

Radiotherapy and immunotherapy

Citation for published version (APA):

Rekers, N. H. (2017). *Radiotherapy and immunotherapy: the perfect partnership*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20170309nr>

Document status and date:

Published: 01/01/2017

DOI:

[10.26481/dis.20170309nr](https://doi.org/10.26481/dis.20170309nr)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Document license:

Unspecified

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

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.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

The overall aim of this dissertation was to investigate the possibility of transforming the local effects of radiotherapy (RT) into a systemic tumour-targeted therapy, by enhancing its initial immune stimulating effects with the immunocytokine L19-IL2. We investigated the CD8⁺ T cell mediated anti-tumour effects of RT in combination with L19-IL2 on irradiated tumours (chapter 3 and 4) and on non-irradiated tumours (chapter 5). We additionally assessed the possibility of this combination treatment to induce a protective and long-lasting anti-tumour memory potential (chapter 5) and its capacity to activate an effective NK cell mediated anti-tumour immune response (chapter 6 and 7). Furthermore, in this dissertation we investigated the possibility to combine this bimodal treatment with a checkpoint inhibitor, anti-CTLA-4 (chapter 8). In chapter 9 we evaluated our data by placing them in a broader view and discussed the future perspectives linked to this dissertation.

The first study in this dissertation (chapter 3) described the therapeutic potential and related induced anti-tumour immune responses of RT combined with L19-IL2 in three different *in vivo* murine tumour models: the 4T1 breast carcinoma, Lewis lung carcinoma (LLC), and the C51 colon carcinoma, which have respectively increasing ED-B expression levels. The therapeutic efficacy was found to be dependent on ED-B expression levels, with highly synergistic effects and a cure rate of 75% in the high ED-B expressing model C51. These data clearly show the necessity of ED-B expression for an appropriate therapeutic benefit of the combination treatment. Since the majority of human cancers express ED-B, it makes this treatment highly applicable in patients. Furthermore, we proved that CD8⁺ T cells are causally involved in the anti-tumour response of these ED-B⁺ tumours and we showed that the therapeutic benefit is RT dose dependent, since lowering radiation dose resulted in a reduced number of cured animals. These findings resulted in the initiation of a Phase I clinical safety study (NCT02086721) combining SBRT and L19-IL2 in patients with oligometastatic solid tumours, which is currently ongoing in our institute. Preliminary results of this trial indicate that the treatment combination is safe for the first dose level tested.

These curative anti-tumour results clearly show the enormous capability of the 'correctly triggered and enhanced' immune response to distinguish irradiated (i.e. damaged) aberrant (i.e. tumours) from healthy tissues and to eliminate these upon recognition. In chapter 4 we described the possible next steps in this preclinical research; from provoking anti-tumour effects outside RT field to novel treatment combination opportunities for further personalization of this therapy.

The possibility to provoke an anti-tumour effect outside the RT field when combined with systemic L19-IL2 treatment was studied in chapter 5. Anti-tumour effects triggered by RT observed outside the RT field are called 'abscopal effects' (ab = away from, scopus = target), however, since we investigate the 'extended' abscopal effect by combining it with systemic L19-IL2 treatment, we introduced the 'OFRI effect' (out-of-field

radioimmune) terminology in this chapter. We proved for the first time that a single RT dose (15Gy) can result in a curative OFRI effect in 20% of the macroscopic tumours when combined with L19-IL2. We additionally investigated two clinically relevant fractionated RT schedules (5 x 5Gy and 5 x 2Gy), which also induce OFRI effects, though non-curative. The (curative) OFRI effect triggered by 15Gy and L19-IL2 shows an increase of CD4⁺ T cells at day 4 after RT. However, a depletion study (starting at day 5) revealed that the curative single RT dose triggered and L19-IL2 mediated OFRI effect is caused predominantly by CD8⁺ T cells. These data suggest that CD8⁺ T cells are causing the OFRI effect from day 5 onwards and that CD4⁺ T cells are involved at an earlier stage in this anti-tumour effect. When investigating the specificity using a CT26 mismatched tumour, we observed a growth delay of these tumours, though therapy targeting directly the C51 tumour with radiation in combination with L19-IL2 did not result in elimination of the mismatched CT26 tumours, suggesting that only a part of the tumour (neo)antigens between C51 and CT26 non-irradiated tumours are overlapping. Based on these findings it appears that OFRI effect is tumour specific but since tumours of different origin may share common (neo)antigens, this therapy has the potential to eradicate multiple tumors within a patient.

In addition we showed that T cells infiltrating non-irradiated tumours have more often a regulatory (FoxP3⁺CD25⁺) or exhausted (PD-1⁺) phenotype as compared with irradiated tumours from mice treated with the combination treatment. This suggests that the OFRI effect may be improved by combatting this immunosuppressive environment with, for example, an anti-PD-1 checkpoint inhibitor. However, we have clearly shown that only a single RT dose and not fractionated RT can combat this immunosuppressive environment as well, since these irradiated tumours had a significantly lower infiltrate of regulatory and exhausted T cells. Furthermore, we compared 5 x 5Gy + L19-IL2 with 15Gy + L19-IL2 and show that the latter had a higher percentage of tumor infiltrating CD8⁺ T cells and a higher number of circulating CD4⁺ T cells in the blood. These results clearly demonstrate how crucial the RT schedule is in initiating the optimal OFRI effect and show that a single RT dose is the best trigger for a curative OFRI effect in this *in vivo* model.

Of great importance, we described the capability of mice, cured from C51 tumours by the combination treatment, to develop a long-lasting immunological protection against new tumour formation, months after tumour cure. Treatment alone (without C51 tumours) did not result in this protective effect, proving the necessity of the '*in situ*' immunization process. Treatment with surgery combined with L19-IL2 or high dose RT (40Gy) combined with vehicle, showed significantly less protection. These data suggest that RT is the best inducer for this long-lasting protection against tumours and that L19-IL2 is of great importance. Of great interest is the finding that the immune system of mice, able to reject tumour formation upon reinjection of these cells, demonstrated a significant increase of CD44⁺CD62L⁺ and CD44⁺CD62L⁻ expression on CD8⁺ T cells in the

lymph nodes, indicative for central memory T cells and effector T cells respectively. Therefore, we concluded that *central memory T and effector T cells* in the lymph node compartments are involved in the protection against new C51 tumour formation. Furthermore, the same mice had a high expression of CD44⁺CD127⁺ on splenic, lymph nodes and on circulating (blood) CD8⁺ T cells, which are classified as *effector memory T cells*. Effector memory T cells were significantly higher in the blood of mice able to reject tumour cells upon re-challenge and therefore these immune cells are systemically associated with an optimal long-lasting protective effect and may serve as (a basis for) biomarker to identify patients who did not develop immunological memory and thus are at risk for tumour recurrence.

RT combined with L19-IL2 can trigger the adaptive CD8⁺ T cells mediated immune response, targeting irradiated and non-irradiated tumours and preventing the formation of new tumours months after cure and stop treatment. However, tumour cells need to express MHCI in order to be recognized and killed by CD8⁺ T cells, and therefore we investigated the anti-tumour potential of this combination therapy in tumours lacking MHCI expression in [chapter 6](#). Treatment with L19-IL2 alone already resulted in a significant tumour growth delay and showed a significant increase of tumour infiltrating NK cells. Furthermore, no therapeutic gain was observed when RT was delivered during the L19-IL2 treatment schedule (RT day 2, L19-IL2 day 0, 2, 4), but only when RT is delivered prior to L19-IL2, in the same experimental set-up as used before (RT day 0, L19-IL2 day 1, 3, 5). The enhancement of tumour response was associated with an increase in infiltrating NK cells. The difference in treatment efficacy between both schedules might be explained by the fact that L19-IL2 stimulates the proliferation/activation of NK cells, which are killed when the RT dose is delivered during immunotherapy treatment. To what extent this anti-tumour response is directly performed by NK cells, or if they have an indirect role by shaping the tumour microenvironment favoring the adaptive T cells response, is not proven yet. However, findings of this chapter do show the anti-tumour effect of the (RT +) L19-IL2 (combination) therapy in a MHCI negative tumour model, which is of great interest since tumours tend to have a heterogeneous expression of MHCI in a clinical setting. Given the fact that RT + L19-IL2 can induce anti-tumour effects outside the RT field (i.e. the OFRI effect) as described in [chapter 5](#), and this therapy is able to stimulate NK cells as described in [chapter 6](#), this might hold even more promise for (micro)metastatic tumour control.

In [chapter 7](#) we have expressed our opinion on the role of L19-IL2 in ‘the age of the checkpoint inhibitors’ as answer on a commentary. We agreed with the statement that the ability of L19-IL2 to activate NK cells creates an interesting *alternative* for checkpoint inhibitors in case the cytotoxic T cell ‘baseline’ is insufficient or in case MHCI is lacking. However, especially because of the long-lasting (memory) potential provoked by the adaptive immune response, we believe and concluded in [chapter 7](#) that the

primary goal of an immunotherapeutic (combination) approach is to induce an anti-tumour immune response mediated by T cells. NK cells might have a supportive (indirect) role in this process as described above, and are able to kill MHC I negative tumour cells (as shown in chapter 6).

Once the anti-tumour immune response contains the right constituents (delivered via the RT immunization) and is amplified using the right immunotherapy (in our models L19-IL2), it can further be personalized using checkpoint inhibitors able to prolong its anti-tumour potential. In [chapter 8](#) we described our approach to combine low dose RT (2Gy) with L19-IL2 and a checkpoint inhibitor (anti-CTLA-4/Ipilimumab) in the same experimental setting. Here, we have observed that treatment with L19-IL2 results in CTLA-4 expressing T cells and that the trimodal treatment (RT + L19-IL2 + anti-CTLA-4) prolongs growth delay as compared with all other schedules, except the bimodal treatment (RT + L19-IL2). Strikingly, we noticed a *reduced cure rate* in the trimodal treatment. This importantly indicates that, in contrast to our hypothesis, addition of anti-CTLA-4 worsens tumour response. An increase in regulatory T cells is not the explanation for this reduced treatment efficacy and our first preliminary results show that tumour cells express more PD-L1. Therefore, the PD-L1/PD-1 axis might be an immunosuppressive counteract mechanism used by tumours after anti-CTLA-4 treatment in order to escape the immune attack. However, we cannot yet exclude that timing of the anti-CTLA-4 antibody (day 2 in treatment schedule) or the lack of repetitive administration is the cause of these unexpected findings.

In [chapter 9](#) we evaluated the described chapters of this dissertation, discussed recent relevant literature and described what these results hold for the future. It provides the future perspectives that directly resulted from this dissertation, some of which are already ongoing. These include the phase I clinical study (NCT02086721, ongoing) and a phase II clinical study (approved) investigating RT and L19-IL2 in patients with oligometastatic cancer. It additionally includes a planned preclinical (and phase I clinical) study combining RT and L19-IL2 with anti-PD-1 (nivolumab) to investigate the possibility of increasing the OFRI effect for metastatic cancer. It also includes a broader view for future perspectives, stating that cancer research should even more be executed in a 'bench-bedside-bench' approach, with focus on the 'bedside-bench' part. The bench is described as a 'super team'; a collaboration between biologists, oncologists, immunologists, data scientists, mathematicians and medical engineers.

The curative anti-tumour effect observed in this dissertation proves that RT can function as major anti-tumour immune response trigger, which can be enhanced by an immunotherapeutic approach (L19-IL2 in our models), to kill irradiated and non-irradiated tumours, and to prevent tumour formation months after cure. It shows the synergism between both treatment modalities, opening doors for further personalizing in treatment of metastatic disease, with a curative intent.

Nederlandse samenvatting

Het ultieme doel van een anti-kanker behandeling is de patiënt te genezen voor lange termijn, zonder dat zijn gezonde weefsels teveel schade oplopen. De meest gebruikte behandelingsmethoden zijn chirurgie, bestraling en chemotherapie. Waar bij chirurgie een maligniteit invasief wordt verwijderd, wordt deze bij bestraling beschadigd door het gericht toepassen van een stralingsdosis. Chemotherapie hanteert een systemische aanpak welke snel delende cellen doodt, waarvoor onder andere de tumorcellen gevoelig kunnen zijn. Recentelijk staat er een compleet andere aanpak om kanker te vernietigen in de spotlights, namelijk de immuuntherapieën. Na de ontdekking van chemotherapieën in de jaren 40, zijn de opkomst van de immuuntherapieën waarschijnlijk de meest veelbelovende en revolutionaire manier om kanker te bestrijden. Immuuntherapieën verschillen in hun manier van aanpak van bovenstaand beschreven behandelmethoden, omdat deze kanker bestrijden door het immuunsysteem te manipuleren. Dit kunnen we tegenwoordig op een steeds verfijndere en gerichtere manier, en de toediening van L19-IL2 is hiervan een veelbelovend voorbeeld. L19-IL2 is een immuuntherapie welke dankzij zijn L19-deel aan ED-B kan binden, aanwezig in het vaatstelsel van de tumor. IL2 is een interleukine, welke door verschillende immuun cellen wordt geproduceerd en onder andere NK en T cellen kan activeren tot proliferatie. L19-IL2 heeft daarom de potentie om het immuunsysteem gelokaliseerd bij de tumor te activeren.

Het algemene doel van deze dissertatie was het onderzoeken van de systemische anti-tumor immuun gemedieerde effecten bij de combinatie behandeling van (tumor) gerichte bestraling met systemische L19-IL2. Dit is van groot belang, omdat (micro)metastasen zich vrijwel altijd buiten het bestralingsgebied bevinden. Deze worden daarom gemist, wat de verdere groei van de metastasen mogelijk maakt. Het vertalen van de lokale behandelingseffecten van bestraling naar een behandeling die ook systemisch tumoren kan vernietigen, is daarom van groot belang. Aan de andere kant is recentelijk aangetoond dat tumoren na bestraling een vorm van immunogene celdood ondergaan. Bestraling beschadigt de tumor en de vrijgekomen tumor specifieke (neo)antigenen initiëren een immuun reactie, welke de constituenten bevat van de tumor en daarom als een soort '*in situ*' vaccinatie fungeert. De immuuntherapie L19-IL2 heeft de potentie om deze initiële anti-tumor immuun reactie verder te versterken en daarom kan een combinatie van beiden resulteren in de creatie van een gepersonaliseerd en heterogeen 'super medicijn'. Dit super medicijn, de verwekte anti-tumor immuun reactie zelf, heeft de potentie gemetastaseerde kanker gericht te vernietigen, ook nadat de behandeling is gestopt, mogelijk met een curatief resultaat.

In hoofdstuk 3 hebben wij de effecten van een dosis bestraling in combinatie met systemische L19-IL2 onderzocht op de *bestraalde tumoren* met een *variërende expressie van ED-B*. Geen additionele therapeutische verbetering werd geobserveerd in het lage/negatieve ED-B expressie model 4T1 en een additief effect werd geobserveerd in het intermediaire ED-B expressie model LLC. Het model met de hoogste ED-B expressie

(C51) toonde een sterk synergisme tussen bestraling en L19-IL2, met een genezingspercentage van 75%. Dit toont aan dat de werkzaamheid van deze combinatiebehandeling afhangt van ED-B expressie, en aangezien ED-B in de meerderheid van de solide humane tumoren aanwezig is, is de toepasbaarheid van deze behandeling groot. We tonen verder aan dat het percentage CD8⁺ cytotoxische T cellen in tumoren met een hoge ED-B expressie verhoogd is na behandeling met bestraling en L19-IL2, en laten zien dat er een causaal verband bestaat tussen de effectiviteit van deze combinatiebehandeling en de aanwezigheid van deze cellen. Een verdere belangrijke bevinding omschreven in dit hoofdstuk is de afhankelijkheid van deze synergistische behandeling van de gegeven stralingsdosis; een verlaging naar 5 en 2Gy verminderde het aantal tumor eliminaties aanzienlijk. De bevindingen van de studie beschreven in hoofdstuk 3 hebben geresulteerd in de initiatie van een fase I klinische studie (NCT02086721), waarbij patiënten met oligometastasen behandeld worden met SBRT en L19-IL2, welke momenteel loopt binnen ons instituut. Tot nu toe laat de studie zien dat de behandeling veilig is en de milde gemelde pijnklachten die patiënten ervaren bij de tumor regio kunnen mogelijk wijzen op de werkzaamheid van deze behandeling.

Zoals beschreven in hoofdstuk 4, openen de bevindingen beschreven in hoofdstuk 3 de deur voor verder onderzoek. Het synergisme beschreven in hoofdstuk 3 is van groot belang, ze laten duidelijk zien dat beide therapieën elkaar kunnen versterken zodat de snelgroeïende EB-B positieve tumoren volledig verdwijnen. In hoofdstuk 4 staat het 'winnende medicijn', de perfect getriggerde en langdurende anti-tumor immuunreactie zelf, centraal. We beschrijven de mogelijkheden voor verder preklinisch onderzoek; van de systemische behandeling van kanker tot interessante combinaties met hypoxie geactiveerde therapieën (in het geval de tumoren hypoxisch zijn) en checkpoint remmers (in het geval het immuunsysteem een immuun suppressief fenotype heeft).

De mogelijkheid van de perfect getriggerde anti-tumor immuun reactie om tumoren buiten het bestralingsgebied te elimineren en zijn capaciteit om langdurige bescherming te geven tegen de vorming van nieuwe tumoren, staat centraal in hoofdstuk 5. Het elimineren van tumoren buiten het bestralingsgebied is een fenomeen dat weinig geobserveerd wordt, maar klinisch erg interessant is: een lokale behandeling (bestraling) kan op deze manier namelijk systemisch anti-tumor effect hebben. Onderzoek toont aan dat het abscopal effect (ab – weg van, scopus – target) gemedieerd wordt door het immuun systeem. Aangezien wij in onze studie anti-tumor effecten buiten het bestralingsgebied onderzoeken in combinatie met systemische behandeling van L19-IL2, hebben wij een nieuwe terminologie in het leven geroepen, namelijk 'het OFRI effect' (Out-of-field radioimmune). Het OFRI effect is een anti-tumor effect buiten het bestralingsgebied gemedieerd door het eigen immuunsysteem, welke door middel van een immuuntherapie versterkt wordt. In hoofdstuk 5 laten we voor de eerste keer zien dat 1 dosis bestraling (15Gy) gericht op de tumor resulteert in een curatief OFRI effect wanneer gecombineerd met L19-IL2 in 20% van de niet-bestraalde

macroscopische tumoren. Wanneer de stralingsdosis in fracties gegeven werd, 5 x 2Gy of 5 x 5Gy, observeerden wij ook een OFRI effect, echter zonder een curatief resultaat.

Tumoren buiten het bestralingsgebied van muizen behandeld met een enkele dosis bestraling plus L19-IL2 lieten een verhoging van CD4⁺ geïnfilterde T cellen zien (op dag 4), wat suggereert dat deze immuun cellen van belang zijn voor het OFRI effect. Wanneer deze cellen geëlimineerd werden vanaf dag 5, resulteerde dit inderdaad in een snellere groei van de niet bestraalde tumoren, echter dit verschil was niet significant. Wel vonden we een significant snellere tumorgroei wanneer de CD8⁺ T cellen werden geëlimineerd en deze data vormen dan ook het directe bewijs dat het curatieve OFRI effect veroorzaakt wordt door deze cellen. Om de specificiteit van het OFRI effect te onderzoeken, gebruikten we een tweede ED-B positieve tumor (CT26) in dezelfde experimentele opzet. We observeerden eenzelfde groeivertraging van deze mismatchte tumoren, echter geen van deze tumoren kon geëlimineerd worden door het C51 tumor geïnitieerde OFRI effect. Deze resultaten suggereren dat gedeelde (neo)antigenen tussen deze tumoren wellicht als aangrijpingspunt voor de T cellen van het actieve OFRI effect fungeren.

We tonen in hoofdstuk 5 aan dat T cellen geïnfilterd in niet-bestraalde tumoren van muizen behandeld met bestraling en L19-IL2 vaker een immune suppressief fenotype hebben in vergelijking met vehicle controle muizen. Onder andere vonden we een verhoogd infiltraat van PD-1⁺ en van regulatoire (Foxp3⁺CD25⁺) T cellen, wat resulteert in tolerantie en uitputting van deze cellen. Recentelijk zijn er een aantal PD-1 remmers, zoals nivolumab, goedgekeurd als nieuw anti-kanker middel voor bepaalde kankersoorten. Onze bevindingen (hoog PD-1 op T cellen) en deze recente ontwikkelingen, geven de mogelijkheid om het OFRI effect op relatief korte termijn zelfs nog te vergroten. Wanneer muizen behandeld werden met bestraling en L19-IL2, bevatte het immuun infiltraat van bestraalde tumoren een zeer laag percentage regulatoire of uitgeputte (PD-1⁺) T cellen in vergelijking met de niet-bestraalde tumoren. Dit laat zien dat één dosis bestraling op de tumor de samenstelling van het immuun infiltraat kan veranderen van immuun suppressief/regulatoir naar een effectieve immune respons. Fracties bestraling in combinatie met L19-IL2 resulteerde in een hoge expressie van PD-1⁺ T cellen geïnfilterd in tumoren buiten en binnen het bestralingsgebied, in vergelijking met vehicle controle. Wanneer niet-bestraalde tumoren van muizen behandeld met 15Gy + L19-IL2 en 5 x 5Gy + L19-IL2 direct met elkaar vergeleken werden, bleek de eerste groep meer CD8⁺ tumor infiltrerende T cellen en meer CD4⁺ circulerende T cellen in het bloed te hebben.

Uit deze bevindingen kunnen we concluderen dat niet-bestraalde tumoren van muizen behandeld met bestraling (1 dosis) en L19-IL2 een hoog percentage geïnfilterde regulatoire en uitgeputte T cellen bevatten in vergelijking met de bestraling en vehicle controle. Dit immune suppressieve fenotype is ook terug te vinden in zowel de

bestraalde als niet-bestraalde tumoren van muizen behandeld met fracties bestralingen en L19-IL2 (vergeleken fracties bestralingen en vehicle). Echter, een directe vergelijking tussen één dosis bestraling en fracties wanneer beiden gecombineerd worden met L19-IL2, laat zien dat de eerste groep meer CD8⁺ tumor infiltrerende T cellen en meer CD4⁺ circulerende T cellen in het bloed te hebben.

We laten verder in hoofdstuk 5 zien dat wanneer muizen genezen zijn van hun tumoren door de combinatiebehandeling (bestraling plus L19-IL2), ze niet meer in staat zijn nieuwe tumoren te vormen. Muizen verkrijgen een langdurig immunologisch beschermend geheugen tegen deze tumoren. Deze immunologische bescherming wordt niet gevormd wanneer muizen zonder tumoren de combinatie behandeling ontvangen, wat aantoont dat de tumor inderdaad de basis vormt voor deze *'in situ'* vaccinatie. De tumor kan uiteindelijk vertaald worden in een direct (bestraalde tumor), indirect (niet-bestraalde tumor) en langdurig (opnieuw geïnjecteerde tumor) anti-tumor immuun effect. Muizen genezen van de tumoren door chirurgie plus L19-IL2 en hoge dosis bestraling plus vehicle, ontwikkelden significant vaker tumoren na her-injectie van tumorcellen. De eerste groep toont aan dat bestraling en de tweede groep toont aan dat L19-IL2 beiden noodzakelijk zijn voor een optimale langdurige immunologische bescherming tegen tumorvorming. Muizen die niet meer in staat zijn tumoren te vormen, hebben een verhoogd percentage centraal geheugen T cellen (CD44⁺CD62L⁺ op CD8⁺) en effector T cellen (CD44⁺CD62L⁻ op CD8⁺) in hun lymfeklieren. Daarom suggereren wij dat deze cel subsets betrokken zijn bij de bescherming tegen de vorming van nieuwe tumoren. Dezelfde (tegen nieuwe tumorvorming) beschermde muizen, hebben een hoge expressie van CD44⁺CD127⁺ op CD8⁺ T cellen in hun milten, lymfeklieren en bloed. Deze cellen worden geclassificeerd als effector geheugen T cellen. Het blokkeren van CD127 had echter geen invloed op het tumor beschermende vermogen van de muizen. Dit laat zien dat CD127 wel sterk geassocieerd is met het vermogen van de muizen om beschermd te zijn tegen tumoren, maar dat dit beschermende vermogen niet afhankelijk is van CD127. Aangezien de effector geheugen T cellen in het bloed van muizen welke bescherm zijn tegen de vorming van nieuwe tumoren verhoogd is, zouden deze cellen als biomarker kunnen gaan fungeren om een (niet) langdurig immunologisch anti-tumor potentiaal te op te sporen.

De hoofdstukken 1 tot en met 5 richten zich op de T cel gemedieerde anti-tumor immuun response, echter, in hoofdstuk 6 laten we zien dat bestraling en L19-IL2 ook een NK gemedieerde anti-tumor immuun response kunnen induceren. In dit hoofdstuk maken we gebruik van een MHCI negatief, maar ED-B positief, tumor model (F9 teratocarcinoom). In de literatuur staat omschreven dat tumoren zonder MHCI expressie inderdaad als alternatief mechanisme door NK cellen kunnen worden geëlimineerd. In dit hoofdstuk hebben we twee behandelingsschema's gebruikt. Behandeling met alleen L19-IL2 laat een significante tumorgroei vertraging zien. Dit is in lijn met de literatuur welke laat zien dat NK cellen niet noodzakelijk geïmmuniseerd

hoeven te worden (door bijvoorbeeld bestraling) voor hun activatie. Geen additionele tumorgroei vertraging werd geobserveerd wanneer bestraling in het midden van het L19-IL2 schema gegeven werd (bestraling dag 2, L19-IL2 dag 0, 2, 4). Het behandelingschema startend met bestraling (bestraling dag 0, L19-IL2 dag 1, 3 en 5) vertraagt de tumorgroei significant. Mogelijk kan dit verschil verklaard worden doordat bestraling gegeven op dag 2 de door L19-IL2 gestimuleerde NK cellen beëindigt. Inderdaad laten we in hoofdstuk 6 zien dat de anti-tumor reactie van de MHCII negatieve tumoren geassocieerd is met een verhoogd percentage tumor infiltrerende NK cellen. Deze bevindingen zijn van groot belang, in de praktijk zullen tumoren namelijk een heterogene expressie hebben van MHCII en de uitgevoerde studies laten zien dat bestraling plus L19-IL2 niet alleen een T cel response kan induceren, maar ook een NK cel response. Dit vergroot de toepasbaarheid van deze therapie. Zoals ook omschreven wordt in hoofdstuk 7, is de mogelijkheid van deze combinatiebehandeling om NK cellen te activeren tot het elimineren van tumorcellen zeer voordelig vergelijken andere therapieën, zoals checkpoint remmers, welke alleen maar het adaptieve immuunsysteem kunnen moduleren. Echter concluderen we in dit hoofdstuk dat een optimaal geïnduceerde anti-tumor immuun effect van adaptieve origine de meeste potentie heeft, vooral gezien zijn langdurende bescherming tegen nieuwe tumorvorming. Echter, de indirecte rol van NK cellen om het adaptieve immuunsysteem te moduleren, is wellicht cruciaal voor een optimaal eindresultaat.

In hoofdstuk 3 laten we zien dat bestraling plus L19-IL2 een curatieve en langdurende CD8⁺ T cel gemedieerde immuun response kan mediëren, welke curatief is in bestraalde tumoren. In hoofdstuk 5 laten we zien dat het verhogen van de bestralingsdosis naar 15Gy (plus L19-IL2) resulteert in een curatief effect in 100% van de bestraalde tumoren. In plaats van de bestralingsdosis verhogen, is het ook een optie om een lage dosis bestraling (immuun initiërende trigger) te combineren met L19-IL2 (immuun response versterker) en een checkpoint inhibitor (haalt de rem van de T cellen af/verlengt de anti-tumor immune response), om zo de mogelijke stralingsdosis afhankelijke gezonde weefseltoxiciteit te beperken. In hoofdstuk 8 hebben we daarom een behandeling van bestraling (2Gy), L19-IL2 en anti-CTLA-4 (ipilimumab) onderzocht in het ED-B positieve C51 colon carcinoom model. Onze hypothese was dat toevoeging van anti-CTLA-4 aan de bimodale behandeling in een extra groeivertraging of eliminatie van de tumoren zou resulteren. Echter vonden wij dat toevoeging van anti-CTLA-4 resulteerde in een significant minder anti-tumor effect dan behandeling met de bimodale therapie zonder anti-CTLA-4. Geen verschil in circulerende regulatoire T cellen kon worden geobserveerd. De eerste resultaten wijzen op een toename van PD-L1 expressie van tumorcellen na de trimodale behandeling, wat mogelijk als een belangrijk immune suppressief ontsnappingsmechanisme kan fungeren. Echter, het is ook mogelijk dat de gekozen timing van de anti-CTLA-4 injectie (dag 2) niet optimaal is in dit schema.

Samenvattend laat deze dissertatie zien dat bestraling in combinatie met L19-IL2 kan resulteren in een CD8⁺ T cel en NK cel gemedieerde anti-tumor immuun response, afhankelijk van het model. Het laat de mogelijkheid van deze behandeling zien om de CD8⁺ T cel response te activeren zodat deze zelfs tumoren buiten het bestralingsgebied kunnen elimineren en maanden na genezing (en beëindiging van de therapie) kunnen voorkomen dat nieuwe tumoren gevormd worden. Dit immunologische beschermingsmechanisme wordt zeer sterk geassocieerd met de systemische aanwezigheid van effector geheugen T cellen, welke mogelijk als interessant klinisch uitleessysteem (biomarker) kunnen gaan fungeren. Deze studies laten zien dat het mogelijk is het immuunsysteem met bestraling en een immuuntherapie (L19-IL2) volledig te moduleren in een zeer veelzijdige anti-tumor response. Deze anti-tumor response heeft het geweldige potentieel vertaald te worden naar patiënten, met als uiteindelijk doel gemetastaseerde kanker te gaan behandelen met een curatieve intentie.