerend anti-V γ 9V δ 2-TCR VHH gefuseerd aan een blokkerend anti-EGFR VHH met als doel de gewenste verplaatsing en activatie van V γ 9V δ 2-T cellen specifiek naar de locatie van de EGFR-expresserende tumor te bewerkstelligen, wat daar tot de lysis van tumorcellen zal leiden. Hoewel het merendeel van $\gamma\delta$ -T cellen in het humane bloed bestaat uit V γ 9V δ 2-T cellen, bestaan er ook $\gamma\delta$ -T cellen met een andere TCR combinatie, bijvoorbeeld V γ 9⁺V δ 2⁻ $\gamma\delta$ -T cellen en V γ 9V δ 2⁺ $\gamma\delta$ -T cellen, maar deze reageren niet op fosfoantigeen stimulatie. Aangezien V γ 9V δ 2⁺ $\gamma\delta$ -T cellen in aanzienlijk lagere aantallen voorkomen in het bloed dan V γ 9⁺V δ 2⁻ $\gamma\delta$ -T cellen^{42,43}, zal een VHH gericht tegen de V δ 2-TCR keten zich specifiek richten tegen het V γ 9⁺V δ 2⁻ $\gamma\delta$ -T cel subtype. Het V δ 2-specifieke VHH 6H4 liet consistente activatie van V γ 9V δ 2-T cellen zien en werd daarom geselecteerd voor gebruik in het bispecifieke VHH. Het voorheen gerapporteerde, zeer specifieke en EGFR-blokkerende VHH 7D12 was geselecteerd als een geschikte anti-EGFR VHH kandidaat.⁴⁴ Als tumor target is gekozen voor EGFR (epidermale groeifactor receptor) aangezien dit een bewezen klinisch relevant tumor antigen is en therapeutica gericht op de blokkering van EGFR (b.v. EGFR competitor anti-EGFR mAbs, zoals cetuximab en panitumumab, en EGFR-specifieke “small molecule kinase inhibitors”, zoals erlotinib en gefitinib) doeltreffende behandelingsmethoden zijn voor verscheidene vormen van epitheelkanker in vergevorderde stadia zoals niet-kleincellig longkanker (NSCLC), darmkanker, alveesklierkanker en hoofd-halskanker (HNSCC). Hoewel de behandeling met deze therapeutica effect kunnen hebben op progressie-vrije en totale overleving, geldt dit gunstige effect slechts voor een minderheid van de patiënten. Daarnaast zijn *RAS* and *BRAF* mutatie-geïnduceerde ongevoeligheid voor het therapeuticum en nare bijwerkingen als huidtoxiciteit beperkende factoren welke ruimte bieden voor de verbetering van op EGFR gerichte therapieën.^{45,46} Het bispecifieke VHH kan gelijktijdig binden aan V γ 9V δ 2-T cellen en EGFR overexpresserende tumorcellen bewerkstelligen en stimuleert op deze wijze een sterke activatie van V γ 9V δ 2-T cellen en cytotoxiciteit tegen tumorcellen. Dit bispecifieke VHH zou toegepast kunnen worden bij een grote groep patiënten aangezien de lysis van tumorcellen onafhankelijk is van *KRAS* of *BRAF* mutaties of van variaties in de δ 2-CDR3 regio van de V γ 9V δ 2-TCR, welke tussen individuen kunnen

verschillen.⁴⁷ Daar het anti-EGFR VHH eenvoudig uitgewisseld kan worden voor een VHH gericht tegen een ander tumor antigen⁴⁸, is deze nieuwe op V γ 9V δ 2-T cel gerichte therapie potentieel inzetbaar voor een breed scala aan tumortypen.

Concluderende opmerkingen

In dit proefschrift hebben we de rol beschreven die iNKT en V γ 9V δ 2-T cellen bij kanker kunnen spelen en hoe de functies van deze cellen gemanipuleerd kunnen worden voor immunotherapeutische doeleinden met behulp van specifieke VHHs. De V γ 9V δ 2-T cel en CD1d-specifieke VHHs beschreven in dit proefschrift zijn veelbelovende moleculen, niet alleen om te worden ingezet voor de karakterisatie van deze immuuncel subtypen, maar ook voor de ontwikkeling van toekomstige behandelingen tegen de diverse ziekten waarbij deze cellen een belangrijke rol spelen.

Referenties

1. Burkholder B, Huang R-Y, Burgess R, Luo S, Jones VS, Zhang W, Lv Z-Q, Gao C-Y, Wang B-L, Zhang Y-M, et al. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1845:182–201.
2. Whitesides GM. Whitesides' Group: Writing a paper. *Adv Mater* 2004; 16:1375–7.
3. Najjar YG, Finke JH. Clinical perspectives on targeting of myeloid derived suppressor cells in the treatment of cancer. *Front Oncol* 2013; 3:49.
4. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010; 140:883–99.
5. Gajewski TF, Schreiber H, Fu Y-X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol* 2013; 14:1014–22.
6. Fridman WH, Galon J, Pagès F, Tartour E, Sautès-Fridman C, Kroemer G. Prognostic and predictive impact of intra- and peritumoral immune infiltrates. *Cancer Res* 2011; 71:5601–5.
7. Lanier LL, Sun JC. Do the terms innate and adaptive immunity create conceptual barriers? *Nat Rev Immunol* 2009; 9:302–3.
8. Gogoi D, Chiplunkar S V. Targeting gamma delta T cells for cancer immunotherapy: bench to bedside. *Indian J Med Res* 2013; 138:755–61.
9. Wu Y-L, Ding Y-P, Tanaka Y, Shen L-W, Wei C-H, Minato N, Zhang W. $\gamma\delta$ T cells and their potential for immunotherapy. *Int J Biol Sci* 2014; 10:119–35.
10. Taniguchi M, Harada M, Dashtsoodol N, Kojo S. Discovery of NKT cells and development of NKT cell-targeted anti-tumor immunotherapy. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2015; 91:292–304.
11. Terabe M, Berzofsky JA. The role of NKT cells in tumor immunity. *Adv Cancer Res* 2008; 101:277–348.
12. Wilson SB, Delovitch TL. Janus-like role of regulatory iNKT cells in autoimmune disease and tumour immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:211–22.
13. McEwen-Smith RM, Salio M, Cerundolo V. The Regulatory Role of Invariant NKT Cells in Tumor Immunity. *Cancer Immunol Res* 2015; 3:425–35.
14. Bonneville M, Scotet E. Human V γ 9V δ 2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors. *Curr Opin Immunol* 2006; 18:539–46.
15. Braza MS, Klein B. Anti-tumour immunotherapy with V γ 9V δ 2 T lymphocytes: from the bench to the bedside. *Br J Haematol* 2013; 160:123–32.
16. Legut M, Cole DK, Sewell AK. The promise of $\gamma\delta$ T cells and the $\gamma\delta$ T cell receptor for cancer immunotherapy. *Cell Mol Immunol* 2015; 12:656–68.
17. Harmsen MM, De Haard HJ. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 77:13–22.
18. Transue TR, De Genst E, Ghahroudi MA, Wyns L, Muyldermans S. Camel single-domain antibody inhibits enzyme by mimicking carbohydrate substrate. *Proteins* 1998; 32:515–22.
19. van der Linden RH, Frenken LG, de Geus B, Harmsen MM, Ruuls RC, Stok W, de Ron L, Wilson S, Davis P, Verrips CT. Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1431:37–46.

20. Weinkove R, Brooks CR, Carter JM, Hermans IF, Ronchese F. Functional invariant natural killer T-cell and CD1d axis in chronic lymphocytic leukemia: implications for immunotherapy. *Haematologica* 2013; 98:376–84.
21. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2010; 363:24–35.
22. Metelitsa LS, Wu H-W, Wang H, Yang Y, Warsi Z, Asgharzadeh S, Groshen S, Wilson SB, Seeger RC. Natural killer T cells infiltrate neuroblastomas expressing the chemokine CCL2. *J Exp Med* 2004; 199:1213–21.
23. Tachibana T, Onodera H, Tsuruyama T, Mori A, Nagayama S, Hiai H, Imamura M. Increased intratumor Valpha24-positive natural killer T cells: a prognostic factor for primary colorectal carcinomas. *Clin Cancer Res* 2005; 11:7322–7.
24. Yue SC, Shalov A, Wang R, Balk SP, Exley MA. CD1d ligation on human monocytes directly signals rapid NF-kappaB activation and production of bioactive IL-12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:11811–6.
25. Spanoudakis E, Hu M, Naresh K, Terpos E, Melo V, Reid A, Kotsianidis I, Abdalla S, Rahemtulla A, Karadimitris A. Regulation of multiple myeloma survival and progression by CD1d. *Blood* 2009; 113:2498–507.
26. Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:101–17.
27. Roozendaal R, Mebius RE, Kraal G. The conduit system of the lymph node. *Int Immunol* 2008; 20:1483–7.
28. Cerundolo V, Silk JD, Masri SH, Salio M. Harnessing invariant NKT cells in vaccination strategies. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:28–38.
29. van der Vliet HJJ, Balk SP, Exley MA. Natural killer T cell-based cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2006; 12:5921–3.
30. van der Vliet HJJ, Molling JW, von Blomberg BME, Nishi N, Kölgen W, van den Eertwegh AJM, Pinedo HM, Giaccone G, Scheper RJ. The immunoregulatory role of CD1d-restricted natural killer T cells in disease. *Clin Immunol* 2004; 112:8–23.
31. Nussbaum SR, Younger J, Vandepol CJ, Gagel RF, Zubler MA, Chapman R, Henderson IC, Mallette LE. Single-dose intravenous therapy with pamidronate for the treatment of hypercalcemia of malignancy: comparison of 30-, 60-, and 90-mg dosages. *Am J Med* 1993; 95:297–304.
32. Adami S, Bhalla AK, Dorizzi R, Montesanti F, Rosini S, Salvagno G, Lo Cascio V. The acute-phase response after bisphosphonate administration. *Calcif Tissue Int* 1987; 41:326–31.
33. Hewitt RE, Lissina A, Green AE, Slay ES, Price DA, Sewell AK. The bisphosphonate acute phase response: rapid and copious production of proinflammatory cytokines by peripheral blood gd T cells in response to aminobisphosphonates is inhibited by statins. *Clin Exp Immunol* 2005; 139:101–11.
34. Sauty A, Pecherstorfer M, Zimmer-Roth I, Fioroni P, Juillerat L, Markert M, Ludwig H, Leuenberger P, Burckhardt P, Thiebaud D. Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels after bisphosphonates treatment in

- vitro and in patients with malignancy. *Bone* 1996; 18:133–9.
35. Gober H-J, Kistowska M, Angman L, Jenö P, Mori L, De Libero G. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med* 2003; 197:163–8.
 36. Thompson K, Rogers MJ. Statins prevent bisphosphonate-induced gamma,delta-T-cell proliferation and activation in vitro. *J Bone Miner Res* 2004; 19:278–88.
 37. Coscia M, Vitale C, Peola S, Foglietta M, Rigoni M, Griggio V, Castella B, Angelini D, Chiaretti S, Riganti C, et al. Dysfunctional V γ 9V δ 2 T cells are negative prognosticators and markers of dysregulated mevalonate pathway activity in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2012; 120:3271–9.
 38. Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S, Reimer P, Weissinger F, Ruediger T, Tony H-P. Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* 2003; 102:200–6.
 39. Wang H, Morita CT. Sensor Function for Butyrophilin 3A1 in Prenyl Pyrophosphate Stimulation of Human V γ 2V δ 2 T Cells. *J Immunol* 2015; 195:4583–94.
 40. Fournié J-J, Sicard H, Poupot M, Bezombes C, Blanc A, Romagné F, Ysebaert L, Laurent G. What lessons can be learned from $\gamma\delta$ T cell-based cancer immunotherapy trials? *Cell Mol Immunol* 2013; 10:35–41.
 41. Latha TS, Reddy MC, Durbaka PVR, Rachamalla A, Pallu R, Lomada D. $\gamma\delta$ T Cell-Mediated Immune Responses in Disease and Therapy. *Front Immunol* 2014; 5:571.
 42. Kabelitz D, Kalyan S, Oberg H-H, Wesch D. Human V δ 2 versus non-V δ 2 $\gamma\delta$ T cells in antitumor immunity. *Oncoimmunology* 2013; 2:e23304.
 43. Fowler DW, Bodman-Smith MD. Harnessing the power of V δ 2 cells in cancer immunotherapy. *Clin Exp Immunol* 2015; 180:1–10.
 44. Roovers RC, Vosjan MJWD, Laeremans T, el Khoulati R, de Bruin RCG, Ferguson KM, Verkleij AJ, van Dongen GAMS, van Bergen en Henegouwen PMP. A biparatopic anti-EGFR nanobody efficiently inhibits solid tumour growth. *Int J Cancer* 2011; 129:2013–24.
 45. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 2008; 358:1160–74.
 46. Van den Eynde M, Baurain JF, Mazzeo F, Machiels JP. Epidermal growth factor receptor targeted therapies for solid tumours. *Acta Clin Belg* 66:10–7.
 47. Gründer C, van Dorp S, Hol S, Drent E, Straetemans T, Heijhuurs S, Scholten K, Scheper W, Sebestyzen Z, Martens A, et al. γ 9 and δ 2CDR3 domains regulate functional avidity of T cells harboring γ 9 δ 2TCRs. *Blood* 2012; 120:5153–62.
 48. Kijanka M, Dorresteijn B, Oliveira S, van Bergen en Henegouwen PM. Nanobody-based cancer therapy of solid tumors. *Nanomedicine* 2015; 10:161–74.

