

GEORG SPEYER HAUS
INSTITUTE FOR TUMOR BIOLOGY
AND EXPERIMENTAL THERAPY



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Entwicklung bispezifischer Antikörper für die zielgerichtete Eliminierung von Tumorzellen durch natürliche Killerzellen

vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

Dissertation

von Anne Kiefer (geb. Scherer)

Erstgutachterin: Prof. Dr. Beatrix Süß

Zweitgutachter: Prof. Dr. Winfried Wels

Darmstadt 2024

Anne Kiefer (geb. Scherer): Entwicklung bispezifischer Antikörper für die zielgerichtete
Eliminierung von Tumorzellen durch natürliche Killerzellen

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt,

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2024

Tag der mündlichen Prüfung: 18.06.2024

Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International

<https://creativecommons.org/licenses/>

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht. Die eingereichte elektronische Version stimmt mit der schriftlichen Version überein.

Darmstadt, den

(Unterschrift)

Zusammenfassung

Immuntherapien stellen einen aktuellen und wichtigen Ansatz für die Behandlung von Krebserkrankungen dar. Sie basieren prinzipiell auf der Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen durch das Immunsystem. Insbesondere NK-Zellen sind für die initiale Abwehr entarteter Zellen mit entscheidend, wobei der aktivierende Rezeptor NKG2D durch seine Bindung an stressinduzierte NKG2D-Liganden (NKG2D-L) auf der Oberfläche maligner Zellen eine zentrale Rolle spielt. Aufgrund der verstärkten, meist exklusiven Expression auf Tumorzellen stellen NKG2D-L eine vielversprechende universelle Zielstruktur für die adoptive Immuntherapie mit Effektor-Lymphozyten dar, die endogen NKG2D exprimieren oder mit einem NKG2D-basierten chimären Antigenrezeptor (CAR) ausgestattet sind. Jedoch kann der damit verbundene Selektionsdruck das Auswachsen von Tumorzellvarianten begünstigen, die sich der NKG2D-vermittelten Immunabwehr durch eine reduzierte Liganden-Expression oder die Freisetzung von proteolytisch prozessierten, löslichen Liganden entziehen. Um die Erfolgsaussichten einer NKG2D-basierten Therapie zu verbessern, wurden daher bispezifische Killerzell-*Engager* (BiKE) entwickelt, die eine Spezifität für NKG2D und ein Tumor-assoziiertes Oberflächenantigen aufweisen und somit die Interaktion von NKG2D-exprimierenden Lymphozyten und Antigen-positiven Tumorzellen unabhängig von der NKG2D-Ligandenexpression ermöglichen.

In vorausgegangenen Arbeiten der Gruppe wurde ein erster solcher bispezifischer Antikörper (NKAB-ErbB2) generiert, welcher NKG2D über das *single-chain fragment variable* (scFv) Antikörperfragment Kyk2.0 und das Tumor-assoziierte Antigen ErbB2 (HER2) über die scFv-Domäne FRP5 erkennt. Die beiden Bindungsstellen des Moleküls sind dabei über die Fc-Region von humanem IgG4 verknüpft. Dies ermöglicht ähnlich der Struktur natürlicher IgG-Moleküle die Ausbildung von über Disulfidbrücken verbundenen Homodimeren. Um den experimentellen Ansatz um Effektor-Lymphozyten mit verstärkter NKG2D-Reaktivität zu erweitern, wurden etablierte humane NK-92 NK-Zellen mit einem CAR versehen, der für die Zielzellerkennung die extrazelluläre Domäne des humanen NKG2D trägt. Die modifizierten Zellen (NKAR-NK-92) zeigten im Vergleich zu parentalen NK-92 Zellen eine gesteigerte NKAR/NKG2D-Expression und in Kombination mit NKAB-ErbB2 ein erhöhtes zytotoxisches Potenzial gegenüber ErbB2-exprimierenden Glioblastom-Zellen in *in vitro* und *in vivo* Studien. Zudem wurden NKG2D-L positive Tumorzellen auch in Abwesenheit von NKAB-Molekülen effektiv von NKAR-NK-92 Zellen lysiert.

Zusammenfassung

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war die Erweiterung des Kombinationsansatzes durch die Entwicklung von NKAB-Molekülen mit Spezifität für weitere Tumor-assoziierte Antigene. Zudem wurden NKAR-NK-92 Zellen durch ektopische Expression des IL-15 Superagonisten RD-IL15 weiter optimiert. Hierfür wurde ein bicistronischer Vektor generiert, der neben dem bereits zuvor untersuchten NKG2D-CAR die Sequenz von RD-IL15 enthält. Dieses Molekül setzt sich aus einer Affinitäts-optimierten IL-15-Mutante (IL-15_{N72D}) und der Sushi-Domäne der Rezeptoruntereinheit IL-15R α zusammen. Nach der Transduktion von NK-92 Zellen mit lentiviralen Vektorpartikeln wurden NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung gewonnen und nachfolgend im Vergleich zu bisherigen NKAR-NK-92 Zellen in *in vitro* Analysen funktionell charakterisiert. Beide NKAR-exprimierende NK-92 Zellerivate zeigten dabei in durchflusszytometrischen Untersuchungen im Vergleich zu parentalen NK-92 Zellen ein erhöhtes NKAR/NKG2D-Signal. In *in vitro* Zytotoxizitätsassays wiesen beide NKAR-NK-92 Derivate eine vergleichbare natürliche Zytotoxizität gegenüber K562 Leukämiezellen und NKAR-vermittelte Zytotoxizität gegen NKG2D-L positive MDA-MB468 Mammakarzinomzellen auf. Ebenso war die von NKAB-ErbB2 vermittelte Zytotoxizität gegenüber ErbB2-exprimierenden MDA-MB453 Mammakarzinomzellen vergleichbar. Die Sekretion von RD-IL15 durch NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen in den Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestätigt. Die autokrine Aktivierung des IL-15 Signalwegs in den Produzentenzellen wurde durch die Detektion von phosphoryliertem STAT5 im Immunoblot nachgewiesen. Außerdem zeigten NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen im Gegensatz zu NKAR-NK-92 Zellen ohne RD-IL15 in Abwesenheit von exogenem IL-2 eine konstante Proliferation und Vitalität. Um die Wirkung von sekretiertem RD-IL15 auf umgebende Immunzellen in parakriner Weise zu analysieren, wurden Transwell-Assays durchgeführt. Dabei steigerte das von NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen sekretierte RD-IL15 die natürliche Zytotoxizität von kokultivierten primären Lymphozyten gegenüber der NK-Zell-sensitiven Leukämie-Zelllinie K562. In einer gemischten Lymphozytenreaktion führte die Sekretion von RD-IL15 zudem zu einer gesteigerten Proliferation von kokultivierten primären CD8-positiven T-Zellen. Dies weist nach, dass sekretiertes RD-IL15 neben seiner unterstützenden Wirkung auf die Produzentenzellen selbst auch benachbarte Immunzellen aktivieren kann, die für eine endogene anti-Tumor Immunantwort wichtig sind.

Im Fall bispezifischer NKAB-Moleküle wurde zunächst überprüft, inwiefern der prototypische NKAB-ErbB2 Antikörper weiter optimiert werden kann. Hierzu wurde neben einem Austausch der Bindungsdomänen am N- und C-Terminus auch die Orientierung der variablen Domänen der schweren (V_H) und der leichten (V_L) Antikörperkette im NKG2D-bindenden scFv-Fragment verändert. Die so modifizierten NKAB-Moleküle wurden wie alle weiteren hier untersuchten NKAB-Antikörper als IgG4-Fc Fusionsprotein in Expi293F Zellen produziert, mittels Affinitätschromatographie aus dem

Zusammenfassung

Zellkulturmedium aufgereinigt und anschließend für die funktionelle Charakterisierung eingesetzt. In Immunoblot-Analysen der isolierten NKAB-Moleküle wurde nachgewiesen, dass diese größtenteils als Dimer und nur zu einem geringen Teil als Monomer vorliegen. Die Positionierung der NKG2D-spezifischen Domäne am C-Terminus und der ErbB2-spezifischen Domäne am N-Terminus (NKAB-ErbB2 rev) führte in funktionellen Analysen im Vergleich zum umgekehrt organisierten Ausgangsmolekül NKAB-ErbB2 zu keiner Änderung der Aktivität. Dies weist auf eine hohe Flexibilität im Design solcher Moleküle hin. Obwohl im Fall der NKG2D-spezifischen Domäne die ursprüngliche V_HV_L Orientierung innerhalb des scFv-Fragments im Vergleich zur V_LV_H Orientierung in durchflusszytometrischen Analysen in einer abgeschwächten NKG2D-Bindung resultierte, wurden keine Unterschiede in der NKAB-vermittelten Zytotoxizität von NKAR-NK-92 Zellen festgestellt. Die N-terminale Verknüpfung des prototypischen NKAB-ErbB2 Moleküls mit RD-IL15 (RD-IL15-NKAB-ErbB2) hatte ebenfalls keine verminderte Funktionalität des NKAB-Moleküls im Bezug auf Zellbindung und Vermittlung von Zytotoxizität zur Folge. RD-IL15-NKAB-ErbB2 aktivierte jedoch zusätzlich den IL-15 Signalweg in NKAR-NK-92 Zellen und ermöglichte die Proliferation der Zellen bis zu 4 Tage in Abwesenheit von IL-2.

Um zu klären, ob dieser experimentelle Therapieansatz auch für andere Tumorentitäten nutzbar ist, wurden nachfolgend NKAB-Moleküle mit Spezifität für weitere Tumor-assoziierte Zielantigene generiert. Zunächst erfolgte die Ableitung von NKAB-EGFR. Dieses Molekül trägt neben einer C-terminalen NKG2D-interagierenden Domäne am N-Terminus das von dem Antikörper Cetuximab abgeleitete scFv(225)-Antikörperfragment mit Spezifität für EGFR und die Deletionsmutante EGFRvIII. Neben der spezifischen Bindung von NKAB-EGFR an NKAR/NKG2D-exprimierende NK-92 Zellen und EGFR/EGFRvIII-positive Tumorzellen konnte auch eine durch dieses Molekül vermittelte Steigerung der Aktivität von NKAR-NK-92 Derivaten und primären NK-Zellen gesunder Spender gegenüber EGFR- und EGFRvIII-exprimierenden Tumorzellen nachgewiesen werden. Zudem wurde in einem Degranulationsassay mit löslichem NKAB-EGFR in An- oder Abwesenheit von EGFR-exprimierenden Mammakarzinomzellen festgestellt, dass lediglich die Kreuzvernetzung von Ziel- und Effektorzellen durch das NKAB-Molekül zur spezifischen Degranulation von NKAR-NK-92 Zellen führt, während hohe Konzentrationen des bispezifischen Antikörpers in löslicher Form allein keine unspezifische Aktivierung der Effektorzellen induzierten. Dies stellt einen wichtigen Sicherheitsaspekt des Therapieansatzes dar.

Ein Problem bei der Behandlung von Krebserkrankungen mit zielgerichteten Immuntherapien ist die mögliche Heterogenität der Expression geeigneter Tumor-assoziiierter Antigene im Tumorgewebe. Ein therapeutischer Ansatz, der lediglich ein bestimmtes Ziel-Antigen angreift, kann in diesem Fall

Zusammenfassung

nicht alle Zellen eines Tumors eliminieren. Daher wurden in dieser Arbeit neben dem Einsatz eines einzelnen NKAB-Moleküls auch die Effekte einer Kombinationstherapie mit NKABs unterschiedlicher Spezifitäten untersucht. Da ErbB2 und EGFR in unterschiedlichen Tumorentitäten koexprimiert werden können, wurde eine Kombination von NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR erprobt. Hierzu wurden als Modell murine Glioblastomzellen (GL261) genetisch so modifiziert, dass sie ektopisch entweder ErbB2 (GL261/ErbB2) oder EGFR/EGFRvIII (GL261/EGFR, GL261/EGFRvIII) exprimieren, oder beide Zielantigene tragen (GL261/ErbB2/EGFR, GL261/ErbB2/EGFRvIII). Doppelt-positive Zellen wurden durch NKAR-NK-92 Derivate sowohl in Gegenwart nur eines NKAB-Moleküls als auch bei Kombination von NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR effektiv lysiert. Dagegen wurden gemischte Tumor-Kokulturen aus GL261/ErbB2 und GL261/EGFR oder GL261/EGFRvIII Zellen, die als Modell für heterogene Tumorpulationen dienten, nur effektiv lysiert, wenn beide NKAB-Moleküle vorhanden waren. Der alleinige Einsatz von NKAB-EGFR oder NKAB-ErbB2 vermittelte lediglich die Abtötung der jeweiligen, das relevante Antigen exprimierenden Zielzellsubpopulation, während Antigen-negative Tumorzellen trotz ihrer räumlichen Nähe unberührt blieben. Dies verdeutlicht die hohe Selektivität des experimentellen Ansatzes und legt nahe, dass eine Kombination von NKAB-Molekülen nützlich sein kann, um heterogene Tumorpulationen effektiv zu eliminieren.

Neben der Behandlung von soliden Tumoren wurde auch die Eignung des Kombinationsansatzes aus NKAR-NK-92 Derivaten und NKAB-Molekülen für die Therapie von hämatologischen B-Zell-Malignitäten untersucht. Sowohl CD19 als auch CD20 werden abhängig vom Differenzierungsgrad auf der Oberfläche von gesunden und malignen B-Zellen exprimiert und daher bereits erfolgreich als Zielstrukturen für unterschiedliche Krebsimmuntherapien genutzt. Basierend darauf wurden die Moleküle NKAB-CD19 und NKAB-CD20 generiert, welche analog zu NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR die NKG2D-bindende scFv(Kyk2.0)-Domäne tragen. Für die Bindung an CD19 und CD20 wurden scFv-Fragmente von den Antikörpern 4G7 (anti-CD19) und Leu16 (anti-CD20) abgeleitet und in den entsprechenden NKAB-Molekülen eingesetzt. Sowohl NKAB-CD19 als auch NKAB-CD20 waren in der Lage, Antigen-positive Leukämie- und Lymphomzellen zu binden und die Zytotoxizität von primären NK-Zellen und NKAR-NK-92 Derivaten zu vermitteln. Zudem wurde in Degranulationsassays auch für NKAB-CD19 und NKAB-CD20 nachgewiesen, dass selbst hohe Konzentrationen von löslichem Protein in Abwesenheit passender Zielzellen keine unspezifische Aktivierung der Effektorzellen induzieren. Erst durch die spezifische Bindung an Zielzellen ermöglichten sie die Kreuzvernetzung mit NKAR-exprimierenden NK-92 Zellen und die Exozytose lytischer Granula. Im Hinblick auf eine zukünftige Erprobung des Ansatzes in syngenem Leukämie- und Lymphommodellen in immunkompetenten Mäusen wurde zudem ein NKAB-mCD19 Molekül entwickelt, das mit der Bindungsstelle am N-Terminus das murine Antigen CD19 (mCD19) erkennt und C-terminal die NKG2D-Bindungsdomäne

Zusammenfassung

trägt. Auch die Spezifität dieses Moleküls wurde durch seine Bindung an die murine Lymphom-Zelllinie A20, primäre NK-Zellen und NKAR-NK-92 Derivate bestätigt. Darüber hinaus vermittelte NKAB-mCD19 eine gesteigerte Zytotoxizität von Effektorzellen gegenüber endogen mCD19-exprimierenden A20 Zellen.

Die in dieser Arbeit durch die Erweiterung und Optimierung des modularen Systems aus NKAR-NK-92 Derivaten und NKAB-Molekülen gewonnenen Daten belegen die hohe Flexibilität der eingesetzten NKAB-Moleküle, die sich durch den Austausch der scFv-Antikörperfragmente ohne einhergehenden Funktionsverlust variabel anpassen lassen. Darüber hinaus erwiesen sich die NKAB-Moleküle sowohl in Bindungsassays als auch in *in vitro* Zytotoxizitätsassays mit Tumor-Kokulturen als hochspezifisch. Eine Bindung erfolgte nur an Zellen, die das entsprechende Antigen exprimierten. Diese Bindung war auch Voraussetzung für die Eliminierung der Zielzellen durch NKAR-NK-92 Derivate. So wurde durch den experimentellen Kombinationsansatz eine erhöhte antitumorale Aktivität gegenüber Antigen-positiven und/oder NKG2D-L exprimierenden Tumorzellen erzielt. Des Weiteren waren NKAB-Moleküle in der Lage, primäre NK-Zellen mit Tumorzellen zu vernetzen. Im Fall von NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen aktivierte das sekretierte RD-IL15 auch benachbarte primäre Effektor-Lymphozyten. Entsprechend könnte ein Ansatz aus NKAB-Molekülen und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen neben einem direkten antitumoralen Effekt auch Zellen des endogenen Immunsystems gegen den Tumor aktivieren. Die hier erarbeiteten Erkenntnisse erlauben nun weiterführende Untersuchungen in Tumor-organoidmodellen, ergänzt durch primäre Immunzellen, und *in vivo* Experimente in immun-kompetenten Mausmodellen, um die anti-Tumor Aktivität und immunmodulatorische Wirkung des Kombinationsansatzes auch in komplexeren Systemen zu analysieren.

Inhaltsverzeichnis

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....	II
ZUSAMMENFASSUNG	III
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Entstehung und Immunüberwachung von Krebserkrankungen.....	1
1.1.1 Maligne Transformation von Zellen	1
1.1.2 Immunüberwachung und Immunoediting von Tumoren	2
1.2 Natürliche Killerzellen	4
1.2.1 Regulation der NK-Zell-Aktivität durch inhibierende und aktivierende Rezeptoren	5
1.2.2 Der aktivierende Rezeptor NKG2D und seine Rolle in der Immunüberwachung	7
1.2.3 Zytotoxische Effektormechanismen von NK-Zellen.....	11
1.3 Antikörper-basierte Immuntherapie von Krebserkrankungen	13
1.3.1 Einsatzmöglichkeiten unterschiedlicher Antikörperformate.....	14
1.3.2 Bi- und trispezifische Antikörper	17
1.4 Zelluläre Immuntherapie von Krebserkrankungen.....	19
1.4.1 Chimäre Antigenrezeptoren	20
1.4.2 Immuntherapie mit NK-Zellen	23
1.4.3 Kombinationstherapie aus NKG2D-CAR modifizierten NK-92 Zellen und einem bispezifischen Antikörper	29
1.5 Ziel der Arbeit	32
2 MATERIAL.....	34
2.1 Laborgeräte und Apparaturen.....	34
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	36
2.3 Chemikalien und Reagenzien	37
2.4 Puffer und Lösungen	38
2.5 Kits	39
2.6 Rekombinante Proteine	40
2.7 Antikörper und Nachweisreagenzien.....	42
2.8 Plasmide	43
2.9 Oligonukleotide	45

Inhaltsverzeichnis

2.10	Bakterienstämme	48
2.11	Bakterienmedien und Antibiotika	49
2.12	Zellkulturmedien und Zusätze	49
2.13	Eukaryotische Zelllinien und Kulturbedingungen	51
3	METHODEN	53
3.1	Molekularbiologische Techniken	53
3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	53
3.1.2	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	54
3.1.3	Ligation von DNA-Fragmenten	54
3.1.4	Isothermaler Zusammenbau nach Gibson.....	55
3.1.5	DNA-Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	55
3.1.6	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	56
3.1.7	Herstellung von chemokompetenten Bakterien	56
3.1.8	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	57
3.1.9	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	57
3.1.10	Bestimmung der DNA-Konzentration und DNA-Sequenzierung.....	58
3.2	Proteinbiochemische Methoden	58
3.2.1	Herstellung von Zelllysaten	58
3.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	59
3.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels NanoDrop	59
3.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	59
3.2.5	Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung	60
3.2.6	Immunoblot-Analyse	61
3.2.7	Reinigung von rekombinanten Proteinen.....	62
3.2.8	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	64
3.2.9	Erzeugung von fluorochromgekoppelten Antikörpern.....	65
3.3	Zellbiologische Methoden	65
3.3.1	Kultivierung von Zelllinien	65
3.3.2	Bestimmung der Zellzahl	66
3.3.3	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	66
3.3.4	Bestrahlung von Zellen	67
3.3.5	Transfektion von Zellen mittels FuGene.....	67
3.3.6	Transduktion von Zellen mit lentiviralen Vektorpartikeln.....	67
3.3.7	Selektion transduzierter Zellen.....	68
3.3.8	Proteinproduktion in transient transfizierten Expi293F Zellen	68
3.3.9	Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes.....	69

Inhaltsverzeichnis

3.3.10	Isolation von primären NK-Zellen aus humanem Blut.....	70
3.3.11	Durchflusszytometrische Analysen.....	70
3.3.12	Zytotoxizitätsassay	72
3.3.13	Degranulationsassay.....	73
3.3.14	Proliferationsassay	74
3.3.15	Transwell-Assays.....	74
3.4	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	77
3.5	Statistische Analysen	79
3.6	Graphische Darstellungen	79
4	ERGEBNISSE	80
4.1	Generierung und funktionelle Charakterisierung NKG2D-CAR-exprimierender NKAR-NK-92 Zellen.....	80
4.2	Funktionelle Charakterisierung RD-IL15-exprimierender NKAR-NK-92 Zellen.....	84
4.2.1	Nachweis von RD-IL15 im Zellkulturüberstand von NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen	84
4.2.2	Autokrine Aktivierung von NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen durch RD-IL15	86
4.2.3	Parakriner Effekt von sekretiertem RD-IL15 auf benachbarte Immunzellen.....	88
4.3	Zusammenfassung der Abschnitte 4.1 und 4.2	91
4.4	Generierung und funktionelle Charakterisierung bispezifischer Antikörper gerichtet gegen NKG2D und ErbB2	91
4.4.1	NKAB-ErbB2 als prototypisches NKAB-Molekül.....	92
4.4.2	Funktionelle Charakterisierung des bispezifischen Moleküls NKAB-ErbB2	93
4.4.3	Optimierung des NKAB-ErbB2 Moleküls.....	96
4.4.4	Kombination von NKAB-ErbB2 mit dem IL-15 Superagonisten RD-IL15	100
4.4.5	Zusammenfassung der Abschnitte 4.4.1 bis 4.4.4	105
4.5	Generierung und funktionelle Charakterisierung eines bispezifischen Antikörpers gerichtet gegen NKG2D und EGFR	105
4.5.1	Erweiterung des NKAB-Repertoires durch NKAB-EGFR.....	106
4.5.2	Funktionelle Charakterisierung des bispezifischen Moleküls NKAB-EGFR	108
4.5.3	Zusammenfassung der Abschnitte 4.5.1 und 4.5.2	113
4.6	Kombinationstherapie mit NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR	114
	Zusammenfassung des Abschnitts 4.6.....	125
4.7	Generierung und funktionelle Charakterisierung NKG2D-bindender bispezifischer Antikörper mit Selektivität für B-Zell-Malignitäten	125
4.7.1	Ableitung und funktionelle Charakterisierung des bispezifischen Antikörpers NKAB-CD19 ..	126
4.7.2	Ableitung und funktionelle Charakterisierung des bispezifischen Antikörpers NKAB-CD20 ..	131

Inhaltsverzeichnis

4.7.3	Zytotoxisches Potenzial von primären NK-Zellen in Kombination mit NKAB-CD19 und NKAB-CD20	136
4.7.4	Zusammenfassung der Abschnitte 4.7.1 bis 4.7.3	138
4.8	Ableitung und funktionelle Charakterisierung eines NKG2D-bindenden bispezifischen Antikörper mit Selektivität für murines CD19	138
5	DISKUSSION.....	143
5.1	Kombination von NKG2D-CAR-exprimierenden NK-92 Zellen (NKAR-NK-92) und einem bispezifischen NKAB-Molekül (NKAB-ErbB2) als modularer Behandlungsansatz	144
5.2	Optimierung des prototypischen NKAB-ErbB2 Moleküls.....	146
5.3	Steigerung der anti-Tumor Aktivität von Immunzellen durch RD-IL15.....	147
5.3.1	Die Rolle von IL-15 in der Krebsimmuntherapie.....	147
5.3.2	Der optimierte IL-15 Superagonist RD-IL15	148
5.3.3	Generierung von NKAB-Molekülen mit RD-IL15-Domäne	150
5.3.4	Generierung von RD-IL15-exprimierenden CAR-NK Zellen.....	151
5.3.5	Autokrine Wirkung von ektopisch exprimiertem RD-IL15	152
5.3.6	Parakrine Wirkung von RD-IL15 auf benachbarte Immunzellen	155
5.4	Das NKAB/NKAR-System als modularer immuntherapeutischer Ansatz.....	157
5.4.1	NKAB-EGFR	158
5.4.2	Kombinationstherapie mit NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR	162
5.4.3	Ableitung von NKAB-CD19 und NKAB-CD20 zur Behandlung von B-Zell-Malignomen	164
5.5	Ausblick	167
6	LITERATURVERZEICHNIS	170
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	208
	TABELLENVERZEICHNIS	210
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	211
	PUBLIKATIONEN	214
	DANKSAGUNG	217
	LEBENS LAUF	219

1 Einleitung

1.1 Entstehung und Immunüberwachung von Krebserkrankungen

Bereits im Jahr 2020 erkrankten etwa 500.000 Menschen in Deutschland erstmals an Krebs (RKI, 2019), der nach Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache weltweit darstellt (Hayes, 2020). Aufgrund des demografischen Wandels wird zudem zwischen 2015 und 2030 ein Anstieg der Neuerkrankungen von 23% prognostiziert (RKI, 2019).

1.1.1 Maligne Transformation von Zellen

Die Entstehung von Krebs basiert auf der Entartung körpereigener Zellen, die deren kontinuierliches und unkontrolliertes Wachstum zur Folge hat. Im Allgemeinen wird der mehrstufige Prozess der Karzinogenese durch Mutationen, Amplifikationen oder Deletionen in normalerweise streng regulierten Genen initiiert, wodurch die unter physiologischen Bedingungen herrschende Homöostase zwischen zellulären Prozessen wie der Proliferation, Differenzierung und Apoptose gestört wird. Irreversible somatische Mutationen, die eine Aktivierung von Onkogenen (*Gain of function*) verursachen oder zur Deaktivierung von Tumorsuppressorgenen (*Loss of function*) beitragen, spielen dabei eine maßgebliche Rolle und können sowohl durch eine genetische Prädisposition als auch chemische, physikalische und biologische Kanzerogene verursacht werden (Ames et al., 1995; Sarkar et al., 2013; Tysnes & Bjerkvig, 2007). Aufgrund der Fähigkeit, die Apoptose und Differenzierung zu unterbinden und die Zellteilung und das Zellwachstum zu fördern, induziert der Übergang von streng regulierten Proto-Onkogenen in transformierende, konstitutiv aktive und/oder überexprimierte Onkogene (*Gain of function*-Mutationen) wachstumspromovierende Effekte (Adamson, 1987; Weinstein & Joe, 2006). Durch Tumorsuppressorgene kodierte Proteine üben Kontrollfunktionen im Zellzyklus aus und sind in der Lage die Apoptose zu initiieren, wodurch sie einer ungehemmten Zellproliferation entgegenwirken können. Dementsprechend kann deren Funktionsverlust durch sogenannte *Loss of function*-Mutationen zur Entstehung und Progression von Tumoren beitragen (Weinberg, 1994). Die Karzinogenese lässt sich in die folgenden drei Phasen einteilen: Initiation, Promotion und Progression (Jones & Baylin, 2002; Vogelstein & Kinzler, 1993). Nachdem Zellen während der Initiation aufgrund somatischer Mutation in einen präneoplastischen Zustand übergehen, wird im Laufe der zunächst reversiblen Promotion durch die wiederholte Exposition mit tumorfördernden Faktoren (Promotoren) deren klonale Expansion induziert (Abel & DiGiovanni, 2015; Rundhaug &

Fischer, 2010). Durch die Akkumulation weiterer genetischer und epigenetischer Veränderungen während der Phase der Tumorprogression wird entsprechend der klonalen Selektionstheorie die Proliferation von Tumorzellen mit einer gesteigerten Wachstumsrate und/oder einem erhöhten invasiven Potenzial begünstigt. Bei fortschreitendem Tumorwachstum setzt sich dieser Prozess mehrfach fort, wobei sich häufig heterogene Tumorphysologien mit einer gesteigerten Malignität ausbilden (Cooper, 2000; Nowell, 1976).

1.1.2 Immunüberwachung und Immunoediting von Tumoren

Bereits im Jahr 1909 stellte Paul Ehrlich die Hypothese auf, dass entartete Zellen durch das körpereigene Immunsystem eliminiert werden, und prägte somit das moderne Verständnis einer Tumormunität (Ehrlich, 1909). Ausgehend von dieser Hypothese entwickelten Thomas und Burnet die Theorie der *Immunosurveillance*, die eine Erkennung und Beseitigung von Tumorzellen durch das Immunsystem anhand veränderter Oberflächenstrukturen beschreibt (Burnet, 1957; Thomas, 1982). Ein Beweis der Theorie erfolgte allerdings erst viele Jahre später unter anderem durch Tierversuche, in welchen gezeigt werden konnte, dass immundefiziente Mäuse häufiger spontane und karzinogen-induzierte Tumoren entwickelten als immunkompetente Tiere (Dunn et al., 2006). Jedoch wurde auch deutlich, dass insbesondere Tumorzellen, die sich in Anwesenheit eines intakten Immunsystems entwickelten, nach der erneuten Transplantation in immunkompetente Mäuse aggressiver wachsende Tumoren ausbildeten als Zellen, die aus immundefizienten Tieren isoliert wurden (Shankaran et al., 2001). Diese Beobachtungen bildeten die Grundlage für die Hypothese des *Immunoediting*, laut der das Immunsystem nicht nur zu einer Eliminierung von entarteten Zellen beiträgt, sondern durch einen anhaltenden Selektionsdruck auch die Etablierung von Tumorzellvarianten fördert, die sich durch eine erhöhte Immuntoleranz auszeichnen. Die Hypothese des *Immunoediting* lässt sich dabei in die aufeinanderfolgenden Phasen der Eliminierung, dem Equilibrium und dem Tumor-Escape unterteilen (Dunn et al., 2004). In der Phase der Eliminierung werden Tumorzellen entsprechend der *Immunosurveillance* Theorie vom Immunsystem erkannt und eliminiert. Aufgrund ihres invasiven Wachstums können Tumorzellen lokale Gewebeschäden verursachen, wodurch *Damage-associated molecular pattern* (DAMP) Moleküle und pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine freigesetzt werden (Garg et al., 2013). Diese tragen zur Rekrutierung von Immunzellen des angeborenen Immunsystems und deren Einwanderung in das inflammatorische Gewebe bei. In diesem Zusammenhang sind unter anderem natürliche Killerzellen (NK-Zellen), welche im nachfolgenden Abschnitt 1.2 im Detail beschrieben werden, natürliche Killer-T (NKT)-Zellen, $\gamma\delta$ T-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen (*Dendritic cell*, DC) zu nennen (Girardi et al., 2001; Guerra et al., 2008; Smyth et al., 2001). NK-, NKT- und $\gamma\delta$ T-Zellen erkennen

Einleitung

Tumorzellen aufgrund phänotypischer Veränderungen wie der Expression von Stressliganden und sekretieren nachfolgend IFN- γ (Dunn et al., 2002; Khong & Restifo, 2002). Durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine werden weitere NK-Zellen und Makrophagen rekrutiert, die sich durch die Sekretion von IFN- γ und IL-12 gegenseitig aktivieren und nachfolgend die Lyse von Tumorzellen induzieren (Ikeda et al., 2002; Trinchieri, 1995). Die bei der Beseitigung von Tumorzellen entstehenden Zelltrümmer können durch lokale DCs mittels Endozytose bzw. Phagozytose aufgenommen und prozessiert werden (Sallusto & Lanzavecchia, 2002). DCs wandern anschließend in ableitende Lymphknoten ab, wo sie durch die Präsentation von Antigenen im Komplex mit MHC-Klasse-II (*Major histocompatibility complex*, MHC) Molekülen CD4⁺ T-Helferzellen (T_H1 Zellen) stimulieren und eine MHC-Klasse-I-vermittelte Kreuzpräsentation für zytotoxische CD8⁺ T-Zellen (*Cytotoxic T lymphocyte*, CTL) ermöglichen (Comber & Philip, 2014; Dunn et al., 2002). Für ihre vollständige Aktivierung benötigen CTLs ein zweites Signal, das durch die Bindung von kostimulatorischen Rezeptoren auf T-Zellen und entsprechenden Liganden auf professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (*Antigen presenting cell*, APC) vermittelt wird (Chen & Flies, 2013). Anschließend migrieren aktivierte Tumor-spezifische CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen über Blutgefäße in Richtung Tumor, wo sie zusammen mit dem angeborenen Immunsystem maligne Zellen eliminieren (Ostroumov et al., 2018).

Ist es dem Immunsystem nicht möglich, Tumorzellen vollständig zu beseitigen, tritt die nächste Phase, das Equilibrium, ein, in der sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Tumorzellproliferation und der Eliminierung einzelner maligner Zellen einstellt. Dies bedingt eine Stagnation des Tumorwachstums und stellt die längste Phase des *Immunoediting* dar, in der Tumorzellen über einen langen Zeitraum bestehen (Lasek, 2022; O'Donnell et al., 2018). Allerdings können durch den anhaltenden Selektionsdruck während der Gleichgewichtsphase auch progressiv wachsende Tumorzellvarianten entstehen, die durch angeeignete Evasionsmechanismen eine Immuntoleranz induzieren und in die *Escape*-Phase übergehen (Hanahan, 2022; Lasek, 2022). Die der Immunevasion zugrundeliegenden Mechanismen können dabei von Tumorzellen selbst oder aufgrund eines immunsuppressiven Tumormikromilieus (*Tumor microenvironment*, TME) vermittelt werden. Unter anderem wird durch eine reduzierte Expression von MHC-Klasse-I Molekülen oder eine fehlerhafte Antigen-Prozessierung die Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen durch zytotoxische T-Zellen verhindert (Vinay et al., 2015). Ebenso können Tumorzellen inhibitorische *Immune-Checkpoint*-Liganden wie *Programmed cell death ligand 1* (PD-L1) oder nicht klassische MHC-Moleküle exprimieren, welche die Aktivität von Immunzellen negativ beeinflussen und/oder die Entstehung eines dysfunktionalen Phänotyps fördern (Creelan & Antonia, 2019; Morandi & Airoidi, 2022; Zhang et al., 2020). Ein weiterer Aspekt der Immunevasion ist die Sekretion löslicher immunsuppressiver

Faktoren wie Interleukin (IL)-10 oder TGF- β (*Transforming growth factor* β), wodurch Effektorzellen gehemmt und die Infiltration von Immunzellen vermindert wird (Tormoen et al., 2018; Vinay et al., 2015). Diese und zahlreiche weitere Mechanismen fördern die Immuntoleranz gegenüber Tumorzellen und tragen zur Progression der Krebserkrankung bei (Khong & Restifo, 2002; Quezada et al., 2011).

1.2 Natürliche Killerzellen

NK-Zellen sind Teil des angeborenen Immunsystems und stellen die erste Verteidigungslinie zur Bekämpfung von malignen und virusinfizierten Zellen dar (Herberman et al., 1975; Kiessling et al., 1975). Wie auch die Antigen-spezifischen Lymphozyten des adaptiven Immunsystems gehen sie aus einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle (*Common lymphoid progenitor*, CLP) hervor (Murphy & Weaver, 2018). Im peripheren Blut beträgt der Anteil an NK-Zellen etwa 5-20% der zirkulierenden Lymphozyten, die sich durch einen CD56⁺CD3⁻ Phänotyp von anderen Immunzellen abgrenzen lassen (Abel et al., 2018; Langers et al., 2012; Vivier et al., 2008). Weiterhin werden NK-Zellen basierend auf ihrem Expressionsniveau des Zelladhäsionsmoleküls CD56 und des Fc γ -Rezeptors CD16 (Fc γ RIIIa) in zwei Subpopulationen unterteilt, die sich hinsichtlich ihrer Funktion, prozentualer Verteilung und Lokalisation unterscheiden: zytotoxische CD56^{dim}CD16^{bright} und immunregulatorische CD56^{bright}CD16^{dim/neg} NK-Zellen (Lanier et al., 1986). CD56^{dim}CD16^{bright} NK-Zellen, die ca. 90% der NK-Zellen im peripheren Blut ausmachen, besitzen große Mengen Perforin- und Granzym-haltiger Granula und weisen hauptsächlich zytotoxische Eigenschaften auf (Anfossi et al., 2006; Cooper et al., 2001). Um in umliegendes, vorwiegend entzündliches Gewebe migrieren zu können und dort Effektorfunktionen auszuüben, exprimieren CD56^{dim}CD16^{bright} NK-Zellen die Chemokinrezeptoren CXCR1 und CX3CR1 (Campbell et al., 2001). Im Gegensatz dazu zeichnen sich die als weniger zytotoxisch beschriebenen CD56^{bright}CD16^{dim/neg} NK-Zellen durch die Expression von *Homing* Rezeptoren sowie Adhäsionsmolekülen (z.B. CCR7 und CD62L) für sekundäre lymphatische Organe aus und sekretieren nach Aktivierung hohe Mengen an Zytokinen wie IFN- γ , Tumornekrosefaktor α (TNF α) und den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktor (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) (Cooper et al., 2001). CD56^{bright}CD16^{dim/neg} NK-Zellen tragen damit vorwiegend zur Modulation der adaptiven Immunantwort bei und gelten als immunregulatorische NK-Zell Subpopulation (Carrega & Ferlazzo, 2012).

1.2.1 Regulation der NK-Zell-Aktivität durch inhibierende und aktivierende Rezeptoren

NK-Zellen exprimieren eine Vielzahl verschiedener Keimbahn-kodierter Rezeptoren und können, nachdem sie über die Bindung von Liganden mit Zielzellen in Kontakt getreten sind, durch das komplexe Zusammenspiel der Rezeptor-vermittelten Signale zwischen gesunden und gestressten, entarteten oder virusinfizierten Zellen unterscheiden (Cerwenka & Lanier, 2001; Lanier, 2004). Gesunde Zellen mit physiologischer MHC-Klasse-I Expression induzieren eine dominierende Signaltransduktion über inhibierende Rezeptoren, sodass eine Selbsttoleranz erzeugt und eine Lyse durch NK-Zellen verhindert wird (Kruse et al., 2014; Long et al., 2013; Watzl, 2014). Im Gegensatz dazu weisen transformierte oder virusinfizierte Zellen häufig eine verminderte MHC-Klasse-I Expression auf (*Missing self*) und/oder exprimieren stressinduzierte Liganden (*Induced self*), sodass vorwiegend aktivierende Signale integriert werden und die Lyse der Zielzelle vermittelt wird (Pazina et al., 2017). Während der Entwicklung durchlaufen NK-Zellen einen Prozess, der als *Education/Licensing* bezeichnet wird, und sie erst nach Interaktion mit MHC-Klasse-I Molekülen funktionell reifen und ihr volles Effektorpotenzial entfalten lässt. Dabei gehen NK-Zellen ohne inhibitorische Rezeptoren zur Erkennung von Selbst-Antigenen aufgrund ihres autoreaktiven Potenzials in einen hyporeaktiven Zustand über (Sivori et al., 2019).

Die meisten aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren zur Erkennung von Zielzellen lassen sich in die folgenden Gruppen einteilen: natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren (*Natural cytotoxicity receptor*, NCR), Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (*Killer cell immunoglobulin-like receptor*, KIR), Leukozyten-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (*Leukocyte immunoglobulin-like receptor*, LIR/ILT) und Killerzell-Lektin-ähnliche Rezeptoren (*Killer cell lectin-like receptor*, KLR) (Finton & Strong, 2012). Die KIR-Familie beinhaltet sowohl inhibierende als auch aktivierende Rezeptoren, welche sich in der Länge ihrer zytoplasmatischen Domäne und der Art ihrer Signaltransduktion unterscheiden. Die Erkennung körpereigener Zellen durch inhibitorische KIRs erfolgt durch die Bindung an die klassischen humanen MHC-Klasse-I Moleküle HLA-A, HLA-B und HLA-C (Humanes Leukozytenantigen, HLA), die von allen kernhaltigen gesunden Zellen exprimiert werden. Durch die Transduktion inhibitorischer Signale aufgrund der KIR/MHC Interaktion wird eine NK-Zell-vermittelte Lyse gegen gesunde Körperzellen verhindert (Paul & Lal, 2017; Pegram et al., 2011). Auch Vertreter der LIRs lassen sich in aktivierende und inhibierende Rezeptoren unterteilen, wobei sie im Gegensatz zu KIRs neben klassischen HLA-Molekülen auch die nicht-klassischen Leukozytenantigene HLA-E, HLA-F und HLA-G erkennen (Lee et al., 1998; Shiroishi et al., 2003). Nicht-klassische HLA-E Moleküle werden zusätzlich durch Mitglieder der KLRs gebunden, die inhibitorische (NKG2A/CD94 und NKG2B/CD94) sowie aktivierende (NKG2C/CD94, NKG2E/CD94 und NKG2H/CD94) Rezeptorkomplexe umfassen

(Houchins et al., 1991; Lanier et al., 1998). Zu den aktivierenden Rezeptoren zählen unter anderem die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren NKp30, NKp44, NKp46 und NKp80. Mit Ausnahme des Rezeptors NKp44, der erst nach NK-Zell Aktivierung auf der Oberfläche vorzufinden ist, werden alle weiteren NCRs sowohl von ruhenden als auch aktivierten NK-Zellen exprimiert (Fuchs et al., 2005; Moretta et al., 2001). Bisher identifizierte Liganden für NCRs wie beispielsweise B7-H6, BAG6, Galectin-3 oder Hämagglutinin sind sowohl auf Tumorzellen als auch auf virusinfizierten Zellen zu finden, wodurch NCRs maßgeblich zur Lyse pathologisch veränderter Zellen beitragen (Barrow et al., 2019; Brandt et al., 2009; Mandelboim et al., 2001; Ponath et al., 2021). Darüber hinaus interagieren NK-Zellen unter anderem über den Rezeptor NKp30 mit DCs und nehmen Einfluss auf deren Reifungszustand und Qualität (Hudspeth et al., 2013; Zhang et al., 2017). Neben NCRs können NK-Zellen zusätzlich den Fc-Rezeptor CD16 exprimieren, der nach Interaktion mit dem Fc-Teil von an Zielzellen gebundenen IgG-Molekülen, hauptsächlich IgG1 und IgG3, eine Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (*Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) induzieren kann (Stern-Ginossar & Mandelboim, 2010).

Die Signaltransduktion über aktivierende Rezeptoren erfolgt über akzessorische Adaptormoleküle wie beispielsweise FcεR1γ, CD3ζ und DAP12, welche als Homo- oder Heterodimere vorliegen und sogenannte Immunrezeptor Tyrosin-basierte Aktivierungsmotive (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, ITAM) mit der charakteristischen Aminosäuresequenz YxxL/Ix₍₆₋₈₎YxxL/I tragen (Lanier, 2008). Nach Rezeptor-Liganden-Interaktion erfolgt die Phosphorylierung von Tyrosinresten innerhalb des ITAM durch Tyrosinkinasen der Src-Familie, welche nachfolgend die Rekrutierung und Aktivierung der Tyrosinkinasen Syk (*Spleen tyrosin kinase*) und Zap70 (*Zeta-chain associated protein 70*) induzieren. Durch die daraus folgende Phosphorylierung weiterer Signalmediatoren wie Phospholipase C und Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) wird der Einstrom von Calcium-Ionen, die Reorganisation des Zytoskeletts und letztlich die Freisetzung zytotoxischer Granula und die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen induziert (Paul & Lal, 2017). Im Gegensatz dazu tragen inhibitorische Rezeptoren ein gemeinsames zytoplasmatisches Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Inhibierungsmotiv (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*, ITIM), das durch die konservierte Aminosäuresequenz S/I/V/LxYxxL/V definiert ist (Lanier, 2008). Nach Rezeptoraktivierung werden Tyrosin-Reste innerhalb des ITIM durch Kinasen der Src-Familie phosphoryliert, wodurch die Phosphatasen SHIP (*SH2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase*), SHP-1 und SHP-2 (*SH2-containing protein tyrosine phosphatase-1/2*) rekrutiert werden (Tomasello et al., 2000). Diese sind wiederum in der Lage, durch Dephosphorylierung essenzieller Signalmediatoren in die durch aktivierende Rezeptoren induzierte Signaltransduktionskaskade einzugreifen und somit die Degranulation, Zytokinproduktion und Proliferation von NK-Zellen zu hemmen (Lanier, 2008). Die Integration

simultaner inhibierender und aktivierender Signale resultiert folglich in der Dominanz inhibierender Signale und verhindert die durch aktivierende Rezeptoren induzierten Effektorfunktionen (Levi-Schaffer & Mandelboim, 2018; Long et al., 2013).

1.2.2 Der aktivierende Rezeptor NKG2D und seine Rolle in der Immunüberwachung

Eine zentrale Rolle in der Immunüberwachung und antitumoralen Immunantwort übernimmt der aktivierende Rezeptor NKG2D (*Natural Killer Group 2D*), welcher von NK-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, den meisten NKT-Zellen und Subpopulationen von CD4⁺ und $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert wird. NKG2D gehört zu den KLRs, liegt jedoch im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der NKG2-Rezeptorfamilie, die mit CD94 assoziieren, als homodimeres Typ-II-Transmembranprotein vor (Raulet, 2003). NKG2D interagiert mit acht verschiedenen Liganden (NKG2D-L), welche in ihrer Struktur MHC-Klasse-I Molekülen ähneln und den Familien der MHC-Klasse-I-ähnlichen Moleküle (*MHC class I chain-related sequence A/B*, MICA/B) und den UL16-bindenden Proteinen (ULBP1-6) angehören (**Abbildung 1.1**) (Eagle & Trowsdale, 2007; Lazarova et al., 2020; Lerner et al., 2023; Nausch & Cerwenka, 2008). Im Gegensatz zu dem hoch konservierten Rezeptor sind NKG2D-L mit über 70 identifizierten Allelen sehr polymorph und können nach Bindung an NKG2D unterschiedliche Effektorfunktionen vermitteln (Fan et al., 2022; Radosavljevic et al., 2002; Stephens, 2001). Zur Weiterleitung aktivierender Signale assoziiert humanes NKG2D mit dem Adaptormolekül DAP10, welches im Gegensatz zu den akzessorischen Adaptormolekülen Fc ϵ R1 γ , CD3 ζ und DAP12 kein ITAM, sondern ein YXNM-Motiv enthält. Phosphoryliertes DAP10 rekrutiert und aktiviert PI3-K sowie den Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*)-Vav1 (*Vav guanine nucleotide exchange factor 1*)-Komplex, wodurch die Exozytose lytischer Granula und/oder Zytokinsekretion vermittelt wird (Jamieson et al., 2002; Upshaw et al., 2006; Zingoni et al., 2018). Während NKG2D auf CD8⁺ T-Zellen als ko-stimulatorischer Rezeptor agiert, der nach TCR (*T cell receptor*)-Stimulierung zur T-Zellproliferation und der Sekretion von Zytokinen wie IL-2 und IFN- γ beiträgt, vermittelt die NKG2D/NKG2D-L Interaktion in NK-Zellen auch bei gleichzeitiger Signaltransduktion inhibierender Rezeptoren deren zytotoxische Aktivität (Bauer et al., 1999; Bryceson et al., 2006; Groh et al., 2001; Maasho et al., 2005; Zingoni et al., 2018).

Einleitung

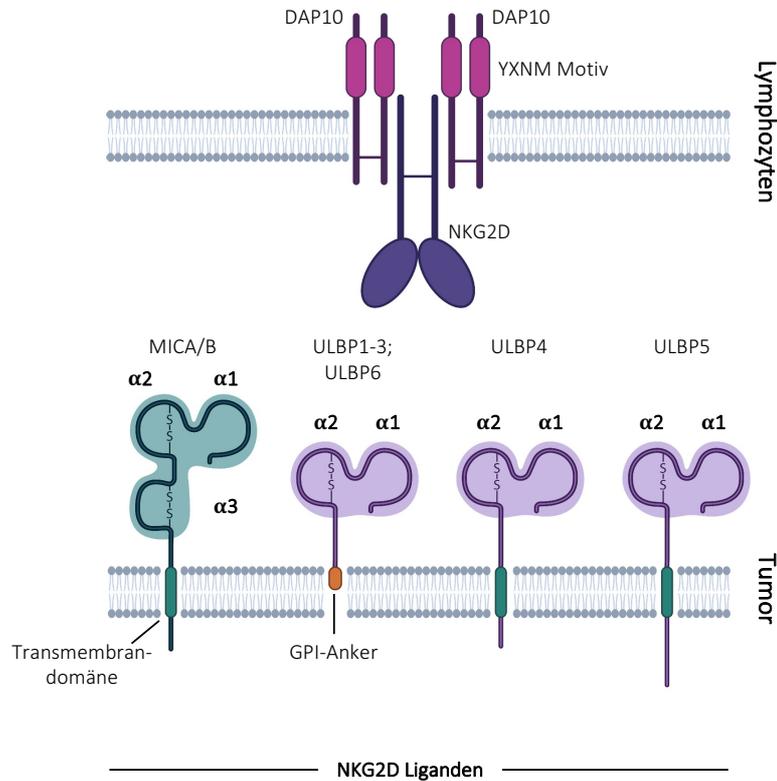


Abbildung 1.1. NKG2D-Rezeptor und seine Liganden. Der humane NKG2D-Rezeptor ist ein homodimeres Typ-II-Transmembranprotein, welches zur Signalweiterleitung mit dem Adaptormolekül DAP10 assoziiert, in dem ein YXNM Motiv integriert ist. NKG2D erkennt stressinduzierte Liganden (NKG2D-L), welche entweder den MHC-Klasse-I-ähnlichen Molekülen (MICA und MICB) oder UL16-bindenden Proteinen (ULBP1-6) zugeordnet werden. Neben den in allen Liganden enthaltenen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Domänen des MHC-Klasse-I-Komplexes besitzen MICA und MICB zusätzlich eine $\alpha 3$ Domäne. Die UL16-bindenden Proteine ULBP1-3 und ULBP6 sind über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker und MICA, MICB, ULBP4 und ULBP5 über eine Transmembrandomäne und einen zyttoplasmatischen Anteil in der Zellmembran verankert. NKG2D-L werden hauptsächlich auf der Zelloberfläche als Folge von zellulärem Stress exprimiert. Modifiziert nach (Eagle & Trowsdale, 2007).

Aufgrund der streng regulierten Expression von NKG2D-L auf transkriptioneller, translationaler und posttranslationaler Ebene sind die Glykoproteine kaum auf der Oberfläche gesunder Zellen zu finden. Jedoch kann zellulärer Stress, beispielsweise bedingt durch eine virale Infektion oder maligne Transformation, zu einer gesteigerten Ligandenexpression beitragen (Lanier, 2015). So können unter anderem DNA-Reparaturmechanismen (*DNA damage response*, DDR) verschiedene Transkriptionsfaktoren wie p53 oder E2F1 aktivieren, die nachfolgend die Transkription unterschiedlicher NKG2D-L stimulieren (Soriani et al., 2014, 2017; Textor et al., 2011). Weitere, während der malignen Transformation von Zellen beobachtete Prozesse, wie die Aktivierung von Hitzeschockproteinen und onkogenen Signalwegen sowie oxidativer Stress, können die NKG2D-L Expression zusätzlich beeinflussen (Borchers et al., 2006; Groh et al., 1996; Nanbakhsh et al., 2014; G. Tan et al., 2023; Yamamoto et al., 2001).

Bedingt durch die nahezu universelle Expression von NKG2D-L auf transformierten Zellen bei gleichzeitiger Abwesenheit auf gesunden Zellen wird dem Rezeptor eine maßgebende Rolle bei der Immunüberwachung von Tumorzellen zugeschrieben. Allerdings induziert der anhaltende Selektionsdruck einer fortwährenden Immunabwehr auch die Etablierung von Tumorzell-Varianten, die durch bestimmte Evasionsmechanismen einer NKG2D-vermittelten Erkennung entgehen können. Neben der epigenetischen Regulation beispielsweise durch Histon-Deacetylierung und DNA-Methylierung von NKG2D-L kodierenden Genen, zeigten unterschiedliche Studien unter anderem, dass NKG2D-L im endoplasmatischen Retikulum von Tumorzellen zurückgehalten und nicht an die Zelloberfläche transportiert werden (Chen et al., 2011; Fuertes et al., 2008; Tan et al., 2023). Ein weiterer, bedeutender Mechanismus ist die von Tumorzellen vermittelte Freisetzung von löslichen Liganden (*soluble* NKG2D-L, sNKG2D-L). Diese können NKG2D auf Immunzellen dauerhaft blockieren, was zur Internalisierung und Degradation des Rezeptors sowie zur Desensibilisierung von Effektor-Lymphozyten führt (Groh et al., 2002; Hilpert et al., 2012; Song et al., 2006). Die prognostische Bedeutung dieses Immunevasionsmechanismus zeigt sich in der Korrelation einer erhöhten Serumkonzentration löslicher Liganden mit einem schlechteren Therapieansprechen sowie Gesamtüberleben (*Overall survival*, OS) in Krebspatienten (Groh et al., 2002; Schmiedel & Mandelboim, 2018). Beispielsweise korrelierte in Melanom-Patienten eine erhöhte sULBP2 Serumkonzentration mit einem reduzierten OS. In einer weiteren Studie wurde ein verkürztes Überleben von Patienten mit erhöhter sMICA Serumkonzentration nach Immuntherapie mit dem Checkpoint-Inhibitor Ipilimumab festgestellt (Koguchi et al., 2015; Paschen et al., 2009). Darüber hinaus lässt sich die Beobachtung, dass Patienten mit fortgeschrittener Krebserkrankung häufig eine verminderte Anzahl zirkulierender NKG2D-exprimierender NK-Zellen aufweisen und verbleibende NK-Zellen in ihrer zytotoxischen Aktivität beeinträchtigt sind, unter anderem auf die Anwesenheit von sNKG2D-L zurückführen (Dobrovina et al., 2003; Secchiari et al., 2022; Shen et al., 2012). Die proteolytische Abspaltung von NKG2D-L erfolgt hauptsächlich durch die in Tumorzellen häufig überexprimierten Metalloproteasen ADAM (*A disintegrin and metalloproteinase*) 10 und 17 sowie MMPs (Matrix-Metalloproteasen) (Chitadze et al., 2013; Mustafa et al., 2022; Salih et al., 2002; Wang et al., 2022; Yuan et al., 2020; Zingoni et al., 2018). Darüber hinaus zeigten weitere Untersuchungen, dass sowohl Mitglieder der MIC- als auch ULBP-Familie in Tumorexosomen nachweisbar sind, die sowohl zur Herunterregulierung von NKG2D auf mononukleären Zellen des peripheren Bluts (*Peripheral blood mononuclear cell*, PBMC) als auch zu einer verminderten zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen beitragen (Ashiru et al., 2010; Clayton et al., 2008; Fernández-Messina et al., 2010; Hedlund et al., 2011; Labani-Motlagh et al., 2016).

Aufgrund der zentralen Rolle der NKG2D/NKG2D-L-Achse bei der Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen durch zytotoxische Lymphozyten werden, wie auch in dieser Arbeit, vielfältige Ansätze erforscht, diese Mechanismen für immuntherapeutische Strategien zu nutzen, die die NKG2D-vermittelte anti-Tumor Aktivität von Effektorzellen steigern (Lazarova et al., 2020). Einer dieser Ansätze beruht auf der Entwicklung bispezifischer Antikörper (siehe Abschnitt 1.3.2) mit Spezifität für NKG2D und ein Tumor-assoziiertes Antigen (TAA), wodurch auch unabhängig von der NKG2D-L Expression eine Quervernetzung von Tumor- und NKG2D-exprimierenden Effektorzellen ermöglicht wird. Weiterhin werden niedermolekulare Verbindungen (*Small molecules*) eingesetzt, um die Expression von NKG2D oder NKG2D-L zu steigern (Armeanu et al., 2005; De Andrade et al., 2020; Krieg & Ullrich, 2013; Lazarova & Steinle, 2019). Beispielsweise tragen hypomethylierende Substanzen und Histon-Deacetylase-Inhibitoren zu einer gesteigerten Oberflächenexpression von MICA/B und ULBPs auf malignen und infizierten Zellen bei (Baraganõ Raneros et al., 2014; Kato et al., 2007; Sers et al., 2009; Wu et al., 2012). Eine klinisch relevante Steigerung der Ligandenexpression wurde dabei in Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) nach der Behandlung mit All-trans-Retinsäure (*All-trans-retinoic acid*, ATRA) oder dem Histon-Deacetylase-Inhibitor Valproinsäure beobachtet (Poggi et al., 2009). Zudem induzierten AML-Blasten der behandelten Patienten im Gegensatz zu unbehandelten Blasten in *in vitro* Assays die Exozytose lytischer Granula von autologen CD8⁺T-Zellen und NK-Zellen, wodurch erste Hinweise auf die klinische Relevanz einer gesteigerten NKG2D-L Expression gewonnen werden konnten. Darüber hinaus befinden sich Antikörper in der Erprobung, die durch ihre Bindung an die α 3-Domäne der MICA/B-Liganden eine proteolytische Abspaltung durch Metalloproteasen verhindern. Durch den Einsatz solcher Antikörper konnte die NK-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen *in vitro* gesteigert und das Tumorwachstum in verschiedenen Mausmodellen verlangsamt werden (De Andrade et al., 2018, 2020). In einer klinischen Phase I Studie wird ein solcher MICA/B-spezifischer monoklonaler Antikörper bereits in Patienten mit soliden Tumorerkrankungen auf seine Verträglichkeit und Wirksamkeit überprüft (NCT05117476) (Wang et al., 2023). Zudem wird die im Abschnitt 1.4.1 näher beschriebene CAR (chimäre Antigenrezeptor)-Technologie genutzt, um NKG2D-CAR-exprimierende Effektorzellen zu generieren. Solche NKG2D-CAR T- und NK-Zellen befinden sich bereits in der klinischen Erprobung (Sallman et al., 2023; Xiao et al., 2019).

1.2.3 Zytotoxische Effektormechanismen von NK-Zellen

Die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität wird wie oben beschrieben durch das Zusammenspiel von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren reguliert. Die der Aktivierung zugrundeliegenden Mechanismen können sowohl durch die sogenannte *Missing self*- und *Induced self*-Hypothesen als auch das Prinzip der Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität beschrieben werden (**Abbildung 1.2**). Gesunde Körperzellen exprimieren MHC-Klasse-I Moleküle auf ihrer Zelloberfläche und können von NK-Zellen durch die Bindung an inhibierende Rezeptoren als solche erkannt und vor einer Lyse geschützt werden (Laskowski et al., 2022). Eine verminderte Expression oder Abwesenheit von körpereigenen MHC-Klasse-I Molekülen führt hingegen zu einer Reduktion oder dem Verlust inhibitorischer Signale, wodurch sich das Gleichgewicht in Richtung der aktivierenden Signaltransduktion verschiebt und eine NK-Zell-vermittelte Lyse der Zielzellen induziert (*Missing self*) (Ljunggren & Kärre, 1990; Vivier & Ugolini, 2011). Allerdings können auch Zielzellen mit physiologischer Expression von MHC-Klasse-I Molekülen von NK-Zellen eliminiert werden, wenn diese eine gesteigerte Expression bestimmter Oberflächenmoleküle aufweisen (*Induced self*) (Langers et al., 2012). Zellulärer Stress kann bspw. die Expression von NKG2D-L bedingen, die eine Erkennung und dominierende Signaltransduktion über aktivierende Rezeptoren vermitteln und somit die Beseitigung der Zielzelle durch NK-Zellen einleiten. Ebenso können NK-Zellen pathologisch veränderte Zellen über ADCC eliminieren. Diese beruht auf der Opsonierung von virusinfizierten oder malignen Zellen durch IgG-Antikörper, vorwiegend IgG1 und IgG3, und deren Erkennung durch den auf NK-Zellen exprimierten Fc-Rezeptor CD16 (Morvan & Lanier, 2015). Vor allem für den in Abschnitt 1.3 beschriebenen Einsatz therapeutischer Antikörper in der Krebsimmuntherapie ist die durch CD16 vermittelte Zytotoxizität von NK-Zellen von Bedeutung und wird im Folgenden genauer erläutert.

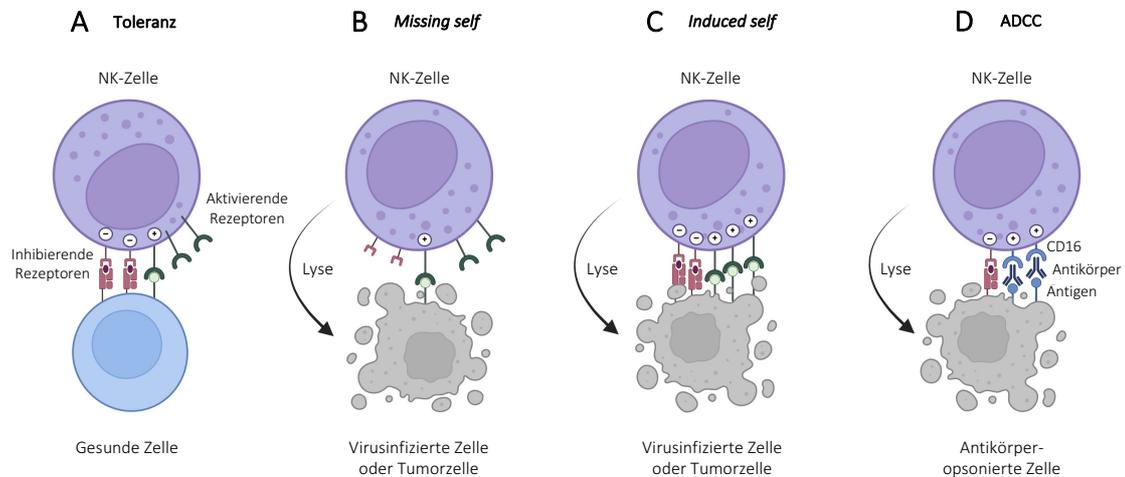


Abbildung 1.2. NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität. Die Zytotoxizität von NK-Zellen wird durch das Zusammenspiel von inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren reguliert. **(A)** Gesunde körpereigene Zellen exprimieren MHC-Klasse-I Moleküle auf ihrer Oberfläche, welche von inhibierenden Rezeptoren erkannt werden und durch die Weiterleitung inhibitorischer Signale innerhalb der NK-Zelle eine Toleranz vermitteln. **(B)** Gemäß der *Missing self*-Hypothese wird durch eine stark verminderte oder fehlende MHC-Klasse-I Expression das Gleichgewicht zugunsten aktivierender Signale verschoben und somit die Lyse der entsprechenden Zellen induziert. **(C)** Die *Induced self*-Hypothese beschreibt die Eliminierung von transformierten Zellen trotz der Expression von MHC-Klasse-I Molekülen. Durch die gesteigerte Expression von Liganden aktivierender Rezeptoren verschiebt sich das Gleichgewicht trotz simultaner Bindung von MHC-Klasse-I Molekülen durch inhibierende Rezeptoren in Richtung aktivierender Signale und die NK-Zell-vermittelte Lyse wird initiiert. **(D)** Darüber hinaus können mit Antikörpern opsonierte Zellen durch die Interaktion des aktivierenden Rezeptors CD16 mit der IgG-Fc-Domäne erkannt und eliminiert werden. ADCC: *Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*.

Die NK-Zell-vermittelte Eliminierung von Zielzellen kann sowohl über die Freisetzung zytotoxischer Granula als auch über eine Interaktion von Liganden wie Fas-L und TRAIL mit korrespondierenden Todesrezeptoren der Zielzellen erfolgen (Lieberman, 2003). Nach der Ausbildung einer immunologischen Synapse (IS) zwischen Ziel- und NK-Zelle und der Transduktion überwiegend aktivierender Signale an der Kontaktstelle wird der Inhalt lytischer Granula, darunter Perforin, Granzyme und Granulysin, zielgerichtet über Exozytose in den synaptischen Spalt freigesetzt (Ham et al., 2022; Krzewski & Coligan, 2012; Orange, 2008). In Folge einer Perforin-vermittelten Porenbildung in der Membran der Zielzelle wird diese permeabilisiert und für Effektormoleküle wie die Serinprotease Granzym B (GzmB) durchlässig. Diese vermittelt über die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 und der nachgeschalteten proteolytischen Kaskade die Apoptose der Zielzelle (Prager & Watzl, 2019). Darüber hinaus ist GzmB in der Lage, weitere Substrate wie beispielsweise BID (*BH3 interacting domain death agonist*) zu spalten, wodurch die Apoptose über den mitochondrialen Signalweg aufgrund der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und der Freisetzung von Cytochrom C eingeleitet wird (Cullen et al., 2010). Die Fähigkeit, lytische Granula und Effektorproteine zu recyceln oder neu zu synthetisieren, ermöglicht es NK-Zellen im Anschluss weitere

Zielzellen zu eliminieren, was als *Serial killing* bezeichnet wird (Bhat & Watzl, 2007; Li et al., 2011; Liu et al., 2005). Im Verlauf des *Serial killing* erfolgt die initiale Eliminierung von Zielzellen fast ausschließlich durch die Freisetzung von zytotoxischen Granula und erst nach Abnahme der intrazellulären Perforin- und Granzym-Konzentration und der Akkumulation von Todesliganden wie TRAIL und Fas-L auf der Oberfläche der NK-Zellen über Todesrezeptoren-vermitteltes Abtöten (Prager et al., 2019; Ramírez-Labrada et al., 2022). Dabei bildet sich nach Bindung der Liganden durch die Multimerisierung der zugehörigen Todesrezeptoren auf der Zielzelle und Assoziation mit Adaptorproteinen ein sogenannter DISC (*Death-inducing signal complex*), der die Rekrutierung und Aktivierung der Pro-Caspasen 8 und 10 zur Folge hat. Anschließend wird auch hier die Apoptose über mitochondriale oder Caspase-vermittelte Signalkaskaden induziert (Prager & Watzl, 2019).

1.3 Antikörper-basierte Immuntherapie von Krebserkrankungen

Eine Strategie zur Behandlung von Krebserkrankungen ist der Einsatz von monoklonalen Antikörpern (*Monoclonal antibody*, mAb), die aus einem Zellklon hervorgehen und durch ihre einheitliche Struktur und identische Antikörpersequenz spezifisch an ein bestimmtes Antigen binden können (Lipman et al., 2005). Der Grundstein für die therapeutische Anwendung monoklonaler Antikörper wurde durch die Entwicklung der Hybridoma-Technologie im Jahr 1975 gelegt, die erstmals eine Produktion von mAbs in hoher Konzentration und Reinheit durch eine Zelllinie erlaubte, die durch die Verschmelzung einer Antikörper-produzierenden B-Zelle und malignen Myelomzelle generiert wurde (Köhler & Milstein, 1975). Die erste Zulassung eines solchen Antikörpers erfolgte bereits in den späten 1980er Jahren mit dem für die Behandlung bei Abstoßungsreaktionen von Nierentransplantaten zugelassenen murinen monoklonalen Antikörper OKT3, der gegen das humane T-Zell-Antigen CD3 gerichtet ist (Ecker et al., 2015). Jedoch war der Einsatz von mAbs murinen Ursprungs mit nachteiligen Eigenschaften wie beispielsweise einer kurzen *in vivo* Halbwertszeit, einer reduzierten Fähigkeit ADCC oder komplementvermittelte Zytotoxizität (*Complement-dependent cytotoxicity*, CDC) zu stimulieren und aufgrund des immunogenen Charakters mit der Produktion neutralisierender humaner anti-Maus-Antikörper (*Human anti-murine antibody*, HAMA) verbunden (Ober et al., 2001; Stern & Herrmann, 2005). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden durch die Verknüpfung der Antigenbindungsdomäne muriner Antikörper mit den konstanten Bereichen humaner Antikörper sogenannte chimäre Antikörper entwickelt (Morrison et al., 1984), welche vorteilhaftere Eigenschaften wie bspw. eine verlängerte Halbwertszeit besitzen. Zwar weisen chimäre Antikörper auch eine verringerte Immunogenität als murine Antikörper auf, jedoch besteht weiterhin die Möglichkeit einer gegen die variablen murinen Sequenzen gerichteten Immunantwort (Presta, 2006). Durch weitere Modifikationen wurden daher humanisierte Antikörper entwickelt, bei

welchen lediglich die komplementaritätsbestimmenden Regionen (*Complementarity determining region*, CDR) murinen Ursprungs sind, während das restliche Molekül zu etwa 95% aus humanen Sequenzen besteht (Jones et al., 1986). Zusätzlich konnten durch die Nutzung humaner Antikörper-Phage-Display Bibliotheken und die Generierung transgener Mausstämme mit integriertem humanem Antikörpergen-Repertoire humane Antikörper abgeleitet werden (Carr et al., 1994; Little et al., 2000; Vaughan et al., 1996; Winter et al., 2003). Sowohl humanisierte als auch humane Antikörper sind dabei weniger immunogen und entsprechen in ihren Eigenschaften dem endogenen IgG (Baker et al., 2010). Dabei spielt neben den variablen Bereichen, welche die Spezifität des Antikörpers bestimmen, auch die Fc-Domäne des Antikörpers eine bedeutende Rolle. Diese ermöglicht die Vermittlung von Effektorfunktionen wie ADCC und CDC und beeinflusst maßgeblich die *in vivo* Halbwertszeit. Während ADCC und CDC vor allem durch IgG1 und IgG3 basierte mAb vermittelt werden, weisen die Isotypen IgG2 und IgG4 verminderte Effektorfunktionen auf (Natsume et al., 2008).

1.3.1 Einsatzmöglichkeiten unterschiedlicher Antikörperformate

Die Bedeutung von monoklonalen Antikörpern für die Behandlung von Krebserkrankungen wird beispielsweise durch den CD20-spezifischen Antikörper Rituximab und den ErbB2 (HER2)-spezifischen Antikörper Trastuzumab verdeutlicht, deren Zulassung einen Wendepunkt in der Antikörper-basierten Immuntherapie darstellte. So erzielte der im Jahr 1997 erstmals durch die US-Arzneimittelbehörde FDA (*Food and drug administration*) zur Behandlung des folliculären Non-Hodgkin-Lymphoms (NHL) zugelassene Antikörper Rituximab als Erstlinien-Therapie in Lymphom-Patienten Ansprechraten von über 70%. Auch der adjuvante und neoadjuvante Einsatz von Trastuzumab zur Behandlung des ErbB2-positiven Mammakarzinoms trug zu einer signifikanten Verbesserung des progressionsfreien Überlebens (*Progression-free survival*, PFS) und des Gesamtüberlebens von Patienten bei (Gianni et al., 2014; Hainsworth, 2002; Slamon et al., 2011). Für die therapeutische Anwendung wurden neben den klassischen Antikörperformaten in den letzten Jahren auch Antikörperfragmente, bi- und trispezifische Antikörper und Antikörper-Wirkstoff-Konjugate entwickelt (Jin et al., 2022). Eine Auswahl an Einsatzmöglichkeiten der unterschiedlichen Formate für die Krebsimmuntherapie ist in **Abbildung 1.3** gezeigt. Maligne Zellen können unter anderem durch Tumorantigen-spezifische Antikörpermoleküle gebunden und damit für das Immunsystem markiert werden. Neben einer induzierten CDC und ADCC durch NK-Zellen können manche Moleküle, wie bspw. der CD20-spezifische Antikörper Rituximab, auch intrinsische Signalkaskaden aktivieren, welche die Apoptose in Zielzellen einleiten (Ghetie et al., 1997; Maloney et al., 1997; Mattes et al., 2009; Tutt et al., 1998). Darüber hinaus werden Antikörper eingesetzt, um

die Interaktion zwischen aktivierenden Liganden und ihren Rezeptoren oder die Dimerisierung von Rezeptoren gezielt zu blockieren, sodass nachgeordnete Signaltransduktionskaskaden gehemmt werden. Diese Wirkmechanismen wurden ausführlich im Zusammenhang mit Rezeptoren der ErbB-Tyrosinkinase Familie erprobt, wobei vor allem die beiden klinisch zugelassenen ErbB2-spezifischen Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab für die Behandlung von metastasierendem ErbB2-positivem Brustkrebs zu erwähnen sind (Rimawi et al., 2015; Swain et al., 2020) (**Abbildung 1.3; A**). Eine weitere Strategie zur Behandlung von soliden Krebserkrankungen sind Angiogenese-inhibierende Antikörper, welche nicht an Tumorzellen selbst binden, sondern deren notwendige Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff abschneiden (Ferrara et al., 2004). Ein klinisch zugelassener Antikörper ist beispielsweise der in Kombination mit Chemotherapie eingesetzte VEGF-A (*Vascular endothelial growth factor A*)-spezifische monoklonale Antikörper Bevacizumab für die Behandlung unterschiedlicher Tumorentitäten wie dem metastasierenden Mamma- und Kolonkarzinom (Garcia et al., 2020) (**Abbildung 1.3; B**). Vielversprechende Therapieerfolge bei verschiedenen Krebserkrankungen, darunter Melanom, Lungen- und Nierenzellkarzinom, wurden zudem mit sogenannten Immuncheckpoint-Inhibitoren erzielt, welche regulatorische Rezeptoren (*Immune checkpoints*) auf Immunzellen oder deren Liganden auf Tumorzellen blockieren (**Abbildung 1.3; C**) (Page et al., 2014; Pardoll, 2012). Wichtige Checkpoint-Moleküle auf Immunzellen sind bspw. PD-1 (*Programmed cell death protein 1*) und CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), welche vor allem bei der Regulation und Aufrechterhaltung von T-Zell-Effektorfunktionen eine entscheidende Rolle spielen, sowie der Ligand PD-L1, der auf verschiedenen Zell- und Gewebetypen exprimiert wird und zur Immunhomöostase beiträgt (Keir et al., 2008; Nishimura et al., 1996). PD-L1 ist auch auf vielen Tumorzellen vorzufinden und trägt dort zur Unterdrückung einer effektiven Immunantwort bei, wodurch seine Expression häufig mit einem verschlechterten Krankheitsverlauf assoziiert ist (Eppihimer et al., 2002; Patel & Kurzrock, 2015; Yamazaki et al., 2002). Die Blockade solcher Immuncheckpoints mit Hilfe monoklonaler Antikörper kann daher zu einer robusten und langanhaltenden T-Zell-vermittelten Immunantwort beitragen (Page et al., 2014; Pardoll, 2012). Neben klinisch zugelassenen Antikörpern, welche mit CTLA-4, LAG-3 (*Lymphocyte-activation gene 3*) oder der PD-1/PD-L1 Achse interferieren, werden weitere mögliche Checkpoint-Moleküle wie TIM-3 (*T-cell immunoglobulin and mucin containing protein 3*) zurzeit als Angriffspunkt für Antikörpertherapien klinisch erprobt (Barth & Naran, 2022; Marin-Acevedo et al., 2021). Darüber hinaus befindet sich der NKG2A-spezifische Checkpoint-Inhibitor Monalizumab derzeit in mehreren klinischen Studien, unter anderem zur Behandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NCT05221840 und NCT05061550). Der inhibitorische Rezeptor NKG2A wird von CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen exprimiert und interagiert mit dem nicht-klassischen MHC-Molekül HLA-E, welches häufig auf malignen Zellen überexprimiert ist und der Aktivierung von Immuneffektorzellen entgegenwirkt (Van Hall et

al., 2019). Weitere therapeutische Strategien umfassen Radionuklid-gekoppelte Antikörper (**Abbildung 1.3; D**) und Antikörper-Wirkstoffkonjugate (*Antibody-drug conjugate*, ADC) (**Abbildung 1.3; E**), die durch ihre Spezifität radioaktive oder zytotoxische Substanzen gezielt zu Tumorzellen transportieren und ihre Wirkung nach Internalisierung in die Zelle entfalten (Bourgeois et al., 2017; Zolot et al., 2013). Auch die in den nachfolgenden Abschnitten eingehend erläuterten Immuntherapien mit bispezifischen Antikörpern (Abschnitt 1.3.2) (**Abbildung 1.3; F**) und CAR-Molekülen zur Expression in Effektorzellen (Abschnitt 1.4.1 und 1.4.2) (**Abbildung 1.3; G**) basieren auf der hochspezifischen Erkennung von Tumorzellen durch Antikörperdomänen.

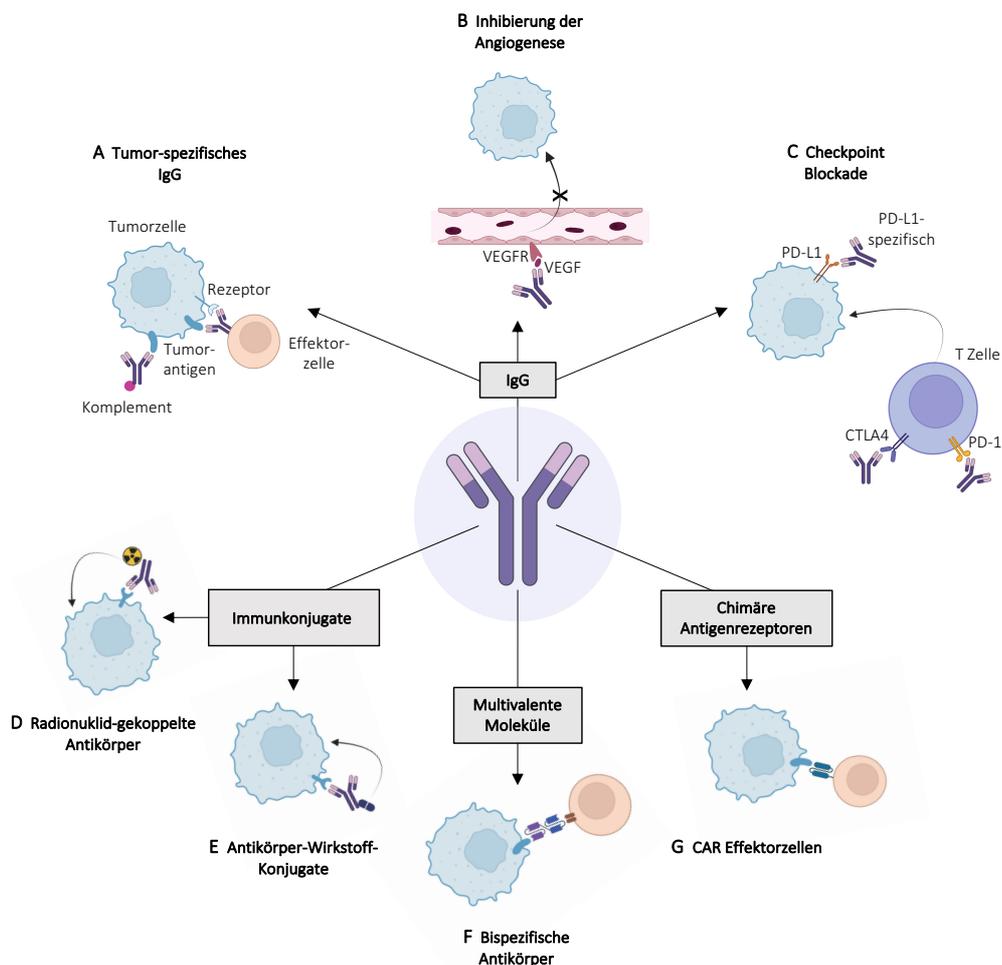


Abbildung 1.3. Strategien der Antikörper-basierten Krebsimmuntherapie. Wie in (A) gezeigt, können IgG-Moleküle an Tumorzellen binden und durch ihren Fc-Teil Effektorfunktionen wie ADCC (*Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) und CDC (*Complement-dependent cytotoxicity*) vermitteln. Des Weiteren wurden Antikörper entwickelt, welche die Neoangiogenese in soliden Tumoren inhibieren (B) oder *Immune Checkpoints* blockieren (C). Immunkonjugate können Radionuklide (D) oder zytotoxische Wirkstoffe (E) zielgerichtet zu Tumorzellen transportieren, welche nach Internalisierung ihre Wirkung entfalten. Bispezifische Antikörper vermitteln durch ihre zwei Bindungsdomänen eine direkte Kreuzvernetzung von Immuneffektorzellen und Tumorzellen (F). Die Expression Tumor-spezifischer CAR-Konstrukte in Immunzellen ermöglicht ebenso eine selektive Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen (G). Weitere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen. Modifiziert nach (Weiner, 2015).

1.3.2 Bi- und trispezifische Antikörper

Bispezifische Antikörper sind rekombinante Moleküle, die zwei Bindungsdomänen tragen und somit in der Lage sind, zwei verschiedene Antigene oder zwei unterschiedliche Epitope des gleichen Antigens zu erkennen, wobei es sich in der Krebsimmuntherapie dabei häufig um ein Tumor-assoziiertes Antigen und ein von Immunzellen exprimiertes Oberflächenprotein handelt (Wang et al., 2019). Generell lassen sich bispezifische Antikörper aufgrund ihrer Struktur in scFv (*single-chain fragment variable*)- und IgG-basierte Formate unterteilen. Einzelne scFv-Domänen werden dabei durch die Verknüpfung der variablen Domänen der leichten und schweren Ketten eines IgG-Moleküls über einen Peptidlinker generiert. Bispezifische, scFv-basierte Antikörpermoleküle, welche über eine ihrer zwei scFv-Domänen T-Zellen über CD3 binden und deren MHC-Klasse-I-unabhängige Aktivierung ermöglichen, werden als sogenannte bispezifische T-Zell-Antikörper (*Bispecific T-cell engager*, BiTE) bezeichnet (Chandran & Klebanoff, 2019). Ein Vertreter ist dabei der erste durch die FDA und die Europäische Arzneimittel-Agentur EMA im Jahr 2018 für die Behandlung einer rezidivierenden oder refraktären akuten lymphatischen Leukämie mit B-Zell-Ursprung (B-ALL) zugelassene BiTE Blinatumomab, welcher CD3 auf T-Zellen und CD19 auf Leukämie- und Lymphomzellen bindet (Mullard, 2015). Aufgrund ihrer verhältnismäßig geringen molekularen Masse von etwa 55 kDa und dem fehlenden Fc-Teil haben BiTEs eine kurze Serumhalbwertszeit von lediglich zwei bis vier Stunden, sodass eine kontinuierliche Infusion der Antikörper für eine optimale Wirkung notwendig ist (Labrijn et al., 2019). Neben dem verringerten Sicherheitsrisiko bedingt durch eine verkürzte Halbwertszeit bei auftretenden Nebenwirkungen weisen kleinere Antikörperformate eine erhöhte Gewebegängigkeit auf (Baeuerle & Reinhardt, 2009; Smits & Sentman, 2016; Sun et al., 2023). Im Gegensatz zu scFv-basierten bispezifischen Antikörpern können IgG-basierte Formate durch den enthaltenen Fc-Teil je nach IgG-Subklasse zusätzliche Effektorfunktionen vermitteln (Carter, 2006). Zudem entgehen endozytierte IgG-Antikörper durch die Bindung an den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) ihrem proteasomalen Abbau im Lysosom und werden stattdessen zurück an die Zelloberfläche transportiert und freigesetzt. Dies erklärt die deutlich längere Serumhalbwertszeit von IgG-Molekülen von 2-4 Wochen im Vergleich zu anderen Antikörperformaten (Ward et al., 2003). Bis zum heutigen Tag wurden sechs bispezifische T-Zell-Engager mit überzeugenden Gesamtansprechraten (*Overall response rate*, ORR) von bis zu 80% von der FDA zugelassen, darunter fünf zur Behandlung hämatologischer Malignitäten und ein weiterer für den Einsatz in Melanom-Patienten (Cao et al., 2023; Fenis et al., 2024).

Auch bispezifische Antikörper mit einer Spezifität für NK-Zellen, bekannt als BiKEs (*Bispecific killer cell engagers*) oder auch NKCEs (*Natural killer cell engagers*), haben in den letzten Jahren verstärkt an Bedeutung gewonnen (Fucà et al., 2021). Dabei werden meist Antikörpermoleküle generiert, welche spezifisch an aktivierende Rezeptoren wie CD16, NKG2D, NKp30 oder NKp46 binden und gleichzeitig eine Bindungsdomäne für ein Oberflächenantigen auf Tumorzellen aufweisen (M. Zhang et al., 2023). Unter anderem konnte in einer präklinischen Studie mit AML-Patienten durch den Einsatz eines CD16 x CD33 BiKE die NK-Zell-vermittelte Lyse von CD33-exprimierenden leukämischen Blasten gesteigert werden (Reusing et al., 2021). Auch der aktivierende Rezeptor NKG2D (siehe Abschnitt 1.2.2) stellt aufgrund seines starken Aktivierungspotenzials und seiner konstitutiven Expression auf NK-Zellen eine vielversprechende Zielstruktur für die Generierung von BiKEs dar (Watzl, 2003). Die Erkennung von NKG2D durch solche Moleküle erfolgt dabei entweder über eine Bindungsdomäne abgeleitet von natürlichen NKG2D-Liganden wie ULBP2 oder MICA (Kellner et al., 2015; Pan et al., 2023; Rothe et al., 2014; Von Strandmann et al., 2006) oder über NKG2D-spezifische scFv-Antikörperfragmente oder Nanobodies (Chan et al., 2018; Lutz et al., 2023; Raynaud et al., 2020; C. Zhang et al., 2021). Die Erweiterung von BiKE-Molekülen durch eine zusätzliche Bindungsdomäne oder ein immunstimulatorisches IL-15-Element resultierte in sogenannten TriKEs (*Trispecific killer cell engagers*) (Felices et al., 2016; Huan et al., 2023; Schmohl et al., 2017). Insbesondere IL-15-integrierende TriKEs werden derzeit intensiv erforscht, wobei erste vielversprechende präklinische Daten unter anderem mit einem gegen CD16 und das Oberflächenprotein Mesothelin gerichteten TriKE gewonnen werden konnten. Neben einer erhöhten Proliferation von aus Lungenkrebspatienten isolierten NK-Zellen wurde durch den Einsatz der TriKE-Moleküle zusätzlich eine gesteigerte anti-Tumor Aktivität und Zytokinproduktion gegenüber Lungenkrebszellen beobachtet (Kennedy et al., 2023). Neben der Integration einer immunstimulatorischen Domäne können TriKE-Moleküle auch mit einer weiteren Bindungsdomäne ausgestattet werden. So zeigte beispielweise ein trispezifisches Molekül mit Spezifität für das auf AML-Zellen häufig überexprimierte Antigen CD123 sowie für die NK-Zell-Rezeptoren NKp46 und CD16 eine im Vergleich zu einem bispezifischen anti-NKp46/anti-CD123 Molekül eine gesteigerte Lyse von AML-Zelllinien sowie primären AML-Zellen *in vitro*. Darüber hinaus konnte durch den Einsatz des TriKEs ein gegenüber der Gabe eines herkömmlichen CD123-spezifischen Antikörpers verlängertes Überleben in einem AML-Mausmodell erzielt werden (Gauthier et al., 2023). Sowohl beim Einsatz von BiTEs als auch BiKEs und TriKEs hängt der Therapieerfolg maßgeblich von der zytotoxischen Aktivität der Effektorzellen ab, welche allerdings bei stark vorbehandelten Krebspatienten beeinträchtigt sein kann. Eine Kombination von bispezifischen Antikörpern mit einer zellulären Immuntherapie könnte solche Einschränkungen überwinden. Im folgenden Abschnitt werden daher unterschiedliche Aspekte, wie der Transfer

von stimulierten Immunzellen oder die Erzeugung von Effektorzellen mit synthetischen Tumorspezifischen Rezeptoren, beleuchtet.

1.4 Zelluläre Immuntherapie von Krebserkrankungen

Für die Behandlung von Krebspatienten hat unter anderem die zelluläre Immuntherapie, die auf dem Transfer autologer (körpereigener) oder allogener (körperfremder) Zellen beruht, in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Im Gegensatz zu konventionellen Wirkstoffen, die in der Regel eine rasche Verstoffwechslung aufweisen, können Zellprodukte Monate bis Jahre im Patienten persistieren und zu einer langanhaltenden Immunantwort beitragen. Darüber hinaus besitzen transferierte Zellen in der Regel eine höhere Spezifität für Oberflächenstrukturen maligner Zellen und können diese gezielt eliminieren, während Chemo- und Strahlentherapie auch gesunde Zellen schädigen können (Hayes, 2020). Besonders im Bereich des adoptiven T-Zell-Transfers wurden bereits vielversprechende Therapieerfolge erzielt. Dabei wird zwischen drei Arten von transferierten T-Zellen unterschieden: Tumordinfiltrierende Lymphozyten (TIL), T-Zellen mit einem Tumorspezifischen T-Zell-Rezeptor oder CAR-exprimierende T-Zellen (Rohaan et al., 2019). Die erste Studie mit autologen TILs zur Therapie von metastasierenden Melanomen wurde bereits in den späten 1980er Jahren in der Gruppe von Steven A. Rosenberg durchgeführt, bei welcher Lymphozyten aus einer Tumorbiopsie isoliert, *ex vivo* expandiert und dem Patienten in Kombination mit systemisch appliziertem IL-2 reinfundiert wurden. Dabei konnte eine Ansprechrate von 34% erzielt werden (Rosenberg et al., 1988, 1994). Obwohl diese durch eine vorausgehende lymphodepletierende Präkonditionierung der Patienten und ein optimiertes Kultivierungsprotokoll der TILs weiter gesteigert werden konnte, weist die Therapie einige Limitierungen auf (Rosenberg et al., 2011). So wurde beispielsweise beobachtet, dass Behandlungserfolge durch TILs in der Regel auf Tumor-entitäten mit hoher Immunogenität beschränkt sind (Garber, 2019; Qin et al., 2021). Ebenso können TILs einen dysfunktionalen Phänotyp aufweisen und lassen sich oft nicht in ausreichenden Mengen isolieren und expandieren (Curiel et al., 2004; Woo et al., 2002). Allerdings wurde vor Kurzem die Infusion *ex vivo* expandierter autologer TILs als erstes solches Zellprodukt (Lifileucel) mit anschließender mehrmaliger IL-2 Applikation für die Behandlung von Patienten mit einem fortgeschrittenen Melanom aufgrund der Ergebnisse einer klinischen Phase II Studie (NCT02360579) mit einer ORR von 31,5% durch die FDA zugelassen (Chesney et al., 2022; Keam, 2024). Um bestehende Limitierungen einer adoptiven TIL-Transplantation zu überwinden und eine weiter gesteigerte anti-Tumor Aktivität zu vermitteln, können allogene oder autologe T-Zellen genetisch modifiziert werden, um nachfolgend einen TCR oder CAR mit definierter Antigen-Spezifität zu exprimieren.

Im Gegensatz zu TILs lassen sich T-Zellen für die Generierung solcher Effektorzellen aus PBMCs gewinnen. Dies stellt nicht nur ein weniger invasives Verfahren dar, sondern trägt auch zu einer größeren Menge verfügbarer Zellen bei (Jin et al., 2018; Rohaan et al., 2019). Bedingt durch die Eigenschaften des TCR können T-Zellen Antigene jedoch nur im Komplex mit MHC-Molekülen (MHC-Restriktion) erkennen. Tumorzellen mit aberranter Expression von MHC-Klasse-I Molekülen können sich folglich einer Erkennung durch TCR-modifizierte T-Zellen entziehen. Einen Vorteil bieten hier synthetische CARs, die gegen ein bestimmtes Oberflächen-assoziiertes Tumorantigen gerichtet sind und dieses in seiner nativen Form erkennen (Waldman et al., 2020).

1.4.1 Chimäre Antigenrezeptoren

Chimäre Antigenrezeptoren (CAR) setzen sich im Allgemeinen aus einer extrazellulären Antigenbindenden Domäne und einem intrazellulären, signaltransduzierenden Element zusammen. Die genetische Modifikation von T-Zellen mit solch einem rekombinanten Transmembranprotein wurde erstmals von Eshhar und Kollegen im Jahr 1993 beschrieben (Eshhar et al., 1993). Durch die Expression von CAR-Molekülen erlangen T-Effektorzellen eine definierte Antigen-Spezifität und überwinden gleichzeitig die MHC-Restriktion, sodass sie auch maligne Zellen mit beeinträchtigter Antigenprozessierung oder aberranter MHC-Expression erkennen können (Chmielewski et al., 2013). In der Regel wird die Spezifität eines CARs durch ein scFv-Antikörperfragment festgelegt (**Abbildung 1.4**). In CAR-Konstrukten der 1. Generation wird die Antigen-bindende Domäne über eine bewegliche Gelenkregion (*Hinge*) und eine Transmembrandomäne mit einem intrazellulären, ITAM-enhaltenden Signaltransduktionselement wie CD3 ζ oder Fc ϵ R1 γ verbunden (Boyiadzis et al., 2018). Durch die integrierten ITAMs erfolgt nach Bindung des Rezeptors an seine Zielstruktur die intrazelluläre Signalweiterleitung und Aktivierung der CAR-exprimierenden Effektorzellen (Lindner et al., 2020; Stambrook et al., 2017). Während T-Zellen, ausgestattet mit einem CAR der 1. Generation, eine spezifische Lyse Antigen-exprimierender Tumorzellen *in vitro* vermittelten, zeigten sie in klinischen Studien zur Untersuchung ihrer Verträglichkeit und Wirksamkeit nur moderate anti-Tumor Effekte (Kershaw et al., 2006; Park et al., 2007; Till et al., 2008). Dies ließ sich auf die geringe Persistenz im Patienten und den Übergang der verabreichten CAR-T-Zellen in einen anergischen Zustand zurückführen, welche durch eine fehlende Ko-Stimulation bedingt waren (Feins et al., 2019). Aufbauend auf diesen Beobachtungen und unter Berücksichtigung der Erkenntnis, dass für die Aktivierung von T-Zellen in der Regel zwei Signale erforderlich sind, wurden CAR-Konstrukte der 2. und 3. Generation entwickelt, die durch eine oder zwei zusätzliche ko-stimulatorische Domänen, bspw. CD28 oder 4-1BB, erweitert wurden.

So konnte in präklinischen und klinischen Studien durch das Einbringen zusätzlicher Signaldomänen nicht nur die Aktivität, Expansion, Persistenz und Zytokinsekretion von T-Zellen gesteigert, sondern insgesamt ein verbessertes Therapieansprechen erzielt werden (Carpenito et al., 2009; Kalos et al., 2011; Savoldo et al., 2011; Song et al., 2012). Eine weitere Optimierung der CAR-basierten zellulären Immuntherapie wurde durch die Koexpression von immunmodulatorischen Zytokinen wie IL-7, IL-15 und IL-21 (4. Generation) realisiert, die sowohl die anti-Tumor Aktivität und *in vivo* Persistenz der transplantierten CAR-Effektorzellen als auch die endogene Immunantwort fördern sollen (Z. Zhang et al., 2021). Im Zusammenhang mit CAR-T-Zellen spricht man hierbei auch von *armored* CARs oder TRUCKs (*T cells redirected for universal cytokine killing*), die bereits in klinischen Phase I Studien zur Behandlung von hämatologischen Malignitäten wie Lymphomen (NCT04684563) und soliden Tumoren wie Neuroblastomen und Osteosarkomen (NCT03635632) untersucht werden (Lin et al., 2023; Omer et al., 2022; Svoboda et al., 2022). Neben der ektopischen Expression immunmodulatorischer Zytokine können CAR-T-Zellen der 4. Generation weitere Transgene wie beispielsweise Tumorspezifische Antikörper oder Chemokin- oder Zytokinrezeptoren exprimieren (Chmielewski et al., 2011; Chmielewski & Abken, 2015; Foeng et al., 2022; Hawkins et al., 2021; Zhang et al., 2011).

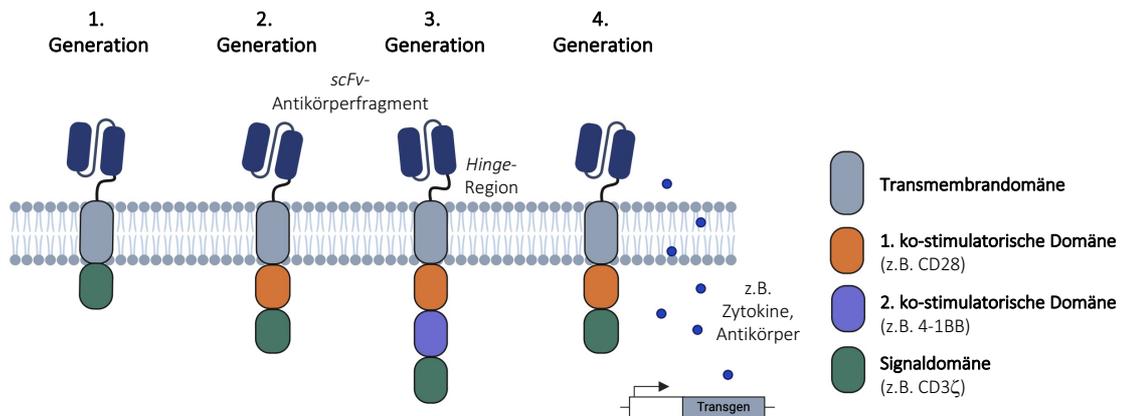


Abbildung 1.4. Schematischer Aufbau von chimären Antigenrezeptoren (CARs). Die Antigen-Spezifität von CAR-Molekülen wird meist durch eine *single-chain fragment variable* (scFv)-Domäne eines Antikörpers vermittelt, welche über eine Gelenkregion (*Hinge*) und eine Transmembrandomäne mit einer intrazellulären Signaltransduktionsdomäne verknüpft ist. Während CAR-Konstrukte der 1. Generation lediglich eine signaltransduzierende intrazelluläre Domäne aufweisen, wurden CARs der 2. und 3. Generation um eine bzw. zwei ko-stimulatorische Domänen erweitert. Durch das Einbringen zusätzlicher Transgene können CARs der 4. Generation, auch bezeichnet als *armored* CARs, immunmodulatorische Zytokine oder Tumorspezifische Antikörper sekretieren oder ausgewählte Zytokinrezeptoren exprimieren. Modifiziert nach (Brentjens & Curran, 2017).

Besonders bei der Therapie von Neoplasien der B-Zell-Linie werden durch den Einsatz der CAR-Technologie beachtliche Erfolge erzielt, sodass die ersten beiden CD19-spezifischen CAR-T-Zellprodukte Kymriah (Tisagenlecleucel) und Yescarta (Axicabtagen ciloleucel) für die Behandlung von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) und bestimmten Formen des Non-Hodgkin-Lymphoms im Jahr 2017 von der FDA und im Jahr 2018 durch die EMA zugelassen wurden (Albinger et al., 2021; Seimetz et al., 2019). Bis heute folgte zudem die Zulassung der beiden CD19-spezifischen CAR-T-Zelltherapeutika Tecartus (Brexucabtagen autoleucel) und Breyanzi (Lisocabtagen maraleucel) sowie der *B-cell maturation antigen* (BCMA)-spezifischen Produkte Abecma (Idecabtagene vicleucel) und Carvykti (Ciltacabtagen autoleucel) durch die FDA und EMA (Mitra et al., 2023). Darüber hinaus werden zurzeit CAR-basierte T-Zellprodukte in fast 1400 klinischen Studien erprobt (<https://clinicaltrials.gov/>), was die enormen Erwartungen an CAR-basierte Immuntherapien verdeutlicht.

Trotz vielversprechender Ergebnisse bei der Behandlung von B-Zell-Malignomen, bei denen die Antigenexposition durch zirkulierende Tumorzellen und gesunde B-Zellen bereits im Blut erfolgt und somit eine schnellere Aktivierung und klonale Expansion der CAR-tragenden Effektorzellen ermöglicht, stellt die erfolgreiche Therapie von soliden Tumoren nach wie vor eine große Herausforderung dar. Gründe hierfür sind unzureichende Migration und Infiltration in das Tumorgewebe und insbesondere die im TME vorherrschenden immunsuppressiven Bedingungen, die die Aktivität, Expansion und Persistenz der Effektorzellen einschränken (Guzman et al., 2023). Eine zusätzliche Schwierigkeit ist zudem die begrenzte Anzahl der bisher identifizierten Antigene, die sich für CAR-Therapien eignen, ohne dabei potenziell schwerwiegende Nebenwirkungen zu verursachen. Wie bereits in einigen klinischen Studien beobachtet, können TAA-spezifische CAR-T-Zellen eine *on-Target/off-Tumor* Toxizität hervorrufen, bei welcher auch gesundes Gewebe geschädigt wird (Flugel et al., 2023). Therapieerfolge bei soliden Tumorerkrankungen sind weiterhin erschwert aufgrund der oft heterogenen Antigenexpression innerhalb einer Tumorphilpopulation und/oder des Immunevasion-bedingten Verlusts der Zielantigene auf der Oberfläche von Tumorzellen. Zur Erweiterung der Antigen-Spezifität wurden daher modulare Systeme wie bspw. sogenannte Adaptor-CARs entwickelt, welche mit löslichen Antikörpermolekülen (Adaptormoleküle) mit Spezifität für ein TAA und das CAR-Molekül kombiniert werden und somit Effektor- und Tumorzellen vernetzen. Dies ermöglicht unter anderem die Behandlung von Krebserkrankungen mit heterogener Antigenexpression mit lediglich einem in Effektorzellen exprimierten CAR-Konstrukt in Kombination mit multiplen Adaptormolekülen (Bachmann, 2019; Cho et al., 2018; Pfeifer Serrahima et al., 2023). Im Allgemeinen kann die CAR-T-Zelltherapie mit leichten bis hin zu lebensbedrohlichen Begleiterscheinungen einhergehen. Eine häufig auftretende Nebenwirkung ist dabei das Zytokinfreisetzungs-

syndrom (*Cytokine release syndrome*, CRS), das in Folge der Aktivierung und klonalen Expansion von CAR-T-Zellen auftritt und eine systemische Entzündungsreaktion hervorruft, die bei schweren Verläufen ein lebensbedrohliches Organversagen verursachen kann. Außerdem wurden Neurotoxizitäten wie die CAR-T-Zell-assoziierte Enzephalopathie (*CAR-T-cell-related encephalopathy syndrome*, CRES) oder das Immuneffektorzell-assoziierte Neurotoxizitätssyndrom (*Immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome*, ICANS) beobachtet (Garcia Borrega et al., 2019; Neelapu et al., 2017). Um solchen Reaktionen möglichst schnell entgegenzuwirken und das Sicherheitsprofil einer CAR-T-Zell-Therapie zu erhöhen, wurden CARs mit integrierten Suizidgenen unter anderem kodierend für eine induzierbare Form der Caspase-9 (iCasp) oder einen trunkierten EGF (*Epidermal growth factor*)-Rezeptor (EGFRt) entwickelt (Gargett & Brown, 2014; Paszkiewicz et al., 2016). Eine weitere Limitierung ergibt sich aus der Tatsache, dass zur Vermeidung einer Graft-versus-Host Reaktion (*Graft-versus-host disease*, GvHD) bisher weitgehend autologe, *ex vivo* modifizierte Effektorzellen eingesetzt werden, was die Isolierung körpereigener T-Zellen in ausreichenden Mengen voraussetzt. Insbesondere bei vorbehandelten, immungeschwächten Patienten kann dies jedoch eine Herausforderung darstellen. Um solche Limitierungen einer T-Zell-basierten Therapie zu überwinden, werden weitere Effektorzellen gegenwärtig intensiv erforscht. Durch die Möglichkeit der allogenen Transplantation ohne Auslösung einer GvHD und den dadurch realisierbaren Einsatz als *off-the-shelf* Produkt stellen besonders CAR-NK-Zellen eine wertvolle Alternative dar und werden derzeit bereits in ersten klinischen Studien erprobt (Moscarelli et al., 2022).

1.4.2 Immuntherapie mit NK-Zellen

NK-Zell-basierte Immuntherapien haben in den letzten Jahren zunehmende Aufmerksamkeit gewonnen, da sie als Effektorzellen des Immunsystems Tumorzellen effektiv eliminieren können und nach Transfusion in Patienten ein vorteilhaftes Sicherheitsprofil aufweisen (Page et al., 2024). Der Grundstein der adoptiven NK-Zell-Therapie wurde durch eine Reihe klinischer Studien zur Behandlung verschiedener Malignitäten mit Lymphokin-aktivierten Killer (LAK)-Zellen gelegt, welche durch eine *ex vivo* erfolgende Zytokin-Stimulation autologer Lymphozyten gewonnen werden (Grimm et al., 1982, 1983; Rosenberg, 1985). Allerdings konnten durch deren Einsatz nur moderate anti-Tumor Effekte erzielt werden. Neben dem Transfer von LAK-Zellen ist auch die Therapie mit *ex vivo* kultivierten autologen NK-Zellen durch gewisse Limitierungen gekennzeichnet (Herberman, 1998; Law et al., 1995; Rosenberg et al., 1985). So sind NK-Zellen von Krebspatienten häufig in ihrer Anzahl reduziert und weisen funktionale Defekte auf, wodurch ihre anti-Tumor Wirkung beeinträchtigt ist (Hu et al., 2019; Lizana-Vasquez et al., 2023).

Im Gegensatz dazu wurde in Studien mit allogenen NK-Zellen, beruhend auf der *Missing self*-Hypothese, ein gesteigerter *Graft-versus-leukemia* (GvL)-Effekt festgestellt (Ruggeri et al., 2002). Dies lässt sich auf die sogenannte HLA-Inkompatibilität (*Mismatch*) zurückführen. Dabei erkennen allogene NK-Zellen keine HLA-Klasse-I Moleküle des Empfängers, wodurch die fehlende Aktivierung inhibierender KIR-Rezeptoren eine Alloreaktivität auslöst, sie sich jedoch nicht in einer generellen GvHD manifestiert (Ruggeri et al., 1999). In Studien, unter anderem mit AML-Patienten, konnte durch die Transplantation von haploidentischen NK-Zellen mit *KIR-ligand Mismatch* im Gegensatz zu NK-Zellen ohne einen solchen *Mismatch* ein verbessertes Ansprechen und *Engraftment* erzielt werden (Ruggeri et al., 2015). Entsprechend gilt ein *KIR-ligand Mismatch* heutzutage als wesentliche Voraussetzung für ein geeignetes Spenderprofil (Farag et al., 2002; Ruggeri et al., 2002). Einen weiteren Vorteil einer NK-Zell-Therapie stellt die MHC-unabhängige Zielzell-Erkennung dar. Während Tumorzellen der T-Zell Überwachung durch Herabregulation von MHC-Klasse-I Molekülen entgehen können, fördert dies basierend auf der *Missing self*-Hypothese die Erkennung durch NK-Zellen. Zudem können NK-Zellen als allogenes, *off-the-shelf* Zellprodukt genutzt werden, während in der CAR-T-Zelltherapie zur Vermeidung einer Alloreaktivität und GvHD bisher meist autologe T-Zellen eingesetzt werden.

Wie bereits für T-Zellen beschrieben, können auch NK-Zellen zur Steigerung ihrer antitumoralen Aktivität durch genetische Modifikation mit CAR-Molekülen ausgestattet werden. Im Gegensatz zu T-Zellen, die große Mengen an proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF α sekretieren, produzieren NK-Zellen hauptsächlich IFN- γ und GM-CSF, wodurch das Risiko eines Zytokinsturms verringert und eine zusätzliche Therapie mit Immunsuppressiva wie Kortikosteroiden oder Tocilizumab, ein IL-6-Rezeptor spezifischer monoklonaler Antikörper, zur Eindämmung von schweren Nebenwirkungen vermieden werden kann (Brudno & Kochenderfer, 2019; Klingemann, 2014). Ebenso ist das Risiko langanhaltender *on-Target/off-Tumor* Effekte durch die vergleichsweise kurze Lebensdauer zirkulierender NK-Zellen deutlich geringer, was zu dem günstigen Nebenwirkungsprofil von NK-Zellen als Effektorzellen in der adoptiven Immuntherapie beiträgt (Zhang et al., 2007). Dabei können NK-Zellen aus unterschiedlichen Quellen, wie dem Nabelschnurblut, PBMCs und induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS), gewonnen und durch etablierte Methoden expandiert und nach Bedarf modifiziert und aktiviert werden (Basar et al., 2020; Shimasaki et al., 2020). In einer klinischen Phase I/II Studie (NCT03056339) wurden aus Nabelschnurblut isolierte NK-Zellen mit einem retroviralen Vektor codierend für einen anti-CD19-CAR sowie IL-15 und induzierbare Caspase-9 transduziert und für die Therapie von Patienten mit rezidivierenden oder refraktären B-Zell-Lymphomen oder Leukämien eingesetzt.

Nach Verabreichung der CAR-NK-Zellen entwickelte kein Patient schwerwiegende Nebenwirkungen wie CRS, Neurotoxizität oder GvHD (Liu et al., 2020). Die Behandlung zeigte 100 Tage nach Verabreichung der NK-Zellen eine vielversprechende Ansprechrates (ORR) von 48,6%. Nach einem Jahr lag das Gesamtüberleben bei 68%, wobei die Krankheit bei 32% der Patienten nicht weiter fortgeschritten war (PFS) (Marin et al., 2024). Ein weiterer vielversprechender Ansatz kombiniert den NKCE AFM13 mit Spezifität für CD30 und CD16 mit aus dem Nabelschnurblut isolierten aktivierten NK-Zellen. Im Vergleich zum alleinigen Einsatz des Antikörpers oder der aktivierten NK-Zellen resultierte die Kombination aus NKCE und NK-Zellen in der effektiven Eliminierung von CD30-positiven Lymphomzellen *in vitro* und *in vivo*. Diese Strategie wird derzeit in einer klinischen Phase I/II Studie zur Behandlung von Patienten mit rezidivierenden oder refraktären Hodgkin oder Non-Hodgkin-Lymphomen eingesetzt (NCT04074746) (Kerbaui et al., 2021). Ebenso wird die Verträglichkeit, Pharmakokinetik und Wirksamkeit von genetisch modifizierten, durch gezielte Differenzierung aus induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnenen NK-Zellen bereits in klinischen Studien untersucht (Ran et al., 2022; Zhang et al., 2022; NCT04245722; NCT05336409).

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse, die mit primären NK-Zellen erzielt wurden, ist deren Gewinnung, Expansion und genetische Modifikation noch immer mit einem hohen technischen und finanziellen Aufwand verbunden. Eine valide Alternative zu Primärmaterial stellt daher der Einsatz etablierter NK-Zelllinien dar, die kryokonserviert und nach Bedarf in kosteneffizienten Verfahren expandiert werden können. Da Zelllinien meist von einem Einzelklon abstammen, weisen sie einen gut charakterisierten, homogenen Phänotyp auf, was eine Standardisierung klinischer Produkte ermöglicht. Weitere Vorteile der Verwendung von Zelllinien sind deren kontinuierliches Wachstum und die vergleichsweise einfache Gewinnung reiner genetisch modifizierter Zellpopulationen durch Methoden wie *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) (Klingemann, 2023). Mehrere etablierte NK-Zelllinien wie beispielsweise NKL, NK3.3, YT oder NK101 werden präklinisch in Ansätzen zur Immuntherapie untersucht. Jedoch weisen diese teilweise unerwünschte Eigenschaften wie die Infektion mit reaktivierbaren Epstein-Barr-Viren (EBV) auf, wodurch sie für einen therapeutischen Einsatz im Menschen ungeeignet sind (Kühnel et al.; in press). Lediglich die IL-2 abhängige NK-Zelllinie NK-92 wird bisher in klinischen Studien zur Krebsimmuntherapie eingesetzt. Die NK-92 Zelllinie wurde ursprünglich aus dem Blut eines 50-jährigen Patienten mit fortgeschrittenem Non-Hodgkin-Lymphom isoliert und weist eine hohe zytotoxische Aktivität gegenüber unterschiedlichen Malignitäten auf (Gong et al., 1994). Dies lässt sich vor allem auf die Expression multipler aktivierender Rezeptoren (NKp30, NKp46, 2B4, NKG2D, NKG2E, CD28) bei gleichzeitiger Abwesenheit inhibierender Rezeptoren mit Ausnahme von KIR2DL4, CD94/NKG2A und LIR1 zurückführen. Die zytotoxische Aktivität von NK-92 wird vorwiegend durch die Sekretion zytotoxischer Granula vermittelt,

kann jedoch auch durch die Expression von Todesliganden (TNF α , FasL und TRAIL) induziert werden (Maki et al., 2004). Das therapeutische Potenzial von NK-92 Zellen wurde dabei in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien gezeigt. Während unterschiedliche Tumor-Zelllinien effizient lysiert wurden, zeigten NK-92 keine Reaktivität gegenüber gesunden PBMCs oder hämatopoetischen Stammzellen (*Hematopoietic stem cell*, HSC) (Maki et al., 2003; Tam et al., 2004; Yan et al., 1998). Obwohl keine Langzeitpersistenz von NK-92 Zellen in Tiermodellen festgestellt werden konnte (Tam et al., 1999; Yan et al., 1998), werden diese für eine klinische Anwendung vor Infusion bestrahlt, um die mögliche Entstehung sekundärer Lymphome aufgrund des malignen Ursprungs zu vermeiden. Dabei kommt es bei einer Dosis von 10 Gy zum vollständigen Arrest der Proliferation von NK-92, während Zytotoxizität und Zytokinproduktion der Zellen für 16-24 Stunden vollständig erhalten bleiben und danach nur graduell abnehmen (Maki et al., 2004; Navarrete-Galvan et al., 2022; Schönfeld et al., 2015). In vier Phase I Studien wurde die Sicherheit und die Effizienz einer adoptiven Immuntherapie mit bestrahlten NK-92 Zellen erprobt. Zusammenfassend wurde in allen Studien gezeigt, dass eine wiederholte Behandlung auch mit hohen Zellzahlen nicht zu schwerwiegenden Nebenwirkungen führte und generell gut verträglich war. Zudem wurde bei 36% der Patienten eine klinische Aktivität festgestellt, die eine Verkleinerung des Tumors und partielle Remissionen umfasste (Arai et al., 2008; Boyiadzis et al., 2017; Klingemann, 2023; Tonn et al., 2001, 2013; Williams et al., 2017).

Auch die anti-Tumor Effekte von NK-92 Zellen können durch die genetische Modifikation mit CAR-Molekülen gesteigert werden (Uherek et al., 2002; Zhang et al., 2017). Neben CAR-exprimierenden NK-92 Zellen mit einer Spezifität für Leukämie- oder Lymphom-assoziierte Antigene wie CD19, CD20 und Flt-3 wurden auch CAR-NK-92 Zellen generiert, die Antigene solider Tumorerkrankungen wie beispielsweise ErbB2 (HER2), EpCAM, GD2, EGFR und EGFRvIII erkennen (Bodden et al., 2023; Esser et al., 2012; Genßler et al., 2015; Müller et al., 2008; Oelsner et al., 2017, 2019; Sahm et al., 2012; Schönfeld et al., 2015). Im Vergleich zu parentalen NK-92 Zellen zeigten die erwähnten CAR-Effektorzellen in präklinischen *in vitro* und *in vivo* Modellen eine gesteigerte spezifische Lyse Antigen-exprimierender Tumorzellen. Zurzeit werden CAR-modifizierte NK-92 Zellen in fünf klinischen Studien erprobt (Pan et al., 2022). Dabei wurde die Phase I Studie CAR2BRAIN (NCT03383978) zur Behandlung von Glioblastom-Patienten mit ErbB2-spezifischen CAR-NK-92 Zellen (NK-92/5.28.z) unter Beteiligung unserer Arbeitsgruppe initiiert (Burger et al., 2019, 2023). Das *Good manufacturing practice* (GMP)-konforme Zellprodukt NK-92/5.28.z, das in dieser Studie eingesetzt wird, ist ein hoch zytotoxischer und umfassend charakterisierter Einzelzellklon, der durch lentivirale Transduktion von NK-92 Zellen mit einem ErbB2-spezifischen CAR der 2. Generation (CD28/CD3 ζ) gewonnen wurde (Nowakowska et al., 2018; Schönfeld et al., 2015).

Im abgeschlossenen ersten Teil der Studie wurde die Sicherheit und Machbarkeit einer einzelnen intrakraniellen Injektion von bis zu 1×10^8 Zellen während einer Rezidiv-Operation gezeigt. Schwere Nebenwirkungen wie CRS oder ICANS traten ebenso wenig auf wie eine humorale Immunantwort gegenüber den applizierten CAR-NK-92 Zellen. Bei den behandelten Patienten betrug das mittlere PFS 7 Wochen und das OS 31 Wochen. In der nachfolgend untersuchten Expansions-Kohorte wurden Patienten bis zu 12 Wochen lang wöchentlich lokal mit bestrahlten NK-92/5.28.z Zellen behandelt. Das Ansprechen der Patienten auf die Therapie wird zurzeit klinisch bewertet (Burger et al., 2019, 2023).

Basierend auf den in Abschnitt 1.4.1 beschriebenen CAR-Konstrukten der 4. Generation zielt ein weiterer Ansatz unserer Arbeitsgruppe auf die Koexpression des IL-15 Superagonisten RD-IL15 in CAR-tragenden NK-92 Zellen ab (**Abbildung 1.5**) (Häcker, unpubliziert; Bodden et al., 2023; Kiefer et al., 2024; Müller, 2012). Rekombinantes IL-15 gilt aufgrund seiner positiven Wirkung auf die Entwicklung, Aktivierung und das Überleben von $CD8^+$ T-Zellen, NKT-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen und NK-Zellen als vielversprechende Alternative zu den als Monotherapie genutzten Zytokinen IL-2 und IFN- α . Allerdings führte die klinische Anwendung von IL-15 zu keinen bedeutenden Therapieeffekten (Sindaco et al., 2023). Dies lässt sich auf die kurze Halbwertszeit von IL-15 und eine schwache *in vivo* Aktivität bedingt durch die fehlende Assoziation mit der IL-15 Rezeptor α (IL-15R α) Kette und der dadurch ausbleibenden Transpräsentation zurückführen. Unter physiologischen Bedingungen interagiert IL-15 im endoplasmatischen Reticulum der IL-15 produzierenden Zelle mit der IL-15R α Untereinheit und wird als Komplex an die Oberfläche transportiert, wodurch eine anschließende Wechselwirkung mit dem sogenannten *Intermediate affinity* Rezeptor bestehend aus der IL-2/IL-15 Rezeptor β -Kette und der gemeinsamen γ -Kette auf der Oberfläche von benachbarten Effektor-T-Zellen, T-Gedächtniszellen und NK-Zellen möglich wird. Der Komplex der drei Rezeptor-Untereinheiten wird auch als *High affinity* Rezeptor bezeichnet (**Abbildung 1.5**) (Jabri & Abadie, 2015). Um die biologische Aktivität von IL-15 zu steigern, wurden zum einen Mutationen eingeführt, die die Affinität des Zytokins für seinen Rezeptor erhöhen. Dabei erwies sich der Austausch von Asparagin 72 zu Asparaginsäure (N72D) mit einer 4-5-fachen Steigerung der biologischen Aktivität als besonders vorteilhaft (Zhu et al., 2009). Eine weitere Optimierung des stimulierenden Potenzials konnte durch eine kovalente Verknüpfung von IL-15 mit der IL-15R α Sushi-Domäne erreicht werden, die einen Großteil der für die Zytokinbindung relevanten strukturellen Elemente enthält. Im Vergleich zu löslichem IL-15 ahmen solche als Superagonisten bezeichnete Fusionsproteine die physiologische Transpräsentation nach und zeigen eine bis zu 50-fach höhere Aktivität als natürliches IL-15 (Han et al., 2011). In laufenden Studien zur Behandlung von Lymphom-Patienten werden daher größtenteils IL-15 Superagonisten eingesetzt (Knudson et al., 2020).

Einleitung

Um die für eine Zytokin-Therapie üblichen Nebenwirkungen (Fieber, Hypothonie, Appetitlosigkeit, Neutropenie und Anämie) zu vermeiden, werden sie dabei meist in geringen Mengen und mit weiteren Krebstherapeutika wie Rituximab kombiniert verabreicht (Foltz et al., 2021; Robinson & Schluns, 2017). Erst kürzlich wurde der IL-15 Superagonist ANKTIVA (N-803), ein Fusionsprotein bestehend aus IL-15 (N72D), der Sushi-Domäne des IL-15R α und einer IgG1-Fc-Domäne, für die Behandlung von nicht-muskelinvasivem Harnblasenkarzinom (*Non-muscle-invasive bladder cancer*, NMIBC) in Kombination mit BCG (Bacille Calmette-Guérin) durch die FDA zugelassen (ImmunityBio, 2024.). Bei BCG handelt es sich um einen Tuberkulose-Impfstoff mit abgeschwächten Erregern der Rinder-Tuberkulose, der bei der Behandlung von Blasenkrebs eingesetzt wird, um eine lokale Inflammation und Immunaktivierung hervorzurufen (Mukherjee et al., 2021). In der zugehörigen Phase II/III Studie (NCT03022825) konnte nach intravesikulärer Instillation von BCG und N-803 in 58 von 82 Patienten (71%) ein vollständiges Ansprechen (*Complete response*, CR) mit einer durchschnittlichen Dauer von 26,6 Monaten erzielt werden (Chamie et al., 2022). Auch der in dieser Arbeit eingesetzte IL-15 Superagonist RD-IL15 ist von der Struktur des IL-15/IL-15R α -Komplexes abgeleitet, beinhaltet jedoch keine zusätzliche IgG1-Fc-Domäne (**Abbildung 1.5**). Die Koexpression von RD-IL15 in CAR-NK-92 Zellen soll dabei der Optimierung des im nachfolgenden Abschnitt 1.4.3 beschriebenen Kombinationsansatzes aus einem bispezifischen Antikörper und NKG2D-CAR-exprimierenden NK-92 Zellen dienen.

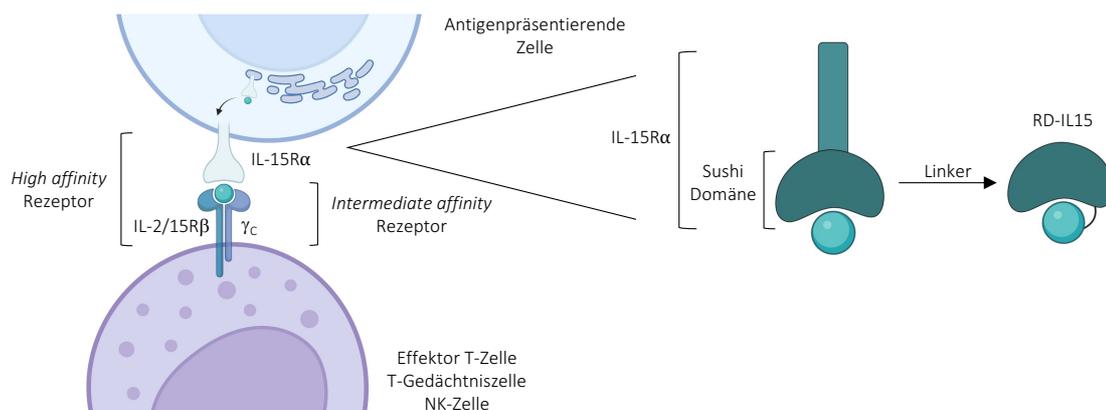


Abbildung 1.5. Ableitung des IL-15 Superagonisten RD-IL15. Das Zytokin IL-15 assoziiert im endoplasmatischen Reticulum antigenpräsentierender Zellen mit dem IL-15 Rezeptor α (IL-15R α) und wird anschließend als Komplex auf der Oberfläche präsentiert. Durch Bindung an den Komplex aus den IL-2/IL-15R β - und γ_c -Untereinheiten (γ_c) auf der Oberfläche von NK- und T-Zellen bildet sich ein *High affinity* Rezeptor aus. Basierend auf der unter physiologischen Bedingungen stattfindenden Transpräsentation von IL-15 im Komplex mit IL-15R α wurde ein in seiner Aktivität und Halbwertszeit optimierter IL-15 Superagonist (RD-IL15) abgeleitet, der sich aus der Sushi-Domäne des IL-15R α und einer mutierten Form von IL-15 (N72D), verknüpft über einen kurzen Peptidlinker, zusammensetzt. Weitere Details sind dem Text zu entnehmen.

1.4.3 Kombinationstherapie aus NKG2D-CAR modifizierten NK-92 Zellen und einem bispezifischen Antikörper

Neben dem alleinigen Einsatz von BiKEs oder TriKEs zur Behandlung von Tumorerkrankungen stellt deren Kombination mit zytotoxischen CAR-exprimierenden Effektorzellen eine weitere, in dieser Arbeit verfolgte und im Folgenden näher beschriebene Strategie dar. Ein bekanntes Problem bei der Behandlung von Krebserkrankungen sind *Immune escape* Mechanismen, die es Tumorzellen ermöglichen, das körpereigene Immunsystem umzuprogrammieren oder fehlzuleiten und so einer Immunabwehr zu entgehen. Insbesondere NK-Zellen sind für die initiale Abwehr von Tumorzellen wichtig, wobei unter anderem der aktivierende Rezeptor NKG2D, der NK-Zellen die Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen durch ihre Expression von stressinduzierten NKG2D-L ermöglicht, eine Rolle spielt. Der dabei entstehende Selektionsdruck kann jedoch das Auswachsen von Tumorzellvarianten fördern, die durch eine reduzierte Liganden-Expression auf der Oberfläche der Tumorzellen oder die Freisetzung von proteolytisch prozessierten, löslichen Liganden (*Ligand shedding*) der NKG2D-vermittelten Immunabwehr entgehen (**Abbildung 1.6**) (Lazarova & Steinle, 2019; Schmiedel & Mandelboim, 2018). Durch die Bindung löslicher Liganden an NKG2D kann zudem dessen Endozytose und Degradierung induziert werden (Groh et al., 2002). Ebenso wurde gezeigt, dass NKG2D-L auf leukämischen Stammzellen (*Leukaemic stem cell*, LSC) abwesend sind, sodass NKG2D-basierte Therapien zur Behandlung von AML-Patienten trotz initialer anti-Tumor Effekte ein erhöhtes Risiko eines Rezidivs aufgrund des Auswachsens von NKG2D-L negativen LSCs bergen (Paczulla et al., 2019). Zusammen weisen diese Beobachtungen auf die Notwendigkeit eines Therapieansatzes hin, welcher NKG2D-exprimierende Immuneffektorzellen auch in Richtung NKG2D-L negativer Tumorzellen umleitet. Ein in unserer Arbeitsgruppe verfolgter und in dieser Arbeit weiterentwickelter Ansatz ist dabei der Einsatz bispezifischer Antikörper (*NKG2D-binding antibody*, NKAB), welche über die gleichzeitige Bindung von NKG2D und eines TAA wie ErbB2 (HER2) (NKAB-ErbB2) NKG2D-exprimierende primäre Zellen mit ErbB2-positiven Tumorzellen vernetzen und die Tumorzell-Lyse vermitteln (**Abbildung 1.6**) (C. Zhang et al., 2021).

Einleitung

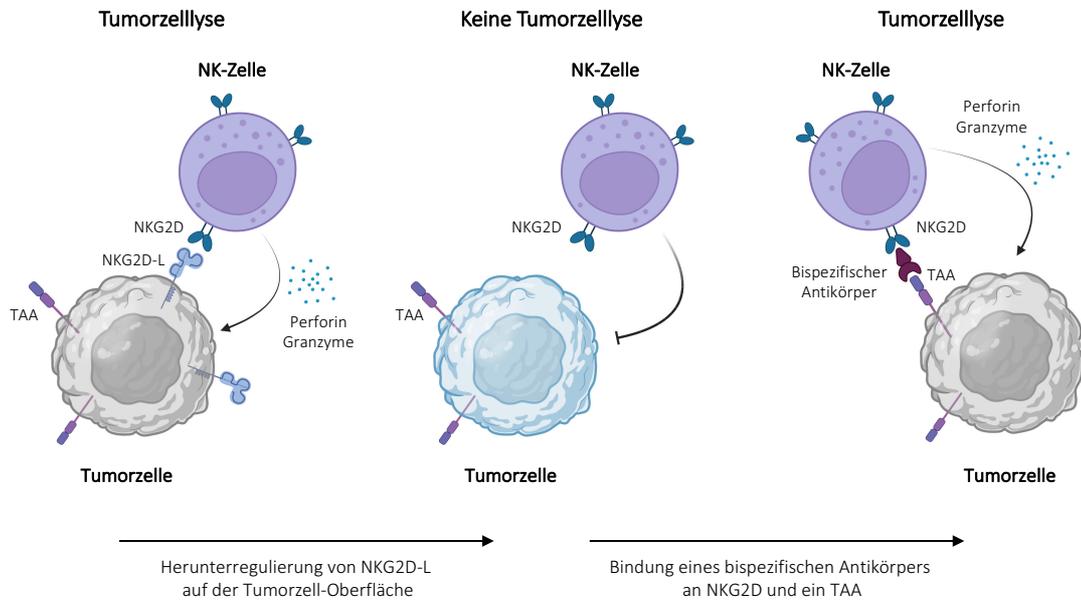


Abbildung 1.6. Umleitung der NKG2D-vermittelten Tumorzell-Lyse. Unter physiologischen Bedingungen können NK-Zellen Tumorzellen über die Expression von stressinduzierten NKG2D-L durch ihren aktivierenden Rezeptor NKG2D erkennen und beseitigen. Aufgrund des Selektionsdrucks können jedoch Tumorzellen auswachsen, die über unterschiedliche Mechanismen der NKG2D-basierten Erkennung entgehen. Um dennoch eine NKG2D-vermittelte Lyse von Liganden-negativen Tumorzellen zu erreichen, wurde ein bispezifischer Antikörper entwickelt, welcher sowohl NKG2D auf NK-Zellen als auch das TAA ErbB2 (HER2) auf Tumorzellen erkennt (NKAB-ErbB2). Auf diese Weise werden NKG2D-exprimierende Effektorzellen unabhängig von der NKG2D-L Expression mit ErbB2-positiven Tumorzellen vernetzt. Weitere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen. TAA – Tumor-assoziiertes Antigen, NKG2D-L – NKG2D Liganden.

Die therapeutische Wirkung des NKAB-ErbB2 Moleküls ist maßgeblich von der NKG2D-Expression auf Effektorzellen abhängig. Um diese zu steigern, wurden NK-92 Zellen mit einem NKG2D-CAR (*NKG2D-based activating receptor*, NKAR) versehen, welcher anstelle einer Antigen-spezifischen scFv-Domäne für die Zielzellerkennung den extrazellulären Bereich von humanem NKG2D trägt (detailliert im Ergebnisteil beschrieben). Die so generierten Zellen (NKAR-NK-92) zeigten im Vergleich zu parentalen NK-92 Zellen eine gesteigerte NKAR/NKG2D-Expression und in Kombination mit NKAB-ErbB2 ein verstärktes zytotoxisches Potenzial gegenüber ErbB2-exprimierenden Brustkrebs- und Glioblastom-Zelllinien. Zusätzlich wurde eine gesteigerte Lyse NKG2D-L positiver Tumorzellen durch NKAR-NK-92 Zellen auch in Abwesenheit von NKAB-Molekülen beobachtet (C. Zhang et al., 2021). Dies macht deutlich, dass die generierten NKAR-NK-92 Zellen im Fall von Liganden-positiven Zellen sowohl allein als auch in Kombination mit einem für Tumorzellen spezifischen NKAB-Molekül wirksam sind. Zudem interagieren NKAB-Moleküle sowohl mit endogenem NKG2D als auch dem synthetischen NKAR-Molekül und vermitteln so die Zytotoxizität gegenüber Antigen-exprimierenden Tumorzellen (**Abbildung 1.7**). Ein weiterer Vorteil des experimentellen Ansatzes konnte in Versuchen mit löslichem MICA (sMICA) gezeigt werden (C. Zhang et al., 2021). Dabei wurde die zytotoxische

Aktivität von NKAR-NK-92 Zellen gegenüber der Brustkrebs-Zelllinie MDA-MB453 durch an NKG2D/NKAR gebundenes sMICA inhibiert, das proteolytisch prozessiertes MICA nachbildet. Die Zytotoxizität von NKAR-NK-92 Zellen konnte jedoch durch die Zugabe von NKAB-ErbB2 wieder hergestellt werden. Darüber hinaus zeigten durchflusszytometrische Analysen, dass die Bindung von sMICA an NKAR-NK-92 Zellen in der Anwesenheit von NKAB-ErbB2 abnahm. Dies stützt die Hypothese, dass NKAB-ErbB2 sMICA aus dem Komplex mit NKG2D/NKAR verdrängen und somit einer durch lösliche NKG2D-L vermittelten Immunsuppression entgegenwirken kann. Neben vielversprechenden *in vitro* Daten konnte die antitumorale Wirkung des Therapieansatzes auch in einem immunkompetenten Mausmodell gezeigt werden. Durch die Kombination aus NKAR-NK-92 Zellen und NKAB-ErbB2 wurde das Wachstum von murinen Glioblastomzellen, die das humane ErbB2 Zielantigen exprimieren, verlangsamt. In 7 von 9 Mäusen waren dabei 3 Monate nach der letzten Behandlung keine Tumoren mehr nachweisbar. Entsprechend der Kinetik des Tumorwachstums konnte auch das mittlere symptomfreie Überleben nach Applikation von NKAR-NK-92 Zellen zusammen mit NKAB-ErbB2 im Vergleich zu einer Applikation von NKAR-NK-92 Zellen allein (36,5 Tage) oder einer Kombination von parentalen NK-92 Zellen und NKAB-ErbB2 (46 Tage) signifikant verlängert werden (115 Tage) (C. Zhang et al., 2021).

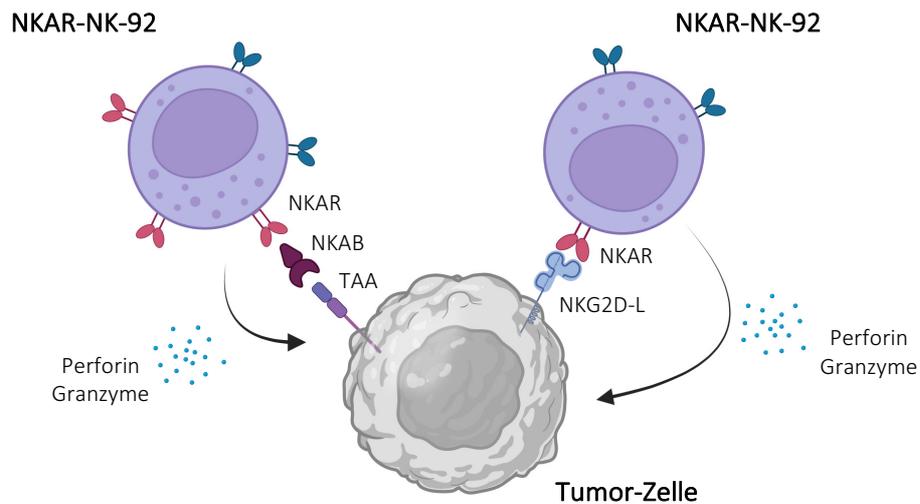


Abbildung 1.7. Kombinationsansatz aus bispezifischen Antikörpern (NKAB) und NKG2D-CAR-exprimierenden NKAR-NK-92 Zellen. Durch das Einbringen eines NKG2D-basierten CAR in NK-92 Zellen (NKAR-NK-92) können diese NKG2D-L positive Tumorzellen direkt sowie über die Bindung eines bispezifischen Antikörpers mit Spezifität für NKG2D/NKAR und ein entsprechendes Tumorantigen erkennen und die spezifische Lyse vermitteln. TAA – Tumor-assoziiertes Antigen, NKG2D-L – NKG2D Liganden.

1.5 Ziel der Arbeit

Eine große Herausforderung bei der Entwicklung immuntherapeutischer Ansätze zur Behandlung von Krebserkrankungen ist die Identifizierung geeigneter Zielstrukturen. Oftmals werden ausgewählte Tumorantigene auch auf gesundem Gewebe exprimiert und bergen somit die Gefahr von *on-Target/off-Tumor* Effekten. Aufgrund ihrer gesteigerten, meist exklusiven Expression auf malignen Zellen gelten NKG2D-L als universelle Zielstruktur für die adoptive Immuntherapie mit Effektor-Lymphozyten, die endogen NKG2D exprimieren oder mit einem NKG2D-basierten CAR ausgestattet sind (Curio et al., 2021; Demoulin et al., 2017). Autologe NKG2D-CAR-T-Zellen haben in klinischen Phase I Studien zur Behandlung von akuter myeloischer Leukämie, myelodysplastischen Syndromen oder multiplem Myelom neben einem akzeptablen Sicherheitsprofil eine anti-leukämische Aktivität in einem Teil der behandelten Patienten gezeigt. Jedoch konnte keine dauerhafte anti-Tumor Aktivität beobachtet werden (Baumeister et al., 2019; Sallman et al., 2018, 2023). Mögliche Ursachen dafür stellen die fehlende oder schwache Expression von NKG2D-L auf Krebsstammzellen sowie die proteolytische Abspaltung von Liganden dar (Ibáñez-Navarro et al., 2023; Paczulla et al., 2019; Salih et al., 2002).

Um die Erfolgsaussichten NKG2D-basierter Immuntherapien zu verbessern, wurden daher bispezifische Killerzell-*Engager* (BiKE oder NKCE) entwickelt, die gleichzeitig NKG2D und ein Tumor-assoziiertes Oberflächenantigen binden können und so die Interaktion NKG2D-exprimierender Lymphozyten und Antigen-positiver Tumorzellen unabhängig von der NKG2D-Ligandenexpression ermöglichen (Kellner et al., 2013; Peipp et al., 2022). Auch in einer früheren Arbeit der Gruppe wurde ein bispezifischer Antikörper (NKAB-ErbB2) generiert, welcher an NKG2D und das Tumor-assoziierte Antigen ErbB2 (HER2) bindet. Mit Hilfe dieses Killerzell-*Engagers* wurden nicht nur zytotoxische Lymphozyten mit endogener NKG2D Expression auf ErbB2-positive Krebszellen umgelenkt, sondern auch die spezifische anti-Tumor Aktivität von genetisch modifizierten NKG2D-CAR-exprimierenden NK- und T-Zellen deutlich gesteigert (C. Zhang et al., 2021).

Darauf aufbauend war ein Ziel dieser Arbeit die Weiterentwicklung von NKAR-NK-92 Zellen, die durch die Sekretion des IL-15 Superagonisten RD-IL15 eine autokrine Aktivierung der Produzentenzellen ermöglichen und zu einer parakrinen Stimulation umliegender Immunzellen beitragen sollen. Nach der Ableitung entsprechender NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen wurde die Sekretion von RD-IL15 und seine Wirkung sowohl auf die Aktivierung und Proliferation produzierender Zellen als auch auf das Wachstum und die antitumorale Aktivität umgebender primärer Immunzellen *in vitro* untersucht. Um zu überprüfen, ob ähnliche Moleküle wie NKAB-ErbB2 zur Behandlung anderer Tumorentitäten

Einleitung

eingesetzt werden können, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, NKAB-Moleküle mit Spezifität für EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) und die B-Zell-Antigene CD19 und CD20 zu entwickeln und deren Funktionalität und anti-Tumor Aktivität in Kombination mit NKG2D/NKAR-exprimierenden Immuneffektorzellen zu erproben. Dabei wurde auch untersucht, inwiefern die Kombination zweier NKAB-Moleküle mit unterschiedlicher Spezifität zusammen mit NKAR-NK-92 Derivaten für die Behandlung von Tumorpopulationen mit heterogener Antigenexpression geeignet ist.

2 Material

2.1 Laborgeräte und Apparaturen

In Tabelle 2.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte und Apparaturen aufgeführt.

Tabelle 2.1. In dieser Arbeit verwendete Geräte und Apparaturen.

Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	FVS2 * UWK 20.0 Fedegari (Frankfurt am Main)
Äkta-FPLC-Anlage	GE Healthcare (München)
Bestrahlungseinheit	Biobeam GM 2000 (Gamma Service Medical, Leipzig)
Brutschränke	CO ₂ -Inkubator: Binder (Tuttlingen) Mikrobiologischer Inkubator: Heraeus (Hanau)
Durchflusszytometer: FACS Aria Fusion FACSCanto II LSRFortessa	BD Biosciences (Heidelberg)
Einfrierhilfe	CoolCell LX: BioCision (Weinheim) Mr. Frosty: Nalgene (Rochester, USA)
Elektrophoresekammer	Agarosegele: BioRad (Feldkirchen) SDS-Page: BioRad (Feldkirchen)
Gefrierschränke	-20 °C: Liebherr (Biberach an der Riß) -80 °C: New Brunswick/Eppendorf (Hamburg)
Geldokumentationssystem	Fusion Fx7: Peqlab (Erlangen)
Heizblock	Bio-Techne (Wiesbaden)
Infrared Imaging System Li-COR Odyssey	Li-COR Biosciences (Bad Homburg)
Inkubationsschüttler	HAR Multitron: Infors (Bottmingen, Schweiz)
Kühlschränke	Liebherr (Biberach an der Riß)
Magnetrührer	IKA Mag RCT (Staufen)
Mikroskope	Nikon TMS: Nikon (Heidelberg) Axiovert 25: Zeiss (Oberkochen) CQ1: Yokogawa (Ratingen)

Material

Bezeichnung	Hersteller
Mikrotiterplatten-Lesegerät	SpectraMax iD3: Molecular Devices (München)
Mikrowelle	Severin (Sundern)
Netzgeräte	PowerPac 300: BioRad (Feldkirchen)
PCR-Maschine	Biometra® T3000 Thermocycler RT-PCR: Biometra (Göttingen)
pH-Meter	MP220: Mettler Toledo (Gießen)
Pipetten und Pipettierhilfe	P2, P20, P200, P1000 Pipetten: Gilson (Berlin) Pipetboy acu: Integra Biosciences (Biebertal)
Rollenmischer	RM5-30V: CAT-Ing. (Ballrechten-Dottingen)
Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine	XR 24 Pro: Dürr Dental (Bietigheim-Bissingen)
Sonifikator	Bioruptor: Diagenode (Seraing, Belgien)
Spektrophotometer	Anthos Reader 2001: Anthos Labtec Instruments (Salzburg, Österreich) Evolution 60: Thermo Fisher Scientific (Dreieich) Nanodrop 1000: Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Sterilbank	Sterilbank (Klasse 2): CleanAir by Baker (Utrecht, Niederlande) Mikrobiologische Sterilbank: HeraSafe, Heraeus (Hanau)
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad (Feldkirchen)
Vortex-Gerät	Vortex-Genie 2: Fisher Scientific (Schwerte)
Waage	Explorer: Ohaus (Nänikon, Schweiz)
Wasseraufbereitungsanlage	Elix Essential: Merck Millipore (Darmstadt)
Wasserbad	LAUDA-GFL (Burgwedel)
Zentrifugen	Avanti™ J-25; Beckmann Coulter (Krefeld) Biofuge pico: Heraeus (Hanau) Megafuge 1.0R: Heraeus (Hanau) Mikro 22R: Hettich (Tuttlingen) Rotina 46R: Hettich (Tuttlingen) Z 160M: Hermle Labortechnik (Wehingen)

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien, die in dieser Arbeit genutzt wurden, sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Tabelle 2.2. Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
Autoradiographie-Film	Super RX: Fujifilm Europe (Düsseldorf)
Dialyseschlauch	Carl Roth (Karlsruhe)
Einmal-Küvetten	Sarstedt (Nümbrecht)
Filterspitzen	Fisher Scientific (Schwerte)
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
HisTrap™ HP Säule	GE Healthcare (München)
Protein-G Säule	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranfilter	Merck Millipore (Darmstadt)
Plastikwaren	Corning (Kaiserslautern), Greiner Bio-One (Frickenhausen), BD Biosciences (Heidelberg), Sarstedt (Nümbrecht), Thermo Fisher Scientific (Dreieich), Ibidi (Gräfelfing)
Sterilfilter (0,22 µm; 0,45 µm)	Merck Millipore (Darmstadt)
Zählkammer	KOVA® GLASSTIC® Slide 10: KOVA International (Amsterdam, Niederlande)
Zellkultureinsätze (ThinCERT™ Cell Culture Inserts)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Amicon™ Zentrifugalfiltereinheiten (MWCO 50 kDa)	Merck Millipore (Darmstadt)

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.3. In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Peqlab (Erlangen)
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	InGen (Toulouse, Frankreich)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Calcein Violet AM	Invitrogen (Darmstadt)
CellTrace™ CFSE	Invitrogen (Darmstadt)
CellTrace™ FarRed	Invitrogen (Darmstadt)
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail	Merck (Darmstadt)
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva (Heidelberg)
DAPI	Carl Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth (Karlsruhe)
dNTP Mix	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Essigsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe)
FuGene® 4K Transfektionsreagenz	Promega (Walldorf)
Imidazol	Carl Roth (Karlsruhe)
Ionomycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Magermilchpulver	Fluka® Analytical (München)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth (Karlsruhe)
NucView® 488 Caspase-3 Substrat	Biotium, Inc. (Fremont, USA)

Material

Bezeichnung	Hersteller
PhosSTOP™	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
PMA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Poly-L-Lysin	Merck Millipore (Darmstadt)
Polybren	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Polyethylenimin, 25 kDa linear (PEI)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Q5 <i>High GC-Enhancer</i>	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Q5-Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
RosetteSep™ <i>Human NK Cell Enrichment Cocktail</i>	Stemcell™ Technologies (Köln)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck Millipore (Darmstadt)
TWEEN® 20	Carl Roth (Karlsruhe)

2.4 Puffer und Lösungen

In Tabelle 2.4 sind die in dieser Arbeit genutzten Puffer und Lösungen aufgelistet.

Tabelle 2.4. Verwendete Puffer und Lösungen.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung/Hersteller
0,05% Trypsin/EDTA-Lösung	Gibco (Schwerte)
0,4% Trypanblau-Lösung	Gibco (Schwerte)
Bradford-Reagenz	Bio-Rad (Feldkirchen)
CutSmart® Puffer	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
DNA-Größenstandard, 1 kb plus	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
DNA-Ladepuffer	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> (DPBS) 1x und 10x	Gibco (Schwerte)

Material

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung/Hersteller
Erythrozyten-Lysepuffer Pharm Lyse™	BD Biosciences (Heidelberg)
Ethidiumbromidlösung	Carl Roth (Karlsruhe)
GolgiStop	BD Biosciences (Heidelberg)
Hoechst 33342	Invitrogen (Darmstadt)
<i>Lymphocyte Separation Medium</i>	PromoCell (Heidelberg)
Matrigel (<i>Growth factor reduced</i>)	Corning (Kaiserslautern)
<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
<i>Phosphate-buffered saline-Tween 20 (PBS-T)</i>	8,06 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,47 mM KH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl, 2,67 mM KCl, 0,05% [v/v] Tween 20, pH 7,5
Q5-Polymerasepuffer	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
T4-DNA-Ligase Puffer (10x)	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Tris-Acetat-EDTA Puffer (TAE)	1 mM EDTA, 40 mM Tris, pH 8,0 eingestellt mit Eisessig
<i>Tris-buffered saline-Tween 20 (TBS-T)</i>	150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0,1% [v/v] Tween 20, pH 7,5

2.5 Kits

In Tabelle 2.5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Kits aufgeführt. Wenn nicht anders beschrieben, wurden diese nach Herstellerangaben genutzt.

Tabelle 2.5. In dieser Arbeit verwendete Kits.

Bezeichnung	Hersteller
<i>Antibody-Conjugation</i> -Kit	Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
ExpiFectamine 293 Transfektionskit	Gibco (Schwerte)
<i>GeneJET</i> Gel-Extraktions-Kit	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
<i>GeneJET</i> PCR-Aufreinigungs-Kit	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
<i>GeneJET</i> Plasmid-Miniprep-Kit	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
<i>MojoSort™ Human CD3 Selection</i> Kit	Biolegend (Koblenz)
<i>NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning</i> Kit	New England Biolabs (Frankfurt am Main)

Material

Bezeichnung	Hersteller
<i>NucleoBond</i> ® Xtra Maxi-Kit	Macherey-Nagel (Düren)
<i>RosetteSep</i> TM Human NK Cell Enrichment Cocktail	Stemcell (Köln)
<i>TGX Stain-Free FastCast Acrylamide</i> Kit, 12%	Bio-Rad (Feldkirchen)
<i>TransBlot Turbo RTA Mini PVDF Transfer</i> Kit	Bio-Rad (Feldkirchen)

2.6 Rekombinante Proteine

In Tabelle 2.6 sind die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine aufgelistet. Soweit diese im Rahmen der Arbeit selbst generiert wurden, ist dies entsprechend aufgeführt.

Tabelle 2.6. In dieser Arbeit verwendete rekombinante Proteine.

Rekombinantes Protein	Hersteller
IL-2 (Proleukin® S)	Novartis (Nürnberg)
IL-15	Pepro Tech (Hamburg)
6xHis-RD-IL15	In dieser Arbeit generiert. Der lösliche IL-15 Superagonist (RD-IL15) besteht aus einer mutierten humanen IL-15 Variante (N72D) und der Sushi-Domäne des IL-15-Rezeptors α (IL-15-R α) (Aminosäuren 31-107). Beide Komponenten sind über einen G4S Linker miteinander verknüpft. Mit Hilfe eines 6xHis-Tags am N-Terminus des IL-15 Superagonisten kann das Protein mittels <i>Immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie</i> (IMAC) aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt werden.
NKAB-ErbB2 (Kyk2.0(V _H V _L)-IgG4Fc-FRP5)	(C. Zhang et al., 2021) Der bispezifische Antikörper besteht aus einem N-terminalen scFv-Antikörperfragment spezifisch für NKG2D und einem C-terminalen ErbB2-spezifischen scFv-Fragment, verbunden über die CH2 und CH3 Domänen von humanem IgG4. Innerhalb der NKG2D-spezifischen scFv Domäne ist die Orientierung der <i>heavy chain variable domain</i> (V _H) und der <i>light chain variable domain</i> (V _L) wie folgt: V _H V _L .
NKAB-ErbB2_2 (Kyk2.0(V _L V _H)-IgG4Fc-FRP5)	In dieser Arbeit generiert. Der bispezifische Antikörper besteht aus einem N-terminalen scFv-Antikörperfragment spezifisch für NKG2D und einem C-terminalen ErbB2-spezifischen scFv-Fragment, verbunden über die CH2 und CH3 Domänen von humanem IgG4. Innerhalb der NKG2D-spezifischen scFv Domäne ist die Orientierung der <i>heavy chain variable domain</i> (V _H) und der <i>light chain variable domain</i> (V _L) wie folgt: V _L V _H .

Material

Rekombinantes Protein	Hersteller
NKAB-ErbB2 rev (FRP5-IgG4Fc- Kyk2.0(V _H V _L))	In dieser Arbeit generiert. Der bispezifische Antikörper besteht aus einem N-terminalen scFv-Antikörperfragment spezifisch für ErbB2 und einem C-terminalen NKG2D-spezifischen scFv-Fragment, verbunden über die CH2 und CH3 Domänen von humanem IgG4. Innerhalb der NKG2D-spezifischen scFv Domäne ist die Orientierung der <i>heavy chain variable domain</i> (V _H) und der <i>light chain variable domain</i> (V _L) wie folgt: V _H V _L .
NKAB-ErbB2 rev_2 (FRP5-IgG4Fc- Kyk2.0(V _L V _H))	In dieser Arbeit generiert. Der bispezifische Antikörper besteht aus einem N-terminalen scFv-Antikörperfragment spezifisch für ErbB2 und einem C-terminalen NKG2D-spezifischen scFv-Fragment, verbunden über die CH2 und CH3 Domänen von humanem IgG4. Innerhalb der NKG2D-spezifischen scFv Domäne ist die Orientierung der <i>heavy chain variable domain</i> (V _H) und der <i>light chain variable domain</i> (V _L) wie folgt: V _L V _H .
RD-IL15-NKAB-ErbB2 (RD-IL15-Kyk2.0(V _H V _L)-IgG4Fc-FRP5)	In dieser Arbeit generiert. Das rekombinante Protein besteht aus dem IL-15 Superagonisten (RD-IL15) fusioniert an den bispezifischen Antikörper NKAR-ErbB2.
NKAB-CD19 (Kyk2.0(V _H V _L)-IgG4Fc-4G7)	In dieser Arbeit generiert. Der bispezifische Antikörper besteht aus einem N-terminalen scFv-Antikörperfragment spezifisch für NKG2D und einem C-terminalen CD19-spezifischen scFv-Fragment, verbunden über die CH2 und CH3 Domänen von humanem IgG4. Innerhalb der NKG2D-spezifischen scFv Domäne ist die Orientierung der <i>heavy chain variable domain</i> (V _H) und der <i>light chain variable domain</i> (V _L) wie folgt: V _H V _L .
NKAB-CD20 (Kyk2.0(V _H V _L)-IgG4Fc-Leu16)	In dieser Arbeit generiert. Der bispezifische Antikörper besteht aus einem N-terminalen scFv-Antikörperfragment spezifisch für NKG2D und einem C-terminalen CD20-spezifischen scFv-Fragment, verbunden über die CH2 und CH3 Domänen von humanem IgG4. Innerhalb der NKG2D-spezifischen scFv Domäne ist die Orientierung der <i>heavy chain variable domain</i> (V _H) und der <i>light chain variable domain</i> (V _L) wie folgt: V _H V _L .
NKAB-EGFR (225-IgG4Fc-Kyk2.0(V _H V _L))	In dieser Arbeit generiert. Der bispezifische Antikörper besteht aus einem N-terminalen scFv-Antikörperfragment spezifisch für EGFR und einem C-terminalen NKG2D-spezifischen scFv-Fragment, verbunden über die CH2 und CH3 Domänen von humanem IgG4. Innerhalb der NKG2D-spezifischen scFv Domäne ist die Orientierung der <i>heavy chain variable domain</i> (V _H) und der <i>light chain variable domain</i> (V _L) wie folgt: V _H V _L .
NKAB-mCD19 (1D3-IgG4Fc-Kyk2.0(V _H V _L))	In dieser Arbeit generiert. Der bispezifische Antikörper besteht aus einem N-terminalen scFv-Antikörperfragment spezifisch für murines CD19 und einem C-terminalen NKG2D-spezifischen scFv-Fragment, verbunden über die CH2 und CH3 Domänen von humanem IgG4. Innerhalb der NKG2D-spezifischen scFv Domäne ist die Orientierung der <i>heavy chain variable domain</i> (V _H) und der <i>light chain variable domain</i> (V _L) wie folgt: V _H V _L .

2.7 Antikörper und Nachweisreagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie weitere Nachweisreagenzien und deren eingesetzte Verdünnungen sind Tabelle 2.7 zu entnehmen.

Tabelle 2.7. In dieser Arbeit verwendete Antikörper und Nachweisreagenzien.

Zielantigen	Klon/Spezies	Markierung	Hersteller	Eingesetzte Verdünnung
Antikörper verwendet in ELISA:				
IL-15 (human)	34593, Maus	-	R&D systems (Wiesbaden)	1:250
IL-15R α (human)	polyklonal, Ziege	Biotin	R&D systems (Wiesbaden)	1:400
Primärantikörper für durchflusszytometrische Analysen:				
CD3 (human)	UCHT1, Maus	APC/Fire 750	Biolegend (Koblenz)	1:400
CD8 (human)	monoklonal, Maus	APC	BD Biosciences (Heidelberg)	1:100
CD56 (human)	NCAM16.2, Maus	BV-421	BD Biosciences (Heidelberg)	1:100
NKG2D (human)	BAT221, Maus	PE	Miltenyi (Bergisch Gladbach)	1:100
CD16 (human)	monoklonal, Maus	AF647	BD Biosciences (Heidelberg)	1:200
CD16 (human)	3G8, Maus	APC	BD Biosciences (Heidelberg)	1:100
CD107a (human)	H4A3, Maus	APC	Biolegend (Koblenz)	1:600
ErbB2 (human)	24D2, Maus	AF-647	Biolegend (Koblenz)	1:100
EGFR (human)	AY13, Maus	AF-488	Biolegend (Koblenz)	1:200
EGFR (human)	R-1, Maus	PE	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)	1:100
CD19 (human)	4G7, Maus	APC	Biolegend (Koblenz)	1:100

Material

Zielantigen	Klon/Spezies	Markierung	Hersteller	Eingesetzte Verdünnung
CD19 (murin)	REA749	PE	Miltenyi (Bergisch Gladbach)	1:100
CD20 (human)	2H7, Maus	AF-647	Biologend (Koblenz)	1:100

Sekundärantikörper für durchflusszytometrische Analysen:

IgG-Fc (human)	polyklonal, Ziege	APC	Jackson Immuno Research (Hamburg)	1:20
----------------	-------------------	-----	-----------------------------------	------

Primärantikörper für Immunoblotanalysen:

pSTAT5 (human)	C11C5	-	CellSignaling	1:1000
STAT5 (human)	89/Stat5, Maus	-	BD Biosciences (Heidelberg)	1:1000
γ -Tubulin (human)	Hase	-	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	1:2000

Sekundärantikörper für Immunoblotanalysen und Nachweisreagenzien:

IgG-Fc (human)	polyklonal, Ziege	HRP	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	1:10000
IgG-Fc (murin)	polyklonal, Ziege	HRP	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	1:16000
Streptavidin	rekombinant	HRP	GenScript (Rijswijk, Niederlande)	1:10000

2.8 Plasmide

In Tabelle 2.8 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgeführt. Soweit diese im Rahmen der Arbeit selbst generiert wurden, ist dies entsprechend aufgeführt.

Tabelle 2.8. In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Bezeichnung	Eigenschaft	Referenz
pCMV_ΔR8.91	Lentivirales Verpackungsplasmid, kodiert sowohl Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine, als auch Reverse Transkriptase, Integrase und Polymerase (pol). Abgeleitet von <i>Human immunodeficiency virus type 1</i> (HIV-1).	(Zufferey et al., 1997)

Material

Bezeichnung	Eigenschaft	Referenz
pMD2.G	Lentivirales Verpackungsplasmid; welches das Hüllprotein des <i>Vesicular stomatitis virus</i> (VSV-G) kodiert	(Zufferey et al., 1997)
pS-Nz-IEW (= pS-NKAR-IEW)	Das lentivirale Transferplasmid kodiert einen NKG2D-basierten chimären Antigenrezeptor (NKAR) mit CD3 ξ Signaldomäne. Die Expression wird über den <i>Spleen Focus Forming Virus</i> (SFFV) Promotor kontrolliert. Gefolgt wird die NKAR-Sequenz von einer <i>Internal ribosome entry site</i> (IRES) und <i>Enhanced green fluorescent protein</i> (EGFP) cDNA als Markergen.	(C. Zhang et al., 2021)
pS-Nz-P2A-RD-IL15-IEW (= pS-NKAR-RD-IL15-IEW)	Das lentivirale Transferplasmid kodiert für einen NKG2D-basierten chimären Antigenrezeptor (NKAR) mit CD3 ξ Signaldomäne und den humanen IL-15 Superagonisten (RD-IL15). Die Expression wird über den SFFV-Promotor kontrolliert. Die NKAR-Sequenz ist über eine P2A Schnittstelle mit der Sequenz des IL-15 Superagonisten verbunden. Nachfolgend schließen sich eine IRES und EGFP als Markergen an.	In dieser Arbeit generiert.
pLV-EGFR	Lentivirales Transferplasmid, welches den humanen <i>Epidermal growth factor receptor</i> (EGFR) kodiert. Die Rezeptorexpression steht unter der Kontrolle des EF-1 α Promotors.	In dieser Arbeit generiert.
pLV-EGFRVIII	Lentivirales Transferplasmid, welches mutierten humanen <i>Epidermal growth factor receptor, variant III</i> (EGFRVIII) kodiert. Die Expression steht unter der Kontrolle des EF-1 α Promotors.	In dieser Arbeit generiert.
pcDNA3-6xHis-RD-IL15	Eukaryotisches Expressionsplasmid, welches den IL-15 Superagonisten (RD-IL15) mit vorgelagertem 6-fach His-Tag kodiert. Die Expression steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors.	In dieser Arbeit generiert.
pcDNA3-Kyk2.0(V _H V _L)-IgG4Fc-FRP5 (= pcDNA3-NKAB-ErbB2)	Eukaryotisches Expressionsplasmid, welches den bispezifischen Antikörper NKAB-ErbB2 kodiert. Die Expression erfolgt unter der Kontrolle des CMV-Promotors.	(C. Zhang et al., 2021)
pcDNA3-Kyk2.0(V _L V _H)-IgG4Fc-FRP5 (= pcDNA3-NKAB-ErbB2_2)	Eukaryotisches Expressionsplasmid, welches den bispezifischen Antikörper NKAB-ErbB2_2 kodiert. Die Expression erfolgt unter der Kontrolle des CMV-Promotors.	In dieser Arbeit generiert.
pcDNA3-FRP5-IgG4Fc-Kyk2.0(V _H V _L) (= pcDNA3-NKAB-ErbB2 rev)	Eukaryotisches Expressionsplasmid, welches den bispezifischen Antikörper NKAB-ErbB2 rev kodiert. Die Expression erfolgt unter der Kontrolle des CMV-Promotors.	In dieser Arbeit generiert.
pcDNA3-FRP5-IgG4Fc-Kyk2.0(V _L V _H) (= pcDNA3-NKAB-ErbB2 rev_2)	Eukaryotisches Expressionsplasmid, welches den bispezifischen Antikörper NKAB-ErbB2 rev_2 kodiert. Die Expression erfolgt unter der Kontrolle des CMV-Promotors.	In dieser Arbeit generiert.

Material

Bezeichnung	Eigenschaft	Referenz
pcDNA3-RD-IL15-Kyk2.0(V _H V _L)-IgG4Fc-FRP5 (= pcDNA3-RD-IL15-NKAB-ErbB2)	Eukaryotisches Expressionsplasmid, welches den IL-15 Superagonisten (RD-IL15), fusioniert an den bi-spezifischen Antikörper NKAB-ErbB2 kodiert. Die Expression erfolgt unter der Kontrolle des CMV-Promotors.	In dieser Arbeit generiert.
pcDNA3-Kyk2.0(V _H V _L)-IgG4Fc-4G7 (= pcDNA3-NKAB-CD19)	Eukaryotisches Expressionsplasmid, welches den bi-spezifischen Antikörper NKAB-CD19 kodiert. Die Expression erfolgt unter der Kontrolle des CMV-Promotors.	In dieser Arbeit generiert.
pcDNA3-Kyk2.0(V _H V _L)-IgG4Fc-Leu16 (= pcDNA3-NKAB-CD20)	Eukaryotisches Expressionsplasmid, welches den bi-spezifischen Antikörper NKAB-CD20 kodiert. Die Expression erfolgt unter der Kontrolle des CMV-Promotors.	In dieser Arbeit generiert.
pcDNA3-225-IgG4Fc-Kyk2.0(V _H V _L) (= pcDNA3-NKAB-EGFR)	Eukaryotisches Expressionsplasmid, welches den bi-spezifischen Antikörper NKAB-EGFR kodiert. Die Expression erfolgt unter der Kontrolle des CMV-Promotors.	In dieser Arbeit generiert.
pcDNA3-1D3-IgG4Fc-Kyk2.0(V _H V _L) (= pcDNA3-NKAB-mCD19)	Eukaryotisches Expressionsplasmid, welches den bi-spezifischen Antikörper NKAB-mCD19 kodiert. Die Expression erfolgt unter der Kontrolle des CMV-Promotors.	In dieser Arbeit generiert.

2.9 Oligonukleotide

In Tabelle 2.9 sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide mit ihrer Sequenz und Verwendung aufgelistet. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden mit ddH₂O auf eine Stockkonzentration von 100 µM eingestellt und bei -20 °C gelagert. Für die Arbeitskonzentration wurde eine 1:10 Verdünnung hergestellt.

Tabelle 2.9. In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz [5'-3']	Orientierung	Verwendung
BPK6	GCTTCTGCTCCCGAGCTC	vorwärts	Sequenzierung von pSIEW-Konstrukten; hybridisiert an SFFV-Promotor
BPK7	CACACCGGCTTATTCCAAG	rückwärts	Sequenzierung von pSIEW-Konstrukten; hybridisiert an IRES
C_Kyk2(VLVH) fwd	GCGGAGGATCCAGTCTGC	vorwärts	PCR zur Generierung von pcDNA3-FRP5-IgG4Fc-Kyk2.0(V _L V _H)

Material

Bezeichnung	Sequenz [5'-3']	Orientierung	Verwendung
C_Kyk2(VLVH) rev	TCGAGCGGCCGCTAACTAG	rückwärts	PCR zur Generierung von pcDNA3-FRP5-IgG4Fc-Kyk2.0(V _L V _H)
CD3z TM_IC pSIEW Nz fwd	AGGCGGAGCTGTGCACAC	vorwärts	Gibson-Assembly zur Generierung von pS-Nz-P2A-RD-IL15-IEW
CD3z TM_IC pSIEW Nz rev	AGAGAAGTTTGTTCACGGGG AGGCAGGGCCTGC	rückwärts	Gibson-Assembly zur Generierung von pS-Nz-P2A-RD-IL15-IEW
EGFR fwd	TTAGCTAGCGCCACCATGGGA CCCTCCGGG	vorwärts	PCR zur Generierung von pLV-EGFR
EGFR rev	AGCGCCGTCGACATCTCATGC TCCAATAAATTCAC	rückwärts	PCR zur Generierung von pLV-EGFR
EGFRvIII fwd	TTAGCTAGCGCCACCATGGGA CCCTCCGGGAC	vorwärts	PCR zur Generierung von pLV-EGFRvIII
EGFRvIII rev	AGCGCCGTCGACAGGTCATGC TCCAATAAATTCAC	rückwärts	PCR zur Generierung von pLV-EGFRvIII
hCD19 fwd	TTAGCTAGCGCCACCATGCC	vorwärts	PCR zur Generierung von pLV-CD19
hCD19 rev	AGCGCCGTCGACATCTCAG	rückwärts	PCR zur Generierung von pLV-CD19
hCD20 fwd	TTAGCTAGCGCCACCATGACA AC	vorwärts	PCR zur Generierung von pLV-CD20
hCD20 rev	AGCGCCGTCGACATCTTAAGG	rückwärts	PCR zur Generierung von pLV-CD20
IgG4 rev	CCAGCTGCACCTGGGATC	rückwärts	Sequenzierung von pcDNA3-NKAB Plasmiden; hybridisiert innerhalb der IgG4 Domäne
IgG4_1 fwd	TTTCACCTTTGGCTCCGGCAC	vorwärts	Sequenzierung von pcDNA3-NKAB Plasmiden; hybridisiert innerhalb der IgG4 Domäne
IgG4_1 rev	AGGGCAGACTGGGATCCTC	rückwärts	Sequenzierung von pcDNA3-NKAB Plasmiden; hybridisiert innerhalb der IgG4 Domäne
IgG4_2 fwd	TAGCCCCCATGCCATC	vorwärts	Sequenzierung von pcDNA3-NKAB Plasmiden; hybridisiert innerhalb der IgG4 Domäne

Material

Bezeichnung	Sequenz [5'-3']	Orientierung	Verwendung
IgG4 hinge rev	TGGGCATGATGGGCATGG	rückwärts	Sequenzierung von pcDNA3-NKAB Plasmiden; hybridisiert innerhalb der IgG4 Domäne
Kyk2 internal fwd	TCAGCGCCTGCAGTCTGAGG	vorwärts	Sequenzierung von pcDNA3-NKAB Plasmiden; hybridisiert an Kyk2.0 Sequenz
mCD19 fwd	TAATACGACTCACTATAGGG	vorwärts	PCR zur Generierung von pcDNA3-1D3-IgG4Fc-Kyk2.0(V _H V _L)
mCD19 rev	TGCTGGGCATGATGGGC	rückwärts	PCR zur Generierung von pcDNA3-1D3-IgG4Fc-Kyk2.0(V _H V _L)
N_Kyk2(VLVH) fwd	ACCCAAGCTTCGCCGCCAC	vorwärts	PCR zur Generierung von pcDNA3-Kyk2.0(V _L V _H)-IgG4Fc-FRP5
N_Kyk2(VLVH) rev	TGGGGGGCTAGCACTAGACAC	rückwärts	PCR zur Generierung von pcDNA3-Kyk2.0(V _L V _H)-IgG4Fc-FRP5
pcDNA3 FP	CTCTGGCTAACTAGAGAAC	vorwärts	Sequenzierung von pcDNA3-Expressionsplasmiden; hybridisiert an CMV-Promotor
pcDNA3 RP	CAAACAACAGATGGCTGGC	rückwärts	Sequenzierung von pcDNA3-Expressionsplasmiden; hybridisiert an BGH Polyadenylierungssignal
pLV EGFR fwd	GAGTCATGGGAGAAAACAAC ACC	vorwärts	Sequenzierung von pLV-EGFR; hybridisiert innerhalb der extrazellulären Domäne von EGFR
pLV EGFR rev	GTTTTCTCCCATGACTCCTGC	rückwärts	Sequenzierung von pLV-EGFR; hybridisiert innerhalb der extrazellulären Domäne von EGFR
pLV EGFRVIII fwd	AGGTGAGAAAGTTAAAATTC CCG	vorwärts	Sequenzierung von pLV-EGFRVIII; hybridisiert in EGFRVIII Sequenz
pLV EGFRVIII rev	TTTTAACTTTCTCACCTTCTGGG	rückwärts	Sequenzierung von pLV-EGFRVIII; hybridisiert in EGFRVIII Sequenz
pLV Seq MCS fwd	CTTGGTTCATTCTCAAGCC	vorwärts	Sequenzierung von pLV-Konstrukten; hybridisiert innerhalb der <i>Multiple cloning site</i> (MCS)
pLV WPRE uni rev	GCCATACGGGAAGCAATAGC	rückwärts	Sequenzierung von pLV-Konstrukten; hybridisiert in WPRE

Bezeichnung	Sequenz [5'-3']	Orientierung	Verwendung
scFv(4G7) fwd	GCGGATCAGGCGGCGG	vorwärts	PCR zur Generierung von pcDNA3-Kyk2.0(V _H V _L)-IgG4Fc-4G7
scFv(4G7) rev	GATGCATGCTCGAGCGGC	rückwärts	PCR zur Generierung von pcDNA3-Kyk2.0(V _H V _L)-IgG4Fc-4G7
scFv(225) fwd	AAGCTTCGCCGCCACCATG	vorwärts	PCR zur Generierung von pcDNA3-225-IgG4Fc- Kyk2.0(V _H V _L)
scFv(225) rev	GCTAGCTTTGATTCCAGCTTG	rückwärts	PCR zur Generierung von pcDNA3-225-IgG4Fc- Kyk2.0(V _H V _L)

2.10 Bakterienstämme

Der chemokompetente, rekombinationsdefiziente Bakterienstamm *E. coli* Stbl3 wurde für die Herstellung von lentiviralen Transferplasmiden verwendet, während für die Herstellung von eukaryotischen Expressionsplasmiden der chemokompetente Bakterienstamm *E. coli* TOP10 eingesetzt wurde.

Tabelle 2.10. Verwendete chemokompetente Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> Stbl3	F ⁻ mcrB mrrhsdS20(r _B ⁻ , m _B ⁻) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Str ^R) xyl-5 λ ⁻ leumtl-1	Invitrogen (Darmstadt)
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74 recA1 ara139 (ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Invitrogen (Darmstadt)

2.11 Bakterienmedien und Antibiotika

Luria Bertani (LB)-Flüssigmedium und LB-Agar wurden zunächst bei 121 °C und einem Dampfdruck von 180-200 kPa autoklaviert. Sobald das Medium anschließend auf eine Temperatur von etwa 55 °C abgekühlt war, wurde Ampicillin bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben.

Tabelle 2.11. Verwendete Bakterienmedien und Antibiotika

Bezeichnung	Zusammensetzung
Ampicillin	InGen Europe (Toulouse, Frankreich) 100 mg/ml In ddH ₂ O, sterilfiltriert
Luria Bertani (LB)-Medium	5 g NaCl 5 g Hefeextrakt 10 g Trypton gelöst in 1 l ddH ₂ O
LB-Selektions-Medium	LB-Medium 100 µg/ml Ampicillin
LB-Ampicillin-Agar	LB-Medium 1,5% [w/v] Agar-Agar 100 µg/ml Ampicillin

2.12 Zellkulturmedien und Zusätze

Sowohl die Arbeiten mit eukaryotischen Zellen als auch das Ansetzen und die Verwendung der aufgeführten Zellkulturmedien und Zusätze erfolgten unter sterilen Bedingungen. Fötale Kälberserum (*Fetal calf serum*, FCS) und humanes Plasma wurden vor ihrer Verwendung zunächst für 30 min bei 56 °C hitze-inaktiviert. Die verwendeten Zellkulturmedien und Zusätze sind nachfolgend aufgeführt (Tabelle 2.12).

Material

Tabelle 2.12 In dieser Arbeit verwendete Medien und Zusätze.

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
DMEM ⁺⁺⁺ (mit Zusätzen)	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Gibco, Schwerte) 10% [v/v] FCS (hitze-inaktiviert) 2 mM L-Glutamin 1% [v/v] Penicillin/Streptomycin (100x)
Einfrüermedium NK-92	10% [v/v] DMSO in humanem Plasma
Einfrüermedium Tumorzellen	10% [v/v] DMSO in FCS
Expi293F Expressionsmedium	Gibco (Schwerte)
Fötale Kälberserum (<i>Fetal calf serum</i> , FCS)	Capricorn Scientific (Ebsdorfergrund)
Humanes Plasma	Deutsches Rotes Kreuz (DRK)-Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen
IL-2	Proleukin® S (Novartis Pharma, Nürnberg)
IMDM ⁺⁺⁺ (mit Zusätzen)	IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium; Gibco, Schwerte) 10% [v/v] FCS (hitze-inaktiviert) 2 mM L-Glutamin 1% [v/v] Penicillin/Streptomycin (100x)
L-Glutamin	Gibco (Schwerte)
Matrigel	Corning (Kaiserslautern)
Medium für primäre NK-Zellen	X-VIVO 10 (Lonza, Basel, Schweiz) 5% [v/v] humanes Plasma (hitze-inaktiviert) 500 IU/ml IL-2 50 ng/ml IL-15
Opti-MEM	Gibco (Schwerte)
Penicillin/Streptomycin-Lösung (100x)	Gibco (Schwerte)
RPMI ⁺⁺⁺ (mit Zusätzen)	RPMI 1640 (Gibco, Schwerte) 10% [v/v] FCS (hitze-inaktiviert) 2 mM [v/v] L-Glutamin 1% [v/v] Penicillin/Streptomycin (100x)

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
X-VIVO 10 ⁺⁺ (mit Zusätzen)	X-VIVO 10 (Lonza, Basel, Schweiz) 5% [v/v] humanes Plasma (hitze-inaktiviert) 100 IU/ml IL-2

2.13 Eukaryotische Zelllinien und Kulturbedingungen

In Tabelle 2.13 sind die verwendeten etablierten humanen und murinen Zelllinien aufgeführt. Des Weiteren wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) und primäre NK-Zellen isoliert und für begrenzte Zeitperioden kultiviert. Die dafür verwendeten Kultivierungsbedingungen und Medien sind in den jeweiligen Abschnitten beschrieben.

Tabelle 2.13. In dieser Arbeit verwendete Zelllinien und die dazugehörigen Zellkulturmedien.

Zelllinie	Beschreibung	Kulturmedium	Referenz/ATCC-Nr.
A20	murines (BALB/c) B-Zell-Lymphom	RPMI ⁺⁺⁺ + 5% β -Mercaptoethanol	TIB-208
BV-173	humane B-Zell Leukämie	RPMI ⁺⁺⁺	ACC 20 (DSMZ No.)
Expi293F TM	abgeleitet aus der etablierten HEK293 Zelllinie	Expi293F Expressionsmedium	Gibco (Schwerte)
GL261	murines (C57BL/6) Glioblastom	DMEM ⁺⁺⁺	ACC 802 (DSMZ No.)
GL261/ErbB2/EGFR	murines (C57BL/6) Glioblastom transduziert mit humanen ErbB2 und EGFR Konstrukten	DMEM ⁺⁺⁺	In dieser Arbeit generiert.
GL261/EGFR	murines (C57BL/6) Glioblastom transduziert mit humanem EGFR Konstrukt	DMEM ⁺⁺⁺	In dieser Arbeit generiert.
GL261/EGFRVIII	murines (C57BL/6) Glioblastom transduziert mit humanem EGFRVIII Konstrukt	DMEM ⁺⁺⁺	In dieser Arbeit generiert.
GL261/ErbB2	murines (C57BL/6) Glioblastom transduziert mit humanem ErbB2 Konstrukt	DMEM ⁺⁺⁺	(Strecker et al., 2022)
GL261/ErbB2/EGFRVIII	murines (C57BL/6) Glioblastom transduziert mit humanen ErbB2 und EGFRVIII Konstrukten	DMEM ⁺⁺⁺	In dieser Arbeit generiert.

Material

Zelllinie	Beschreibung	Kulturmedium	Referenz/ATCC-Nr.
HEK293T	humane embryonale Nierenzellen; exprimieren das große T-Antigen von SV40.	DMEM ⁺⁺⁺	CRL-11268
K562	humane chronische myeloische Leukämie	RPMI ⁺⁺⁺	CCL-243
MDA-MB453	humanes Mammakarzinom	DMEM ⁺⁺⁺	HTB-131
MDA-MB468	humanes Mammakarzinom	DMEM ⁺⁺⁺	HTB-132
Nalm-6	humane akute lymphatische Leukämie	RPMI ⁺⁺⁺	CRL-3273
NK-92	humanes Non-Hodgkin-Lymphom	X-VIVO 10 ⁺⁺	CRL-2407
NKAR NK-92	humanes Non-Hodgkin-Lymphom, transduziert mit pS-NKAR-IEW. Exprimiert einen NKG2D-basierten CAR	X-VIVO 10 ⁺⁺	(C. Zhang et al., 2021)
NKAR-RD-IL15-NK-92	humanes Non-Hodgkin-Lymphom, transduziert mit pS-NKAR-RD-IL15-IEW. Exprimiert einen NKG2D-basierten CAR (NKAR) und sekretiert zusätzlich den IL-15 Superagonisten RD-IL15	X-VIVO 10 ⁺⁺	In dieser Arbeit generiert.
Raji	humanes Burkitt-Lymphom	RPMI ⁺⁺⁺	CCL-86
SEM	humane akute lymphatische Leukämie	IMDM ⁺⁺⁺	ACC 546 (DSMZ No.)
T98G	humanes Glioblastom	DMEM ⁺⁺⁺	CRL-1690

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Techniken

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) wurden DNA-Bereiche gezielt amplifiziert oder Restriktionsschnittstellen für nachfolgende Klonierungsschritte eingefügt. Der verwendete PCR-Ansatz ist in Tabelle 3.1 aufgeführt, während das für die Amplifikation verwendete Programm in Tabelle 3.2 gezeigt ist. Die Reaktion erfolgte in einer Biometra® TGradient PCR-Maschine.

Tabelle 3.1. PCR Reaktionsansatz.

Reagenzien	Mengen
<i>template</i> -DNA	50 – 100 ng
dNTPs (10 mM)	1 µl
Q5-Polymerasepuffer	10 µl
<i>GC Enhancer</i>	10 µl
<i>forward</i> -Primer (10 µM)	1 µl
<i>reverse</i> -Primer (10 µM)	1 µl
Q5-Polymerase	1 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Tabelle 3.2 Reaktionsschritte der durchgeführten PCRs.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	30 sek	1
Denaturierung	98 °C	20 sek	25
Hybridisierung	T _A (Primer-spezifisch)	30 sek	
Elongation	72 °C	30 sek/kb	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1

Um einen definierten DNA-Bereich zu amplifizieren, wurden Sequenz-spezifische Oligonukleotide verwendet, deren Primer-spezifische, optimale *Annealing*-Temperatur (T_A) für die Hybridisierung zuvor kalkuliert wurde (biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html). Im Anschluss an die PCR wurden die amplifizierten DNA-Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt und mit einem Gel-Extraktionskit isoliert (siehe 3.1.5 und 3.1.6).

3.1.2 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

DNA-Fragmente können mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen Sequenz-spezifisch gespalten werden. Für den DNA-Verdau wurden jeweils 5 *Units* (U) des entsprechenden Restriktionsenzym (New England Biolabs, Frankfurt am Main) mit 2 μg DNA für 2 h bei 37 °C inkubiert. Als Reaktionspuffer wurde der vom Hersteller empfohlene Puffer verwendet. Beim Einsatz von zwei Restriktionsendonukleasen wurde ein Reaktionspuffer gewählt, welcher die Aktivität beider Endonukleasen gewährleistet. Nach der Inkubationszeit wurden die entstandenen DNA-Fragmente über ein Agarosegel aufgetrennt und das gewünschte Fragment mit Hilfe eines Gel-Extraktionskits isoliert (siehe 3.1.5 und 3.1.6).

3.1.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Nach erfolgreichem Restriktionsverdau und Gewinnung der gewünschten DNA-Fragmente aus dem Agarosegel wurden diese zusammen mit Plasmid-DNA mittels T4-DNA-Ligase (1 U, New England Biolabs, Frankfurt am Main) über spezifische Schnittstellen verknüpft. Insgesamt wurden bis zu 50 ng Plasmid-DNA und *Insert* in einem Verhältnis von 1:3 eingesetzt.

Dabei wurde die einzusetzende Menge wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Plasmid – DNA [ng]} \times \text{Insert [bp]}}{\text{Plasmid – DNA [bp]}} \times \frac{3}{1} = \text{Insert [ng]}$$

Die Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 20 μl auf Eis mit dem vom Hersteller bereitgestellten T4-DNA-Ligase Puffer angesetzt. Nach einer Inkubation des Ligationsansatzes über Nacht bei 16 °C wurde dieser unmittelbar für die Transformation von chemisch kompetenten Bakterien verwendet (siehe 3.1.8).

3.1.4 Isothermaler Zusammenbau nach Gibson

Bei dem isothermalen Zusammenbau nach Gibson (*Gibson assembly*) können mehrere DNA-Fragmente ohne die Verwendung von Restriktionsendonukleasen verknüpft werden. Dabei werden in einem Zwei-Stufen-Prozess zunächst die benötigten DNA-Fragmente mittels PCR amplifiziert und homologe DNA-Sequenzen mit Hilfe von Überhangprimern generiert (siehe 3.1.1). Im Anschluss werden durch die Verwendung von DNA-Exonukleasen einzelsträngige 3'-DNA-Überhänge generiert, welche die Hybridisierung von homologen Sequenzen ermöglichen. Simultan werden die fehlenden Nukleotide durch die Q5-Polymerase aufgefüllt und die hybridisierten DNA-Stränge durch die T4-DNA-Liase miteinander ligiert. Für den isothermalen Zusammenbau nach Gibson wurde das NEBuilder® *HiFi DNA Assembly Cloning Kit* (New England Biolabs, Frankfurt am Main) verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß der Herstellerangaben. Im Anschluss an eine 20-minütige Inkubation bei 50 °C wurde das entstandene DNA-Produkt unmittelbar für die Transformation von chemisch kompetenten Bakterien genutzt.

3.1.5 DNA-Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden Nukleinsäure-Ketten abhängig von ihrer Größe aufgetrennt. Somit können DNA-Fragmente, welche durch Restriktionsverdau oder PCR entstanden sind, analysiert oder für ihre weitere Verwendung isoliert werden. Für die Auftrennung wurden die DNA-Proben zunächst mit DNA-Ladepuffer versetzt und im Anschluss in einem Ethidiumbromid enthaltenden Agarosegel (1%) aufgetrennt. Die Separation erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V. Als Laufpuffer wurde 1x TAE Puffer verwendet (siehe Tabelle 3.3). Die DNA-Fragmente wurden im Anschluss unter UV-Licht detektiert und gegebenenfalls isoliert.

Tabelle 3.3 Verwendete Komponenten zur Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese

Materialien	Zusammensetzung / Hersteller
Agarose	1% [w/v] in 1x TAE-Puffer
1x TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer	40 mM Tris 1 mM EDTA pH 8,0 – mit Eisessig eingestellt
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml (Roth) 1:10.000 im Agarosegel verdünnt

Materialien	Zusammensetzung / Hersteller
DNA-Ladepuffer	<i>Gel Loading Dye, Purple (6x)</i> (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
DNA-Größenstandard	1 kb+ DNA-Marker (Thermo Scientific, Dreieich) 100 bp+ DNA-Marker (Thermo Scientific, Dreieich)

3.1.6 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der Agarose-Gelelektrophorese und der Detektion der DNA-Fragmente unter UV-Licht wurden Gelstücke mit den gewünschten DNA-Fragmenten ausgeschnitten und die DNA-Fragmente im Anschluss mit Hilfe des *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo Fisher Scientific) gemäß der Herstellerangaben aus dem Agarosegel aufgereinigt und in 20 µl ddH₂O eluiert.

3.1.7 Herstellung von chemokompetenten Bakterien

Transformationspuffer 1	100 mM RbCl
	50 mM MnCl ₂
	30 mM KAc
	10 mM CaCl ₂
	13% (v/v) Glycerin
	pH 5,8 – eingestellt mit Eisessig
Transformationspuffer 2	10 mM MOPS (pH 7,0)
	10 mM RbCl
	75 mM CaCl ₂
	13% (v/v) Glycerin
	pH 7,0 – eingestellt mit NaOH

Um chemokompetente Bakterien für die Transformation herzustellen, wurden 5 ml LB-Medium mit *E. coli* Bakterien des Stammes TOP10 oder Stbl3 inokuliert. Im Anschluss wurde der Ansatz bei 37 °C und 180 rpm (Schüttelinkubator) kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Vorkultur in 400 ml frisches LB-Medium überführt und weiter bei 37 °C kultiviert. Sobald die Bakterienkultur eine optische Dichte

(OD₆₀₀) von 0,5 erreicht hatte, wurde die Kultur auf Eis für 15 min abgekühlt und anschließend bei 3.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Bakterienpellet wurde in 133 ml kaltem Transformationspuffer 1 aufgenommen, für 2 h auf Eis inkubiert und im Anschluss bei 6.000 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Im finalen Schritt wurde das Pellet in 10 ml eiskaltem Transformationspuffer 2 suspendiert, die entstandenen chemokompetenten Bakterien wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.8 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Für die Transformation von eukaryotischen Expressionsplasmiden wurden chemokompetente *E. coli* Bakterien des Stammes XL-1 Blue verwendet, während für die Transformation von lentiviralen Transferplasmiden der rekombinationsdefiziente *E. coli* Stamm Stbl3 genutzt wurde. In beiden Fällen wurden die chemokompetenten Bakterien zunächst auf Eis aufgetaut. Der Transformationsansatz bestehend aus 50 µl Bakteriensuspension (XL-1 Blue oder Stbl3) und 100 ng Plasmid-DNA oder 20 µl Ligationsansatz wurde für 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgten ein Hitzeschock der Bakterien bei 42 °C für eine Minute und eine Inkubation auf Eis für eine weitere Minute. Die transformierten Bakterien wurden in 500 µl LB-Medium überführt und der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension auf eine Ampicillin-enthaltende LB-Agar-Platte (Selektionsantibiotikum) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht kultiviert.

3.1.9 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Von den über Nacht kultivierten transformierten Bakterienkulturen wurden Einzelkolonien mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen, in LB-Selektionsmedium (Ampicillin) überführt und über Nacht bei 37 °C expandiert. Um zu analysieren, ob die gewünschte Plasmid-DNA in *E. coli* eingebracht werden konnte, wurden 3 ml der Bakterienkultur bei 13.000 rpm pelletiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA laut Herstellerangaben mit Hilfe des *GeneJET* Plasmid Mini Kits isoliert. Für die Isolierung von größeren Mengen an Plasmid-DNA aus bis zu 350 ml Bakterienkultur wurde das NucleoBond® Xtra Maxi-Kit (Macherey-Nagel, Düren) laut Herstellerangaben verwendet.

3.1.10 Bestimmung der DNA-Konzentration und DNA-Sequenzierung

Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe des NanoDrop™ 1000 Spektrophotometers (Thermo Scientific, Dreieich) durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 230 nm bestimmt. Zur Sequenzanalyse wurde der Service einer externen Firma (Eurofins Sequencing, Luxemburg) herangezogen. Dazu wurden 25 pmol Primer mit 500 ng der zu analysierenden DNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl angesetzt. Die Analyse der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit der Software SnapGene Viewer.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Herstellung von Zelllysaten

RIPA (<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>)-Puffer	50 mM Tris HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl 5 mM EDTA 0,1% [w/v] SDS 0,5% [w/v] Na-Desoxycholat 1% [v/v] NP-40
10x PhosSTOP Phosphatase-Inhibitor Cocktail	1 Tablette in 1 ml RIPA-Puffer
7x Complete Protease-Inhibitor Cocktail	1 Tablette in 1,5 ml RIPA-Puffer

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden Zellen zunächst geerntet und einmal mit PBS gewaschen. Je nach Größe des entstandenen Zellpellets wurde dieses in 40 – 80 µl Lyse-Puffer, bestehend aus RIPA-Puffer, PhosSTOP Phosphatase-Inhibitor 1:10 [v/v] und Complete Protease-Inhibitor 1:7 [v/v], suspendiert und auf Eis für 20 min inkubiert. Um einen vollständigen Aufschluss zu bewerkstelligen, wurden die Zelllysate im Anschluss dreimal für jeweils 30 sek bei mittlerer Intensität sonifiziert. Im finalen Schritt wurde der Ansatz für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und dabei das Proteinlysate von den Zellfragmenten getrennt. Das Proteinlysate wurde abgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt (3.2.2). Die längerfristige Lagerung der Lysate erfolgte bei -20 °C.

3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten wurde ein quantitativer Bradford-Assay durchgeführt. Mit Hilfe einer zuvor gemessenen BSA-Standardkurve kann die Proteinkonzentration mittels Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes bestimmt werden.

$$\text{Lambert-Beer'sche Gesetz } E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} * c * d$$

Die gemessene Extinktion (E_{λ}) ist bei gleichbleibender Schichtdicke des durchstrahlten Körpers (d) und dem gleichen substanzspezifischen, dekadischen Extinktionskoeffizienten ε_{λ} , linear abhängig von der Stoffmengenkonzentration der absorbierenden Substanz (c).

Zur Konzentrationsbestimmung wurde 1 μl des Proteinlysats mit 999 μl Bradfordlösung (angesetzt laut Herstellerangaben; Bio-Rad, Feldkirchen) gemischt und die Absorption an einem Evolution 60 Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

3.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels NanoDrop

Die Proteinkonzentration gereinigter rekombinanter Proteine wurde mit Hilfe eines NanoDrop™ 1000 Spektrophotometers (Thermo Scientific, Dreieich) bestimmt. Dazu wurde unter Berücksichtigung der molekularen Masse und des spezifischen Extinktionskoeffizienten des jeweiligen Proteins die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen.

3.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine abhängig von ihrer Molekülmasse zu trennen, wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Hierzu wurden zunächst SDS-Polyacrylamidgele mit einer Konzentration von 12% laut Herstellerangaben hergestellt (Tabelle 3.4). Um die Proben vor der Auftrennung zu konzentrieren, unterteilt sich das hergestellte SDS-Polyacrylamidgel in ein Sammel- und ein Trenngel. Zur Aufbereitung der Probe wurde die Proteinlösung in einem Verhältnis von 1:5 mit reduzierendem (+ 5% β -Mercaptoethanol) oder nicht-reduzierendem Probenpuffer gemischt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Sowohl die Probe als auch der Größenstandard wurden auf das Gel aufgetragen und bei einer konstanten Spannung von 300 V ihrer Masse nach getrennt. Für die

daraufliegende Analyse wurde das Gel entweder mittels Coomassie-Färbung (3.2.5) angefärbt oder als Grundlage für einen Immunoblot (3.2.6) verwendet.

Tabelle 3.4 TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit: 12% SDS-Polyacrylamidgel

Komponente	Sammelgel	Trenngel
Stacker A	1,5 ml	x
Stacker B	1,5 ml	x
Resolver A	x	4 ml
Resolver B	x	4 ml
TEMED	20 µl	20 µl
10% APS	40 µl	60 µl

3.2.5 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung

Coomassie Färbelösung	0,25% [w/v] Coomassie Brilliant Blue R-250 30% [v/v] Ethanol 10% [v/v] Essigsäure
Coomassie Entfärbelösung	30% [v/v] Ethanol 10% [v/v] Essigsäure

Die Analyse der zuvor aufgetrennten Proteine erfolgte unter anderem mit Hilfe einer Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung. Hierzu wurde das Polyacrylamidgel über Nacht bei Raumtemperatur in Coomassie Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie Entfärbelösung entfärbt, sodass nur noch die angefärbten Proteinbanden sichtbar blieben. Mit Hilfe der Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung konnte sowohl die Reinheit der Proteine als auch deren Molekülmasse im Vergleich zu einem Größenstandard bestimmt werden. Nicht-reduzierende Bedingungen ermöglichten zusätzlich das Auftreten der Proteine als Monomer oder Multimer zu analysieren.

3.2.6 Immunoblot-Analyse

Blocking-Puffer

5% [w/v] BSA in PBS-T

Um spezifische Proteine zu identifizieren, wurden die gemäß 3.2.4 aufgetrennten Proteine zunächst auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert und anschließend mit spezifischen Antikörpern detektiert. Für die Übertragung wurde das Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, Feldkirchen) basierend auf dem *Semi-Dry*-Verfahren verwendet. Zunächst wurde die PVDF-Membran für 1 min in Ethanol aktiviert und im Anschluss zusammen mit den Filterpapieren mit Trans-Blot Turbo Puffer getränkt. Das Blot-Sandwich wurde wie folgt in der Kassette des Gerätes aufgebaut: ein Filterpapier, PVDF-Membran, SDS-Polyacrylamidgel und abschließend ein weiteres Filterpapier (**Abbildung 3.1**). Potenziell entstandene Luftblasen wurden aus dem Sandwich entfernt und der Deckel der Kassette vorsichtig auf dem Blot-Sandwich positioniert und geschlossen. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 25 V für 7 min.

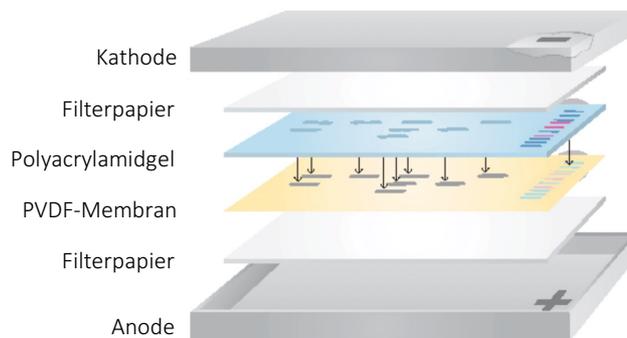


Abbildung 3.1. Aufbau innerhalb der Blotting-Apparatur. Adaptiert von Quick Start Guide Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, Feldkirchen).

Nach beendetem Transfer wurde die PVDF-Membran für 1 h in *Blocking*-Puffer und anschließend über Nacht bei 4 °C mit der Primärantikörper-Lösung inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran zunächst dreimal für 5 min mit TBS-T gewaschen und anschließend mit *Horseradish peroxidase* (HRP)-gekoppelten Antikörpern in *Blocking*-Puffer versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur und drei weiteren Waschschritten mit TBS-T erfolgte die Detektion gebundener Antikörper mittels HRP Substrat-Lösung (ECL Western Blotting Substrate; Thermo Scientific, Dreieich). Hierzu wurde die PVDF-Membran mit der Substratlösung bedeckt und für 1 min inkubiert. Durch die Umsetzung des Substrats wird Licht emittiert, welches mit einem aufgelegten Röntgenfilm detektiert wurde.

Für den Nachweis von gereinigten, rekombinanten Antikörpern, die eine humane IgG-Fc-Domäne enthielten, wurde nach der einstündigen Inkubation in *Blocking*-Puffer unmittelbar der passende Sekundärantikörper zugegeben. Da dieser an den humanen Fc-Teil bindet, ist die Zugabe eines Primärantikörper für die Detektion nicht notwendig. Nach 2-stündiger Inkubation in Sekundärantikörper-Lösung wurde wie bereits oben beschrieben verfahren.

3.2.7 Reinigung von rekombinanten Proteinen

Protein-G-Affinitätschromatographie

Auftragspuffer	20 mM Phosphatpuffer 20 mM Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) 20 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) pH 7,0
Elutionspuffer	100 mM Citratpuffer 100 mM Natriumcitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 100 mM Zitronensäure ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) pH 2,8
Neutralisationspuffer	1 M Tris pH 9,0

Um rekombinante, IgG-basierte bispezifische Antikörperformate zu reinigen, wurde eine Protein-G-Affinitätschromatographie durchgeführt. Die zu reinigenden Proteine wurden in Expi293F Zellen exprimiert und in den Zellkulturüberstand sekretiert (3.3.8). Nach 5-tägiger Inkubation wurden die Kulturen geerntet und zunächst bei $2.500 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der gewonnene proteinhaltige Überstand über einen PVDF-Membranfilter (Porengröße $0,45 \mu\text{m}$; Millipore) gegeben, um verbliebene Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Die Reinigung der erhaltenen Proteine erfolgte an einer Äkta-FPLC-Anlage (Pharmacia, Karlsruhe). Zunächst wurde die Protein-G Säule (1 ml Säulenvolumen, Thermo Fisher Scientific) mit 6 Säulenvolumen Auftragspuffer äquilibriert und im Anschluss der filtrierte Zellkulturüberstand auf die Säule aufgetragen. Im Weiteren erfolgte ein Waschschrift mit 6 ml Auftragspuffer. Durch die Affinität von Protein-G an

Methoden

humanes IgG verbleiben die bispezifischen Antikörper an der Säule, während unspezifisch gebundene Proteine im Waschschrift von der Säule gelöst werden. Im Elutionsschritt wurden die rekombinanten, bispezifischen Antikörper mit 6 ml Elutionspuffer durch die Veränderung des pH-Wertes ins saure Milieu von der Säule gelöst. Die Elution erfolgte in 2 ml Fraktionen. Zuvor wurden in die Auffanggefäße 0,5 ml Neutralisationspuffer vorgelegt, um einen negativen Einfluss des sauren Elutionspuffers auf die gereinigten Proteine zu verhindern. Alle Schritte erfolgten mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min. Um zu untersuchen, welche Fraktionen das gewünschte Protein enthalten, wurde ein Teil des Eluats für die Durchführung einer SDS-PAGE (3.2.4) und eines Immunoblots (3.2.6) verwendet. Nach der Identifikation der proteinhaltigen Fraktionen wurden diese vereinigt und in einen Dialyseschlauch (MWCO 10K) zum Entsalzen und Pufferaustausch überführt. Die Dialyse erfolgte über Nacht in 10 l PBS bei 4 °C. Zur Analyse der finalen Proteinpräparation wurden erneut eine SDS-PAGE (3.2.4) und ein Immunoblot (3.2.6) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels NanoDrop (3.2.3) bestimmt.

Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

Auftragspuffer	1 M NaCl pH 8,8
Elutionspuffer	1 M NaCl 0,5 M Imidazol pH 8,8

Für die Reinigung des His₆-Tag gekoppelten IL-15 Superagonisten wurde eine IMAC durchgeführt. Wie zuvor beschrieben, wurde der IL-15 Superagonist in Expi293F Zellen exprimiert (3.3.8) und der Zellkulturüberstand vor der Reinigung zentrifugiert (2.500 x g, 5 min) und filtriert (PVDF Membran; Porengröße 0,45 µm; Millipore). Im ersten Schritt wurde eine bereits beladene Nickelsäule (HisTrapTM HP; GE Healthcare, Solingen) mit 6 Säulenvolumen Auftragspuffer äquilibriert und mit dem Zellkulturüberstand beladen. Anschließend wurde die Säule mit 6 ml Auftragspuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Zur Elution des IL-15 Superagonisten wurde ein Imidazol-Gradient (2-50%) erzeugt. Hierbei agiert Imidazol als ein kompetitiver Inhibitor für den an den IL-15 Superagonisten gekoppelten und an die Säule gebundenen His₆-Tag und verdrängt diesen aus dem Chelat-Komplex auf der Säule. Die Elution erfolgte in 2 ml Fraktionen. Alle Schritte wurden mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min durchgeführt. Mittels SDS-PAGE (3.2.4) und Immunoblotanalyse (3.2.6) wurden die proteinhaltigen Fraktionen identifiziert, vereinigt und über Nacht im

Methoden

Dialyseschlauch in 10 l PBS bei 4 °C dialysiert. Im nächsten Schritt wurde die Proteinkonzentration mittels NanoDrop (3.2.3) bestimmt. Im letzten Schritt beider Reinigungsvarianten wurden die gewonnenen Proteine bei Bedarf mit Zentrifugalfiltereinheiten mit einer Molekulargewichtsgrenze (*Molecular weight cut-off*, MWCO) von 50 kDa (Merck Millipore, Darmstadt) konzentriert.

3.2.8 *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

PBS-T	8,06 mM Na ₂ HPO ₄ 1,47 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 2,67 mM KCl 0,05% TWEEN pH 7,5
Blocking-Puffer	7,5% [w/v] BSA in DPBS (1x)
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)

Zur Quantifizierung des sekretierten IL-15 Superagonisten im Zellkulturüberstand von NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen wurde ein *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) durchgeführt. Hierzu wurden zunächst definierte Zellzahlen an IL-15 Superagonist sekretierenden Zellen für 3 Tage in X-VIVO 10⁺ (+/- IL-2) kultiviert. Im Anschluss wurde der Überstand nach einer Zentrifugation bei 2.000 rpm für 4 min geerntet und unmittelbar verwendet.

Für den ELISA wurde eine 96-Well-ELISA-Platte mit 100 µl/Vertiefung anti-human IL-15 Antikörper (2 µg/ml, in PBS) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung entfernt und freie Bindungsstellen wurden mit 200 µl/Vertiefung *Blocking*-Puffer für 1 h bei 37° C abgesättigt. Nach drei Waschsritten mit 200 µl/Vertiefung PBS-T wurden 100 µl des zu analysierenden Überstandes der RD-IL15 sekretierenden Zellen in jeweils eine Vertiefung der ELISA Platte pipettiert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Standardkurve durch serielle Verdünnung des zuvor produzierten His₆-RD-IL15 beginnend mit einer Konzentration von 125 ng/ml (in *Blocking*-Puffer) erstellt. Zusätzlich wurde als Kontrolle *Blocking*-Puffer mitgeführt. Alle Proben wurden als Triplikate angesetzt. Nachdem die Platte bei 37 °C für 2 h inkubiert wurde, erfolgten drei Waschsritte mit PBS-T gefolgt von der Zugabe von 100 µl/Vertiefung eines Biotin-gekoppelten humanen IL15-Rα-spezifischen Detektionsantikörpers (0,5 µg/ml in *Blocking*-Puffer). Die Platte

wurde erneut bei 37 °C für 1 h inkubiert, bevor nach drei weiteren Waschschritten die Detektion des IL-15 Superagonisten erfolgte. Hierfür wurde HRP-konjugiertes Streptavidin 1:10.000 in *Blocking-Puffer* verdünnt und 100 µl davon wurden in die jeweiligen Vertiefungen der Platte gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation (37 °C) und drei anschließenden Waschschritten (PBS-T) wurden 100 µl der TMB-Substratlösung in die Vertiefungen gegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Um die enzymatische Reaktion zu stoppen, wurden im Anschluss 100 µl/Vertiefung 0,5 M Schwefelsäure zugegeben. Der durch die Reaktion induzierte Farbumschlag wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm an einem Spektrophotometer (SpectraMax® iD3) gemessen. Anhand der Standardkurve wurde die Menge an IL-15 Superagonisten im Zellkulturüberstand quantifiziert.

3.2.9 Erzeugung von fluorochromgekoppelten Antikörpern

Gereinigte, bispezifische Antikörpermoleküle wurden mit Hilfe eines *Antibody-Conjugation-Kit* (Abcam) mit dem Fluorochrom APC gekoppelt. Die verwendeten Antikörper wurden hierzu zunächst auf 1 mg/ml konzentriert und anschließend gemäß Herstellerangaben mit dem Fluorochrom gekoppelt.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung von Zelllinien

In dieser Arbeit wurden ausschließlich eukaryotische Zelllinien (2.13) verwendet. Diese wurden im entsprechenden Medium (Tabelle 2.13) bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die zur Proteinproduktion verwendete Zelllinie Expi293F wurde bei 8% CO₂ in einem Schüttelinkubator bei 125 rpm kultiviert. Aufgrund von unterschiedlichen Wachstumsraten wurden die Zellkulturen regelmäßig auf ihre Dichte und Vitalität überprüft und zwei- bis dreimal in der Woche passagiert. Adhärenz Zellen wurden dafür mit 0,05%igem Trypsin/EDTA und Inkubation bei 37 °C von der Oberfläche der Zellkulturflasche gelöst und dann je nach Zelldichte mit frischem Zellkulturmedium verdünnt und ausgesät. Bei Suspensionszellen ist ein Ablösen der Zellen mittels Trypsin/EDTA nicht notwendig, sodass diese direkt aus der Flasche entnommen werden konnten. Nach einer Zentrifugation bei 1.300 rpm für 3 min und dem Verwerfen des verbrauchten Kulturmediums, wurde das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und die gewünschte Menge an Zellsuspension in eine neue Flasche überführt.

3.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden Einmal-Zählkammern (KOVA International, Amsterdam, Niederlande) verwendet. Die jeweilige Zellsuspension wurde 1:1 mit 0,4% Trypanblau (Gibco, Schwerte) gemischt und 15 µl des Ansatzes in die Einmal-Zählkammer überführt. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran werden nicht von Trypanblau angefärbt, während der Farbstoff die Zellmembran von toten Zellen passieren kann. Lebende Zellen wurden gezählt und die Zelldichte wurde mit der nachfolgenden Formel bestimmt:

$$\text{Zelldichte} \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Anzahl gezählter Zellen}}{\text{Anzahl Zählquadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor}$$

Um die Vitalität zu bestimmen, wurden neben den lebenden auch die toten Zellen gezählt und die jeweiligen Zellzahlen in ein prozentuales Verhältnis gebracht.

3.3.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Um Zellen dauerhaft zu lagern, wurden diese kryokonserviert. Dafür wurden die Zellen geerntet und im entsprechenden Einfriermedium (2.12) suspendiert. NK-Zellen wurden bei einer Zelldichte von mindestens 1 Mio. Zellen/ml kryokonserviert. Im Anschluss wurden die Zellen in Kryoröhrchen überführt, in einer Kryobox zunächst bei -80 °C eingefroren und am nächsten Tag in einen Flüssigstickstoff-Tank (-196 °C) umgelagert. Mit Hilfe der Kryobox wurde sichergestellt, dass die Temperatur der Zellsuspension stetig um 1 °C pro Minute gesenkt wurde.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C langsam und stetig aufgetaut. Sobald die Zellsuspension flüssig war, wurde sie in warmes Kulturmedium überführt. Um DMSO-Reste zu entfernen, wurde die Zellsuspension anschließend zentrifugiert (1.300 rpm, 3 min) und das Zellpellet in frischem, vorgewärmtem Medium aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt. Im Fall von NK-Zellen erfolgte einen Tag nach dem Auftauen ein vollständiger Austausch des Mediums.

3.3.4 Bestrahlung von Zellen

Zu bestrahlende Zellen wurden in ein 15 ml Falcon überführt und in der Bestrahlungskammer des Biobeam GM 2000 (Gamma Service Medical, Leipzig) platziert. Anschließend wurden die Zellen mit der gewählten Gammastrahlung bei einer Dosisrate von 2,5 Gy/min \pm 25% bestrahlt.

3.3.5 Transfektion von Zellen mittels FuGene

Für die Transduktion von Zellen wurden zunächst lentivirale VSV-G (*Vesicular Stomatitis Virus Protein-G*) pseudotypisierte Vektorpartikel in HEK293T Zellen hergestellt. Einen Tag vor der Transfektion wurden 4×10^6 HEK293T Zellen in 10 ml DMEM⁺⁺⁺ in eine Zellkulturschale ausgesät. Am Folgetag wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen wurden vorsichtig mit PBS gewaschen, bevor 7 ml frisches Zellkulturmedium zugegeben wurde. Der Transfektionsmix wurde, wie in Tabelle 3.5 aufgeführt, angesetzt und für maximal 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz tröpfchenweise zu den Zellen gegeben. Nach 3 Tagen wurde der Viruspartikel-enthaltende Zellkulturüberstand abgenommen und sterilfiltriert (Porengröße 0,45 μ m; Corning, Kaiserslautern).

Tabelle 3.5 Transfektionsansatz zur Herstellung von lentiviralen Vektorpartikeln

Komponente	Menge
OptiMEM	500 μ l
Hüllplasmid pMD2 (VSV-G) (1 mg/ml)	3,5 μ l
Verpackungsplasmid M334 (gag-pol) (1 mg/ml)	6,5 μ l
Transferplasmid	10 μ g (variables Volumen)
FuGene	60 μ l

3.3.6 Transduktion von Zellen mit lentiviralen Vektorpartikeln

Die zu transduzierenden Zellen wurden zunächst gezählt und dann 5×10^5 Zellen entnommen. Nach einer Zentrifugation bei 1.300 rpm für 3 min wurde das Zellpellet in 2 ml des zuvor gewonnenen Virusüberstandes (3.3.5) suspendiert und in eine 6-Well-Platte ausgesät. Anschließend wurden 8 μ M Polybren pro Vertiefung zugegeben und die Platte wurde bei 1.800 x g und 32 °C für 90 min zentrifugiert. Für die Transduktion von NK-Zellen wurden zusätzlich 6 μ M des Multi-Kinase-Inhibitors

BX795 zugegeben. Dieser dient der Erhöhung der Transduktionseffizienz. Im Anschluss wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung bei 37 °C inkubiert.

3.3.7 Selektion transduzierter Zellen

Die in dieser Arbeit transduzierten NK-Zellen exprimieren das Markerprotein EGFP (*Enhanced green fluorescent protein*) und können daher mittels *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) identifiziert und isoliert werden. Um die Abwesenheit infektiöser Viruspartikel zu gewährleisten, erfolgte die Anreicherung der transduzierten Zellen mittels FACS erst 2 Wochen nach der Transduktion. Die Zellen wurden geerntet und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in sterilem FACS-Puffer (PBS mit 3% [v/v] FCS) suspendiert und mit Hilfe eines Zellsiebes vereinzelt. Am FACSAria Fusion Zellsortierer wurden die transduzierten, EGFP-positiven Zellen unter sterilen Bedingungen gewonnen und anschließend weiter kultiviert. Der prozentuale Anteil an EGFP-positiven Zellen wurde nach einer Woche mittels Durchflusszytometrie überprüft (3.3.11). Falls notwendig, wurde der Zellpool ein zweites Mal sortiert.

Zellen, die kein Markerprotein exprimieren (mit EGFR- und EGFRvIII-Konstrukten transduzierte GL261 Zellen), wurden zunächst mit Antikörpern spezifisch für die eingebrachten Oberflächenrezeptoren gefärbt. Dabei wurden die Zellen für 20 min bei 4 °C mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert (Verdünnungen siehe Tabelle 2.7). Nach zwei Waschschritten mit PBS (Zentrifugation bei 1.300 rpm, 3 min) wurden die Zellen wie bereits oben beschrieben in FACS-Puffer (PBS mit 3% [v/v] FCS) aufgenommen und vereinzelt. Im Anschluss wurden die für die Oberflächenproteine positiven Zellen identifiziert, isoliert und bis zu ihrer Verwendung weiter kultiviert.

3.3.8 Proteinproduktion in transient transfizierten Expi293F Zellen

Für die Produktion rekombinanter, bispezifischer Antikörper wurde das Expi293 Expressionssystem (Gibco, Schwerte) verwendet. Die eingesetzten Expi293F Zellen sind von der HEK293-Zelllinie abgeleitet, wachsen jedoch als Suspensionszellen und versprechen hohe Proteinausbeuten bei transienter Transfektion. Einen Tag vor der Transfektion wurden Expi293F Zellen in einer Dichte von $2,5-3 \times 10^6$ Zellen/ml ausgesät und über Nacht kultiviert. Am Tag der Transfektion wurde sichergestellt, dass die Vitalität der Zellen bei über 95% lag und die Zellzahl erneut bestimmt. Die Zellen wurden mit frischem, vorgewärmtem Medium auf eine Zelldichte von 3×10^6 Zellen/ml eingestellt. Für 25 ml Zellsuspension wurden 25 µg Plasmid-DNA benötigt. Nachdem die Plasmid-DNA mit OptiMEM auf 1 µg/µl verdünnt worden war, wurden 1,5 ml OptiMEM mit 25 µl verdünnter

Plasmid-DNA vorsichtig durch Invertieren gemischt. Im nächsten Schritt wurde das kationische, lipid-basierte ExpiFectamine™ 293-Reagenz angesetzt. Hierzu wurden 80 µl des Reagenz in 1,4 ml OptiMEM für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit der zuvor angesetzten Plasmid-DNA-Lösung gemischt. Nach 15 min wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise zu den Expi293F Zellen gegeben und diese wurden im Inkubator kultiviert. Nach 18-22 h wurde der Transfektionsverstärker bestehend aus 150 µl *Enhancer 1* und 1,5 ml *Enhancer 2* hinzugefügt. Dafür wurden zunächst beide Komponenten gemischt und anschließend dem Zellkulturmedium hinzugefügt. Nach einer Kultivierung für 5 Tage wurden die sekretierten Proteine aus dem Zellkulturüberstand gewonnen (3.2.7).

3.3.9 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Für die Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*Peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Als Ausgangsmaterial dienten hierbei *Buffy-Coats* (Leukozytenkonzentrate) von gesunden Spendern, welche als Nebenprodukte bei einer Vollblutspende anfallen. Das Material eines Spenders wurde jeweils in eine Kulturflasche überführt und mit PBS + 2 mM EDTA auf ein Volumen von 70 ml aufgefüllt. Im Anschluss wurden 35 ml der Probe vorsichtig auf 15 ml Biocoll (Biochrom, Berlin) geschichtet und der Ansatz wurde für 35 min bei 400 x g ohne Bremse (Beschleunigung 8) zentrifugiert (Rotina 46R: Hettich, Tuttlingen). Nach erfolgreicher Zentrifugation sind vier Schichten bestehend aus Plasma, PBMCs, Separationsmedium und Erythrozyten zu erkennen (**Abbildung 3.2**). Die mittlere, Leukozyten enthaltende Schicht wurde abgenommen und in einem 50 ml Schraubdeckelröhrchen gesammelt. Anschließend wurden die gewonnenen Zellen dreimal mit PBS + 2 mM EDTA für jeweils 10 min bei Raumtemperatur gewaschen (Zentrifugation bei 300 x g, 250 x g, 200 x g). Nach dem finalen Zentrifugationsschritt wurden die gewonnenen PBMCs in RPMI⁺⁺⁺ suspendiert, die Zellzahl wurde bestimmt (3.3.2) und die Zellsuspension auf eine Dichte von 1 Mio. Zellen/ml eingestellt. Bis zu ihrer Verwendung wurden die PBMCs, wie in 3.3.1 beschrieben, kultiviert.

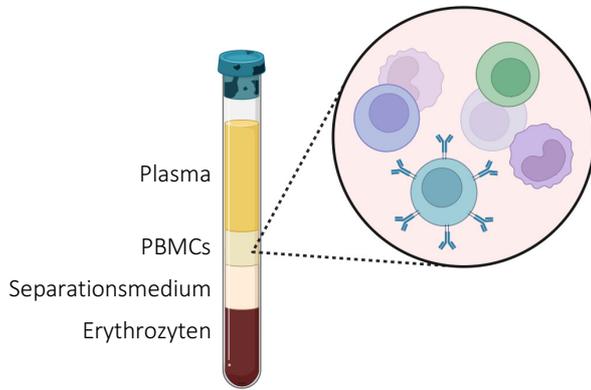


Abbildung 3.2 Gewinnung von PBMCs mit Hilfe von Dichtegradientenzentrifugation.

3.3.10 Isolation von primären NK-Zellen aus humanem Blut

Primäre NK-Zellen wurden mit Hilfe des RosetteSep™ *Human NK Cell Enrichment Cocktail* (Stemcell, Köln) aus dem Blut von gesunden Spendern isoliert. Wie bereits in 3.3.9 dienten als Ausgangsmaterial *Buffy-Coats*. Im ersten Schritt wurden 15 ml des Spendermaterials entnommen und mit 750 µl RosetteSep™ Cocktail gemischt, gefolgt von einer Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 15 ml PBS + 3% FCS zugegeben und der Ansatz wurde vorsichtig auf 15 ml Biocoll (Biochrom, Berlin) geschichtet. Nach einer Zentrifugation für 30 min bei 1.200 x g ohne Bremse, wurde die angereicherte mittlere Zellschicht abgenommen und ein weiteres Mal für 10 min mit 30 ml PBS + 3% FCS (300 x g) gewaschen. Um potenziell verbliebene Erythrozyten zu entfernen, wurden diese lysiert. Dafür wurde 10-fach konzentrierter Lysepuffer (BD Biosciences, Heidelberg) 1:10 mit sterilem Wasser verdünnt und die Zellpellets wurden in 5 ml 1-fach Puffer suspendiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur, wurden die Proben erneut zweimal für 10 min mit PBS + 3% FCS gewaschen (Zentrifugation mit 250 x g; 200 x g) und anschließend in 10 ml Medium (Tabelle 2.12) aufgenommen. Die gewonnenen primären NK-Zellen wurden im finalen Schritt gezählt und zunächst mit einer Ausgangsdichte von 1 Mio. Zellen/ml kultiviert. An Tag 4 der Kultur wurde die Oberflächenexpression von CD56 und CD3 analysiert und die Zellen wurden für weitere Versuche wie Binde- und Zytotoxizitätsassays (3.3.11 und 3.3.12) verwendet.

3.3.11 Durchflusszytometrische Analysen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen hinsichtlich physikalischer und molekularer Eigenschaften wie Größe, Granularität oder Expression von Oberflächenproteinen charakterisiert werden. Für die Analyse wurden die Zellen oder Zellpopulationen zunächst mit PBS gewaschen, anschließend mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt und nach 1-2 weiteren Waschschr

Methoden

in PBS aufgenommen. Die Vereinzelung der Zellen in einem hydrodynamischen Strom und die optische Analyse mittels mehrerer Laser erfolgte im Durchflusszytometer LSRFortessa oder FACSCantoll (BD Biosciences, Heidelberg). Die erhaltenen Daten wurden mit der Software FlowJo® (Version 10.8.1) ausgewertet.

Zellbindung von rekombinanten NKAB-Proteinen

Um die Bindung der in dieser Arbeit hergestellten bispezifischen Antikörper an ihre Zielantigene zu überprüfen, wurden zelluläre Bindungsassays durchgeführt. Nach Zählung der einzusetzenden Zellen und zweimaligen Waschen mit PBS, wurden jeweils 500.000 Zellen in 200 µl PBS aufgenommen und mit 12,5 nM des jeweiligen NKAB-Proteins bei 4 °C für eine Stunde inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen dann für 30 min bei 4 °C mit dem sekundären Antikörper (anti-human-IgG, 1:160 in PBS) inkubiert. Anschließend wurde überschüssiger Sekundärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt, bevor die Proben am Durchflusszytometer analysiert wurden.

Expression von Oberflächenproteinen

Um die Expression von bestimmten Oberflächenproteinen zu analysieren, wurden 500.000 Zellen gewaschen und in 100 µl PBS aufgenommen. Anschließend wurde der entsprechende, Oberflächenprotein-spezifische Antikörper zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 4 °C inkubiert. Die verwendeten Antikörperkonzentrationen sind in Tabelle 2.7 aufgeführt. Für die Detektion von Oberflächenproteinen wurden direkt Fluorochrom-gekoppelte Antikörper verwendet, sodass die Messung unmittelbar nach dreimaligem Waschen erfolgen konnte. Um die Bindung des Fc-Teils der verwendeten Antikörper an die Fc-Rezeptoren von Immunzellen und damit eine unspezifische Färbung zu vermeiden, wurde bei der Färbung von Immunzellen ein Spezies-spezifischer Fc Block (BD Biosciences, Heidelberg) eingesetzt. Die zu färbenden Zellen wurden dazu vor der Zugabe des Antikörpers mit einer 1:100 Verdünnung des Fc Block für mindestens 5 min inkubiert.

Überprüfen der Transduktionseffizienz

Die in dieser Arbeit für die Transduktion von NK-92 Zellen genutzten lentiviralen Vektoren enthalten ein EGFP Markergen, das sie nach erfolgreicher Transduktion exprimieren. Entsprechend konnte der Anteil an EGFP-positiven Zellen ohne weitere Färbungen überprüft werden. Die Zellen wurden geerntet, zweimal gewaschen und für die durchflusszytometrische Messung in PBS suspendiert.

Der für die Transduktion von GL261 Zellen verwendete lentivirale Vektor enthält kein Markergen. In diesem Fall wurde die Expression der eingebrachten Konstrukte EGFR und EGFRvIII wie zuvor beschrieben (3.3.10) mittels Bindung Fluorochrom-gekoppelter Antikörper nachgewiesen und die Transduktionseffizienz wurde so analysiert.

3.3.12 Zytotoxizitätsassay

Calcein Violet AM (CV)-Stammlösung	Thermo Fisher Scientific (Dreieich) 1 mM in DMSO
Propidium-Iodid (PI)-Lösung	PBS 3% [v/v] FCS 1 µg/ml Propidium-Iodid

Um zu überprüfen, ob die Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen durch die genetische Modifikation von NK-Zellen und/oder die Zugabe von bispezifischen Antikörpermolekülen (NKAB-Proteinen) gesteigert werden kann, wurden Zytotoxizitätsassays durchgeführt.

Hierzu wurden 4×10^6 Tumorzellen zweimal mit RPMI ohne Zusätze gewaschen und anschließend in 1 ml 0,1 mM Calcein Violet-Lösung in RPMI suspendiert. Nach einer Inkubation von 20 min bei 4 °C wurden die Zellen erneut mit RPMI gewaschen und schließlich mit einer finalen Dichte von 2×10^5 Zellen/ml in X-VIVO 10⁺⁺ aufgenommen. Die NK-Zellen (Effektorzellen) wurden je nach gewünschtem Effektor (E)- zu Zielzell (T)-Verhältnis (E:T) auf 2×10^6 (10:1), 1×10^6 (5:1) oder 2×10^5 (1:1) Zellen/ml eingestellt. In einer 96-Well-Platte (Rundboden) wurden zunächst 100 µl NK-Zellen vorgelegt und im Anschluss 100 µl der vorbereiteten, gefärbten Tumorzellsuspension zugegeben. Zur Ermittlung der spontanen Lyse von Zielzellen wurden diese zusätzlich in Abwesenheit von NK-Zellen mitgeführt. Nach 2-3 h bei 37 °C wurden die Zellen bei 1.500 rpm für 3 min zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Dann wurden die Zellen unmittelbar vor der Messung am Durchflusszytometer in 100 µl PI-Lösung suspendiert. Die Färbung mit Calcein Violet erlaubte dabei eine Unterscheidung von Effektorzellen und Zielzellen, während der Anteil an toten Zielzellen durch die Messung des PI Signals bestimmt werden konnte. Nur Zellen, deren Zellmembran nicht länger intakt ist, werden mit PI angefärbt. Somit handelt es sich bei CV/PI-doppelt-positiven Zellen um die relevante Population von toten Zielzellen. Um die durch NK-Zellen vermittelte spezifische Lyse zu bestimmen, wurde der prozentuale Anteil an toten Zielzellen gegen spontan lysierte Zellen normalisiert.

Methoden

Zytotoxizitätsassays mit primären NK-Zellen wurden mit einem E:T Verhältnis von 20:1 durchgeführt. Primäre NK-Zellen wurden von gesunden Spendern isoliert (3.3.10) und für 4 Tage kultiviert, bevor sie für den Assay verwendet wurden.

Für die Zytotoxizitätsassays mit bispezifischen Antikörpern wurden die Zielzellen wie bereits oben beschrieben vorbereitet und gefärbt. Danach wurden sie für 15 min bei 4 °C mit unterschiedlichen Konzentrationen an bispezifischen Antikörpern inkubiert, bevor sie in einem E:T Verhältnis von 5:1 zu den NK-Zellen gegeben wurden. Alle weiteren Schritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

3.3.13 Degranulationsassay

Neben Zytotoxizitätsassays wurden Degranulationsassays durchgeführt, um die NK-Zell-Aktivierung und Degranulation nach Kontakt mit Tumorzellen, gegebenenfalls vermittelt durch einen bispezifischen Antikörper, zu analysieren. Der Assay beruht auf der Detektion von CD107a (*Lysosomal-associated membrane protein 1*, LAMP1) auf der Zelloberfläche von NK-Zellen. Nach Aktivierung von NK-Zellen werden u.a. lytische Granula freigesetzt, welche die Eliminierung von Zielzellen auslösen. Die Lipid-Schicht der lytischen Granula enthält das Membranprotein CD107a, welches nach dem Verschmelzen der Granula mit der Zellmembran auf der Oberfläche mittels durchflusszytometrischer Analysen nachgewiesen werden kann. Die Oberflächenexpression von CD107a korreliert dementsprechend mit der Degranulation der analysierten Immunzellen (Alter et al., 2004).

Mastermix	0,25 µl anti-CD107a-PE 0,1 µl Golgi-Stop ad 50 µl X-VIVO 10 ⁺⁺
PMA/Ionomycin	0,075 µl Ionomycin [500 ng/ml] 0,0075 µl PMA [50 ng/ml] ad 50 µl X-VIVO 10 ⁺⁺
Effektorzellen	1x10 ⁵ Zellen in 50 µl X-VIVO 10 ⁺⁺
Zielzellen	1x10 ⁵ Zellen in 50 µl X-VIVO 10 ⁺⁺

Methoden

Um bei der Analyse zwischen Ziel- und Effektorzellen zu unterscheiden, wurden die Zielzellen im ersten Schritt mit FarRed (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) laut Herstellerangaben gefärbt. Im Anschluss wurden 50 µl der NK-Zellen (2×10^6 Zellen/ml) in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte vorgelegt und jeweils 50 µl Zielzellen (2×10^6 Zellen/ml) zugegeben. Als Kontrollen dienten NK-Zellen gemischt mit 50 µl PMA/Ionomycin oder 50 µl K562 Zellen (2×10^6 Zellen/ml) (Positivkontrolle) oder 50 µl X-VIVO 10⁺⁺ (Negativkontrolle). Um die Funktionalität der bispezifischen NKAB-Moleküle zu untersuchen, wurde zu den entsprechenden Ansätzen eine definierte Konzentration (25-100 ng/ml) an NKAB-Molekülen pipettiert. Anschließend wurde jeder Ansatz mit 50 µl des Mastermixes (s. oben) bestehend aus einem CD107a-spezifischem Antikörper, Golgi Stop und X-VIVO 10⁺⁺ gemischt. Nach einer dreistündigen Inkubation bei 37 °C für 3 Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert (1.500 rpm, 3 min) und in 100 µl PBS suspendiert. Unmittelbar vor der Messung am Durchflusszytometer wurde zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen der Fluoreszenzfarbstoff DAPI in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben.

3.3.14 Proliferationsassay

NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen sind genetisch so verändert, dass sie neben einem NKG2D-basierten CAR (NKAR) zusätzlich den IL-15 Superagonisten RD-IL15 exprimieren bzw. sekretieren. Um die Wirkung von sekretiertem RD-IL15 auf die NK-Zellen zu analysieren, wurden NKAR-NK-92 und RD-IL15-NKAR-NK-92 Zellen in An- oder Abwesenheit von IL-2 kultiviert und die Zellzahl und Vitalität wurde über 7 Tage bestimmt. Zu Beginn des Versuches wurden die Zellen dabei zunächst mit PBS gewaschen, um das im Medium enthaltene IL-2 vollständig zu entfernen. Nach Bestimmung von Zellzahl und Vitalität (3.3.2) wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in 200 µl X-VIVO 10 mit oder ohne IL-2 in eine 96 Well Platte ausgesät. Jede Probe wurde in Triplikaten angesetzt. An Tag 1, 4 und 7 erfolgte erneut die Bestimmung der Vitalität und Zelldichte. Für Vitalitäts- und Proliferationsassays mit RD-IL15-NKAB-ErbB2 wurden $2,5 \times 10^5$ NKAR-NK-92 Zellen in 200 µl X-VIVO 10 ausgesät und für 7 Tage in Medium mit IL-2, ohne IL-2 oder mit RD-IL15-NKAB-ErbB2 (50 ng/ml) kultiviert. An Tag 3 wurde die entsprechende Probe erneut mit RD-IL15-NKAB-ErbB2 (50 ng/ml) stimuliert. Eine Restimulation mit IL-2 erfolgte nicht. Auch hier wurde die Zellzahl und Vitalität der Zellen an Tag 0, 1, 4 und 7 bestimmt

3.3.15 Transwell-Assays

Um den Einfluss des sekretierten IL-15 Superagonisten RD-IL15 auf benachbarte Immunzellen zu untersuchen, wurden Transwell-Assays durchgeführt. Durch die Verwendung von Transwell-Zellkultureinsätzen (Porengröße 0,4 µm) können Zellpopulationen räumlich voneinander getrennt

Methoden

werden, während der Austausch von löslichen Molekülen, wie z.B. RD-IL15, weiterhin möglich ist. Durch diesen Versuchsaufbau kann überprüft werden, ob RD-IL15 benachbarte Zellen, unter Ausschluss von direktem Zell-Zell-Kontakt, stimulieren kann.

Transwell-Zytotoxizitätsassay

Zellkultureinsätze (ThinCERT™ Cell Culture Inserts)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Propidium-Iodid (PI)-Lösung	PBS 3% [v/v] FCS 1 µg/ml Propidium-Iodid

Zunächst wurden 1×10^6 RD-IL15 sekretierende oder nicht weiter modifizierte NKAR-NK-92 Zellen/ml in X-VIVO 10⁺ ohne IL-2 ausgesät und für drei Tage kultiviert. Danach wurde das konditionierte Medium abgenommen und die NK-92 Zellen wurden für den Versuch geerntet. Als zu untersuchende Effektorzellen dienten dabei isolierte PBMCs gesunder Spender (3.3.9). Diese wurden in einer Zelldichte von $2,4 \times 10^6$ Zellen in 1 ml des jeweiligen konditionierten Mediums suspendiert und in eine 24-Well-Platte ausgesät. Im Anschluss wurden die Transwelleinsätze eingesetzt und 300 µl der NKAR(-RD-IL15)-NK-92 Zellen wurden zugegeben (3×10^5 Zellen). Als Positivkontrolle dienten PBMCs suspendiert in frischem Medium (X-VIVO 10⁺, ohne IL-2) supplementiert mit rekombinatem humanem IL-15 (50 ng/ml). Nach einer Inkubation über Nacht wurden K562 Zellen, welche als Zielzellen dienten, mit Calcein Violet gefärbt (3.3.12) und in einem Verhältnis von 1:20 zu den PBMCs gegeben. PBMCs und K562 Zellen wurden für 2 h kokultiviert, geerntet und mit PBS gewaschen. Um tote Zielzellen zu identifizieren, wurden die Proben unmittelbar vor der Messung am Durchflusszytometer mit PI-Lösung gefärbt. Im Anschluss wurde der prozentuale Anteil an toten Zielzellen (PI/CV-doppelt-positiv) bestimmt.

Transwell-Gemischte Lymphozyten Reaktion (GLR)

Zellkultureinsätze (ThinCERT™ Cell Culture Inserts)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
CellTrace™ CFSE	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
MojoSort™ Human CD3 Selection Kit	Biolegend (Koblenz)

Methoden

Um den Effekt von sekretiertem RD-IL15 auf umgebende Immunzellen zu analysieren, wurden PBMCs zunächst wie in 3.3.9 beschrieben isoliert, mit CFSE gefärbt (Effektorzellen) und auf eine Dichte von 3×10^6 Zellen/ml eingestellt (X-VIVO 10⁺). Isolierte PBMCs eines zweiten Spenders (Stimulatorzellen) wurden mit Hilfe des *MojoSort™ Human CD3 Selection Kits* einer CD3-Negativselektion unterzogen und mit 25 Gy bestrahlt (3.3.4). Die bestrahlten, CD3⁻ Zellen wurden anschließend mit den parallel isolierten und gefärbten Effektorzellen in einem Verhältnis von 1:1 (jeweils 50 µl) gemischt und mit X-VIVO 10⁺ auf 200 µl aufgefüllt. Konditioniertes Medium wurde wie zuvor beschrieben durch 3-tägige Kultivierung RD-IL15 sekretierender oder nicht weiter modifizierter NKAR-NK-92 gewonnen. RD-IL15 sekretierende NK-Zellen oder NKAR-NK-92 Zellen wurden auf eine Dichte von 3×10^5 Zellen/ml mit dem jeweiligen konditionierten Medium eingestellt und jeweils 1 ml der angesetzten Zellsuspension wurde in die Vertiefung einer 24-Well-Platte überführt. Im Anschluss wurden die Transwelleinsätze in die 24-Well-Platte eingesetzt und 300 µl der zuvor hergestellten Kokultur aus Effektor- und Stimulatorzellen in die Einsätze pipettiert. Der allogene MHC-I-Komplex der Stimulatorzellen vermittelt hierbei die immunstimulatorische Wirkung auf die Effektorzellen. Effektorzellen, welchen in Anwesenheit von NKAR-NK-92 Zellen kultiviert wurden dienten als Negativkontrolle. Außerdem wurden $1,5 \times 10^5$ Effektorzellen (50 µl) gelöst in 200 µl X-VIVO 10⁺ in die Vertiefung einer 96-Well-Platte überführt und entweder ohne Zugabe von immunstimulatorischer Faktoren oder mit 20 ng/ml rekombinanten IL-15 kultiviert. Nach einer Inkubation von 4 Tagen bei 37 °C wurden die Kokulturen aus Effektor- und Stimulatorzellen restimuliert. Dazu wurden diese geerntet und bei 1300 rpm für 3 min abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 300 µl frischem Kulturmedium suspendiert. Kontrollen, welche im 96-Well Format kultiviert wurden, wurden wieder in dieses überführt und unter den zuvor beschriebenen Bedingungen stimuliert. Für die Kokulturen im Transwell-Format, wurden zunächst, wie bereits oben beschrieben, NKAR-(RD-IL15-)NK-92 Zellen erneut in frisch gewonnenem konditioniertem Medium auf eine Zellzahl von 3×10^5 Zellen/ml eingestellt und in einer 24-Well-Platte ausgesät. Anschließend wurden die in frischem Medium resuspendierten Kokulturen in die eingesetzten Zellkultureinsätze gegeben und weiter kultiviert. Am Tag 8 wurde die Proben geerntet, zweimal mit DPBS (1x) gewaschen und mit einem anti-human CD8 Antikörper gefärbt. Nach einer 30-minütigen Inkubation und zwei weiteren Waschschritten erfolgt die durchflusszytometrische Analyse am LSRFortessa. Durch die Abnahme des CFSE-Signals und die Antikörperfärbung war es möglich die Proliferation von CD8-positiven T-Zellen zu analysieren.

3.4 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie können sowohl optische Schnitte abgebildet als auch dreidimensionale Aufnahmen erzeugt werden. Hierzu werden die Proben im Rasterverfahren mit einem fokussierten Laserstrahl abgetastet und die dabei entstehenden Daten mit Hilfe eines digitalen Bildverarbeitungsprogrammes zusammengesetzt und analysiert. Zur Erzeugung dreidimensionaler Aufnahmen wird die Probe zunächst in optische Schnitte unterteilt, bevor die Ebenen für die Analyse wieder übereinandergelegt werden. Für diese fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde das konfokale Mikroskop CQ1 von Yokogawa (Ratingen) verwendet.

Detektion fluoreszierender Proben

Das in dieser Arbeit verwendete konfokale Mikroskop CQ-1 ist mit vier Lasern ausgestattet, die Licht der Wellenlängen 405, 488, 561 und 640 nm emittieren. Die zu untersuchenden Proben wurden in Well-Platten oder auf Objektträgern mit 4-, 10- oder 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Dabei wurde bei Aufnahmen mit 20-facher Vergrößerungen ein *Long working distance* Objektiv eingesetzt. Bei 40- und 60-facher Vergrößerung wurden die Proben in Kammerobjektträgern mit dünnem Borosilikatglas ausgesät. In der Regel erfolgten die Aufnahmen mit einer *Excitation Power* von 80% und einer Belichtungszeit zwischen 100-400 ms. Abstände und Anzahl der Schnittebenen wurden individuell in Abhängigkeit von der zu mikroskopierenden Probe angepasst.

Immunfluoreszenzfärbung

Blockierlösung	DPBS + 1-3% BSA
Fixierlösung	2% (v/v) PFA, 1% (v/v) Glutaraldehyd in DPBS
Hoechst 33342 (10 mg/ml)	Thermo Scientific (Dreieich)
Roti®Histofix 4%	Carl Roth (Karlsruhe)

Die Bindung von NKAB-Molekülen an sowohl zweidimensional als auch dreidimensional (Organoide) wachsende Zellstrukturen wurde überprüft. Organoide wurden dafür zunächst vereinzelt und mit Matrigel gemischt. Im Anschluss wurden 5 µl der Zell-Matrigel-Suspension in eine 96-Well-Platte

Methoden

ausgesät, kultiviert und verwendet sobald sie die vorgesehene Größe erreicht hatten. Für die mikroskopische Analyse der NKAB-Bindung wurden die Proben zweimal mit DPBS gewaschen und im Anschluss 10-15 min (Zellen) bzw. 30-60 min (Organoide) bei Raumtemperatur in Fixierlösung inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten in DPBS erfolgte eine Inkubation in Blockierlösung für 60 min. Die für die Färbung verwendeten Fluorochrom-gekoppelten NKAB-Moleküle (3.2.9) wurden in Blockierlösung verdünnt und anschließend mit den Proben für mindestens 4 Stunden bei 4 °C inkubiert. Eine Kernfärbung mit Hoechst 33342 erfolgte dabei durch eine 5-10-minütige Inkubation am Ende der NKAB-Färbung. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen und die Proben am CQ1 Mikroskop analysiert.

Time-Lapse-Imaging (Zeitraffer-Bildgebung)

Poly-L-Lysin (0,01%)

Sigma Aldrich (Taufkirchen)

Mit Hilfe von *Time-Lapse-Imaging* erfolgten mikroskopische Langzeituntersuchungen, wobei ausgewählte Bildausschnitte über einen definierten Zeitraum durch serielle Aufnahmen beobachtet wurden. Durch die Zeitraffer-Bildgebung können dynamische Prozesse an bzw. zwischen lebenden Zellen untersucht werden. Um die Interaktion zwischen Tumor- und Immunzellen in Anwesenheit von Fluorochrom-gekoppelten NKAB-Molekülen zu analysieren, wurden die Tumorzellen zunächst in die vorbehandelten Vertiefungen einer schwarzen 96-Well-Platte mit optischem Boden ausgesät. Die Vorbehandlung der Vertiefungen erfolgte dabei durch die Bedeckung mit Poly-L-Lysin, Inkubation über Nacht bei 4 °C und Entfernen der Lösung am darauffolgenden Tag. Nach Inkubation der Tumorzellen für 30 min im Brutschrank, erfolgte die Zugabe der Effektorzellen und NKAB-Moleküle. Um während der Messung physiologische Bedingungen zu schaffen, wurde die Gas-Zusammensetzung auf 5% CO₂ und die Kammer-Innentemperatur des CQ1 Mikroskops auf 37 °C eingestellt. Zusätzlich wurde über ein integriertes Wasserbad die Luft befeuchtet. Abhängig von der Applikation wurden die Abstände der Zeitrafferaufnahmen, z-Ebenen und Vergrößerungen individuell gewählt. Die Auswertung erfolgte mittels ImageJ.

3.5 Statistische Analysen

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten sind jeweils als Mittelwert \pm Standardabweichung (*Standard deviation*, SD) von mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten angegeben. Um signifikante Unterschiede festzustellen, wurde ein ungepaarter Welch t-Test durchgeführt. Dabei erfolgte die statistischste Auswertung mit der Prism 9 Software (GraphPad, La Jolla, USA).

P-Werte von $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen und wie folgt gekennzeichnet:

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

3.6 Graphische Darstellungen

In dieser Arbeit gezeigte Graphiken wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, mittels Biorender (www.biorender.com) erzeugt.

4 Ergebnisse

Immuntherapien stellen einen wichtigen Ansatz zur Behandlung von Krebserkrankungen dar. Sie basieren darauf, dass das Immunsystem prinzipiell in der Lage ist, Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren. In der initialen Tumorabwehr haben insbesondere natürliche Killerzellen (NK-Zellen) eine besondere Bedeutung. So können diese beispielsweise über den aktivierenden Rezeptor NKG2D entartete Zellen erkennen, die häufig stressinduzierte NKG2D-Liganden (NKG2D-L) wie MICA, MICB und ULBP1 bis 6 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Tumorzellen können sich einer solchen Erkennung durch das Immunsystem jedoch durch sogenannte *Immune escape* Mechanismen entziehen und NKG2D-L herabregulieren oder abspalten (*Ligand shedding*) (Schmiedel & Mandelboim, 2018). Ein möglicher Therapieansatz, der diesem Mechanismus entgegenwirkt, wurde in unserer Gruppe entwickelt. Er basiert auf dem Einsatz eines bispezifischen Antikörpers (NKAB-ErbB2), der neben NKG2D auch das Tumor-assoziierte Antigen ErbB2 erkennt und somit NKG2D-exprimierende Immunzellen gegen ErbB2-positive Tumorzellen ausrichtet. Zudem umgeht dieser bispezifische Antikörper eine durch lösliche NKG2D-L induzierte Hemmung von NK-Zellen. Um dieses Konzept weiterzuführen, wurde durch genetische Modifikation ein NKG2D-basierter CAR in die NK-Zelllinie NK-92 eingebracht (C. Zhang et al., 2021). Die dadurch ermöglichte Kombinationstherapie aus bispezifischem Antikörper und NKG2D-CAR-exprimierenden NK-92 Zellen zeichnete sich durch eine hohe antitumorale Aktivität aus. Ein Ziel dieser Arbeit war es, diesen Ansatz weiter zu optimieren. Zudem sollten durch die Ableitung ähnlicher bispezifischer Antikörper mit Spezifität für weitere Tumor-assoziierte Antigene die Einsatzmöglichkeiten dieses Systems erweitert werden.

4.1 Generierung und funktionelle Charakterisierung NKG2D-CAR-exprimierender NKAR-NK-92 Zellen

Die in vorherigen Arbeiten der Gruppe generierten CAR-Effektorzellen exprimieren einen NKG2D-basierten CAR (NKAR), welcher anstelle eines in klassischen CAR-Molekülen enthaltenen scFv-Antikörperfragments die extrazelluläre Domäne des aktivierenden Rezeptors NKG2D trägt (C. Zhang et al., 2021). Um NKAR-exprimierende NK-92 Zellen zu verbessern, wurde in dieser Arbeit ein weiteres Konstrukt entwickelt. Dafür wurde das NKAR-Molekül mit einem IL-15 Superagonisten (RD-IL15) kombiniert, der sich aus einer mutierten Form von IL-15 (IL-15_{N72D}) und der Sushi-Domäne der Rezeptoruntereinheit IL-15R α zusammensetzt und sich durch eine höhere Halbwertszeit sowie gesteigerte biologische Funktion auszeichnet (Bodden et al., 2023; Han et al., 2011).

Ergebnisse

Das in dieser Arbeit generierte NKAR-Konstrukt kodiert am N-Terminus für die extrazelluläre Domäne von NKG2D (Aminosäuren 82-216), die über einen flexiblen $(G_4S)_2$ Linker und ein Myc-Tag an eine $CD8\alpha$ Gelenkregion (*Hinge*) geknüpft ist. Anschließend folgt die Transmembran- und intrazelluläre Domäne von $CD3\zeta$. Die RD-IL15 Sequenz wurde über eine *porcine teschovirus-1* 2A (P2A) Schnittstelle und ein die Sekretion-vermittelndes Signalpeptid mit der CAR-Sequenz verknüpft (**Abbildung 4.1; A**). Das Einbringen der Sequenz in das Transferplasmid pSIEW erfolgte über Gibson-Assembly. Anschließend wurde das hergestellte Plasmid zur Produktion lentiviraler Vektorpartikel genutzt und diese zur Transduktion von NK-92 Zellen verwendet (**Abbildung 4.1; B**).

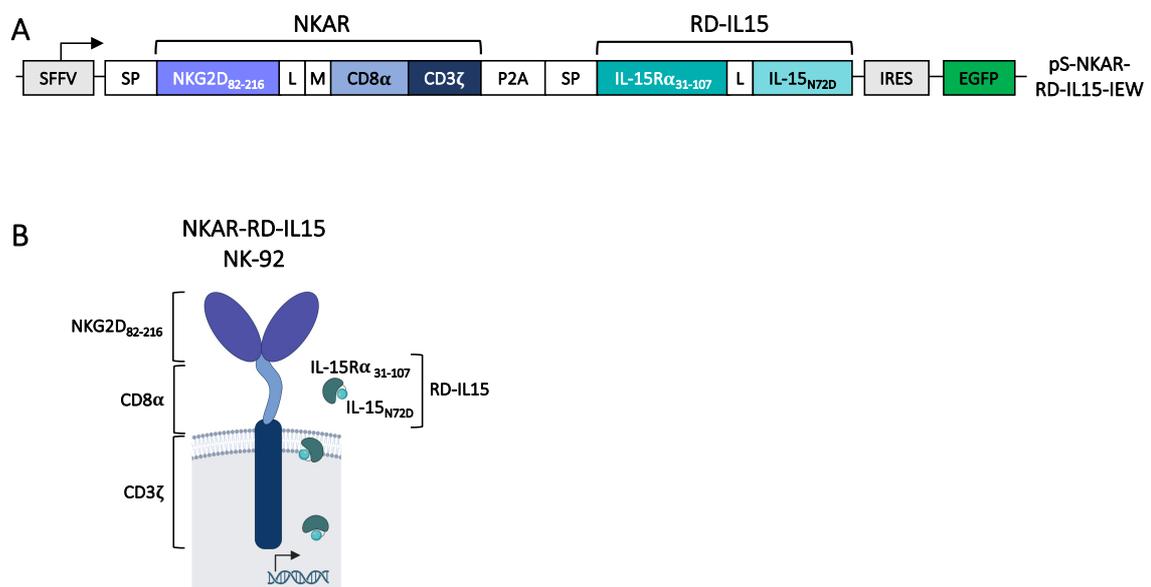


Abbildung 4.1. NKG2D-basierter chimärer Antigenrezeptor (NKAR). **(A)** Schematischer Aufbau der NKAR-RD-IL15 Sequenz. Das in das Transferplasmid pSIEW eingebrachte NKAR-Konstrukt steht unter der Kontrolle des SFFV Promotors und setzt sich aus der NKAR- und RD-IL15-Sequenz zusammen. Dabei sind diese über eine P2A-Schnittstelle miteinander verbunden. Sowohl dem NKAR- als auch dem RD-IL15-kodierenden Abschnitt ist eine Signalpeptidsequenz vorgelagert. Die NKAR-Sequenz beinhaltet einen Teil der extrazellulären Domäne von NKG2D (Aminosäuren 82-216), welcher über einen $(G_4S)_2$ Linker (L) und ein Myc-Tag (M) an eine $CD8\alpha$ -Gelenkregion geknüpft ist. Darauf folgt die Transmembran- und intrazelluläre Domäne von $CD3\zeta$. Der IL-15 Superagonist RD-IL15 setzt sich aus der Sushi-Domäne des IL-15R α (Aminosäuren 31-107), einem Linker (L) und einer mutierten Form von IL-15 (N72D) zusammen. Zusätzlich trägt der Vektor am 3' Ende des Transgens ein über eine IRES-Sequenz verknüpftes EGFP Markergen. **(B)** Schematische Darstellung der in NK-92 Zellen exprimierten Proteine NKAR und RD-IL15. Durch das der NKAR-Sequenz vorgelagerte Signalpeptid wird der chimäre Rezeptor an die Oberfläche der transduzierten Zellen transportiert und über die enthaltene Transmembrandomäne in die Zellmembran eingebettet. Der extrazelluläre Teil des Rezeptors setzt sich aus der NKG2D-Domäne und der $CD8\alpha$ -Gelenkregion zusammen. Neben der Transmembrandomäne beinhaltet der NKAR zusätzlich die intrazelluläre Domäne von $CD3\zeta$. NKAR-transduzierte Zellen sekretieren RD-IL15 in den Zellkulturüberstand. SFFV: *Spleen focus-forming virus* Promotor, SP: Signalpeptid, L: $(G_4S)_2$ Linker, M: Myc-Tag, P2A: *Porcine teschovirus-1* 2A Schnittstelle, IRES: *Internal ribosome entry site*, EGFP: *Enhanced green fluorescent protein*.

Ergebnisse

Mittels *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) wurden nach der Transduktion die EGFP-positiven Zellen angereichert und ihre Reinheit wurde nach einer Woche in Kultur durchflusszytometrisch erneut anhand des EGFP-Signals überprüft (**Abbildung 4.2**).

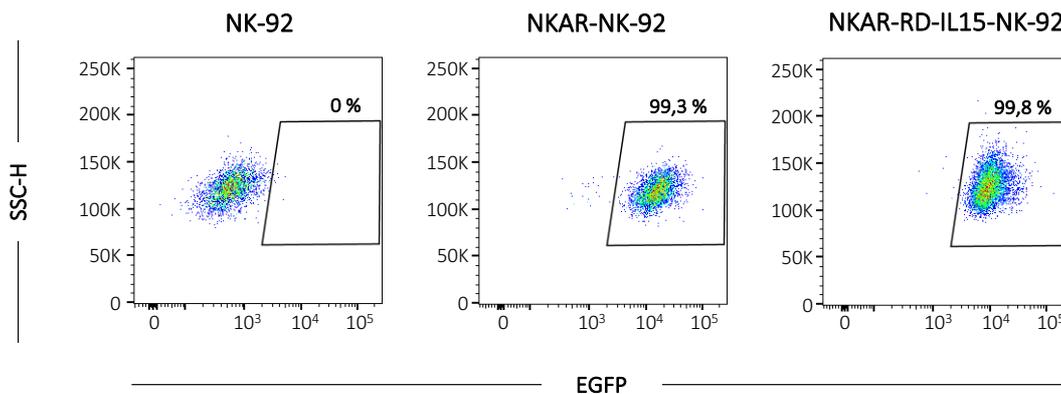


Abbildung 4.2. Durchflusszytometrische Analyse der EGFP-Expression in FACS-angereicherten, lentiviral transduzierten NKAR- und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen. Die Reinheit der Zellpopulationen wurde nach einwöchiger Anreicherung in Kultur überprüft. Als Kontrolle dienten parentale NK-92 Zellen.

Neben der EGFP-Expression wurden die generierten NKAR-Effektorzellen auch hinsichtlich ihrer NKG2D/NKAR-Expression analysiert. Die durchflusszytometrische Analyse mit einem NKG2D-spezifischen Antikörper zeigte dabei eine moderate NKG2D-Expression auf parentalen NK-92 Zellen, während die beiden NKAR-Varianten signifikant höhere Signale aufwiesen. Die NKG2D-Signale der NKAR-NK-92 Zellen korrelierten dabei mit der Expression des Markerproteins EGFP (**Abbildung 4.3; A**). Weiterhin wurde die CAR-Expression der modifizierten Zellen durch Analyse der im NKAR enthaltenen CD3 ξ -Kette mittels Immunoblot untersucht (**Abbildung 4.3; B**). In den NKAR-NK-92-Varianten wurden dabei NKAR-Monomere, NKAR-Homodimere, sowie NKAR-CD3 ξ -Hetero- und CD3 ξ -Homodimere nachgewiesen. NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen zeigten im Vergleich zu NKAR-NK-92 Zellen eine ge-ringere NKAR Expression. Durch die Analyse von γ -Tubulin als Ladekontrolle konnte ausgeschlossen werden, dass diese Unterschiede auf ungleiche Proteinmengen in den aufgetragenen Proben zurückgingen. Wie erwartet, wurden in parentalen NK-92 Zellen lediglich CD3 ξ -Dimere detektiert (**Abbildung 4.3; B**).

Ergebnisse

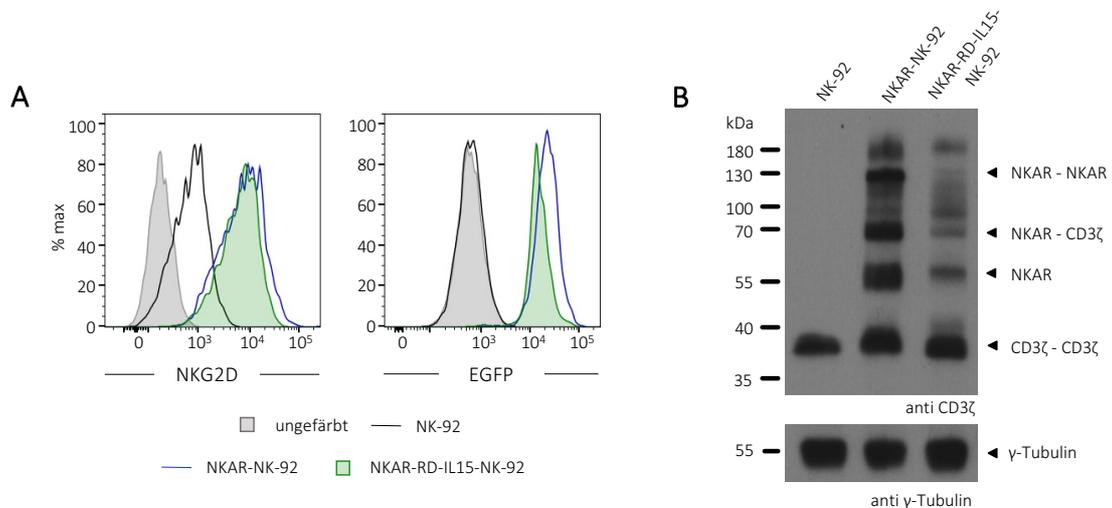


Abbildung 4.3. NKAR-Expression in modifizierten NK-92 Zellen. (A) Durchflusszytometrische Analyse der NKG2D- und EGFP-Expression. Die erfolgreiche Transduktion und Expression von NKAR wurde durch den Nachweis von NKG2D und EGFP bestätigt. Unmodifizierte parentale NK-92 Zellen dienten als Kontrolle. **(B) Detektion von CD3ξ mittels Immunoblot-Analyse.** In Proteinlysaten von NK-92, NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen wurde unter nicht-reduzierenden Bedingungen CD3ξ detektiert. Der verwendete Antikörper bindet dabei auch die in den NKAR-Molekülen enthaltene CD3ξ-Domäne. In Proteinlysaten der modifizierten NK-92 Zellen konnten NKAR- und CD3ξ-Homodimere, NKAR-CD3ξ-Heterodimere und NKAR- und CD3ξ-Monomere nachgewiesen werden. γ-Tubulin wurde als Ladekontrolle analysiert.

Nach Bestätigung der Expression des NKG2D-basierten CAR (NKAR) wurde im nächsten Schritt der Einfluss des NKAR auf die Zytotoxizität von NK-92 gegenüber der MHC-I negativen Leukämie-Zelllinie K562 und der NKG2D-L positiven Brustkrebs-Zelllinie MDA-MB468 untersucht (**Abbildung 4.4**). In einem Durchflusszytometrie-basierten Zytotoxizitätsassay mit unterschiedlichen Effektor- zu Zielzell-Verhältnissen zeigten NK-92, NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen eine ähnliche natürliche Zytotoxizität gegenüber K562 Zellen (**Abbildung 4.4; A**). Die NKAR-vermittelte Zytotoxizität wurde mit Hilfe der NKG2D-L positiven Brustkrebslinie MDA-MB468 untersucht (**Abbildung 4.4; B**), deren Liganden-Expression repräsentativ für MICA/B dargestellt ist (**Abbildung 4.4; C**). Im Vergleich zu parentalen NK-92 Zellen zeigten Zellen, die den NKG2D-basierten NKAR exprimieren (NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92), eine signifikant gesteigerte Zytotoxizität gegenüber diesen NKG2D-L positiven Zellen (E:T Verhältnis 10:1: NKAR-NK-92: $53,4 \pm 6,9\%$; NKAR-RD-IL15-NK-92: $50,0 \pm 3,2\%$; NK-92: $5,1 \pm 3,9\%$). Die zusätzliche Sekretion von RD-IL15 durch NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen führte hierbei zu keiner weiteren Steigerung der spezifischen Lyse.

Ergebnisse

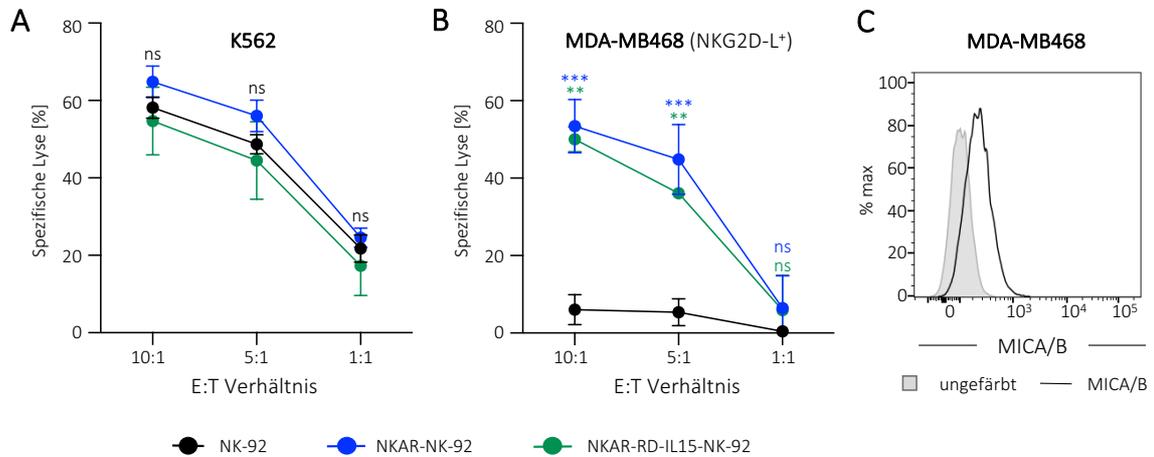


Abbildung 4.4. Zytotoxizität parentaler und NKG2D-L spezifischer NKAR-NK-92 Zellen gegenüber Tumor-Zelllinien. NKAR-exprimierende und parentale NK-92 Zellen wurden in den angegebenen Effektor- zu Zielzell-Verhältnissen (E:T) mit Tumorzellen für 3 h kokultiviert. Im Anschluss wurde die spezifische Lyse der Tumorzellen durchflusszytometrisch bestimmt. Als Zielzellen wurden die MHC-I negative Leukämie-Zelllinie K562 **(A)** und die NKG2D-L positive Brustkrebs-Zelllinie MDA-MB468 **(B)** eingesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. ns: $p > 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$. **(C) Durchflusszytometrische Analyse der NKG2D-L Expression (MICA/B) auf der Zelloberfläche von MDA-MB468 Zellen.** Die Oberflächenexpression wurde mit einem MICA/B-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Ungefärbte Zellen dienten als Kontrolle.

4.2 Funktionelle Charakterisierung RD-IL15-exprimierender NKAR-NK-92 Zellen

4.2.1 Nachweis von RD-IL15 im Zellkulturüberstand von NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen

Nach Analyse der genmodifizierten NK-92 Zellen hinsichtlich ihrer NKAR-Expression und Zytotoxizität gegenüber Tumor-Zelllinien wurde im nächsten Schritt die Sekretion des IL-15 Superagonisten (RD-IL15) untersucht. Als Standard für die Quantifizierung des sekretierten RD-IL15 wurde das Protein zunächst rekombinant in Expi293F Zellen produziert. Dazu wurde die Sequenz von RD-IL15 mit einem N-terminalen 6xHis-Tag über Restriktionsenzym-basierte Klonierung in das Expressionsplasmid pcDNA3 transferiert (pcDNA3-6xHis-RD-IL15) **(Abbildung 4.5)**. Nach transients Transfektion des Plasmids in Expi293F Zellen wurde das Protein dann aus konditioniertem Zellkulturüberstand über Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) gereinigt.

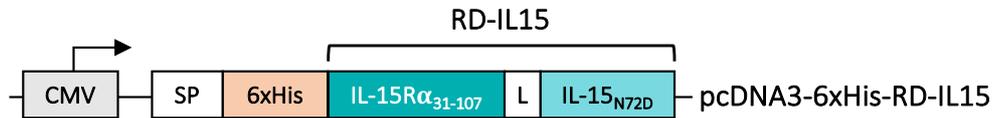


Abbildung 4.5. Schematische Darstellung der RD-IL15 Sequenz im Expressionsplasmid pcDNA3. Das für die Herstellung von rekombinantem RD-IL15 genutzte Konstrukt setzt sich aus einem Signalpeptid, einem 6xHis-Tag und der RD-IL15 Sequenz, bestehend aus der Sushi-Domäne von IL-15Rα (IL-15Rα₃₁₋₁₀₇) und einer mutierten Form von IL-15 (N72D), zusammen. Die Expression von RD-IL15 steht dabei unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

Um die Menge an sekretiertem RD-IL15 im Zellkulturüberstand von NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen zu bestimmen, wurde ein Sandwich-ELISA mit IL-15Rα- und IL-15-spezifischen Antikörpern durchgeführt (**Abbildung 4.6; A**). Zur Erstellung einer Standardkurve für die Quantifizierung wurde dabei das rekombinant hergestellte und aufgereinigte RD-IL15 Protein verwendet. In den Überständen RD-IL15 sekretierender NKAR-NK-92 Zellen wurden nach 3-tägiger Kultivierung abhängig von der Zellzahl bis zu $43 \pm 3,6$ ng/mL RD-IL15 nachgewiesen. Die als Kontrolle mit untersuchten NKAR-NK-92 Zellen zeigten hingegen wie erwartet keine Sekretion von RD-IL15 (**Abbildung 4.6; B**).

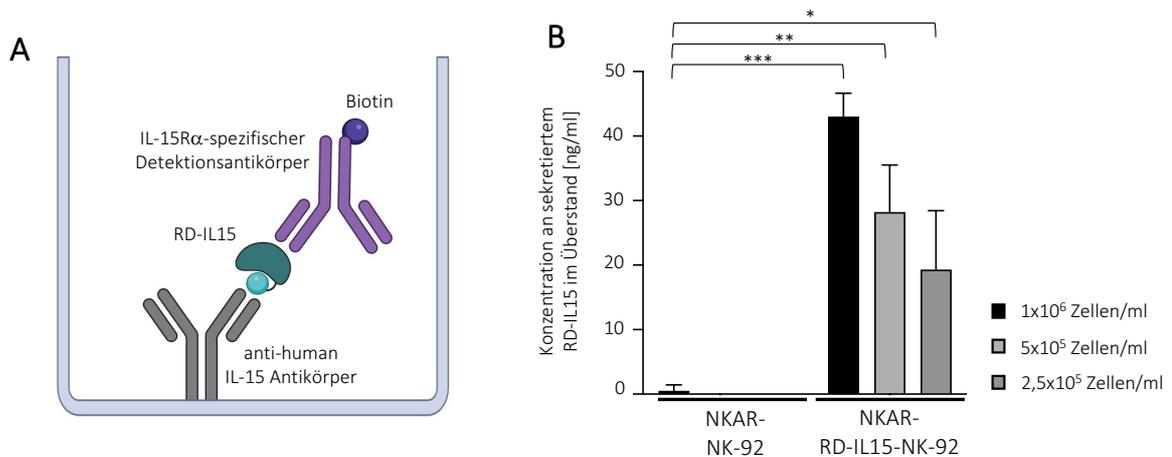


Abbildung 4.6. Sandwich-ELISA zur Quantifizierung von RD-IL15. (A) Schematischer Aufbau des ELISA. Die Oberfläche einer ELISA Platte wurde mit einem anti-human IL-15 Antikörper beschichtet. Anschließend erfolgte die Zugabe des zu analysierenden konditionierten Kulturüberstands von NKAR- und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen. Mit Hilfe eines Biotin-gekoppelten humanen IL15-Rα-spezifischen Detektionsantikörpers, HRP-konjugiertem Streptavidin und einer TMB-Substratlösung wurde RD-IL15 nachgewiesen. **(B) Quantifizierung von sekretiertem RD-IL15 im Zellkulturüberstand.** Die Konzentration an RD-IL15 im Zellkulturüberstand von NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen, ausgesät in unterschiedlichen Zelldichten ($2,5 \times 10^5$, 5×10^5 oder 1×10^6 Zellen/ml), wurde mit Hilfe des Sandwich-ELISA quantifiziert. Als Kontrolle diente der Zellkulturüberstand von NKAR-NK-92 Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

4.2.2 Autokrine Aktivierung von NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen durch RD-IL15

Um die biologische Aktivität von RD-IL15 nachzuweisen, wurde neben der Detektion von phosphoryliertem STAT5 (*Signal transducer and activator of transcription 5*) in einem Immunoblot (**Abbildung 4.7**) auch die Auswirkung einer IL-2 Depletion auf das Wachstumsverhalten und die Vitalität von RD-IL15 sekretierenden Zellen untersucht (**Abbildung 4.8**). Nach der Bindung von IL-2 und/oder IL-15 an deren Rezeptoruntereinheit α und die gemeinsamen Untereinheiten β und γ -Kette kommt es zu einer Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs, der über die Phosphorylierung der Januskinasen JAK1 und JAK3 zur Phosphorylierung von STAT5 führt (**Abbildung 4.7; A**). Die Detektion von phosphoryliertem STAT5 (pSTAT5) im Immunoblot diente daher zum Nachweis der Aktivierung des IL-15 Signalwegs und dementsprechend der biologischen Aktivität von RD-IL15. NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen (1×10^6 Zellen/ml) wurden zunächst für 24 h in Medium mit oder ohne IL-2, oder im Fall von NKAR-NK-92 Zellen, unter Zugabe von 20 ng/ml rekombinantem IL-15 kultiviert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen geerntet und Lysate hergestellt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein Immunoblot zum Nachweis von pSTAT5 mit gleichen Proteinmengen pro Spur durchgeführt. Wie erwartet konnte dabei pSTAT5 in NKAR-NK-92 Zellen nur nachgewiesen werden, wenn sie in X-VIVO 10⁺ mit IL-2 oder rekombinantem IL-15 kultiviert wurden, nicht aber in Medium ohne IL-2. Im Gegensatz dazu wurde pSTAT5 in NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen auch dann detektiert, wenn sie in Abwesenheit von IL-2 und IL-15 kultiviert wurden (**Abbildung 4.7; B**). Dies zeigt, dass in NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen eine autokrine Aktivierung des IL-15 Signalwegs über die Bindung des sekretierten RD-IL15 erfolgt (**Abbildung 4.7**).

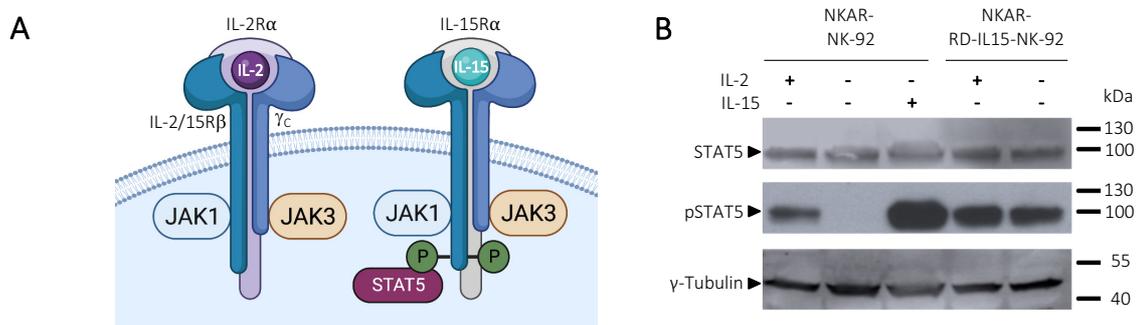


Abbildung 4.7. Autokrine Stimulation RD-IL15-exprimierender NKAR-NK-92 Zellen. (A) Aktivierung des STAT5-Signalwegs durch IL-2 und IL-15. Nach Bindung von IL-2 und IL-15 an ihre jeweilige Rezeptor α -Untereinheit ($R\alpha$) und die gemeinsamen β/γ -Rezeptorketten werden die Januskinasen JAK1 und JAK3 phosphoryliert und aktiviert. Im Anschluss erfolgt die Phosphorylierung von STAT5 durch die zuvor aktivierten Januskinasen. Modifiziert nach (Waldmann, 2006). **(B) Detektion von phosphoryliertem STAT5 (pSTAT5) in NKAR-NK-92 Zellen.** STAT5 und pSTAT5 wurden mittels Immunoblot-Analyse in Lysaten von NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen detektiert, welche für 24 h in An- oder Abwesenheit von IL-2 kultiviert wurden. Als Positivkontrolle dienten NKAR-NK-92 Zellen kultiviert mit rekombinantem IL-15 in Abwesenheit von IL-2. γ -Tubulin wurde als Ladekontrolle eingesetzt.

Ergebnisse

Um weitere Erkenntnisse hinsichtlich der biologischen Aktivität von RD-IL15 zu erlangen, wurde dessen Effekt auf die Vitalität und Proliferation der sekretierenden Zellen überprüft. Hierfür wurden nach Bestimmung der Vitalität $2,5 \times 10^5$ NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen in Medium mit oder ohne IL-2 kultiviert. An Tag 1, 4 und 7 erfolgte eine erneute Bestimmung der Vitalität und Zellzahl. Signifikante Unterschiede bezüglich der Vitalität und Proliferation von NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen, die in IL-2 freiem Medium kultiviert wurden, zeigten sich ab Tag 4. Die Vitalität von NKAR-NK-92 Zellen reduzierte sich dabei auf $31 \pm 9,1\%$, während die von RD-IL15 sekretierenden Zellen mit $95,3 \pm 5,7\%$ auch in IL-2 freiem Medium konstant blieb (**Abbildung 4.8; A**). Eine vergleichbare Tendenz wurde auch hinsichtlich der Zellproliferation beobachtet. Bereits an Tag 4 war ein signifikanter Unterschied zwischen der Zellzahl von NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen in Abwesenheit von IL-2 zu erkennen, welcher an Tag 7 noch deutlicher wurde. Dabei lag die Zellzahl von NKAR-NK-92 Zellen bei lediglich $2,3 \times 10^4 \pm 2,1 \times 10^4$. Im Gegensatz dazu zeigten NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen eine deutliche Proliferation, was sich in einem Anstieg der Zellzahl auf $7,1 \times 10^5 \pm 2,2 \times 10^5$ Zellen ausdrückte und mit dem Wachstum von NKAR-NK-92 Zellen in Anwesenheit von IL-2 vergleichbar war (**Abbildung 4.8; B**). Diese Daten weisen nach, dass durch die Sekretion von RD-IL15 das Fehlen von IL-2 kompensiert und die Vitalität sowie Proliferation der NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen autokrin stimuliert wird.

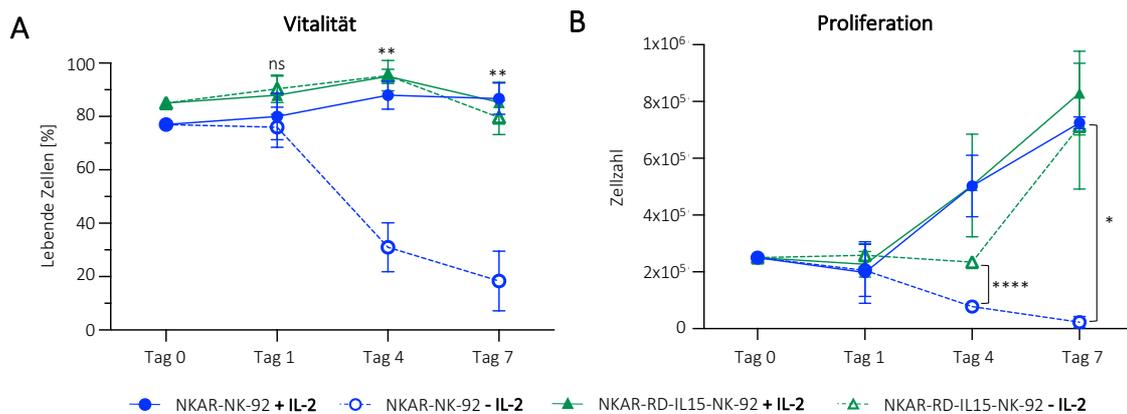


Abbildung 4.8. Auswirkung der Depletion von IL-2 auf die Vitalität und Proliferation von NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen. NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen ($2,5 \times 10^5$ Zellen/ml) wurden in Medium mit oder ohne IL-2 kultiviert und die Vitalität (**A**) und Zellzahl (**B**) an den Tagen 0, 1, 4 und 7 bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$.

4.2.3 Parakriner Effekt von sekretiertem RD-IL15 auf benachbarte Immunzellen

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass RD-IL15 in den Zellkulturüberstand sekretiert wird und in der Lage ist, in den Produzentenzellen die Aktivierung des IL-15 Signalwegs zu initiieren (pSTAT5 Immunoblot; **Abbildung 4.7; B**). Diese autokrine Aktivierung von NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen führte auch in Abwesenheit von IL-2 zum Erhalt der Proliferation und Vitalität (**Abbildung 4.8**). IL-15 spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung, Aktivierung und dem Überleben von CD8⁺ T-Zellen, NKT-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen und NK-Zellen (Sindaco et al., 2023). Im nächsten Schritt wurde daher überprüft, inwiefern RD-IL15 nicht nur einen Effekt auf die Produzentenzellen (NKAR-RD-IL15-NK-92) selbst, sondern auch in parakriner Weise auf benachbarte Immunzellen hat. In einem ersten Experiment wurden PBMCs, isoliert aus gesunden Spendern, mit RD-IL15 sekretierenden NKAR-NK-92 Zellen über Nacht kultiviert. Dabei waren PBMCs und NK-Zellen durch einen Transwelleinsatz räumlich voneinander getrennt, sodass ein Zell-Zell-Kontakt verhindert wurde und lediglich lösliche Moleküle, wie bspw. RD-IL15, die Membran des Einsatzes (Porengröße 0,4 μ m) passieren konnten. Am darauf folgenden Tag wurden MHC- I negative Leukämiezellen (K562) als Zielzellen in einem E:T Verhältnis von 20:1 zu den stimulierten PBMCs gegeben und die spezifische Lyse wurde nach 2 h am Durchflusszytometer bestimmt (**Abbildung 4.9; A**). Als Positivkontrolle dienten PBMCs, welche über Nacht mit 20 ng/ml rekombinatem, humanem IL-15 kultiviert wurden. PBMCs, kultiviert mit NKAR-NK-92 Zellen oder ohne die Zugabe von NK-Zellen wurden als Negativkontrollen eingesetzt. Im Vergleich zu diesen beiden Kontrollen mit einer spezifischen Lyse von K562 von $12,6 \pm 4,9\%$ (ohne NK-Zellen) und $12,1 \pm 4,4\%$ (mit NKAR-NK-92 Zellen) wurde diese durch die Kultivierung der PBMCs mit RD-IL15 sekretierenden Zellen signifikant auf $24,2 \pm 0,1\%$, gesteigert. Ein vergleichbarer Effekt war bei PBMCs zu erkennen, die mit rekombinatem IL-15 kultiviert wurden ($33,7 \pm 4\%$). Der Unterschied in der spezifischen Lyse nach Stimulierung mit rekombinatem IL-15 oder sekretiertem RD-IL15 war dabei nicht signifikant (**Abbildung 4.9; B**). Da es sich bei der Leukämie-Zelllinie K562 u.a. durch das Fehlen von MHC-I Molekülen auf der Zelloberfläche um eine NK-sensitive Zelllinie handelt, kann davon ausgegangen werden, dass der hier beobachtete Effekt vor allem durch primäre NK-Zellen in den PBMCs vermittelt wurde, welche durch sekretiertes RD-IL15 oder rekombinantes IL-15 stimuliert wurden. Dies lässt den Schluss zu, dass der sekretierte IL-15 Superagonist RD-IL15 nicht nur einen aktivierenden Effekt auf die Produzentenzellen selbst, sondern auch auf benachbarte Immunzellen hat.

Ergebnisse

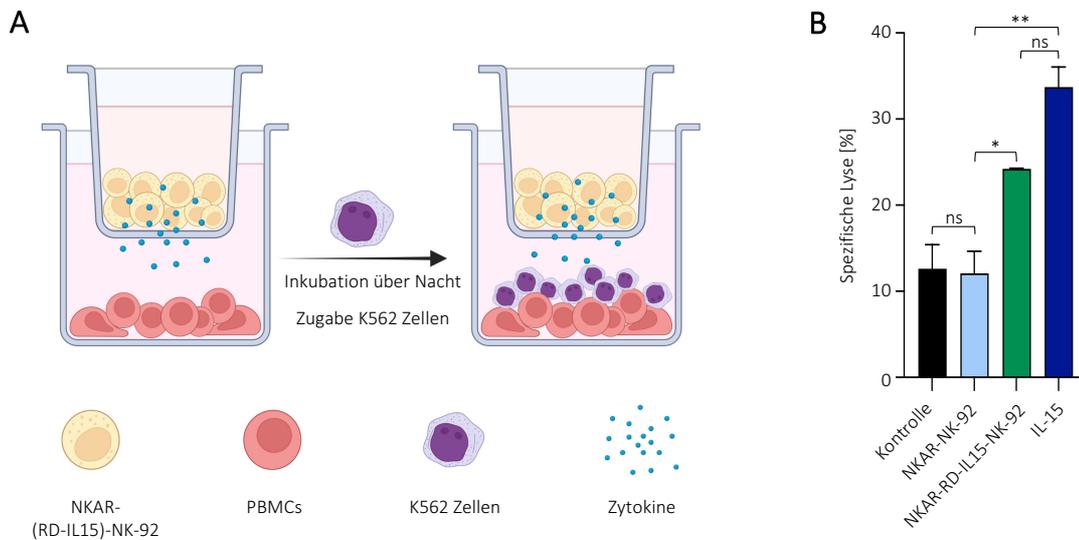


Abbildung 4.9. Effekt von sekretiertem RD-IL15 auf die Zytotoxizität von benachbarten Immunzellen. (A) Schematische Darstellung des durchgeführten Transwell-Zytotoxizitätsassays. Isolierte PBMCs wurden über Nacht mit RD-IL15 sekretierenden NKAR Zellen kultiviert, wobei diese durch einen Transwelleinsatz räumlich getrennt waren. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von K562 Zellen zu den stimulierten PBMCs. **(B) Zytotoxische Aktivität der mit RD-IL15 stimulierten PBMCs.** Nach der Zugabe von K562 Zellen zu stimulierten PBMCs in einem Verhältnis von 1:20 wurde deren Lyse nach 2 h durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrollen dienten PBMCs kultiviert ohne NK-Zellen, kokultiviert mit NKAR-NK-92 Zellen oder rekombinatem, humanem IL-15 (20 ng/ml). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Neben dem Effekt von RD-IL15 auf primäre NK-Zellen innerhalb der PBMCs wurde in einer gemischten Lymphozytenreaktion (GLR) auch der Effekt auf das Proliferationsverhalten von $CD8^+$ T-Zellen untersucht. Für die GLR wurden PBMCs zweier gesunder Spender isoliert. Während PBMCs des ersten Spenders mit CFSE gefärbt wurden (Effektorzellen), wurden PBMCs des zweiten Spenders nach einer $CD3$ -Depletion mit 25 Gy bestrahlt (Stimulatorzellen). Anschließend wurden Effektorzellen zusammen mit Stimulatorzellen in einem Verhältnis von 1:1 ausgesät und für 7 Tage durch Transwelleinsätze räumlich getrennt mit NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen kokultiviert (**Abbildung 4.10; A**). Eine erneute Stimulation mit NK-Zellen erfolgte an Tag 4. In Kontrollansätzen wurden Effektorzellen ohne Stimulatorzellen, mit 20 ng/ml rekombinatem, humanem IL-15 oder mit NKAR-NK-92 Zellen kokultiviert. An Tag 7 wurde die Proliferationsrate von $CD3^+CD8^+$ Effektorzellen durch Messung des CFSE-Signals am Durchflusszytometer analysiert. Die Zugabe von Stimulatorzellen und rekombinatem IL-15 führte dabei zu einer Erhöhung von $CD3^+CD8^+$ -Zellen mit reduziertem CFSE-Signal von $10,9 \pm 3,4\%$ auf $64,9 \pm 16\%$, wohingegen die Kultivierung mit NKAR-NK-92 Zellen \pm Stimulatorzellen keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation der $CD3^+CD8^+$ -Zellen zeigte. Im Gegensatz dazu stieg der prozentuale Anteil von proliferierenden $CD3^+CD8^+$ -Zellen in Anwesenheit von NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen bereits ohne Stimulatorzellen auf $18,0 \pm 1,7\%$ an.

Ergebnisse

Dieser Effekt wurde durch die Zugabe von Stimulatorzellen noch weiter gesteigert ($35,5 \pm 2,3\%$). Zwischen $CD3^+CD8^+$ -Zellen kultiviert mit rekombinantem IL-15 oder sekretiertem RD-IL15 war kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des prozentualen Anteils proliferierender Zellen zu erkennen (**Abbildung 4.10; B**). Mit Hilfe der GLR konnte somit gezeigt werden, dass sekretiertes RD-IL15 bereits in Abwesenheit von Stimulatorzellen in der Lage ist, die Proliferation von $CD8^+$ T-Zellen zu steigern. Nach Zugabe von Stimulatorzellen war der von RD-IL15 induzierte Effekt auf $CD8^+$ Zellen dabei vergleichbar mit dem von rekombinantem, humanem IL-15.

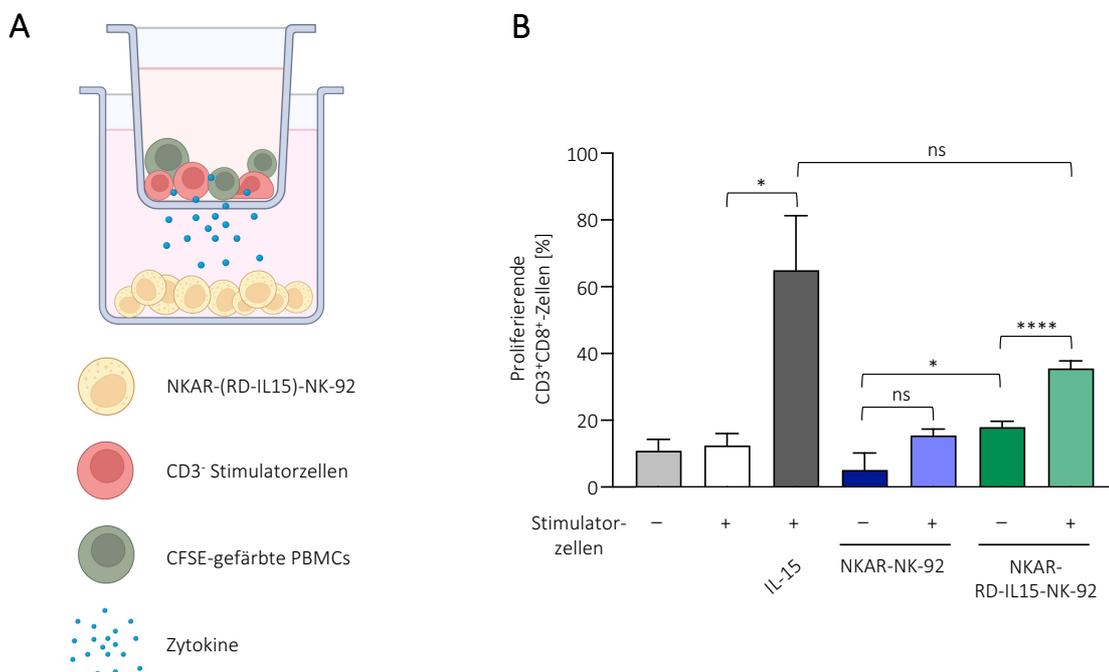


Abbildung 4.10. Effekt von sekretiertem RD-IL15 auf das Proliferationsverhalten von humanen $CD8^+$ T-Zellen. (A) Schematische Darstellung einer gemischten Lymphozytenreaktion (GLR). PBMCs zweier gesunder Spender wurden isoliert und entweder mit CFSE gefärbt (Effektorzellen) oder nach einer $CD3$ -Depletion mit 25 Gy bestrahlt (Stimulatorzellen). Effektor- und Stimulatorzellen wurden in einem 1:1 Verhältnis in einen Transwelleinsatz ausgesät und anschließend mit RD-IL15 sekretierenden Zellen unter räumlicher Trennung kokultiviert. Eine Restimulation mit NK-Zellen in frischem konditioniertem Medium erfolgte an Tag 4. **(B) Einfluss von sekretiertem RD-IL15 auf die Proliferation von $CD8^+$ T-Zellen.** Die Proliferation von $CD3^+CD8^+$ Zellen wurde nach 7 Tagen anhand der Abnahme des CFSE-Signals durchflusszytometrisch bestimmt. Als Negativkontrollen dienten PBMCs ohne Stimulatorzellen und PBMCs kultiviert mit NKAR-NK-92 Zellen. Effektor- und Stimulatorzellen kultiviert mit rekombinantem, humanem IL-15 (IL-15, 20 ng/ml) wurden als Positivkontrolle eingesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; ****: $p < 0,0001$.

4.3 Zusammenfassung der Abschnitte 4.1 und 4.2

In den in den Abschnitten 4.1 und 4.2 beschriebenen Experimenten wurden zunächst NK-92 Zellen generiert, welche einen NKG2D-basierten CAR exprimieren. Zusätzlich wurden diese Zellen genetisch so verändert, dass sie den IL-15 Superagonisten RD-IL15 sekretieren. Die Expression der NKAR-Konstrukte konnte sowohl mittels Immunoblot-Analyse (CD3 ξ Detektion) als auch durchflusszytometrisch (NKG2D-Färbung, EGFP-Signal) bestätigt werden. In einem Zytotoxizitätsassay wurde eine erhöhte spezifische Lyse einer NKG2D-L positiven Tumor-Zelllinie (MDA-MB468) durch NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen nachgewiesen. In einem ELISA wurde die Sekretion von RD-IL15 in den Zellkulturüberstand bestätigt und dessen biologische Aktivität in einem pSTAT5 Immunoblot und Proliferations- und Vitalitätsassay demonstriert. Um den Effekt von RD-IL15 auf benachbarte Immunzellen zu prüfen, wurden ein Transwell-Zytotoxizitätsassay und eine GLR mit primären, humanen Immunzellen durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass RD-IL15 nicht nur in autokriner Weise die sekretierenden Zellen selbst, sondern parakrin auch benachbarte primäre Immunzellen stimulieren kann.

4.4 Generierung und funktionelle Charakterisierung bispezifischer Antikörper gerichtet gegen NKG2D und ErbB2

Tumorzellen sind in der Lage, der NKG2D-vermittelten Immunabwehr durch proteolytische Abspaltung (*Ligand shedding*) oder Herunterregulation der NKG2D Liganden zu entgehen (Schmiedel & Mandelboim, 2018). Proteolytisch prozessierte, lösliche NKG2D-L können außerdem zu einer Herabregulation des NKG2D-Rezeptors auf Effektorzellen führen und damit die Immunantwort zusätzlich supprimieren. Ebenso stellt die häufig heterogene Expression von Tumorantigenen insbesondere im Gewebe solider Tumoren bei der Behandlung von Krebserkrankungen mit Immuntherapien wie monoklonalen Antikörpern oder genmodifizierten Immunzellen ein Problem dar. Durch einen therapeutischen Ansatz, der lediglich gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet ist, kann folglich meist keine vollständige Lyse des Tumors erfolgen. Auch das durch die Therapie begünstigte Wachstum von Zellen, die das ursprünglich exprimierte Zielantigen verloren haben (*Antigen loss*), kann eine effektive Kontrolle des Tumors erschweren (El-Sayes et al., 2021).

Um einen flexiblen Angriff auf Tumorzellen zu ermöglichen, nutzt der in dieser Arbeit weiter entwickelte Ansatz bispezifische Antikörper, die gleichzeitig an ein definiertes Tumor-assoziiertes Antigen und die extrazelluläre Domäne des aktivierenden NK-Zell-Rezeptors NKG2D binden und

damit eine Stimulierung NKG2D-positiver Immunzellen unabhängig von NKG2D-L auf der Tumoroberfläche erlauben. Diese Antikörper (*NKG2D-binding antibodies*, NKAB) können entweder allein oder zur Verstärkung ihrer Wirkung in Kombination mit adoptiv verabreichten Immunzellen eingesetzt werden, die endogen NKG2D exprimieren oder den zuvor eingeführten NKG2D-basierten chimären Antigenrezeptor (NKAR) tragen. In Vorarbeiten der Gruppe wurde bereits gezeigt, dass NKAR-Effektorzellen in Gegenwart eines gegen das Tumor-assoziierte Antigen ErbB2 (HER2) gerichteten bispezifischen NKAB-ErbB2 Antikörpers auch unabhängig von NKG2D-L durch ErbB2-positive Tumorzellen aktiviert werden (C. Zhang et al., 2021).

In den folgenden Abschnitten werden Therapieansätze basierend auf der Kombination von NKAR-NK-92 Zellen mit NKAB-Molekülen beschrieben, welche neben NKG2D die Tumor-assoziierten Antigene ErbB2, EGFRvIII, EGFR, CD19 und CD20 erkennen und somit potenziell für die Behandlung unterschiedlicher Tumorentitäten eingesetzt werden können.

4.4.1 NKAB-ErbB2 als prototypisches NKAB-Molekül

Das bereits publizierte NKAB-ErbB2 Molekül und die in dieser Arbeit generierten NKABs basieren auf der Struktur des humanen IgG4-Antikörpers und nutzen scFv-Antikörperfragmente als Bindungsdomänen. Am N-Terminus trägt das prototypische Molekül NKAB-ErbB2 die Bindungsdomäne für NKG2D (scFv(Kyk2.0)), während über den C-Terminus das Tumor-assoziierte Antigen ErbB2 (scFv(FRP5)) erkannt und gebunden wird. Die Bindungsdomänen sind über die *Hinge* Region, die konstanten Domänen CH2 und CH3 des humanen IgG4 Antikörpers (Aminosäuren 104-327) und einen $(G_4S)_2$ Peptid-*Linker* verbunden (**Abbildung 4.11**). Für die Produktion als rekombinante Proteine wurden die Sequenzen von NKAB-ErbB2 und aller weiterer in dieser Arbeit untersuchten NKAB-Moleküle in das Expressionsplasmid pcDNA3 unter der Kontrolle des CMV-Promotors eingebracht und nach transients Transfektion in Expi293F Zellen exprimiert. Am 5' Ende der NKAB-Sequenzen befindet sich jeweils die Sequenz eines Signalpeptids, welches die Sekretion der exprimierten NKAB-Moleküle in den Kulturüberstand vermittelt.

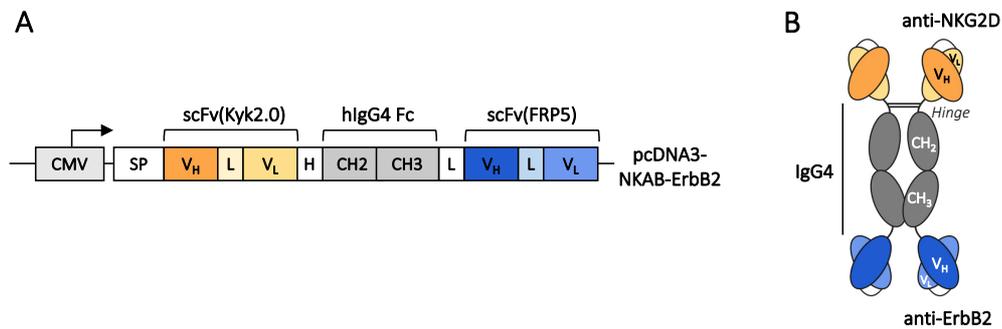


Abbildung 4.11. Aufbau des prototypischen bispezifischen Antikörpers NKAB-ErbB2. (A) Zusammensetzung der NKAB-ErbB2 Sequenz. Das in das Expressionsplasmid pcDNA3 eingebrachte NKAB-ErbB2 Konstrukt (pcDNA3-NKAB-ErbB2) steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors und trägt am N-Terminus ein Signalpeptid. Daran anschließend folgt eine NKG2D-spezifische scFv-Domäne (Kyk2.0) und am C-Terminus ein scFv-Antikörper spezifisch für ErbB2 (FRP5). Diese sind über die Gelenkregion (H), den Fc-Teil des humanen IgG4 (CH2 und CH3) und einen (G₄S)₂ Peptid-Linker miteinander verknüpft. **(B) Schematische Darstellung des NKAB-ErbB2 Moleküls.** Das Molekül ist als Homodimer dargestellt. Ausgebildete Disulfidbrücken innerhalb der Gelenkregion zweier NKAB-ErbB2 Monomere sind mit Linien angedeutet. scFv: *single-chain fragment variable*, IgG: Immunglobulin G, CMV: CMV-Promotor, SP: Signalpeptid, V_H: variable Region der schweren Antikörperkette, V_L: variable Region der leichten Antikörperkette, H: Gelenkregion, Fc: Fragment-kristallisierbare Region eines Antikörpers, L: GS-Linker.

4.4.2 Funktionelle Charakterisierung des bispezifischen Moleküls NKAB-ErbB2

Nach der transienten Transfektion von Expi293F Zellen mit pcDNA3-NKAB-ErbB2 und anschließender 5-tägiger Kultivierung wurde das NKAB-ErbB2 Molekül aus dem Zellkulturüberstand mittels Protein-G-Affinitätschromatographie gereinigt. Im Anschluss wurde die Zellbindung des bispezifischen Antikörpers sowohl durchflusszytometrisch als auch mikroskopisch in 2D- und 3D-Kulturen überprüft (**Abbildung 4.12**). In durchflusszytometrischen Analysen zeigte sich eine Bindung des NKAB-ErbB2 Moleküls an NKAR-NK-92 Zellen sowie an ErbB2-exprimierende Brustkrebszellen (MDA-MB453), während NKG2D- und ErbB2-negative MDA-MB468 Brustkrebszellen nicht gebunden wurden. Dies weist die spezifische Interaktion von NKAB-ErbB2 sowohl mit NKG2D-CAR-exprimierenden Zellen als auch Zielzellen nach, die das Antigen ErbB2 auf der Oberfläche tragen (**Abbildung 4.12; A**). Ebenso konnte in mikroskopischen Analysen mit Fluorochrom-gekoppeltem NKAB-ErbB2 eine Bindung des Antikörpers an die Oberfläche ErbB2-positiver Zellen gezeigt werden (**Abbildung 4.12; B**). Um einen soliden Tumor nachzubilden, wurde zudem die Bindung von NKAB-ErbB2 an ErbB2⁺ Mamma-Organoiden untersucht. Dabei wurde ebenfalls Fluorochrom-gekoppeltes NKAB-ErbB2 eingesetzt. Wie in **Abbildung 4.12; C** dargestellt, ist NKAB-ErbB2 in der Lage, auch in dreidimensionalen Strukturen wachsende Tumorzellen zu binden (rot). Die zusätzliche Färbung mit einem kommerziell

Ergebnisse

erhältlichen ErbB2-Antikörper (grün) zeigte hierbei einer Überlagerung mit den Signalen von NKAB-ErbB2, was die Kolokalisation der beiden Moleküle nachweist.

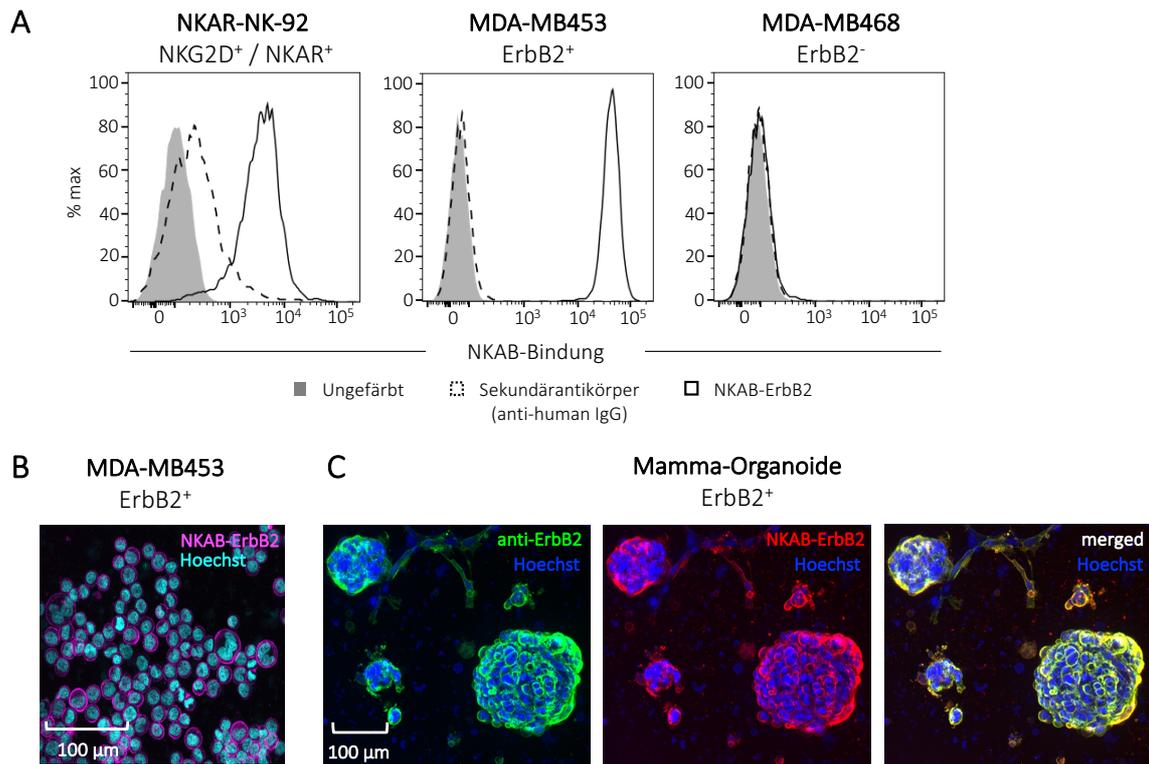


Abbildung 4.12. Analyse der Zellbindung von NKAB-ErbB2. (A) Durchflusszytometrische Analyse der Bindung von NKAB-ErbB2 an Effektor- und Zielzellen. Die Bindung von NKAB-ErbB2 an NKG2D-positive NKAR-NK-92 Zellen, ErbB2-positive (MDA-MB453) und ErbB2-negative Brustkrebszellen (MDA-MB468) wurde durchflusszytometrisch bestimmt. **(B) Mikroskopische Analyse der NKAB-ErbB2 Bindung an ErbB2-exprimierende MDA-MB453 Zellen in 2D-Kultur.** Die Bindung an Zielzellen wurde mit Fluorochrom-gekoppeltem NKAB-ErbB2 (pink) nachgewiesen. Zellkerne wurden mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Hoechst (türkis) gefärbt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des konfokalen Mikroskops CQ-1 bei einer 60-fachen Vergrößerung. **(C) Bindung von NKAB-ErbB2 an ErbB2-positive Mamma-Organoid.** Die Bindung eines kommerziell erhältlichen Antikörpers (grün) und von Fluorochrom-gekoppeltem NKAB-ErbB2 (rot) wurde bei einer 20-fachen Vergrößerung am CQ-1 analysiert. Zusätzlich wurden die Signale zur Vergleichbarkeit der Bindung übereinander gelegt (*merged*, gelb). Zellkerne wurden mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Hoechst angefärbt (blau). Weitere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen.

Nach Bestätigung der Bindung von NKAB-ErbB2 sowohl an NKG2D bzw. den NKG2D-CAR auf Effektorzellen als auch ErbB2 auf Zielzellen wurden im nächsten Schritt Zytotoxizitätsassays in Kombination mit parentalen NK-92, NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen durchgeführt. In Abwesenheit von NKAB-ErbB2 ergab sich dabei kein signifikanter Unterschied in der spezifischen Lyse von ErbB2-exprimierenden MDA-MB453 Brustkrebszellen durch die unterschiedlichen Effektorzellen, jedoch wurde bei höheren E:T Verhältnissen von 10:1 und 5:1 ein Trend hin zu leicht erhöhter

Ergebnisse

Zytotoxizität der NKAR-exprimierenden NK-92 Zellen beobachtet (**Abbildung 4.13; A**). Dies kann auf die Expression von NKG2D-L durch MDA-MB453 Zellen zurückgeführt werden (C. Zhang et al., 2021). Während die Zytotoxizität parentaler NK-92 Zellen durch die Zugabe von NKAB-ErbB2 nicht gesteigert werden konnte, zeigte sich in Anwesenheit von 50 ng/ml (0,32 nM) NKAB-ErbB2 eine signifikant höhere spezifische Tumorzell-Lyse durch NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen von bis zu $76,1 \pm 5,6\%$ (NKAR-NK-92) bzw. $68,6 \pm 15,0\%$ (NKAR-RD-IL15-NK-92) (E:T 10:1). Ein signifikanter Unterschied zwischen NKAR-NK-92 und RD-IL15-exprimierenden NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen wurde hierbei nicht festgestellt (**Abbildung 4.13; B**). Um die für eine optimale Wirkung notwendige Menge von NKAB-ErbB2 zu bestimmen, wurden nachfolgend weitere Zytotoxizitätsassays mit Konzentrationen von 0 – 2500 ng/ml (0 – 16 nM) des Antikörpers bei einem E:T Verhältnis von 5:1 durchgeführt. Mit zunehmender NKAB-Konzentration wurde dabei eine Steigerung der spezifischen Lyse ErbB2-exprimierender MDA-MB453 Zellen durch NKAR-NK-92 Zellen beobachtet, die bei 25 ng/ml (0,16 nM) NKAB-ErbB2 mit $51,5 \pm 4,4\%$ ein Plateau erreichte. Während die Zugabe von 50 und 100 ng/ml (0,32 und 0,64 nM) NKAB-ErbB2 zu keiner weiteren Steigerung der Zytotoxizität führte, zeigte sich bei höheren Antikörperkonzentrationen (500 und 2500 ng/ml; 3,2 und 16 nM) stattdessen eine Reduktion der spezifischen Lyse (**Abbildung 4.13; C**). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass bei höheren Konzentrationen NKAB-Moleküle im Überschuss vorliegen und lediglich an Effektor- oder Zielzellen binden. Eine produktive Quervernetzung von Effektor- und Zielzellen wird so blockiert. Im Gegensatz zu NKAR-exprimierenden Zellen wurde die spezifische Lyse von MDA-MB453 Zellen durch parentale NK-92 Zellen durch die Zugabe von NKAB-ErbB2 nicht signifikant gesteigert. Um auszuschließen, dass dies auf ein grundsätzlich unterschiedliches zytotoxisches Potenzial der Effektorzellen zurückzuführen ist, wurde auch die natürliche Zytotoxizität anhand der spezifischen Lyse von K562-Zellen bestimmt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen parentalen NK-92 und NKAR-NK-92 Zellen (**Abbildung 4.13; D**).

Ergebnisse

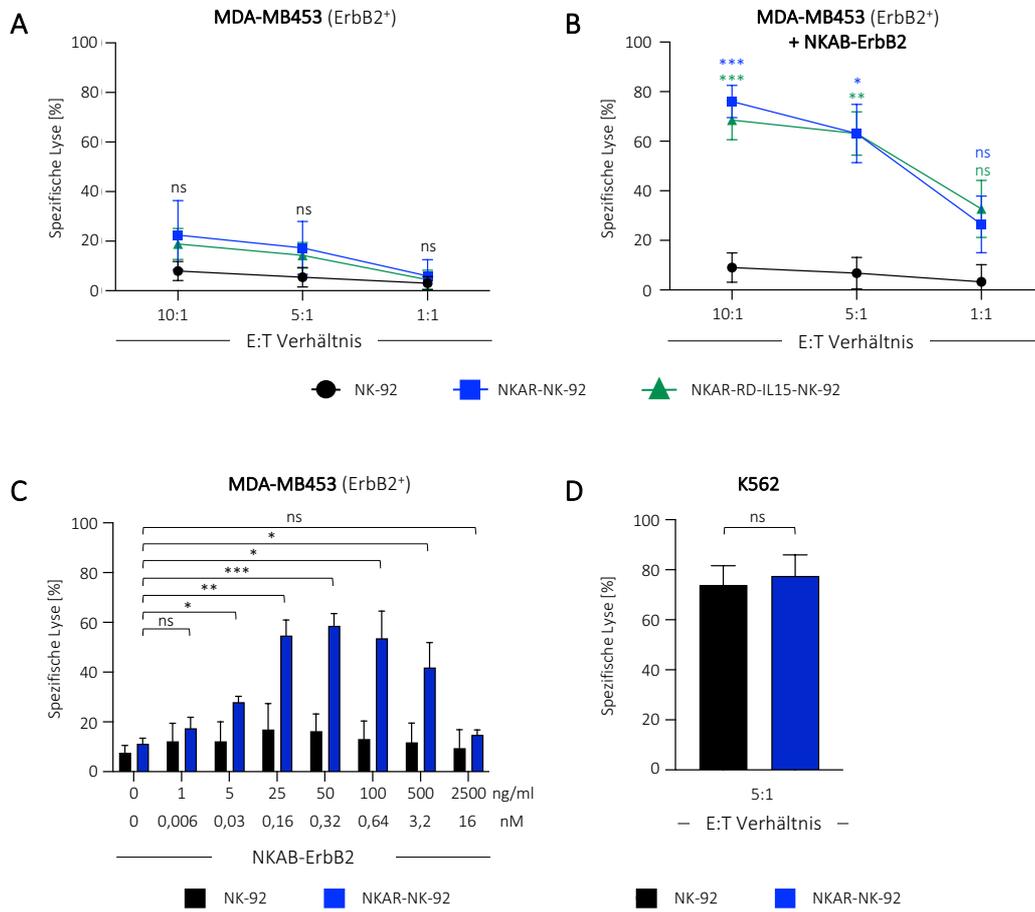


Abbildung 4.13. Zytotoxische Aktivität von NKAR-NK-92 Varianten gegenüber ErbB2-positiven Brustkrebszellen in Kombination mit NKAB-ErbB2. Effektor- und Zielzellen wurden in den aufgeführten E:T Verhältnissen für 3 h ohne (A) oder mit 50 ng/ml NKAB-ErbB2 (B) inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Tumorzell-Lyse. In (C) ist ein 3-stündiger Zytotoxizitätsassay mit parentalen NK-92 und NKAR-NK-92 Zellen in einem E:T Verhältnis von 5:1 in Anwesenheit unterschiedlicher NKAB-ErbB2 Konzentrationen gezeigt. Zum Vergleich der natürlichen Zytotoxizität von parentalen NK-92 und NKAR-NK-92 Zellen ist in (D) zusätzlich ein Zytotoxizitätsassay mit MHC-I negativen K562 Zellen dargestellt. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

4.4.3 Optimierung des NKAB-ErbB2 Moleküls

Im nächsten Schritt wurde überprüft, inwiefern das ursprüngliche NKAB-Format weiter optimiert werden kann. Dazu wurde neben dem Austausch der Bindungsdomänen am N- und C-Terminus (NKAB-ErbB2 rev) auch die Orientierung der V_H- und V_L-Sequenzen innerhalb der scFv(Kyk2.0)-Domäne (NKAB-ErbB2_2 und NKAB-ErbB2 rev_2) verändert. Lediglich die ErbB2-spezifische Bindungsdomäne blieb unverändert (Abbildung 4.14). Wie zuvor beschrieben, wurden auch diese variierten Moleküle in Expi293F Zellen hergestellt und mittels Protein-G-Affinitätschromatographie aus dem Zellkulturüberstand gereinigt.

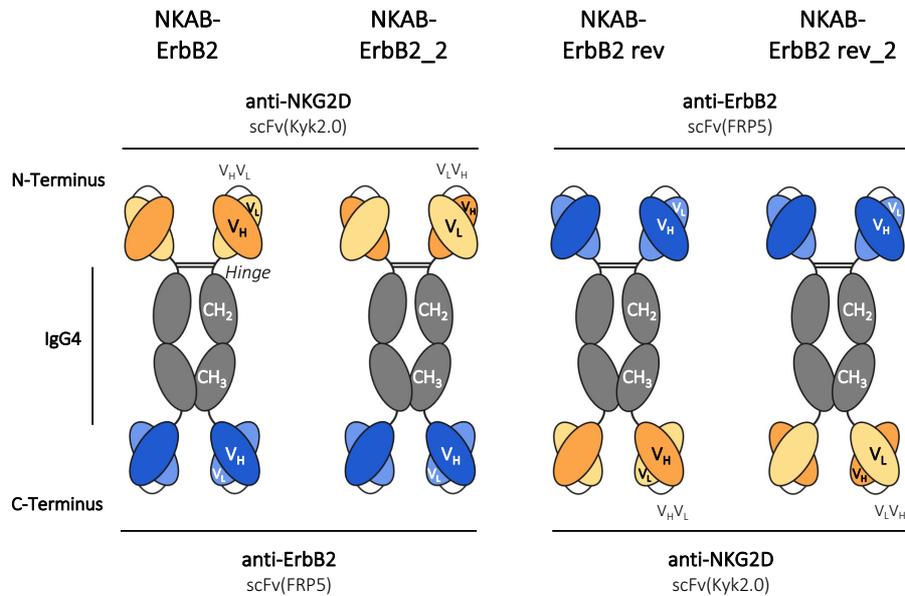


Abbildung 4.14. Schematische Darstellung von NKAB-ErbB2 Varianten. Der Aufbau des bispezifischen Antikörpers NKAB-ErbB2 wurde hinsichtlich der Bindungsdomänen am N- und C-Terminus und der Orientierung der variablen Regionen der leichten (V_L) und schweren (V_H) Antikörperkette innerhalb der NKG2D-Bindungsdomäne variiert. Die Domänen sind über die *Hinge* Region, die konstanten Domänen CH₂ und CH₃ des humanem IgG4 und einen (G₄S)₂ Peptid-Linker miteinander verknüpft. scFv: *single-chain fragment variable*, V_H: variable Region der schweren Antikörperkette, V_L: variable Region der leichten Antikörperkette.

Nachfolgend wurde in einem Immunoblot nach Auftrennung unter nicht-reduzierenden Bedingungen gezeigt, dass die Moleküle vorwiegend als Dimere vorliegen und lediglich zu einem kleinen Anteil als Monomere (**Abbildung 4.15; A**). Insgesamt war der Anteil an Monomeren in den NKAB-Formaten mit NKG2D-Bindungsdomäne am C-Terminus geringer. Dies wurde durch die Quantifizierung der Signale mittels densitometrischer Analyse bestätigt (**Abbildung 4.15; B**). Hierzu wurde die Software ImageJ verwendet. Im Kontrast zur kalkulierten molekularen Masse der NKAB-Moleküle (Monomer 80 kDa, Dimer 160 kDa) lag die Bande von NKAB-Monomeren auf der Höhe von ca. 100 kDa und die der Dimere bei über 180 kDa. Dies lässt sich durch die Glykosylierung der Moleküle an mehreren potenziellen O- und N-Glykosylierungsstellen erklären (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/>; NetOGlyc-4.0 und NetNGly-1.0).

Ergebnisse

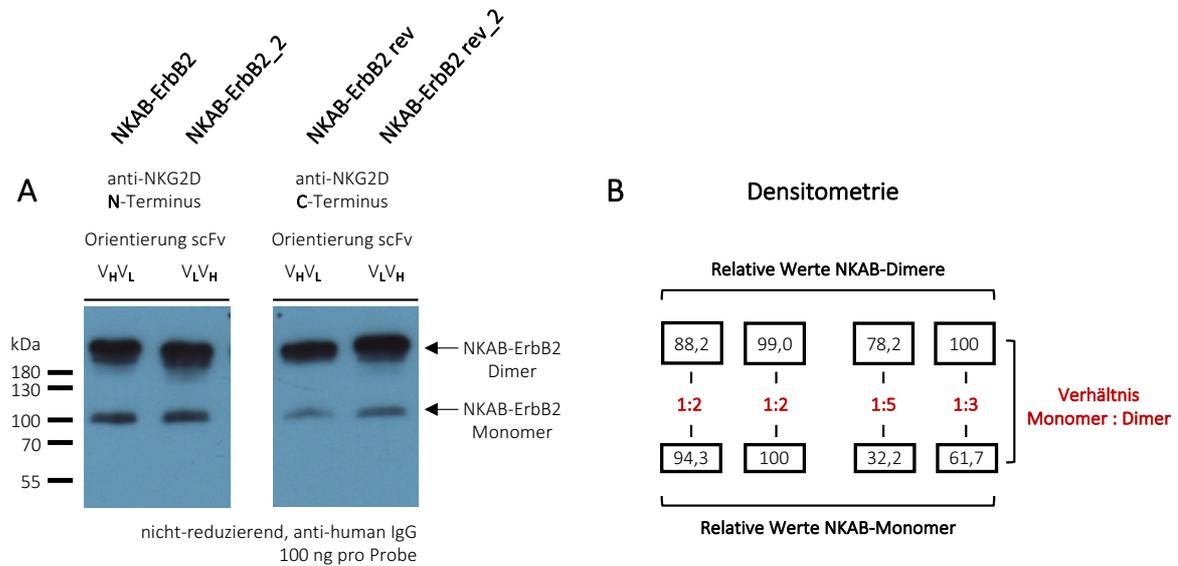


Abbildung 4.15. Immunoblot-Analyse gereinigter NKAB-ErbB2 Varianten. (A) Mittels SDS-PAGE wurden die NKAB-ErbB2 Varianten unter nicht-reduzierenden Bedingungen ihrer Größe nach aufgetrennt. Dabei wurden jeweils 100 ng der NKAB-Moleküle eingesetzt. Im anschließenden Immunoblot erfolgte der Nachweis der NKAB-ErbB2 Varianten mit Hilfe eines humanen IgG4-Fc-spezifischen Sekundärantikörpers. Alle Varianten lagen sowohl als Monomer wie auch als Dimer vor. Kalkulierte molekulare Masse der NKAB-ErbB2 Varianten: Monomer 80 kDa, Dimer 160 kDa. (B) Densitometrische Auswertung des Immunoblots mittels ImageJ. Dargestellt sind relative Werte bezogen auf das jeweils stärkste Signal innerhalb der Banden der NKAB-Dimere und NKAB-Monomere. Zusätzlich wurde das Verhältnis zwischen Monomer und Dimer für jede NKAB-ErbB2 Variante kalkuliert.

Die Bindung der unterschiedlichen NKAB-ErbB2 Varianten an NKAR-NK-92 (NKG2D⁺) und MDA-MB453 (ErbB2⁺) Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Während dabei eine vergleichbare Bindung an ErbB2 festgestellt wurde, deuteten die entsprechenden Histogramme auf Unterschiede der NKAB-ErbB2 Varianten hinsichtlich ihrer NKG2D-Bindung hin (Abbildung 4.16; A). Um dies genauer zu analysieren, wurde die *Mean fluorescence intensity* (MFI) der NKAB-Bindung berechnet und die delta MFI (Δ MFI) durch die Subtraktion der Sekundärantikörper-Einzelfärbung ermittelt. Dabei fiel auf, dass NKAB-ErbB2 Varianten mit V_HV_L-Orientierung innerhalb der scFv(Kyk2.0)-Domäne schlechter an NKG2D auf NKAR-NK-92 Zellen banden. Wie bereits zuvor auf Grundlage der Histogramme vermutet, war dagegen die Bindung aller untersuchten NKAB-ErbB2 Varianten an ErbB2 auf MDA-MB453 Zellen vergleichbar (Abbildung 4.16; B).

Ergebnisse

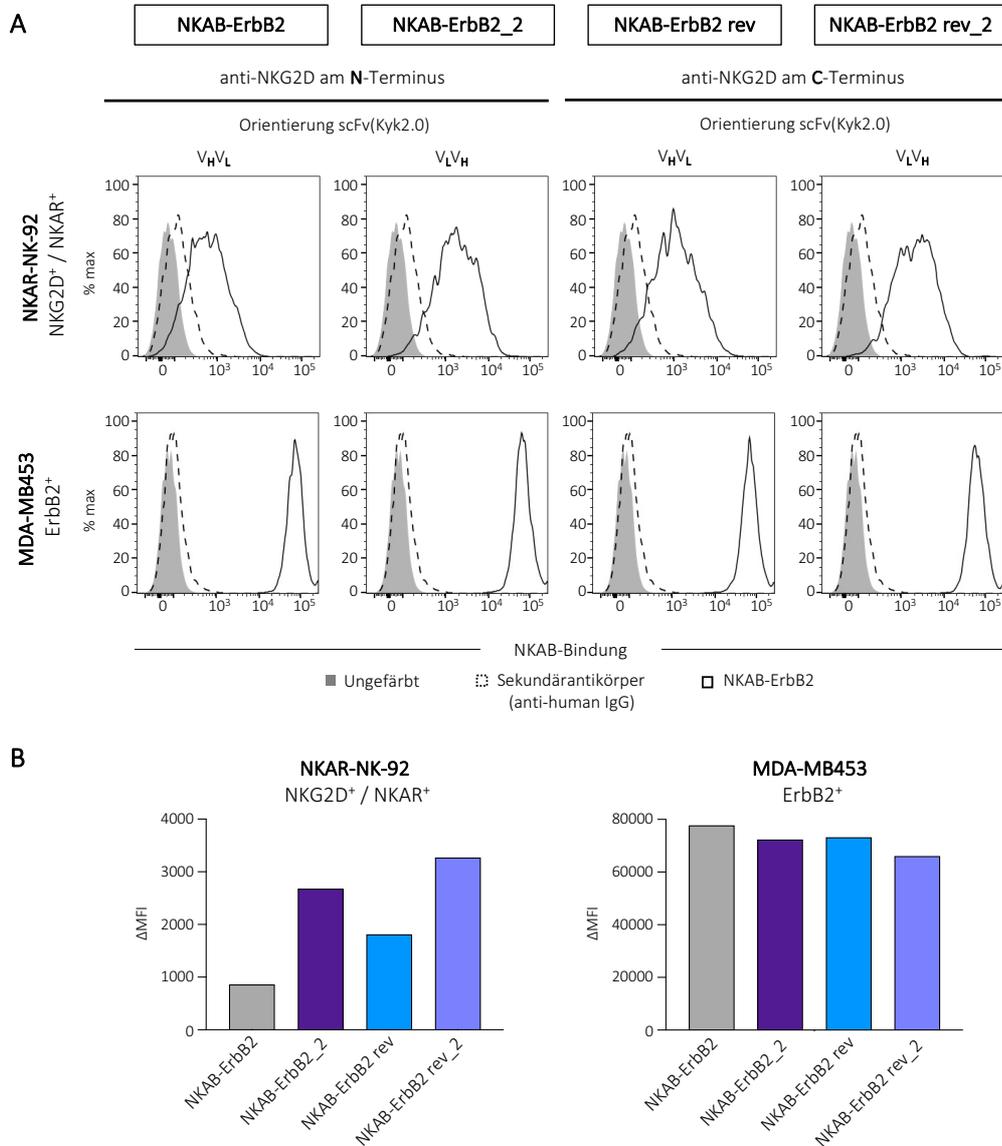


Abbildung 4.16. Analyse der Zellbindung von NKAB-ErbB2 Varianten. (A) Die Bindung der NKAB-ErbB2 Varianten an NKG2D-exprimierende Effektorzellen (NKAR-NK-92) und ErbB2-positive Tumorzellen (MDA-MB453) wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrollen dienten ungefärbte Zellen und Zellen, welche lediglich mit Sekundärantikörper inkubiert wurden. (B) Dargestellt ist die MFI der NKAB-Bindung nach Subtraktion der Sekundärantikörper-Einzelfärbung (Δ MFI). MFI – *Mean fluorescence intensity*.

Um zu untersuchen, ob die Unterschiede in der NKG2D-Bindung einen Einfluss auf die NK-Zell-vermittelte Lyse von ErbB2-exprimierenden MDA-MB453 Zellen haben, wurden FACS-basierte Zytotoxizitätsassays durchgeführt. Hierfür wurden parentale NK-92 und NKAR-NK-92 Zellen in Kombination mit 50 ng/ml (0,32 nM) der NKAB-ErbB2 Varianten in einem E:T Verhältnis von 5:1 eingesetzt und für 3 h mit den Zielzellen inkubiert. Zum Vergleich wurden entsprechende Ansätze mit ErbB2-negativen aber NK-sensitiven K562 Zellen mitgeführt. Die Effektorzellen zeigten dabei auch nach Zugabe der verschiedenen NKAB-ErbB2 Moleküle keine Unterschiede in ihrer natürlichen

Ergebnisse

Zytotoxizität gegenüber der Zielzelllinie K562 (**Abbildung 4.17; A**). Im Fall von MDA-MB453 Zellen führte die Zugabe von NKAB-Molekülen zu keiner gesteigerten Zytotoxizität parentaler NK-92 Zellen. Hingegen wurde die zytotoxische Aktivität von NKAR-NK-92 Zellen durch die NKAB-ErbB2 Varianten von $23,9 \pm 1,6\%$ auf durchschnittlich $58,8 \pm 6,7\%$ gesteigert. Ein signifikanter Unterschied zwischen den NKAB-ErbB2 Varianten war dabei, trotz der zuvor festgestellten Unterschiede in der NKG2D-Bindung, nicht zu erkennen (**Abbildung 4.17; B**). Diese Ergebnisse weisen auf eine hohe Flexibilität im Design der bispezifischen Antikörper hin, die unabhängig von der jeweiligen Orientierung der Bindungsdomänen innerhalb der Moleküle funktional bleiben.

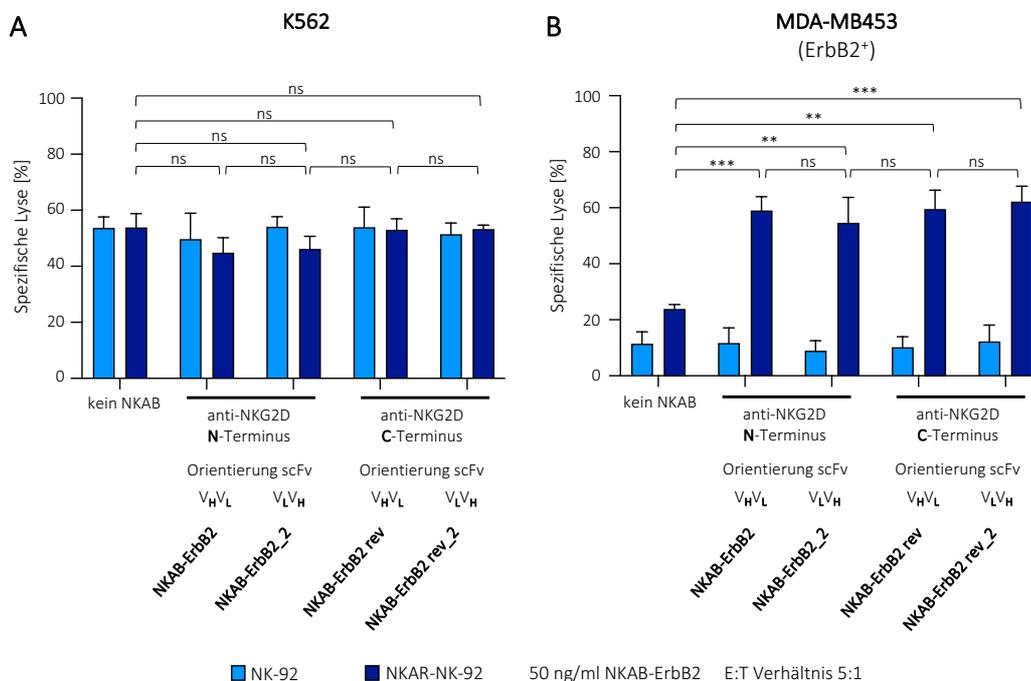


Abbildung 4.17. Zytotoxische Aktivität von parentalen NK-92 und NKAR-NK-92 Zellen in Kombination mit NKAB-ErbB2 Varianten. MHC-I negative K562 Leukämiezellen (**A**) oder ErbB2-positive MDA-MB453 Brustkrebszellen (**B**) wurden mit Effektorzellen in einem Effektor- zu Zielzell-Verhältnis (E:T) von 5:1 in An- oder Abwesenheit der aufgeführten NKAB-ErbB2 Varianten (50 ng/ml; 0,32 nM) für 3 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der zytotoxischen Aktivität am Durchflusszytometer. scFv: *single-chain fragment variable*, V_H: variable Domäne der schweren Antikörperkette, V_L: variable Domäne der leichten Antikörperkette. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. ns: $p > 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0.001$.

4.4.4 Kombination von NKAB-ErbB2 mit dem IL-15 Superagonisten RD-IL15

Im Abschnitt 4.1 und 4.2 wurde bereits die Generierung RD-IL15 sekretierender NKAR-NK-92 Zellen beschrieben und die biologische Aktivität des IL-15 Superagonisten (RD-IL15) bestätigt. Neben der Sekretion von RD-IL15 durch Effektorzellen wurde in dieser Arbeit ein weiterer Ansatz entwickelt, in

Ergebnisse

dem RD-IL15 über einen kurzen Linker an den N-Terminus des prototypischen NKAB-ErbB2 Moleküls (RD-IL15-NKAB-ErbB2) gekoppelt wurde (**Abbildung 4.18; A**). Auch dieses Konstrukt wurde über das Expressionsplasmid pcDNA3 unter der Kontrolle des CMV-Promotors in Expi293F Zellen eingebracht und das entsprechende RD-IL15-NKAB-ErbB2 Molekül in rekombinanter Form produziert. Ein vorgelegertes Signalpeptid gewährleistet die Sekretion des Proteins in den Zellkulturüberstand, aus dem es anschließend mittels Protein-G-Affinitätschromatographie aufgereinigt wurde (**Abbildung 4.18; B**).

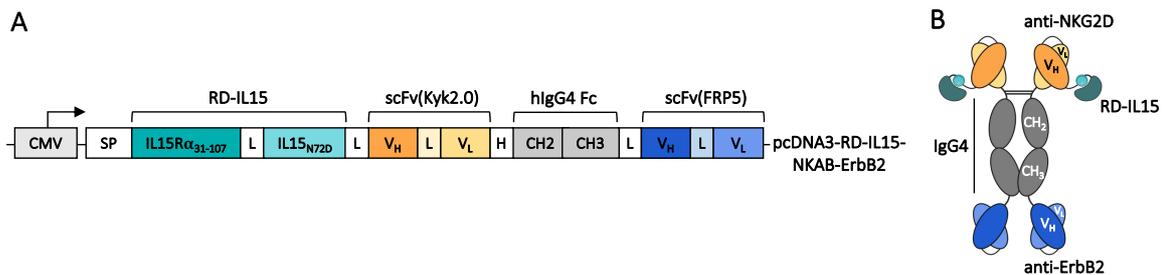


Abbildung 4.18. Struktur des bispezifischen Antikörpers RD-IL15-NKAB-ErbB2. (A) Schematischer Aufbau der RD-IL15-NKAB-ErbB2 Sequenz. Das in das Expressionsplasmid pcDNA3 eingebrachte RD-IL15-NKAB-ErbB2 Konstrukt (pcDNA3-RD-IL15-NKAB-ErbB2) steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors und trägt am N-Terminus ein Signalpeptid. Anschließend folgt zunächst der IL-15 Superagonist RD-IL15, welcher sich aus der Sushi-Domäne der IL-15 Rezeptor-Untereinheit α und einer mutierten Form von IL-15 (N72D) zusammensetzt. Über einen kurzen Linker ist RD-IL15 mit der NKAB-ErbB2 Sequenz verknüpft, welche eine NKG2D-spezifische scFv-Domäne (Kyk2.0) am N-Terminus und eine scFv-Domäne spezifisch für ErbB2 (FRP5) am C-Terminus enthält. Die Domänen sind über die Gelenkregion (H), die Fc-Domäne des humanem IgG4 (CH2 und CH3) und einen (G₄S)₂ Peptid-Linker miteinander verknüpft. **(B) Schematische Darstellung des RD-IL15-NKAB-ErbB2 Moleküls.** Das Molekül ist als Homodimer dargestellt. Ausgebildete Disulfidbrücken innerhalb der Gelenkregion zweier RD-IL15-NKAB-ErbB2 Monomere sind mit Linien angedeutet. scFv: *single-chain fragment variable*, IgG: Immunglobulin G, CMV: CMV-Promotor, SP: Signalpeptid, V_H: variable Domäne der schweren Antikörperkette, V_L: variable Domäne der leichten Antikörperkette, H: Gelenkregion, Fc: Fragment-kristallisierbare Region eines Antikörpers, L: GS-Linker.

Die Bindung von gereinigtem RD-IL15-NKAB-ErbB2 an NKG2D auf NKAR-NK-92 und ErbB2 auf MDA-MB453 Zellen wurde durchflusszytometrisch bestätigt (**Abbildung 4.19; A**). Dabei wurde die Bindung von NKAB-ErbB2 an NKG2D durch den N-terminal verknüpften IL-15 Superagonisten RD-IL15 nicht gehemmt. Das Potenzial von RD-IL15-NKAB-ErbB2 zur Steigerung der Zytotoxizität von NKAR-NK-92 Zellen wurde anschließend im direkten Vergleich mit dem Ausgangsmolekül NKAB-ErbB2 untersucht. Dabei wurden beide Antikörper in gleichen molaren Konzentrationen eingesetzt. Als Zielzelllinie diente die von der murinen Glioblastom-Zelllinie GL261 abgeleitete, ErbB2-exprimierende Variante GL261/ErbB2. In vorherigen Arbeiten der Gruppe wurde bereits gezeigt, dass murine NKG2D-L auf GL261 Zellen nicht von NKAR-Molekülen (basierend auf humanem NKG2D)

Ergebnisse

erkannt werden (C. Zhang et al., 2021). Aufgrund dessen kann mit diesen Zielzellen der Effekt des NKAB-Moleküls ohne den Einfluss einer NKG2D/NKG2D-L Interaktion analysiert werden. Mit bis auf 0,64 nM steigenden NKAB-ErbB2 und RD-IL15-NKAB-ErbB2 Konzentrationen wurde eine zunehmende spezifische Lyse von GL261/ErbB2 Zellen detektiert. Bei Konzentrationen über 0,64 nM sank der Anteil lysierter Zellen dagegen wieder (**Abbildung 4.19; B**). Hierbei wurde kein statistisch signifikanter Unterschied in den Effekten der beiden NKAB-Moleküle festgestellt. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die beiden Moleküle Effektor- und Zielzellen in vergleichbarem Maße binden und eine erhöhte spezifische Lyse von ErbB2-exprimierenden Zielzellen induzieren. Der an NKAB-ErbB2 gekoppelte IL-15 Superagonist beeinflusste diese Interaktion nicht in negativer Weise.

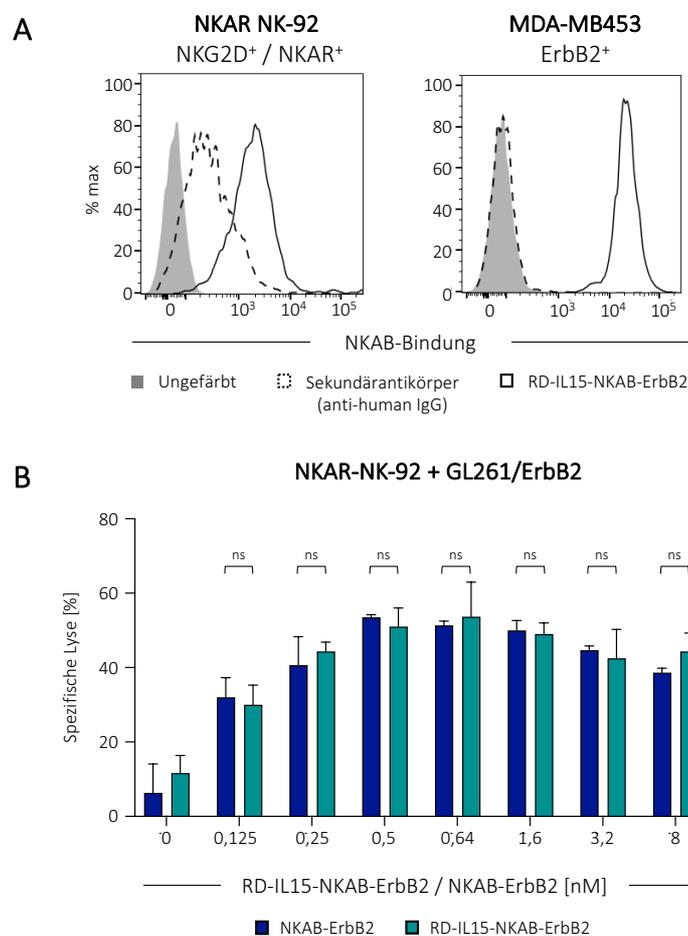


Abbildung 4.19. Funktionalität des RD-IL15-NKAB-ErbB2 Moleküls. (A) Analyse der NKAB-Bindung an NKG2D-positive Effektor- und ErbB2-positive Tumorzellen. Die Bindung des RD-IL15-NKAB-ErbB2 Moleküls an NKG2D-positive NKAR-NK-92 Zellen und ErbB2-positive Brustkrebszellen (MDA-MB453) wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrollen dienen ungefärbte oder lediglich mit Sekundäntikörper gefärbte Zellen. **(B) Vergleich des zytotoxischen Potenzials von RD-IL15-NKAB-ErbB2 und NKAB-ErbB2 in Kombination mit NKAR-NK-92 Zellen.** Es wurde ein Zytotoxizitätsassay mit NKAR-NK-92 und GL261/ErbB2 Zellen in einem E:T Verhältnis von 5:1 mit steigenden Konzentrationen an RD-IL15-NKAB-ErbB2 oder NKAB-ErbB2 für 3 Stunden durchgeführt. Die Tumorzell-Lyse wurde am Durchflusszytometer bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. ns: $p > 0,05$.

Ergebnisse

Nachdem bestätigt werden konnte, dass RD-IL15 die Eigenschaften des bispezifischen Moleküls hinsichtlich der Bindung und induzierten Zytotoxizität nicht negativ beeinflusst, wurde im nächsten Schritt die Funktionalität des an NKAB-ErbB2 gekoppelten IL-15 Superagonisten untersucht. Die biologische Aktivität wurde dabei wie bereits für NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen mit Hilfe eines pSTAT5 Immunoblots und Vitalitäts- und Proliferationsassays überprüft. NKAR-NK-92 Zellen wurden hierzu für 24 h mit rekombinanten Zytokinen oder rekombinantem RD-IL15-NKAB-ErbB2 kultiviert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die in Medium ohne Zytokine kultiviert wurden, während als Positivkontrolle Zellen mit IL-2 oder IL-15 behandelt wurden. Anschließend wurden Zelllysate hergestellt und im Immunoblot auf die Phosphorylierung von STAT5 analysiert. Während in NKAR-NK-92 Zellen, kultiviert ohne IL-2 oder IL-15, kein pSTAT5 nachgewiesen werden konnte, zeigten alle weiteren Proben eine spezifische Bande für phosphoryliertes STAT5 (**Abbildung 4.20; A**). Die Kopplung von RD-IL15 an NKAB-ErbB2 hatte folglich keinen negativen Effekt auf die Bindung der Zytokindomäne an die β/γ -Untereinheit des IL-15 Rezeptors auf NKAR-NK-92 Zellen und die Aktivierung des JAK/STAT Signalwegs.

Für Vitalitäts- und Proliferationsassays wurden $2,5 \times 10^5$ NKAR-NK-92 Zellen ausgesät und für 7 Tage in Medium mit IL-2, ohne IL-2 oder mit RD-IL15-NKAB-ErbB2 (50 ng/ml) kultiviert. An Tag 3 wurde die entsprechende Probe erneut mit RD-IL15-NKAB-ErbB2 (50 ng/ml) stimuliert. Eine Restimulation mit IL-2 erfolgte nicht. Zellzahl und Vitalität der Zellen wurden an Tag 0, 1, 4 und 7 bestimmt. Bereits an Tag 4 war ein Abfall der Vitalität von NKAR-NK-92 Zellen in Abwesenheit von IL-2 zu beobachten ($31 \pm 9,2\%$), welcher an Tag 7 noch weiter vorangeschritten war ($18,3 \pm 11,2\%$). Zellen, die in Abwesenheit von IL-2 aber unter Zugabe von RD-IL15-NKAB-ErbB2 kultiviert wurden, zeigten im Vergleich zu NKAR-NK-92 Zellen kultiviert mit IL-2 dagegen eine ähnlich hohe Vitalität, die erst an Tag 7 leicht abfiel. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (RD-IL15-NKAB: $70,3 \pm 11,7\%$; IL-2: $86,7 \pm 5,9\%$) (**Abbildung 4.20; B**).

Die Analyse der Proliferation ergab eine signifikante Reduktion der Zellzahl von NKAR-NK-92 Zellen ohne IL-2 an Tag 4 ($7,8 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^4$), während Zellen, die mit RD-IL15-NKAB-ErbB2 stimuliert wurden, eine konstante Zellzahl zeigten. Im Vergleich dazu verdoppelte sich die Zellzahl der NKAR-NK-92 Zellen durch IL-2-Stimulation ($5,0 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^5$). Diese Unterschiede verdeutlichten sich an Tag 7. Während sich in Ansätzen ohne Zytokine die Zellzahl weiter reduzierte ($2,3 \times 10^4 \pm 2,1 \times 10^4$), stimulierten sowohl rekombinantes IL-2 als auch RD-IL15-NKAB-ErbB2 die Proliferation der NKAR-NK-92 Zellen. Allerdings zeigte der Vergleich der Zellzahlen der RD-IL15-NKAB-ErbB2 ($4,9 \times 10^5 \pm 5,2 \times 10^4$) und IL-2 stimulierten Proben ($7,3 \times 10^5 \pm 2,1 \times 10^4$) signifikante Unterschiede (**Abbildung 4.20; C**). Die geringere Zellzahl nach Stimulation mit dem RD-IL15-NKAB Fusionsprotein lässt darauf

Ergebnisse

schließen, dass dieses das fehlende IL-2 nicht vollständig kompensieren kann, möglicherweise aufgrund nicht ausreichender Mengen von RD-IL15-NKAB-ErbB2 (eingesetzte Konzentrationen von IL-2: 0,4 nM; RD-IL15-NKAB-ErbB2: 0,1 nM).

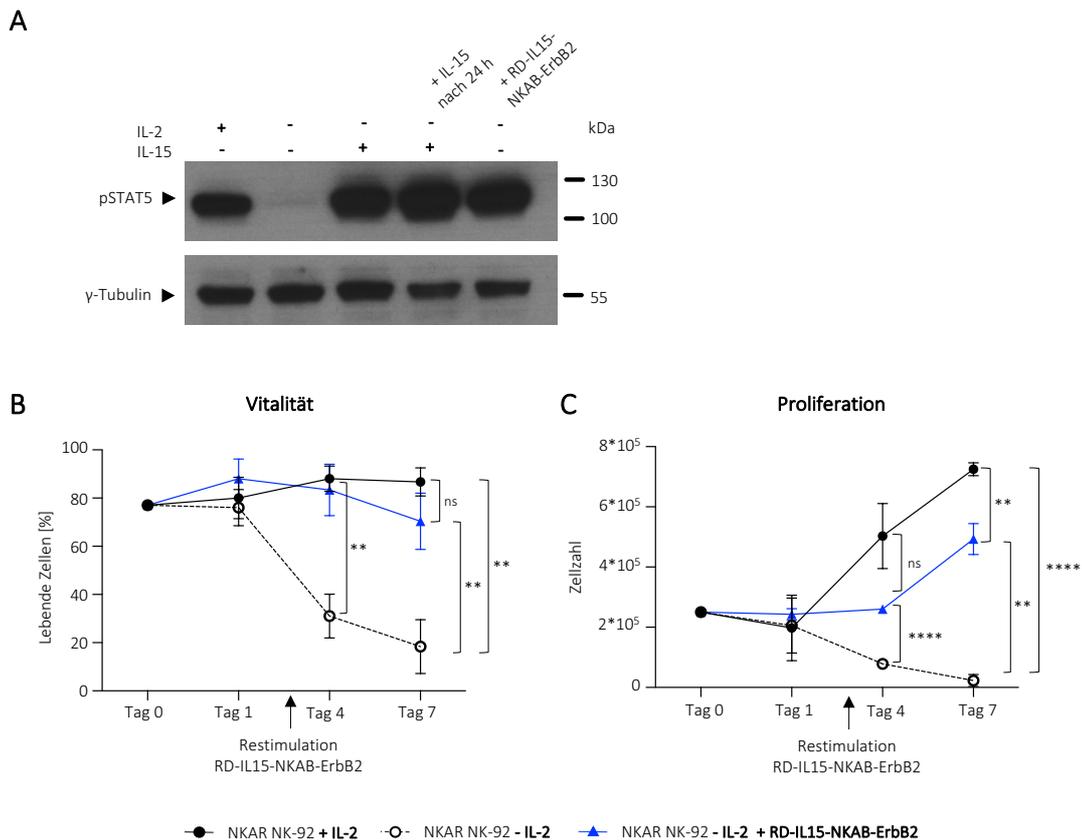


Abbildung 4.20. Biologische Aktivität von RD-IL15 gekoppelt an den bispezifischen Antikörper NKAB-ErbB2 (RD-IL15-NKAB-ErbB2). (A) Detektion von phosphoryliertem STAT5 (pSTAT5) in NKAR-NK-92 Zellen. NKAR-NK-92 Zellen wurden für 24 h in An- oder Abwesenheit von IL-2 mit oder ohne RD-IL15-NKAB-ErbB2 (20 ng/ml; 0,1 nM) kultiviert. Zusätzlich wurden NKAR-NK-92 Zellen in Abwesenheit von IL-2 unter Zugabe von rekombinantem, humanem IL-15 (20 ng/ml) für 24 h oder 0,5 h am Folgetag inkubiert. In einem Immunoblot wurde pSTAT5 detektiert (Molekulare Masse ~ 90 kDa). γ -Tubulin wurde als Ladekontrolle eingesetzt (Molekulare Masse ~ 50 kDa). (B) Auswirkung einer IL-2 Depletion auf die Vitalität und Proliferation von NKAR-NK-92 Zellen in An- oder Abwesenheit von RD-IL15-NKAB-ErbB2. NKAR-NK-92 Zellen wurden in Medium mit oder ohne IL-2 (0,4 nM) kultiviert und Vitalität (B) und Zellzahl (C) wurden an den Tagen 0, 1, 4 und 7 bestimmt. Zusätzlich wurden Zellen unter Zugabe von 50 ng/ml (0,1 nM) RD-IL15-NKAB-ErbB2 in Abwesenheit von IL-2 kultiviert. Eine Restimulation mit RD-IL15-NKAB-ErbB2 erfolgte an Tag 3. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$.

4.4.5 Zusammenfassung der Abschnitte 4.4.1 bis 4.4.4

In vorausgegangenen Arbeiten der Gruppe wurde in durchflusszytometrischen Analysen gezeigt, dass das bispezifische Molekül NKAB-ErbB2 sowohl an den extrazellulären Teil von NKG2D als auch an das Tumor-assoziierte Antigen ErbB2 bindet (C. Zhang et al., 2021). Diese Daten wurden im Rahmen dieser Arbeit durch den Nachweis der spezifischen Bindung von NKAB-ErbB2 an zweidimensional (adhärente MDA-MB453 Zellen) und dreidimensional (ErbB2⁺ Mamma-Organoiden) wachsende Tumorzellen in Fluoreszenz-mikroskopischen Analysen bestätigt. Durch die Kombination von NKAB-ErbB2 und NKAR-NK-92 oder NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen wurde die Lyse ErbB2-exprimierender MDA-MB453 Zellen signifikant gesteigert. Dabei lag die optimale Konzentration von NKAB-ErbB2 bei 50 ng/ml (0,32 nM), während Konzentrationen über 100 ng/ml (0,64 nM) eine Reduktion der Tumorzell-Lyse zur Folge hatten. Um zu prüfen, ob die Funktionalität von NKAB-ErbB2 durch Änderung der Proteinstruktur weiter verbessert werden kann, wurden die Bindungsstellen am N-Terminus und C-Terminus ausgetauscht und die Orientierung der V_H- und V_L-Domänen innerhalb des scFv(Kyk2.0) Antikörperfragments variiert. Die vier untersuchten Formate zeigten kleinere Unterschiede hinsichtlich der NKG2D Bindung. Jedoch hatten diese keine signifikante Auswirkung auf die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität. Dies weist nach, dass das Design der NKAB-Moleküle ein hohes Maß an Variationen ermöglicht, ohne dabei die Funktionalität einzuschränken. Zusätzlich wurde ein NKAB-ErbB2 Molekül generiert, das am N-Terminus den IL-15 Superagonisten RD-IL15 trägt (RD-IL15-NKAB-ErbB2). Auch dieses Fusionsprotein zeigte ebenso wie unmodifiziertes NKAB-ErbB2 eine bispezifische Bindung an die Zielstrukturen NKG2D und ErbB2 und induzierte eine gesteigerte Lyse ErbB2-positiver MDA-MB453 Zellen durch NKAR-NK-92 Zellen. Die biologische Aktivität der RD-IL15 Domäne wurde durch den Nachweis der Aktivierung des IL-15 Signalwegs in NKAR-NK-92 Zellen anhand von phosphoryliertem STAT5 mittels Immunoblot und in Proliferations- und Vitalitätsassays bestätigt.

4.5 Generierung und funktionelle Charakterisierung eines bispezifischen Antikörpers gerichtet gegen NKG2D und EGFR

Wie zuvor bereits aufgeführt, stellt die Heterogenität der Expression von Tumor-assoziierten Antigenen im Gewebe solider Tumoren ein bekanntes Problem bei der Behandlung von Krebserkrankungen mit Immuntherapien wie monoklonalen Antikörpern oder genmodifizierten Immunzellen dar. So besteht die Gefahr, dass Tumorzellen, welche das Zielantigen verloren haben (*Antigen loss*), der Therapie entgehen. Die Kombination aus NKAR-NK-92 Zellen und bispezifischem Antikörper

bietet hingegen die Möglichkeit, die Therapie an das Antigenprofil der Tumorzellen anzupassen und auf weitere Veränderungen im Verlauf der Therapie wie beispielweise *Antigen loss* zu reagieren.

In den vorangegangenen Untersuchungen zeigte sich bereits, dass unterschiedliche Variationen des NKAB-ErbB2-Moleküls, wie zum Beispiel eine geänderte Anordnung der V_H- und V_L-Domänen oder die Kopplung von RD-IL15, nicht zu Einschränkungen in dessen Funktion führen. Der Aufbau des Moleküls erlaubt also ein hohes Maß an Flexibilität bezüglich der Anordnung und Natur der eingesetzten funktionellen Domänen. Um das Therapiekonzept auch auf andere Tumorentitäten auszuweiten, wurden im nächsten Schritt NKAB-Moleküle generiert, die weitere Tumor-assoziierte Antigene binden. Dabei wurde zunächst das bispezifische Molekül NKAB-EGFR generiert. Dieses erkennt neben der extrazellulären Domäne von NKG2D den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (*Epidermal growth factor receptor*; EGFR). EGFR ist eine membranständige Rezeptor-Tyrosinkinase und gehört, wie auch ErbB2, zur ErbB-Protein Familie. Die Expression hoher Mengen von EGFR in unterschiedlichen Tumorentitäten wurde in vielen Studien gezeigt. EGFR fördert dabei das Wachstum, das Überleben, die Adhäsion und die Migration der Tumorzellen und stellt daher ein vielversprechendes Zielmolekül zur Behandlung von Tumorerkrankungen dar (Seshacharyulu et al., 2012; Uribe et al., 2021). Neben der Amplifikation des EGFR-Gens und der Überexpression des wild-typischen EGFR-Proteins sowohl beim Glioblastom als auch bei Tumoren der Brust und Lunge, wurden in Tumorzellen zusätzlich mutierte, hyper-aktive Formen des Rezeptors identifiziert. Dabei ist EGFRvIII die am häufigsten vertretene genetische Aberration in Hirntumoren und wird mit einer schlechten Prognose assoziiert. Obwohl durch das Fehlen eines großen Bereichs der extrazellulären Domäne keine natürlichen EGFR-Liganden an EGFRvIII binden können, ist der Rezeptor konstitutiv aktiv (Uribe et al., 2021).

4.5.1 Erweiterung des NKAB-Repertoires durch NKAB-EGFR

Cetuximab ist ein therapeutisch genutzter, EGFR-spezifischer monoklonaler Antikörper des IgG1 Isotyps, welcher sowohl allein als auch in Kombination mit Chemotherapie eingesetzt wird. Aufgrund seiner hoch affinen Bindung an EGFR verhindert er die Bindung von EGFR-Liganden und somit die Aktivierung des Rezeptors. Außerdem induziert Cetuximab die Internalisierung und Degradation des Rezeptors und kann zusätzlich über seinen Fc-Teil ADCC und CDC vermitteln (Holubec et al., 2016; Yonesaka et al., 2011). Die Bindungsdomäne von Cetuximab erkennt neben EGFR auch die mutierte Variante EGFRvIII. Aufgrund der klinischen Relevanz und der dualen Bindung an EGFR und EGFRvIII wurde daher das Antikörperfragment scFv(225), das die gleiche Bindungsdomäne wie Cetuximab enthält (Müller et al., 2014), in dieser Arbeit für die Generierung von NKAB-EGFR eingesetzt. Das

bispezifische Molekül trägt am N-Terminus die Bindungsstelle für EGFR und am C-Terminus die bereits beschriebene NKG2D-spezifische Domäne. Auch NKAB-EGFR basiert wie das bereits eingeführte NKAB-ErbB2 auf dem humanem IgG4 Molekül (**Abbildung 4.21; A**). Die Sequenz wurde über den pcDNA3-Vektor in Expi293F Zellen eingebracht und das rekombinante Protein unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert (**Abbildung 4.21; B**). Nach einer SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen wurde im Immunoblot gezeigt, dass mittels Protein-G-Affinitätschromatographie gereinigtes NKAB-EGFR vorwiegend als Dimer und nur zu einem kleinen Teil als Monomer vorliegt (**Abbildung 4.21; C**). Im Vergleich zur nicht-reduzierten Probe ist die Proteinbande unter reduzierenden Bedingungen deutlich schwächer ausgeprägt. Möglicherweise beeinträchtigt das Aufbrechen der Disulfidbindungen die Erkennung des Epitops durch den Detektionsantikörper und führt daher zu einem verminderten Signal.

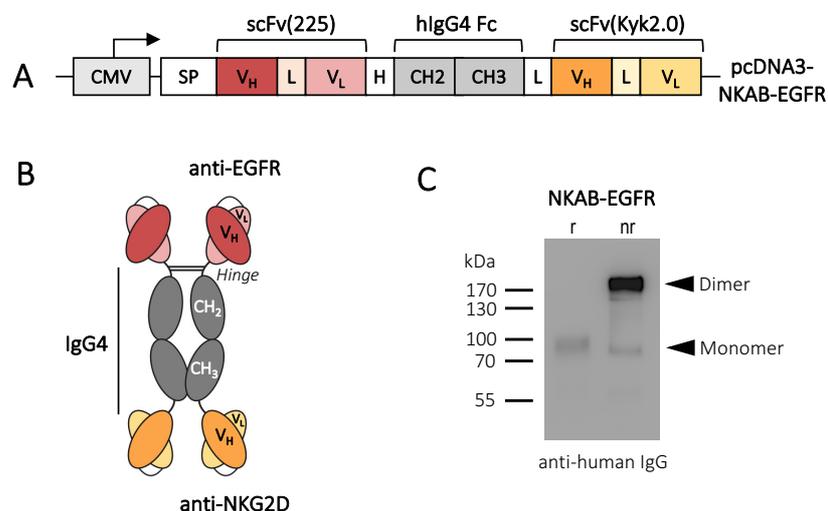


Abbildung 4.21. Aufbau des bispezifischen Antikörpers NKAB-EGFR. (A) Zusammensetzung der NKAB-EGFR Sequenz. Das in das Expressionsplasmid pcDNA3 eingebrachte NKAB-EGFR Konstrukt (pcDNA3-NKAB-EGFR) steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors und trägt am N-Terminus ein Signalpeptid. Daran anschließend folgt eine EGFR-spezifische scFv-Domäne (225) und am C-Terminus ein scFv-Antikörperfragment spezifisch für NKG2D (Kyk2.0). Die Bindungsdomänen sind über die Gelenkregion (H), den Fc-Teil des humanem IgG4 (CH₂ und CH₃) und einen (G₄S)₂ Peptid-Linker (L) miteinander verknüpft. **(B) Schematische Darstellung des NKAB-EGFR Moleküls.** Das Molekül ist als Homodimer dargestellt. Ausgebildete Disulfidbrücken innerhalb der Gelenkregion zweier NKAB-EGFR Monomere sind mit Linien angedeutet. **(C) Immunoblot-Analyse von NKAB-EGFR.** Das gereinigte NKAB-EGFR Molekül wurde unter reduzierenden (r) und nicht-reduzierenden (nr) Bedingungen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Insgesamt wurden 100 ng pro Spur eingesetzt. Der anschließende Nachweis im Immunoblot erfolgte mit Hilfe eines humanen IgG4-Fc-spezifischen Sekundärantikörpers. Molekulare Masse NKAB-EGFR: 80 kDa (Monomer), 160 kDa (Dimer). scFv: *single-chain fragment variable*, IgG: Immunglobulin G, CMV: CMV-Promotor, SP: Signalpeptid, V_H: variable Domäne der schweren Antikörperkette, V_L: variable Domäne der leichten Antikörperkette, H: Gelenkregion, Fc: Fragment-kristallisierbare Region eines Antikörpers, L: GS-Linker.

4.5.2 Funktionelle Charakterisierung des bispezifischen Moleküls NKAB-EGFR

Die Bindung des bispezifischen NKAB-EGFR Moleküls an NKG2D-exprimierende NK-Zell-Varianten (**Abbildung 4.22; A**) und EGFR-exprimierende Glioblastom- (T98G) und Brustkrebs-Zelllinien (MDA-MB468) wurde durchflusszytometrisch untersucht. Während die Bindung von NKAB-EGFR an Antigen-positive Zielzellen ersichtlich war, wurden Antigen-negative K562 Zellen dagegen nicht von NKAB-EGFR gebunden, was die Antigen-Spezifität des Moleküls nachweist (**Abbildung 4.22; B**).

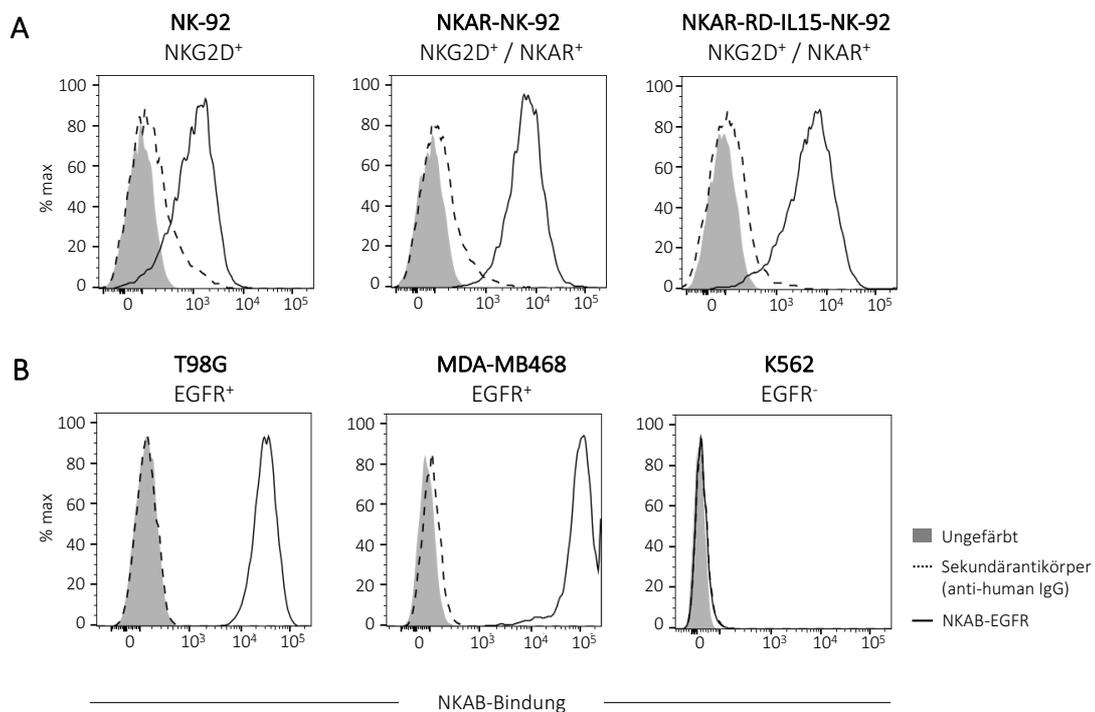


Abbildung 4.22. Durchflusszytometrische Analyse der Zellbindung von NKAB-EGFR. Die Bindung von NKAB-EGFR (25 ng/ml; 0,16 nM) an **(A)** NKG2D-exprimierende Effektorzellen und **(B)** EGFR-positive und -negative Tumorzellen wurde durchflusszytometrisch überprüft. Als Kontrollen dienten ungefärbte oder lediglich mit Sekundärantikörper gefärbte Zellen.

Nach Bestätigung der spezifischen Zellbindung von NKAB-EGFR wurde untersucht, ob die Zugabe des bispezifischen Antikörpers eine Steigerung der Zytotoxizität von parentalen und NKAR-NK-92 Zellen gegenüber EGFR-exprimierenden Glioblastomzellen (T98G) bewirken kann. Dazu wurde ein Zytotoxizitätsassay mit steigenden NKAB-EGFR Konzentrationen und einem E:T Verhältnis von 5:1 durchgeführt. In Kombination mit parentalen NK-92 Zellen wurde eine leichte, aber dennoch signifikante Steigerung der spezifischen Lyse mit einem Wirkoptimum von 10 ng/ml (0,06 nM) NKAB-EGFR detektiert (**Abbildung 4.23; A**). Verglichen mit parentalen NK-92 Zellen zeigten NKAR-NK-92 Zellen in Anwesenheit von NKAB-EGFR eine deutlich erhöhte Zytotoxizität. Während ohne NKAB nur $10,6 \pm 0,6\%$ der T98G Zellen abgetötet wurden, wurde die spezifische Lyse bei einer Konzentration

Ergebnisse

von 25 ng/ml (0,16 nM) NKAB-EGFR auf $32,5 \pm 0,9\%$ gesteigert. Wie bereits für NKAB-ErbB2 gezeigt, erhöhte sich die Tumorzell-Lyse zunächst mit zunehmender NKAB-Konzentration. Bei Konzentrationen über 25 ng/ml (0,16 nM) war jedoch auch im Fall von NKAB-EGFR eine Reduktion der spezifischen Lyse zu beobachten (**Abbildung 4.23; B**). Dies spricht dafür, dass die gegenseitige Konkurrenz solcher Moleküle bei hohen Konzentrationen ein generelles Phänomen darstellt.

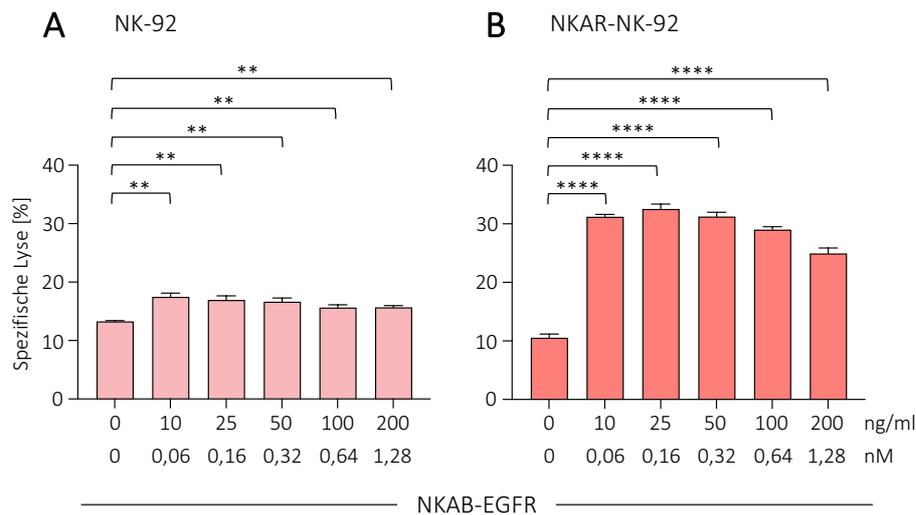


Abbildung 4.23. Zytotoxische Aktivität von parentalen NK-92 und NKAR-NK-92 Zellen in Kombination mit NKAB-EGFR gegenüber EGFR-exprimierenden Glioblastomzellen (T98G). T98G Zellen (Zielzellen) wurden mit (A) parentalen NK-92 und (B) NKAR-NK-92 Zellen (Effektorzellen) in einem E:T Verhältnis von 5:1 und steigenden NKAB-EGFR Konzentrationen koinkubiert. Nach 3 Stunden wurde die spezifische Lyse der Tumorzellen durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$.

Um zu untersuchen, ob hohe Konzentrationen löslicher NKAB-Moleküle in Abwesenheit von Tumorzellen mit entsprechender Antigenexpression bereits eine ungerichtete Aktivierung von NK-Zellen und eine damit einhergehende im Patienten, potenziell mit Nebenwirkungen verbundene Reaktion induzieren, wurde ein Degranulationsassay durchgeführt. Dieser beruht auf der Detektion von CD107a (LAMP1) auf der Zelloberfläche von NK-Zellen. Nach Aktivierung von NK-Zellen werden lytische Granula freigesetzt, welche die Eliminierung von Zielzellen induzieren. Die Lipid-Schicht der lytischen Granula enthält das Membranprotein CD107a, welches nach dem Verschmelzen der Granula mit der Zellmembran auf der Oberfläche mittels durchflusszytometrischer Analysen nachgewiesen werden kann (**Abbildung 4.24**). Die Oberflächenexpression von CD107a korreliert dementsprechend mit der Freisetzung von lytischen Granula und der zytotoxischen Aktivität der analysierten Immunzellen (Alter et al., 2004).

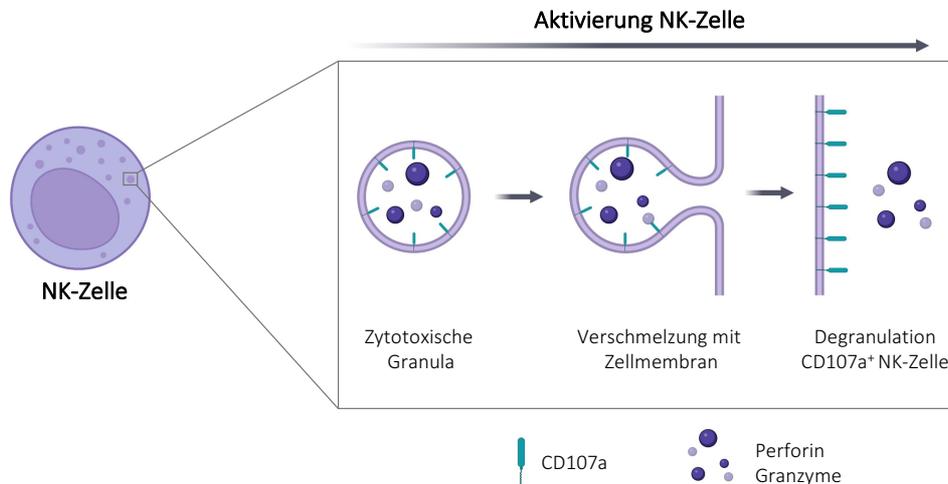


Abbildung 4.24. Degranulation einer NK-Zelle nach Aktivierung. NK-Zellen enthalten lytische Granula, welche nach Aktivierung zur immunologischen Synapse zwischen NK-Zelle und Zielzelle transportiert werden. Dort verschmelzen sie mit der Plasmamembran und setzen ihren zytotoxischen Inhalt in Richtung der Zielzelle frei. Eingebettet in die Lipid-Doppelschicht der Granula befindet sich das Membranprotein CD107a, welches durch die Verschmelzung der Granula mit der Plasmamembran auf der Zelloberfläche von NK-Zellen erscheint.

NKAR-NK-92 Zellen wurden mit 50 ng/ml (0,32 nM) löslichen NKAB-EGFR in An- oder Abwesenheit von EGFR-positiven MDA-MB468 Zellen inkubiert. Als Positivkontrollen dienten NKAR-NK-92 Zellen stimuliert mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)/Ionomycin (Iono) oder inkubiert mit der NK-sensitiven Zielzelllinie K562. Nach 3 h wurden die NKAR-NK-92 Zellen durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer CD107a Expression analysiert. Durch die Zugabe von PMA/Iono ($95,7 \pm 0,3\%$) oder K562 ($69,4 \pm 3,2\%$) wurde der prozentuale Anteil an CD107a⁺ NK-Zellen deutlich gesteigert. NKAR-NK-92 Zellen, inkubiert mit NKAB-EGFR ohne Tumorzellen, zeigten dagegen nahezu keine CD107a Oberflächenexpression ($1,7 \pm 0,3\%$). Die Zugabe von MDA-MB468 Zellen steigerte jedoch den prozentualen Anteil an CD107a⁺ NKAR-NK-92 Zellen auf $37,7 \pm 1,0\%$ (**Abbildung 4.25**). Diese Ergebnisse zeigen, dass NK-Zellen nur dann durch NKAB-Moleküle aktiviert werden, wenn diese an entsprechende Zielantigen-exprimierende Tumorzellen gebunden sind. Damit ist auch bei einem möglichen Einsatz im Patienten von einer hohen Spezifität der NKAB-vermittelten Aktivierung von Effektorzellen auszugehen.

Ergebnisse

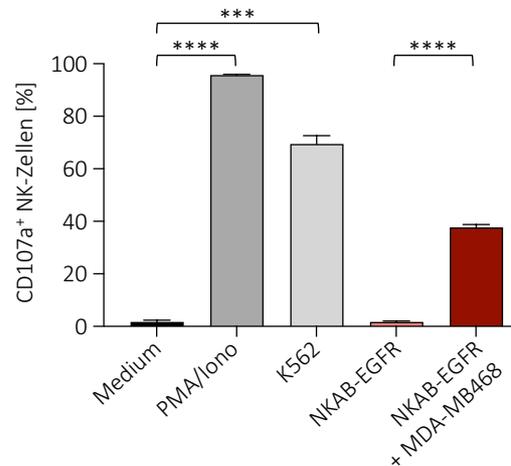


Abbildung 4.25. Degranulationsassay zur Bestimmung der NKAR-NK-92 Aktivierung. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an CD107a⁺ NKAR-NK-92 Zellen nach 3-stündiger Inkubation mit PMA (50 ng/ml) und Ionomycin (500 ng/ml), K562 (Positivkontrolle), 50 ng/ml (0,32 nM) löslichem NKAB-EGFR oder 50 ng/ml (0,32 nM) NKAB-EGFR + MDA-MB468 Brustkrebszellen (EGFR⁺) (E:T 1:1). Unstimulierte, in Medium kultivierte NKAR-NK-92 Zellen wurden als Negativkontrolle eingesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

Neben der in den vorausgegangenen Experimenten bestätigten Aktivierung der NK-Zelllinie NK-92 oder genetisch modifizierter NKAR-NK-92 Zellen gegen Tumorzellen durch spezifische NKAB-Moleküle, ist es von besonderem Interesse zu klären, ob auch primäre NKG2D-exprimierende Immunzellen durch NKAB-Moleküle gegen Tumorzellen ausgerichtet werden können. Um den Effekt von NKAB-EGFR auf primäre Immunzellen zu untersuchen, wurden zunächst PBMCs aus dem Blut gesunder Spender isoliert und mit CD3-spezifischen (**Abbildung 4.26**; T-Zellen – gelb) und CD56-spezifischen (**Abbildung 4.26**; NK-Zellen – türkis) Antikörpern gefärbt. Anschließend wurden mit CFSE gefärbte, EGFR-exprimierende Brustkrebszellen (**Abbildung 4.26**; MDA-MB468 – grün) mit Fluorochrom-gekoppeltem NKAB-EGFR (**Abbildung 4.26**; pink – 50 ng/ml; 0,32 nM) und den gefärbten PBMCs (E:T 5:1) gemischt und für 4 h an einem konfokalen Mikroskop beobachtet. Bereits zu Beginn der Aufzeichnung war im ausgewählten Bildausschnitt der erste Zellkontakt zwischen NK-Zellen und einer mit NKAB-EGFR benetzten Tumorzelle zu erkennen (Pfeil). Im Versuchsverlauf zeigte sich zudem, dass Tumorzellen, welche in Kontakt mit NK-Zellen standen, abgetötet wurden. Dies wurde vor allem durch die blasenförmige Ausstülpung der Zellmembran deutlich, die als *Membrane blebbing* bezeichnet wird und als Merkmal der Apoptose gilt (**Abbildung 4.26**). Das generierte NKAB-EGFR Molekül ist somit, wie bereits für NKAB-ErbB2 gezeigt, in der Lage, auch eine gerichtete Tumorzell-Lyse durch NKG2D-positive primäre NK-Zellen zu induzieren (C. Zhang et al., 2021). Eine durch T-Zellen vermittelte Lyse wurde in diesem Versuch nicht beobachtet. Dies lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass T-Zellen im Vorfeld keiner initialen Aktivierung über CD3 und CD28 unterzogen, sondern zur Stimulation lediglich mit IL-2 und IL-15 kultiviert wurden.

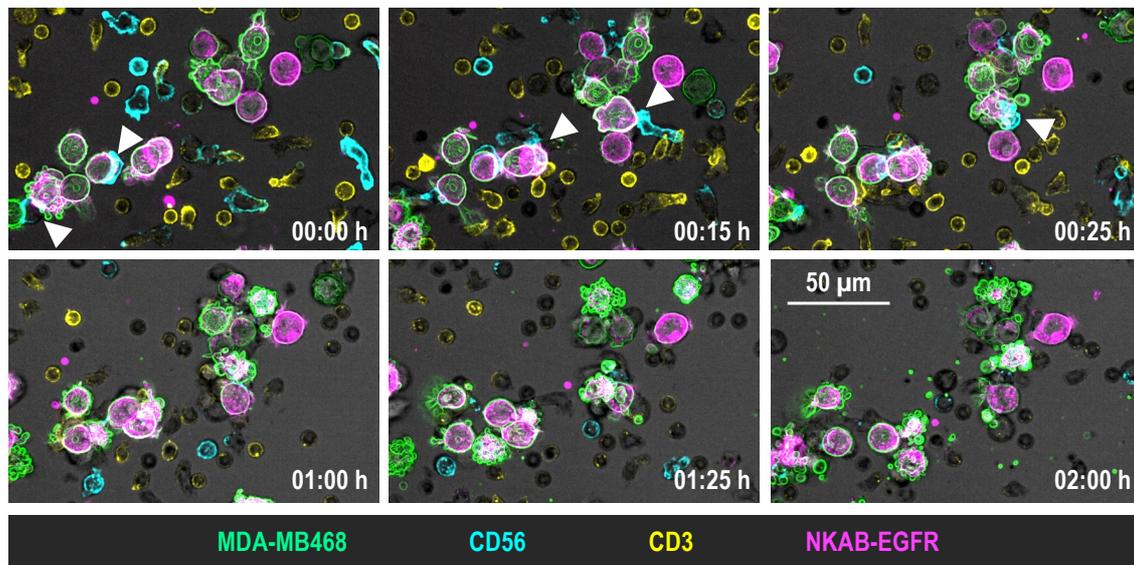
MDA-MB468 (EGFR⁺) + primäre Lymphozyten in Kombination mit NKAB-EGFR

Abbildung 4.26. Analyse der zytotoxischen Aktivität von primären NK-Zellen in Kombination mit NKAB-EGFR gegenüber EGFR-exprimierenden Brustkrebszellen (MDA-MB68) mittels Zeitraffer-Mikroskopie. PBMCs von gesunden Spendern wurden isoliert und mit anti-CD56 (NK-Zellen, türkis) und anti-CD3 (T-Zellen, gelb) Antikörpern gefärbt. Die Immunzellen wurden in einem E:T Verhältnis von 5:1 mit CFSE-gefärbten Brustkrebszellen (MDA-MB468, grün) gemischt. Fluorochromgekoppeltes NKAB-EGFR (pink) wurde in einer Konzentration von 50 ng/ml (0,32 nM) zugegeben. Die Kokultur wurde im Anschluss für 4 h am konfokalen Mikroskop CQ-1 bei einer 40-fachen Vergrößerung analysiert. Die Pfeile zeigen den Kontakt zwischen primären NK-Zellen und NKAB-benetzten Tumorzellen.

Die durch primäre NK-Zellen vermittelte Lyse von MDA-MB468 Zellen in Gegenwart von NKAB-EGFR wurde daneben auch in einem FACS-basierten Zytotoxizitätsassay untersucht und quantifiziert. Primäre NK-Zellen wurden isoliert und nach 4-tägiger Stimulation mit IL-2 und IL-15 in einem E:T Verhältnis von 20:1 mit EGFR-positiven MDA-MB468 Tumorzellen als Zielzellen eingesetzt. Durch die Zugabe von 25 oder 50 ng/ml (0,16 und 0,32 nM) NKAB-EGFR konnte dabei die spezifische Lyse von MDA-MB468 Zellen signifikant gesteigert werden (kein NKAB: $28,3 \pm 1,3\%$; 25 ng/ml: $38,9 \pm 4,7\%$; 50 ng/ml: $38,9 \pm 3,5\%$). Mit steigenden NKAB-Konzentrationen (100 ng/ml / 0,64 nM) fiel die spezifische Lyse dagegen wieder leicht ab ($37,3 \pm 7,0\%$). Verglichen mit der Zytotoxizität von primären NK-Zellen in Abwesenheit von NKAB-EGFR wurde durch die Zugabe von 100 ng/ml NKAB-EGFR daher keine signifikante Steigerung der Tumorzell-Lyse mehr erreicht (**Abbildung 4.27; A**). Die natürliche Zytotoxizität der primären NK-Zellen gegenüber K562 Zellen war innerhalb der Gruppe von Donoren vergleichbar ($68,5 \pm 7,4\%$) (**Abbildung 4.27; B**).

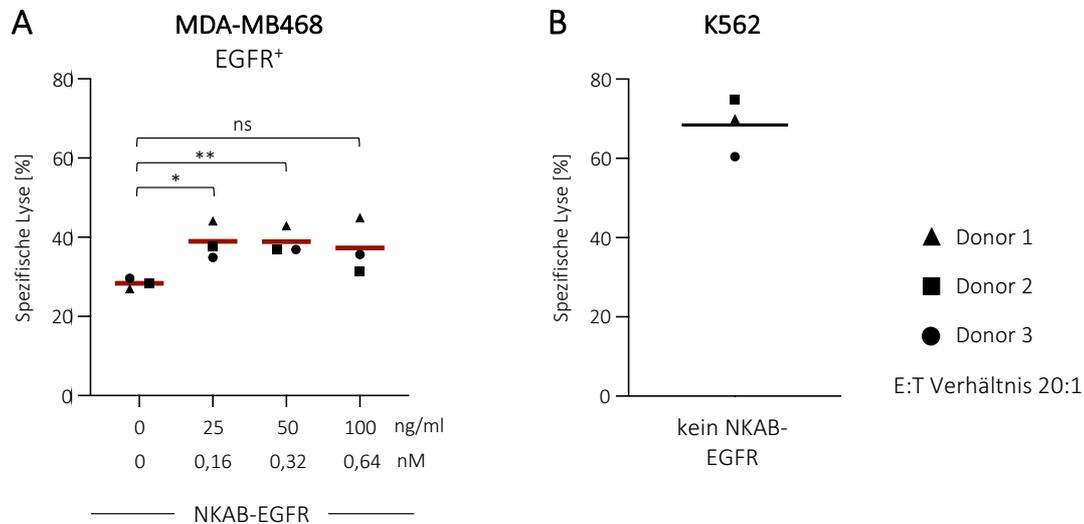


Abbildung 4.27. Zytotoxische Aktivität von primären NK-Zellen gegenüber EGFR-exprimierenden Mammakarzinomzellen (MDA-MB468) in Gegenwart von NKAB-EGFR. (A) Primäre NK-Zellen wurden isoliert und für 4 Tage mit IL-2 und IL-15 stimuliert, bevor sie mit MDA-MB468 Zellen in einem E:T Verhältnis von 20:1 eingesetzt wurden. Der Ansatz aus Effektor- und Zielzellen wurde für 3 Stunden mit unterschiedlichen NKAB-Konzentrationen inkubiert und die spezifische Lyse im Anschluss am Durchflusszytometer bestimmt. **(B)** Die natürliche Zytotoxizität primärer NK-Zellen unterschiedlicher Donoren wurde in einem Zytotoxizitätsassay gegen MHC-I negative K562 Zellen (E:T 20:1) bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

4.5.3 Zusammenfassung der Abschnitte 4.5.1 und 4.5.2

In den in den Abschnitten 4.5.1 und 4.5.2 dargestellten Experimenten wurde durch den Austausch des ErbB2-spezifischen scFv-Antikörperfragments ein bispezifisches NKAB-Molekül generiert (NKAB-EGFR), welches neben NKG2D das Tumor-assoziierte Antigen EGFR erkennt. Neben der spezifischen Bindung von NKAB-EGFR an seine Zielstrukturen wurde auch eine durch das bispezifische Molekül gesteigerte Zytotoxizität von NKAR-NK-92 Zellen gegenüber der EGFR-exprimierenden Glioblastom-Zelllinie T98G nachgewiesen. Zudem konnte in mikroskopischen Untersuchungen und FACS-basierten Zytotoxizitätsassays gezeigt werden, dass NKAB-EGFR auch in Kombination mit primären, humanen NK-Zellen funktional ist und die Lyse von EGFR⁺ MDA-MB468 Brustkrebszellen vermittelt. In einem Degranulationsassay wurde außerdem nachgewiesen, dass NKAB-EGFR Moleküle nur dann NK-Zellen aktivieren, wenn sie an EGFR-exprimierende Tumorzellen gebunden sind. Dies schließt eine unerwünschte ungerichtete Aktivierung von NK-Zellen durch hohe Konzentrationen löslicher NKAB-EGFR Moleküle aus.

4.6 Kombinationstherapie mit NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR

Wie bereits zuvor beschrieben, gehören ErbB2 und EGFR zur Familie der ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinasen und können nach EGFR-Aktivierung Heterodimere ausbilden. Während sie unter normalen Bedingungen kritische Regulatoren für zelluläre Prozesse sind, trägt ihre Deregulierung zur Entwicklung von Tumorerkrankungen bei (Hsu & Hung, 2016). Zudem wurde gezeigt, dass ErbB2 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Resistenzen gegenüber EGFR-spezifischen Antikörpern spielt, und eine erhöhte EGFR-Expression die Resistenzbildung gegenüber ErbB2-spezifischen Therapien wie dem humanisierten, monoklonalen Antikörper Trastuzumab begünstigt (Dua et al., 2010). Die Zulassung des Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK)-Inhibitors Lapatinib, welcher sowohl EGFR als auch ErbB2 inhibiert, zeigt die klinische Relevanz eines Kombinations-Ansatzes. Dies legt nahe, dass auch eine Kombinationstherapie aus NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR einen Vorteil gegenüber einer Monotherapie haben könnte. Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurden zunächst murine Glioblastomzellen (GL261) generiert, welche nach lentiviralem Gentransfer die Oberflächenproteine EGFR oder EGFRvIII stabil exprimieren (GL261/EGFR und GL261/EGFRvIII). Zusätzlich wurden die von Dr. Jasmin Röder in gleicher Weise hergestellten GL261/ErbB2 Zellen eingesetzt. Durch die Verwendung von murinen Zellen kann dabei in den nachfolgenden Untersuchungen eine NKAR-vermittelte Aktivierung über NKG2D-L ausgeschlossen werden, da sowohl humanes NKG2D als auch der synthetische Rezeptor NKAR lediglich humane NKG2D-L, nicht aber murine Liganden, erkennen. Nach Transduktion von GL261 Zellen und Anreicherung der ErbB2- bzw. EGFR-positiven Zellen durch Zellsortierung wurde die Bindung von NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR an die jeweiligen Zielzellen durchflusszytometrisch bestimmt. In diesen und den nachfolgenden Untersuchungen wurde dabei ausschließlich die NKAB-ErbB2 Variante NKAB-ErbB2_rev eingesetzt (hier zur Vereinfachung mit NKAB-ErbB2 bezeichnet), die ein ähnliches Proteindesign wie NKAB-EGFR aufweist. Wie in **Abbildung 4.28** gezeigt, bindet NKAB-ErbB2 an GL261/ErbB2 Zellen (**A**) und NKAB-EGFR sowohl an GL261/EGFR (**B**) als auch GL261/EGFRvIII (**C**) Zellen. Dies bestätigt, dass das scFv(225)-Fragment, das die Antigenbindungsdomäne von Cetuximab enthält, sowohl EGFR als auch EGFRvIII erkennt (Jutten et al., 2009).

Ergebnisse

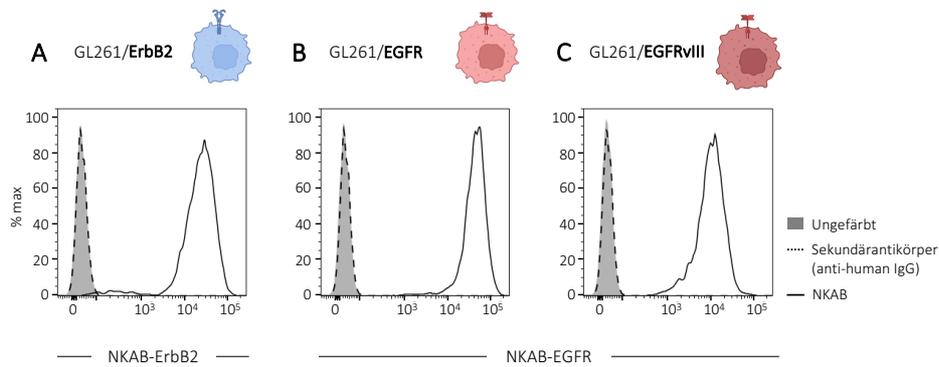


Abbildung 4.28. Durchflusszytometrische Analyse der Bindung von NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR an transduzierte murine Glioblastomzellen (GL261). Die Bindung von (A) NKAB-ErbB2 und (B, C) NKAB-EGFR (25 ng/ml; 0,16 nM) an Antigen-exprimierende Tumor-Zelllinien wurde am Durchflusszytometer nachgewiesen. Als Kontrollen dienten ungefärbte und mit Sekundärantikörper gefärbte Zellen. Weitere Erklärungen sind dem Text zu entnehmen.

Nachfolgend wurden Zytotoxizitätsassays mit GL261/EGFR Zellen in Gegenwart von steigenden NKAB-Konzentrationen in Kombination mit parentalen NK-92, NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen (E:T Verhältnis 5:1) durchgeführt. Dabei wurde die Zytotoxizität parentaler NK-92 Zellen durch die Zugabe von NKAB-EGFR (25 ng/ml; 0,16 nM) auf lediglich $18,3 \pm 2,1\%$ gesteigert (**Abbildung 4.29; A**). Im Gegensatz dazu stieg die spezifische Lyse von GL261/EGFR Zellen durch die Kombination aus NKAB-EGFR und NKAR-NK-92 oder NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen auf bis zu $39,3 \pm 2,5\%$ bzw. $42,0 \pm 6,2\%$ (12,5 ng/ml; 0,08 nM NKAB-EGFR) an (**Abbildung 4.29; B und C**). Wie zuvor mit anderen NKAB-Molekülen beobachtet, wurde auch hier eine Reduktion der Zytotoxizität bei NKAB-Konzentrationen über 12,5 ng/ml (0,08 nM) festgestellt.

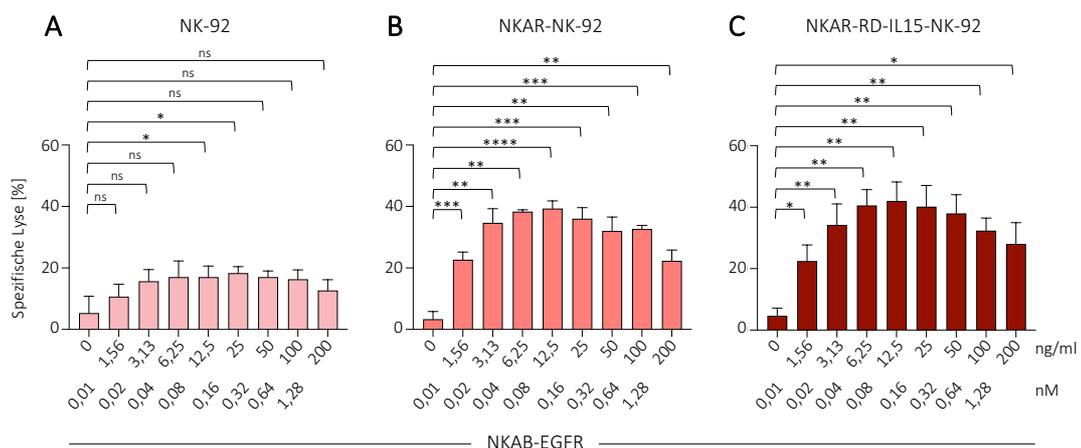


Abbildung 4.29. Zytotoxische Aktivität von parentalen NK-92 und NKG2D-CAR-exprimierenden NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen in Kombination mit NKAB-EGFR gegenüber murinen GL261/EGFR Zellen. GL261/EGFR Zellen (Zielzellen) wurden mit (A) parentalen NK-92, (B) NKAR-NK-92 und (C) NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen (Effektorzellen) in einem E:T Verhältnis von 5:1 und steigenden NKAB-EGFR Konzentrationen inkubiert. Nach 3 Stunden wurde die spezifische Lyse der Tumorzellen durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

Ergebnisse

Unter gleichen Bedingungen wurden auch entsprechende Versuche mit GL261/EGFRvIII Zellen durchgeführt. Parentale NK-92 Zellen zeigten dabei gegenüber GL261/EGFRvIII Zellen eine der gegen GL261/EGFR vergleichbare Zytotoxizität. Das Maximum der spezifischen Lyse ($15,7 \pm 1,5\%$) wurde dabei bei einer Konzentration von 12,5 ng/ml (0,08 nM) NKAB-EGFR erreicht (**Abbildung 4.30; A**). Im Gegensatz zu den mit GL261/EGFR erhaltenen Daten wiesen sowohl NKAR-NK-92 als auch NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen eine etwas geringere Lyse von GL261/EGFRvIII Zellen auf. Während dabei die maximale Lyse von GL261/EGFR Zellen bereits bei einer NKAB-Konzentration von 12,5 ng/ml (0,08 nM) erreicht wurde, lag das Wirkoptimum von NKAB-EGFR in Kombination mit NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen gegenüber GL261/EGFRvIII Zellen bei 25 ng/ml (0,16 nM) ($30,3 \pm 4,0\%$ und $39,0 \pm 2,1\%$). Auch in diesen Experimenten wurde jedoch eine Reduktion der Lyse bei noch höheren NKAB-Konzentrationen festgestellt (**Abbildung 4.30; B und C**).

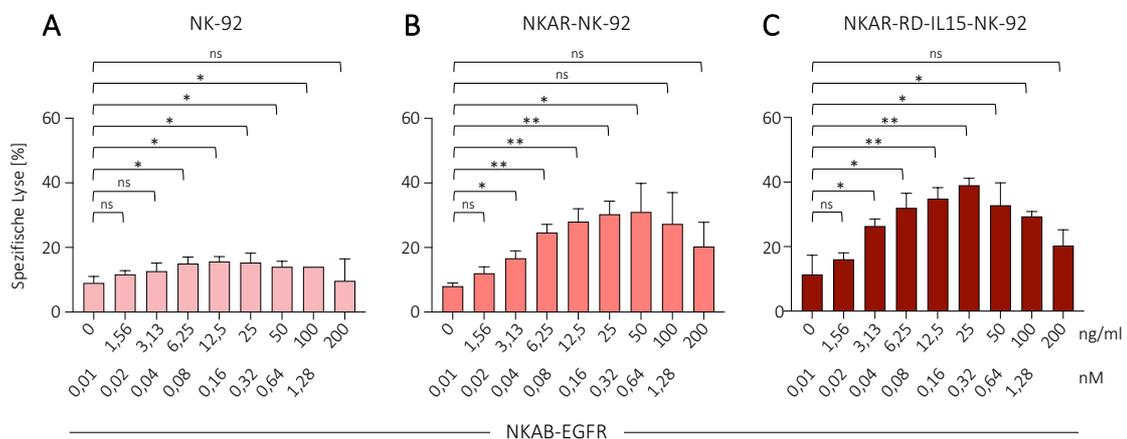


Abbildung 4.30. Zytotoxische Aktivität von parentalen NK-92 und NKG2D-CAR-exprimierenden NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen in Kombination mit NKAB-EGFR gegenüber murinen GL261/EGFRvIII Zellen. GL261/EGFRvIII Zellen (Zielzellen) wurden mit (A) parentalen NK-92, (B) NKAR-NK-92 und (C) NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen (Effektorzellen) in einem E:T Verhältnis von 5:1 und steigenden NKAB-EGFR Konzentrationen inkubiert. Nach 3 Stunden wurde die spezifische Lyse durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Klinisch relevant sind neben ErbB2- oder EGFR-exprimierenden Tumoren auch solche, die beide Antigene tragen. Um auch doppelt-positive Zellen *in vitro* untersuchen zu können, wurden ErbB2-exprimierende GL261 Zellen (GL261/ErbB2) mittels lentiviralem Gentransfer zusätzlich mit EGFR- oder EGFRvIII-kodierenden Konstrukten transduziert und doppelt-positive Zellen mittels Zellsortierung gewonnen. Die Bindung von NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR an die so generierten GL261/ErbB2/EGFR (**Abbildung 4.31; A**) und GL261/ErbB2/EGFRvIII (**Abbildung 4.31; B**) Zellen wurde durchflusszytometrisch bestätigt.

Ergebnisse

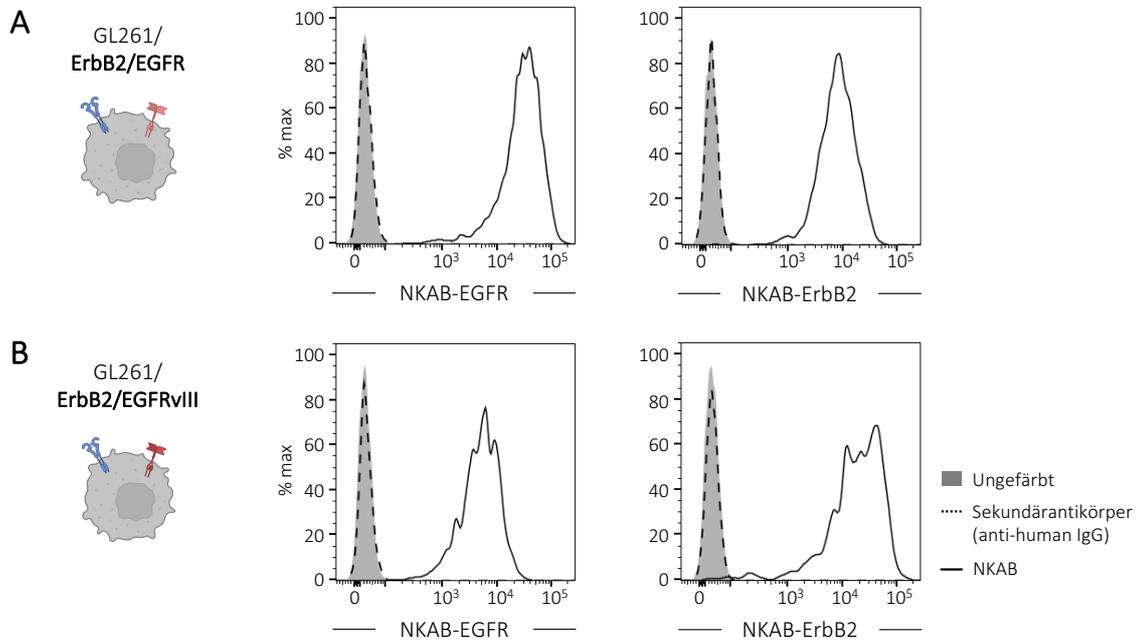


Abbildung 4.31. Durchflusszytometrische Analyse der Bindung von NKAB-EGFR und NKAB-ErbB2 an transduzierte murine Glioblastomzellen (GL261). Die Bindung von NKAB-EGFR und NKAB-ErbB2 (25 ng/ml; 0,16 nM) an (A) GL261/ErbB2/EGFR und (B) GL261/ErbB2/EGFRvIII Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrollen dienten ungefärbte oder lediglich mit Sekundärantikörper gefärbte Zellen. Weitere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen.

Im nächsten Schritt wurden Zytotoxizitätsassays mit GL261/ErbB2, GL261/EGFR und GL261/ErbB2/EGFR Zellen in Anwesenheit von NKAB-ErbB2, NKAB-EGFR (25 ng/ml; 0,16 nM) oder beiden NKAB-Molekülen (jeweils 12,5 ng/ml; 0,08 nM) durchgeführt. Als Effektorzellen wurden parentale NK-92 oder NKAR-NK-92 Derivate eingesetzt. Dabei war vor allem von Relevanz, inwiefern eine Kombination aus zwei NKAB-Molekülen die spezifische Lyse von doppelt-positiven GL261/ErbB2/EGFR Zellen steigern kann. Außerdem war zu prüfen, ob die beiden NKAB-Moleküle in Kombination gegebenenfalls einen negativen Effekt auf die vermittelte Zytotoxizität von Effektorzellen haben. Im Fall von parentalen NK-92 Zellen wurde die Zytotoxizität gegenüber den GL261-Varianten durch Zugabe der NKAB-Moleküle nicht signifikant gesteigert. In Anwesenheit von NKAB-ErbB2 oder NKAB-EGFR wurde jedoch eine erhöhte Lyse der jeweiligen Zielantigen-exprimierenden Zellen durch NKAR-NK-92 und NKAR-RDIL15-NK-92 beobachtet. Die NKAB-vermittelte Lyse war dabei Antigen-spezifisch, so dass die Zugabe von NKAB-ErbB2 keine gesteigerte Lyse von GL261/EGFR Zellen bewirkte (**Abbildung 4.32; A**). Ebenso zeigte sich kein Effekt von NKAB-EGFR auf die Lyse der GL261/ErbB2 Zellen (**Abbildung 4.32; B**). Doppelt-positive GL261/ErbB2/EGFR Zellen wurden nach Zugabe von NKAB-ErbB2 oder NKAB-EGFR vergleichbar lysiert (**Abbildung 4.32; C**). Durch eine Kombination von NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR wurde die Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber den GL261-Varianten jedoch nicht weiter gesteigert.

Ergebnisse

Interessanterweise war im Fall der Behandlung von einfach positiven GL261/EGFR oder GL261/ErbB2 Zellen mit der Kombination von NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR trotz der reduzierten Konzentration von 12,5 ng/ml (0,08 nM) des jeweiligen Antigen-spezifischen NKAB-Moleküls im Vergleich zur Monotherapie keine Reduktion der spezifischen Lyse zu erkennen. Dies stimmt allerdings mit den zuvor erhobenen Daten überein, die zeigten, dass eine Konzentration von 12,5 ng/ml (0,08 nM) von NKAB-EGFR bereits die maximale spezifischen Lyse von GL261/EGFR Zellen bewirkte (siehe **Abbildung 4.29**). Die spezifische Lyse von doppelt-positiven GL261/ErbB2/EGFR Zellen wurde durch die Kombination aus beiden NKAB-Molekülen ebenfalls nicht weiter beeinflusst. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass in Summe die Konzentration beider NKAB-Moleküle (jeweils 12,5 ng/ml; 0,08 nM) der Konzentration der Ansätze mit nur einem NKAB-Antikörper (25 ng/ml; 0,16 nM) entspricht und diese im optimalen Sättigungsbereich liegt. Ein additiver Effekt der Kombinationstherapie wäre dagegen bei NKAB-Konzentrationen deutlich unterhalb von 12,5 ng/ml (0,08 nM) denkbar. Insgesamt zeigen diese Daten jedoch, dass auch eine gleichzeitige Verabreichung von NKAB-Molekülen unterschiedlicher Spezifität eine NK-Zell Stimulation ermöglicht und dabei keine gegenseitige Hemmung auftritt.

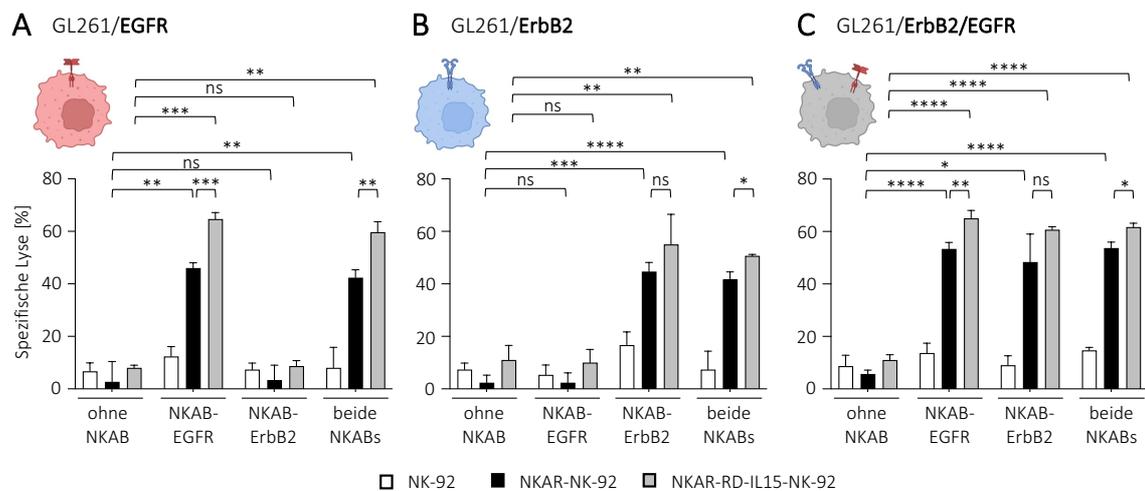


Abbildung 4.32. Zytotoxische Aktivität von parentalen NK-92 und NKG2D-CAR-exprimierenden NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen in Kombination mit NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR gegenüber murinen GL261-Varianten. Die Zielzellen (A) GL261/EGFR, (B) GL261/ErbB2 und (C) GL261/ErbB2/EGFR wurden mit parentalen NK-92, NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen (Effektorzellen) in einem E:T Verhältnis von 5:1 gemischt. Zusätzlich wurden NKAB-EGFR oder NKAB-ErbB2 (jeweils 25 ng/ml; 0,16 nM), oder beide NKAB-Moleküle (jeweils 12,5 ng/ml; 0,08 nM) zugegeben. Nach 3-stündiger Inkubation wurde die spezifische Lyse der Tumorzellen durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

Ergebnisse

Ein bekannter Resistenzmechanismus von Tumorzellen gegenüber CAR-T-Zell-Therapien ist die Herunterregulierung des CAR-Zielantigens auf der Tumoroberfläche (Sternier & Sternier, 2021). Daher gilt eine Therapie, die auf multiple Antigene abzielt, als vielversprechend. Um die hier etablierte Kombinationstherapie mit NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR unter möglichst kliniknahen Bedingungen zu untersuchen, wurden deshalb im Gegensatz zu den zuvor eingesetzten doppelt-positiven GL261/ErbB2/EGFR Zellen heterogene Tumorphpopulationen nachgebildet. Dazu wurden GL261/ErbB2 und GL261/EGFR Zellen mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Markern (Calcein Violet und FarRed) gefärbt und in einem Verhältnis von 1:1 gemischt (**Abbildung 4.33; A**). Anschließend wurde die spezifische Lyse der heterogenen Zielzell-Population durch NK-Zellen in Anwesenheit von NKAB-EGFR, NKAB-ErbB2 (jeweils 25 ng/ml; 0,16 nM) oder beiden Molekülen (je 12,5 ng/ml; 0,08 nM) analysiert. Neben der spezifischen Lyse der gesamten Tumorphpopulation (**Abbildung 4.33; B**) ermöglichte die unterschiedliche Markierung der Zielzellen dabei auch eine unabhängige Analyse der GL261/EGFR (**Abbildung 4.33; C**) und GL261/ErbB2 Zellen (**Abbildung 4.33; D**) innerhalb der Tumor-Kokultur. Wie bereits zuvor zeigten parentale NK-92 Zellen keine Steigerung der Effektor-Funktionen in Gegenwart der NKAB-Moleküle und eine generell nur geringe Zytotoxizität gegenüber GL261 Zellen. Signifikante Unterschiede zwischen den Ansätzen mit nur einem oder beiden NKAB-Molekülen wurden hingegen beim Einsatz von NKAR-NK-92 Zellen beobachtet. Für NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen wurde bei der Betrachtung der gesamten Tumorzell-Population eine Steigerung der spezifischen Lyse in Anwesenheit von NKAB-EGFR auf $40 \pm 2\%$, mit NKAB-ErbB2 auf $37 \pm 4,4\%$, durch die Behandlung mit beiden NKAB-Molekülen jedoch auf $62,5 \pm 2,1\%$ ersichtlich (**Abbildung 4.33; B**). Dies weist nach, dass im Fall von Tumorzellen mit heterogener Antigenexpression die Kombination zweier NKAB-Moleküle vorteilhaft ist. Wurde innerhalb der Kokulturen zwischen den einzelnen Tumorzellen unterschieden, zeigte sich, dass beide NKAB-Moleküle eine spezifische Antigen-gerichtete Lyse verursachten, während jeweils Antigen-negative Zellen unberührt blieben (**Abbildung 4.33; C und D**). Dabei wurde durch die Reduktion der NKAB-Konzentration von 25 ng/ml (0,16 nM) in Ansätzen mit nur einem NKAB-Molekül auf 12,5 ng/ml (0,08 nM) bei der Verwendung beider Moleküle erneut keine verminderte spezifischen Lyse der jeweiligen Zielzellen festgestellt. Dies stimmt mit der Beobachtung in vorherigen Versuchen (siehe **Abbildung 4.29**) überein, die zeigten, dass bei einer Konzentration von 12,5 ng/ml (0,08 nM) bereits die maximale Zytotoxizität erreicht wird, sodass durch eine weitere Erhöhung der Konzentration keine zusätzlichen Effekte zu erwarten sind (**Abbildung 4.33; C und D**).

Ergebnisse

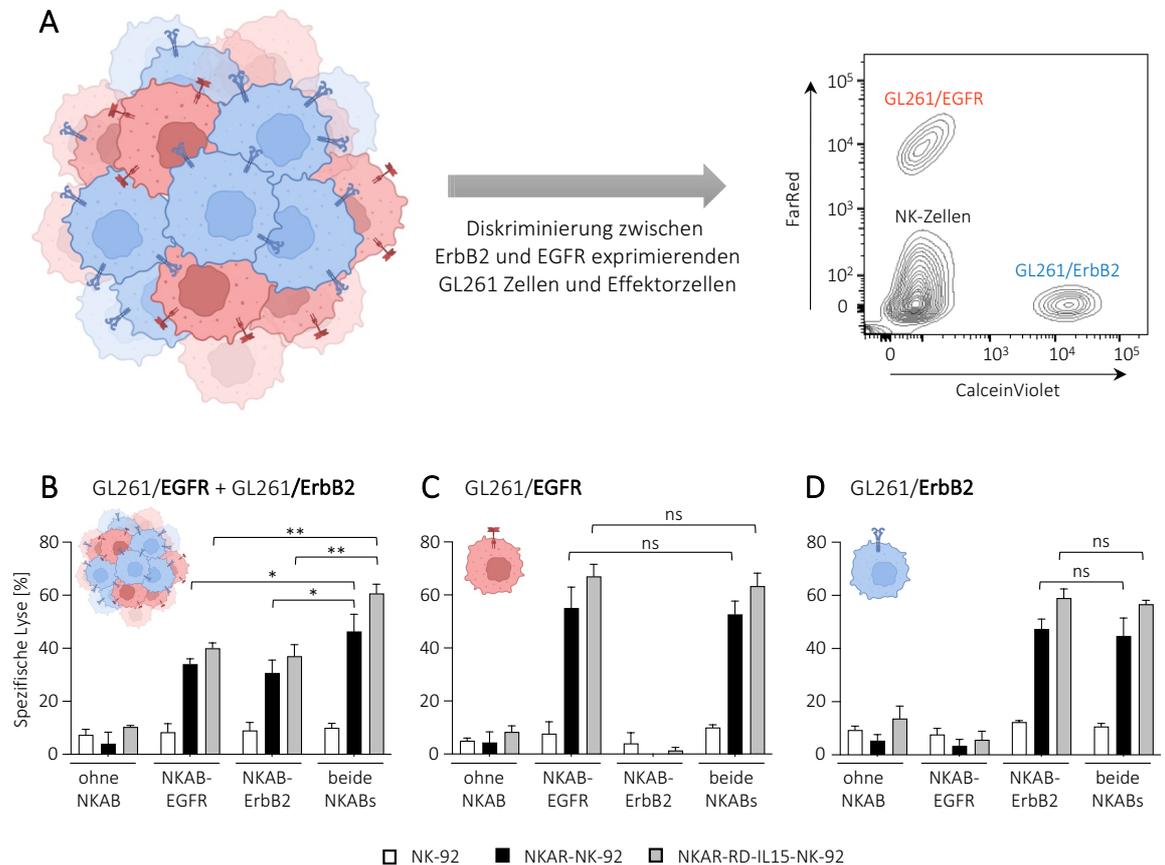


Abbildung 4.33. Duales Targeting von Tumor-Kokulturen mit einer Kombination aus NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR. (A) Durchflusszytometrische Unterscheidung der Tumorzell-Populationen im Zytotoxizitätsassay. GL261/ErbB2 und GL261/EGFR Zellen wurden zur späteren Diskriminierung der beiden Tumorzell-Populationen mit FarRed (GL261/EGFR) und Calcein Violet (GL261/ErbB2) gefärbt. Anschließend wurden die Tumorzellen in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. (B-D) Zytotoxische Aktivität von parentalen NK-92 und NKG2D-CAR-exprimierenden NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen in Kombination mit NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR gegenüber Tumor-Kokulturen (GL261/ErbB2 + GL261/EGFR). Die angesetzten Tumor-Kokulturen wurden mit Effektorzellen (E:T 5:1) und entweder NKAB-EGFR oder NKAB-ErbB2 (jeweils 25 ng/ml; 0,16 nM) oder einer Kombination beider NKAB-Moleküle (jeweils 12,5 ng/ml; 0,08 nM) für 3 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die spezifische Lyse der Tumorzellen am Durchflusszytometer bestimmt. Während in (B) die Lyse der gesamten Tumor-Kokultur gezeigt ist, bilden (C) und (D) die spezifische Lyse von GL261/EGFR oder GL261/ErbB2 innerhalb der Kokultur unabhängig voneinander ab. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Um die Effektivität einer Therapie mit NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR in Kombination mit NKG2D/NKAR-exprimierenden Effektorzellen auch im Rahmen EGFRvIII-exprimierender Tumoren zu untersuchen, wurden murine Glioblastomzellen eingesetzt, welche nach lentiviralem Gentransfer EGFRvIII (GL261/EGFRvIII) oder EGFRvIII und ErbB2 (GL261/ErbB2/EGFRvIII) exprimieren. Wie bereits in vorherigen Versuchen gezeigt, bindet NKAB-EGFR nicht nur EGFR, sondern auch EGFRvIII (siehe **Abbildung 4.28; C** und **Abbildung 4.31; B**) und induziert eine entsprechende NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität (siehe **Abbildung 4.30**).

Ergebnisse

In Zytotoxizitätsassays mit GL261/ErbB2, GL261/EGFRvIII und GL261/ErbB2/EGFRvIII Zellen wurden wie in den vorherigen Experimenten parentale NK-92 und NKAR-NK-92 Derivate in einem E:T Verhältnis von 5:1 in Anwesenheit von NKAB-ErbB2, NKAB-EGFR (jeweils 25 ng/ml; 0,16 nM) oder beiden NKAB-Molekülen (jeweils 12,5 ng/ml; 0,08 nM) eingesetzt. Die Zytotoxizität von parentalen NK-92 Zellen gegenüber den drei untersuchten GL261-Varianten blieb nach Zugabe von NKAB-EGFR, NKAB-ErbB2 oder einer Kombination beider NKAB-Moleküle unverändert. Jedoch wurde in Anwesenheit von NKAB-EGFR oder beiden NKAB-Molekülen die Lyse von GL261/EGFRvIII Zellen durch NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen signifikant gesteigert, während die Zugabe von NKAB-ErbB2 allein keine Auswirkung auf die Zytotoxizität gegenüber EGFRvIII-exprimierenden GL261 Zellen hatte. Beruhend auf der Tatsache, dass bei Kombinationen von beiden NKAB-Molekülen lediglich die halbe Konzentration des gegenüber GL261/EGFRvIII wirksamen NKAB-EGFR Antikörpers eingesetzt wurde, war die spezifische Lyse beim gleichzeitigen Einsatz beider NKAB-Moleküle etwas, wenn auch nicht signifikant, geringer (**Abbildung 4.34; A**). Im Fall von ErbB2-positiven GL261 Zellen wurde durch die Zugabe von NKAB-ErbB2 oder beiden NKAB-Molekülen eine vergleichbare Steigerung der Zytotoxizität erzielt. Jedoch wurde bei alleiniger Gabe von NKAB-ErbB2 ein signifikanter Unterschied zwischen der durch NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 vermittelten Zytotoxizität beobachtet (NKAR-NK-92: $37,8 \pm 3,1\%$; NKAR-RD-IL15-NK-92: $48,3 \pm 4,2\%$). Die Zugabe von NKAB-EGFR hatte dagegen wie erwartet keinen Einfluss auf die spezifische Lyse von GL261/ErbB2 Zellen (**Abbildung 4.34; B**). Doppelt-positive GL261/ErbB2/EGFRvIII Zellen wurden im gleichen Maße durch die Zugabe von NKAB-EGFR, NKAB-ErbB2 oder beiden NKAB-Molekülen in Kombination mit NKAR-NK-92 Derivaten abgetötet. Erneut war ein signifikanter Unterschied zwischen der durch NKAR-RD-IL15-NK-92- oder NKAR-NK-92-vermittelten Lyse von GL261/ErbB2/EGFRvIII Zellen in Anwesenheit von NKAB-ErbB2 zu beobachten (**Abbildung 4.34; C**). Um auszuschließen, dass dieser Unterschied in der spezifischen Lyse auf eine variierende natürliche Zytotoxizität der Effektorzellen zurückzuführen ist, wurde in jedem Zytotoxizitätsassay die NK-sensitive Leukämie-Zelllinie K562 mitgeführt. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede in der Zytotoxizität von parentalen NK-92, NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die Beobachtung, dass die hier untersuchten NKAB-Moleküle nur dann die Lyse von Tumorzellen vermittelten, wenn diese das entsprechende Zielantigen auf der Oberfläche exprimieren, weist erneut die hohe Spezifität des Kombinationsansatzes aus NKAB-Molekülen und Effektorzellen nach.

Ergebnisse

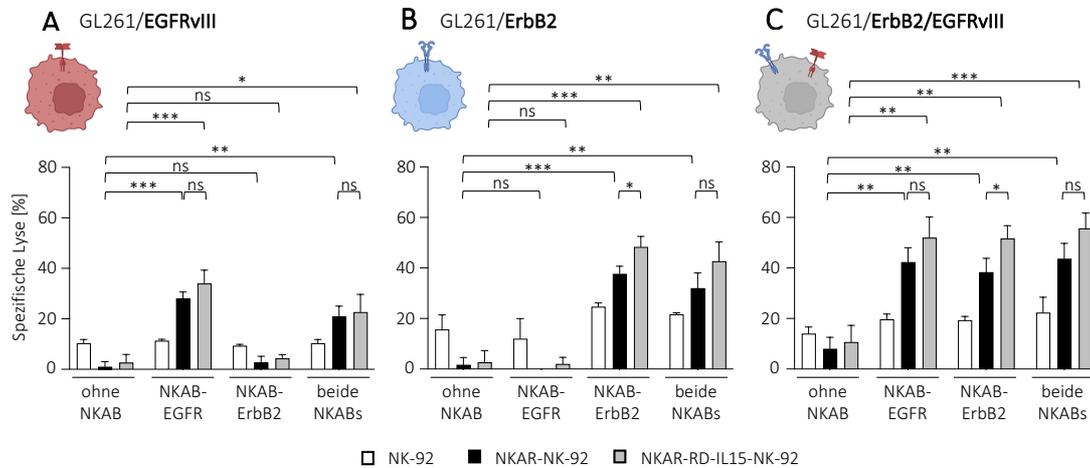


Abbildung 4.34. Zytotoxische Aktivität von parentalen NK-92 und NKG2D-CAR-exprimierenden NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen in Kombination mit NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR gegenüber murinen GL261-Varianten. Die Zielzellen **(A)** GL261/EGFRvIII, **(B)** GL261/ErbB2 und **(C)** GL261/ErbB2/EGFRvIII wurden mit parentalen NK-92, NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen (Effektorzellen) in einem E:T Verhältnis von 5:1 gemischt. Zusätzlich wurden NKAB-EGFR, NKAB-ErbB2 (jeweils 25 ng/ml; 0,16 nM) oder beide NKAB-Moleküle (jeweils 12,5 ng/ml; 0,08 nM) zugegeben. Nach 3-stündiger Inkubation wurde die spezifische Lyse durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Wie zuvor mit GL261/EGFR und GL261/ErbB2 Zellen durchgeführt, wurden auch heterogene Tumorphysen mit GL261/EGFRvIII und GL261/ErbB2 Zellen nachgebildet. Dabei wurden die GL261 Varianten wie zuvor mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen (Calcein Violet und FarRed) markiert und in einem Verhältnis von 1:1 gemischt (**Abbildung 4.35; A**). Der nachfolgende Zytotoxizitätsassay wurde ebenfalls wie oben beschrieben durchgeführt. Auch gegen Tumor-Kokulturen bestehend aus GL261/ErbB2 und GL261/EGFRvIII Zellen wurde die Zytotoxizität von parentalen NK-92 Zellen durch die Anwesenheit eines NKAB-Antikörpers oder beider NKAB-Moleküle nicht beeinflusst (**Abbildung 4.35; B-D**). Sowohl die Monotherapie mit NKAB-EGFR als auch NKAB-ErbB2 resultierte jedoch in einer signifikanten Steigerung der durch NKAR-NK-92 Derivate vermittelten Zytotoxizität. Dabei führte die alleinige Zugabe von NKAB-ErbB2 im Vergleich zu NKAB-EGFR zu einer höheren spezifischen Lyse. Im Vergleich zum prozentualen Anteil eliminiertes Tumorzellen in Anwesenheit von NKAB-EGFR allein wurde zudem ein additiver Effekt durch die Kombination beider NKAB-Moleküle mit NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen erzielt. Dagegen war die spezifische Lyse induziert durch NKAB-ErbB2 oder eine Kombination beider NKAB-Moleküle für beide NKAR-NK-92 Derivate nahezu gleich (**Abbildung 4.35; B**). Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass EGFRvIII-exprimierende GL261 Zellen weniger sensitiv gegenüber der NKAB-EGFR vermittelten Zytotoxizität von NKAR-NK-92 Derivaten sind als GL261/ErbB2 Zellen gegenüber der NKAB-ErbB2

Ergebnisse

vermittelten Lyse. Durch die unterschiedliche Markierung der Zielzellen konnte neben der Analyse der gesamten Tumorphosphorpopulation zusätzlich die spezifische Lyse von GL261/EGFRvIII und GL261/ErbB2 Zellen innerhalb der Kokultur unabhängig voneinander bestimmt werden (**Abbildung 4.35; C und D**). Durch die Zugabe von NKAB-EGFR oder NKAB-ErbB2 wurde dabei eine erhöhte Lyse der jeweiligen Zielantigen-exprimierenden Zellen durch NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen beobachtet, während jeweils Zielantigen-negative Zellen unbeeinflusst blieben. Die Reduktion der individuellen NKAB-Konzentrationen auf 12,5 ng/ml (0,08 nM) bei der Kombination beider Moleküle führte zu einer verminderten spezifischen Lyse der jeweiligen Zielzellen. Bezüglich der Lyse von GL261/EGFRvIII Zellen steht diese Beobachtung im Einklang mit den in **Abbildung 4.34; A** gezeigten Daten. Jedoch war aufgrund vorheriger Ergebnisse (siehe **Abbildung 4.33; D** und **Abbildung 4.34; B**) für GL261/ErbB2 Zellen keine verminderte Lyse bei einer Kombination beider NKAB-Moleküle zu erwarten. Eine mögliche Erklärung bietet die, im Vergleich zu dem in **Abbildung 4.33; D** gezeigten Assay, in diesen Versuchen beobachtete, allgemein geringere Zytotoxizität der NKAR-NK-92 Derivate gegenüber GL261/ErbB2 Zellen in Anwesenheit von NKAB-ErbB2. Dies äußerte sich auch bei der Kombination beider NKAB-Moleküle (**Abbildung 4.35; D**).

Ergebnisse

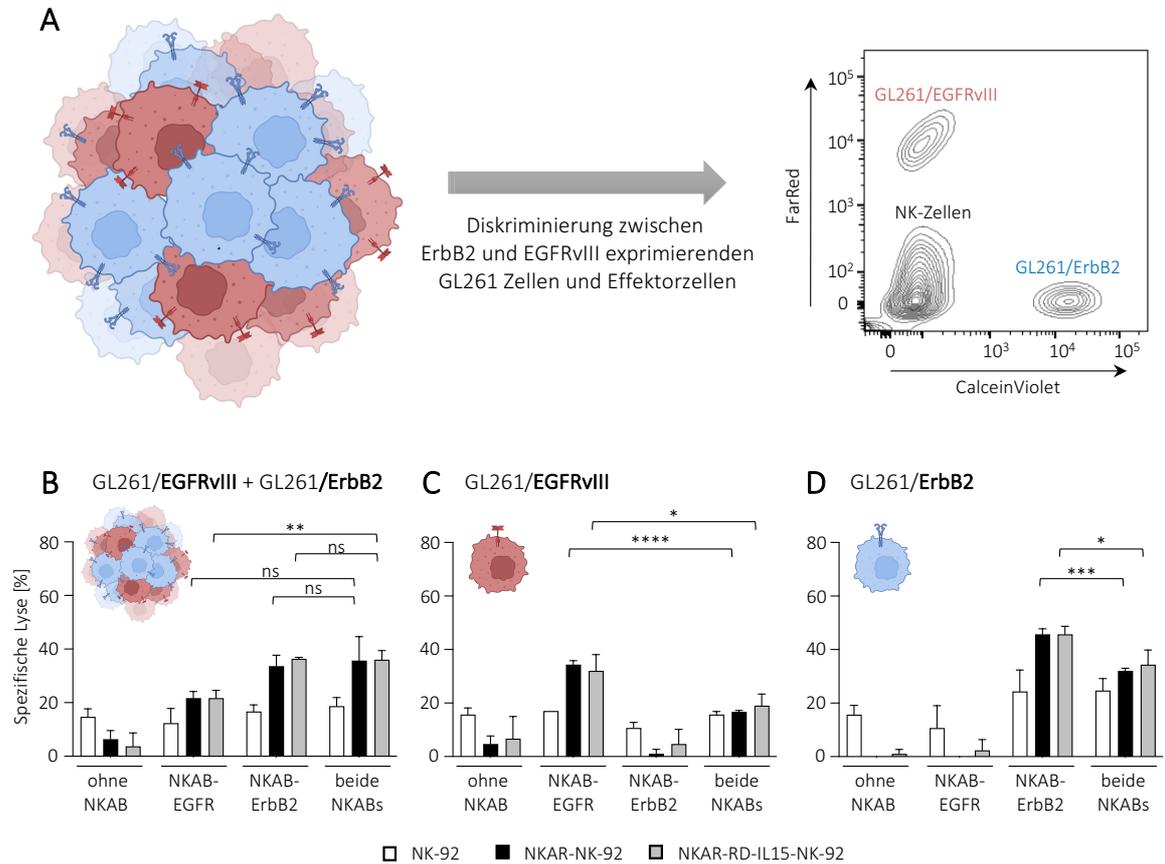


Abbildung 4.35. Duales Targeting von Tumor-Kokulturen mit einer Kombination aus NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR. (A) Durchflusszytometrische Unterscheidung der Tumorzell-Populationen im Zytotoxizitätsassay. Zur späteren Diskriminierung der beiden Tumorzell-Populationen und Effektorzellen wurden GL261/EGFRvIII Zellen mit FarRed und GL261/ErbB2 Zellen mit Calcein Violet gefärbt. Anschließend wurden die Tumorzell-Populationen in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. **(B) – (D) Zytotoxische Aktivität von parentalen NK-92 und NKG2D-CAR-exprimierenden NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen in Kombination mit NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR gegenüber Tumor-Kokulturen (GL261/ErbB2 + GL261/EGFRvIII).** Die angesetzten Tumor-Kokulturen wurden mit Effektorzellen (E:T 5:1) und entweder NKAB-EGFR, NKAB-ErbB2 (jeweils 25 ng/ml; 0,16 nM) oder beiden NKAB-Molekülen (jeweils 12,5 ng/ml; 0,08 nM) für 3 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die spezifische Lyse der Tumorzellen am Durchflusszytometer bestimmt. Während in **(B)** die Lyse der gesamten Tumor-Kokultur gezeigt ist, bilden **(C)** und **(D)** die spezifische Lyse von GL261/EGFRvIII oder GL261/ErbB2 innerhalb der Kokultur unabhängig voneinander ab. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

Zusammenfassung des Abschnitts 4.6

In den im Abschnitt 4.6 dargestellten Experimenten wurde eine Kombinationstherapie mit zwei NKAB-Molekülen unterschiedlicher Spezifität (EGFR und ErbB2) erprobt. Die spezifische Lyse von doppelt-positiven murinen GL261 Zellen (GL261/ErbB2/EGFR und GL261/ErbB2/EGFRvIII) wurde dabei durch die Kombination aus NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR nicht weiter gesteigert. Dagegen wurde in Experimenten mit gemischten Kokulturen von GL261/ErbB2 und GL261/EGFR Zellen oder GL261/ErbB2 und GL261/EGFRvIII ein additiver Effekt der Kombinationstherapie aus NKAB-ErbB2, NKAB-EGFR und NKAR-Effektorzellen beobachtet. Hierbei führte NKAB-ErbB2 zur spezifischen Abtötung von GL261/ErbB2 Zellen und NKAB-EGFR zur Eliminierung von GL261/EGFR und GL261/EGFRvIII Zellen. Dies unterstreicht erneut die hohe Selektivität dieses Ansatzes und legt nahe, dass eine Kombination von NKAB-Molekülen nützlich sein könnte, um *Immune escape* aufgrund von *Antigen loss* zu vermeiden.

4.7 Generierung und funktionelle Charakterisierung NKG2D-bindender bispezifischer Antikörper mit Selektivität für B-Zell-Malignitäten

Neben der experimentellen Therapie von soliden Tumoren mit einer Kombination aus NKAB-Molekülen und NKG2D/NKAR-exprimierenden Effektorzellen war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Entwicklung eines Behandlungsansatzes für hämatologische Neoplasien der B-Zell-Linie. Obwohl die Überlebensrate betroffener Patienten über die letzten Jahre drastisch gestiegen ist (N. Zhang et al., 2023), besteht noch immer die Notwendigkeit optimierter Behandlungsstrategien. Für die Entwicklung eines entsprechenden NKAB-basierten Therapieansatzes wurden zunächst relevante Zielstrukturen ausgewählt. Sowohl CD19 als auch CD20 gelten aufgrund ihrer spezifischen Expression auf B-Zellen und ihrer hohen Expression in vielen B-Zell-Malignitäten als geeignete Zielantigene und finden seit einiger Zeit Anwendung in der klinischen Immuntherapie. So werden z.B. mit CD19-spezifischen CAR-T-Zellen bei hämatologischen Erkrankungen bemerkenswerte Erfolge erzielt. Dies führte bisher zur Zulassung von vier CD19-CAR-T-Zellprodukten (Albinger et al., 2021; Mitra et al., 2023; Seimetz et al., 2019). Auch der durch die FDA für die Behandlung von akuter lymphatischer Leukämie mit B-Zell-Ursprung im Jahr 2014 zugelassene bispezifische Antikörper Blinatumomab bindet neben CD3 auf T-Zellen das B-Lymphozytenantigen CD19 (Mullard, 2015). Der CD20-spezifische monoklonale Antikörper Rituximab wurde bereits 1997 durch die FDA für die Behandlung von B-Zell-Lymphomen zugelassen. Auch wenn die genaue Funktion von CD20 nicht vollständig geklärt ist, stellt dieses Molekül ebenfalls ein hoch relevantes Zielantigen für die Eliminierung des

B-Zell-Kompartiments und damit einhergehend die Kontrolle von B-Zell-Lymphomen dar (Casan et al., 2018). Um den experimentellen Therapieansatz aus NKAR-NK-92 Zellen und NKAB-Molekülen im Kontext hämatologischer Malignitäten untersuchen zu können, wurden daher im Folgenden sowohl ein CD19- (NKAB-CD19) als auch ein CD20-spezifisches (NKAB-CD20) NKAB-Molekül generiert.

4.7.1 Ableitung und funktionelle Charakterisierung des bispezifischen Antikörpers NKAB-CD19

Analog zur Ableitung von NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR wurde die NKAB-CD19 Sequenz *in silico* generiert, als cDNA *de novo* synthetisiert, mittels PCR amplifiziert und in das Expressionsplasmid pcDNA3 unter der Kontrolle des CMV-Promotors eingebracht (pcDNA3-NKAB-CD19). Am N-Terminus trägt das NKAB-CD19 Molekül die bereits beschriebene Bindungsstelle für NKG2D, die über eine Gelenkregion, die Fc-Domäne des humanen IgG4 (CH2 und CH3) und einen (G₄S)₂ Peptid-Linker mit der C-terminalen CD19-spezifischen Antikörperdomäne verknüpft ist. Aufgrund der Tatsache, dass alle bisher zugelassenen CD19-CAR-T-Zellprodukte auf dem scFv-Antikörperfragment FMC63 basieren (Seigner et al., 2023), wurde dieses auch für die initiale Generierung von NKAB-CD19 eingesetzt. Jedoch war die Produktion dieses FMC63-basierten NKAB-CD19 Moleküls mit geringen Ausbeuten und dem Auftreten einer Vielzahl an Degradationprodukten verbunden (Daten nicht gezeigt). Um ein funktionelles Molekül in ausreichenden Mengen für Analysezwecke zu erhalten, wurde daher ein weiteres NKAB-CD19 Molekül mit einer alternativen CD19-spezifischen Bindungsstelle generiert. Basierend auf einer Studie, in der unterschiedliche scFv-Antikörperfragmente für die Entwicklung von CD19-CAR Konstrukten untersucht wurden, fiel die Wahl auf scFv(4G7), da dieses *in vivo* eine mit FMC63-CAR-T-Zellen vergleichbare anti-Tumor Aktivität zeigte (Kang et al., 2020). Abgesehen von dem Austausch der CD19-spezifischen Domäne (scFv(4G7)) blieb der Aufbau des Moleküls gleich (**Abbildung 4.36**).

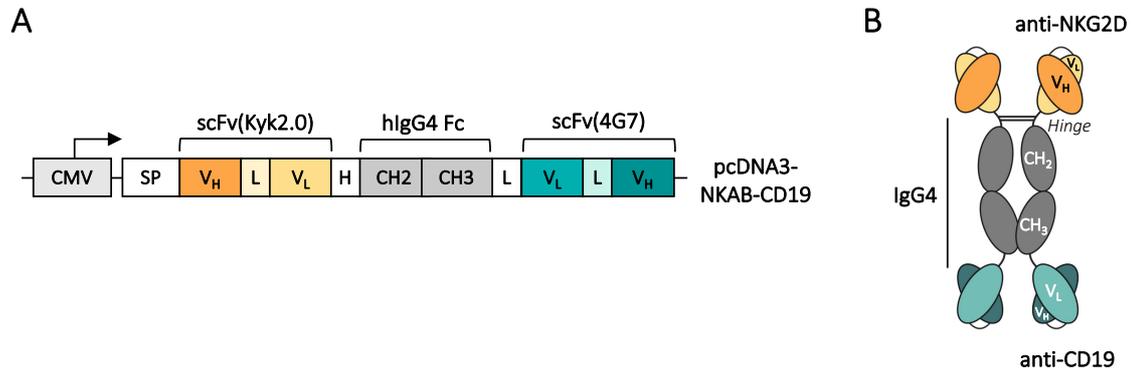


Abbildung 4.36. Aufbau des bispezifischen Antikörpers NKAB-CD19. (A) Zusammensetzung der NKAB-CD19 Sequenz. Das in das Expressionsplasmid pcDNA3 eingebrachte NKAB-CD19 Konstrukt (pcDNA3-NKAB-CD19) steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors und trägt am N-Terminus ein Signalpeptid. Daran anschließend folgt eine NKG2D-spezifische scFv-Domäne (Kyk2.0), die über die Gelenkregion (H), den Fc-Teil des humanen IgG4 (CH2 und CH3) und einen $(G_4)_2$ Peptid-Linker an das C-terminale scFv-Antikörperfragment spezifisch für CD19 (4G7) geknüpft ist. **(B) Schematische Darstellung des NKAB-CD19 Moleküls.** Das Molekül ist als Homodimer dargestellt. Ausgebildete Disulfidbrücken innerhalb der Gelenkregion zweier NKAB-CD19 Monomere sind mit Linien angedeutet. scFv: *single-chain fragment variable*, IgG: Immunglobulin G, CMV: CMV-Promotor, SP: Signalpeptid, V_H : variable Domäne der schweren Antikörperkette, V_L : variable Domäne der leichten Antikörperkette, H: Gelenkregion, Fc: Fragment-kristallisierbare Region eines Antikörpers, L: GS-Linker.

Das Expressionsplasmid pcDNA3-NKAB-CD19 wurde über transiente Transfektion in Expi293F Zellen eingebracht und das sekretierte Protein nach fünf Tagen mittels Protein-G-Affinitätschromatographie aus dem Zellkulturüberstand gewonnen. NKAB-CD19 enthaltende Fraktionen wurden mit einem HRP-gekoppelten anti-human IgG Antikörper in einem Immunoblot identifiziert und anschließend vereint. Nach Auftrennung mittels SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen zeigte das Bandenmuster im Immunoblot, dass NKAB-CD19 hauptsächlich als Dimer mit einer molekularen Masse von ca. 160 kDa vorlag und nur zu einem geringen Anteil als Monomer (ca. 80 kDa). In der Fraktion mit der größten Menge an Protein (Fraktion 2) trat eine weitere Bande bei etwa 50 kDa auf. Hierbei könnte es sich um ein Degradationsprodukt handeln, das nur bei Beladung des Gels mit einer hohen Proteinmenge nachweisbar war (**Abbildung 4.37**). Nach einem Pufferaustausch mittels Dialyse über Nacht wurde die Proteinkonzentration in den vereinigten Fraktionen bestimmt. Das so gereinigte NKAB-CD19 Molekül wurde dann in den nachfolgenden Versuchen eingesetzt.

Ergebnisse

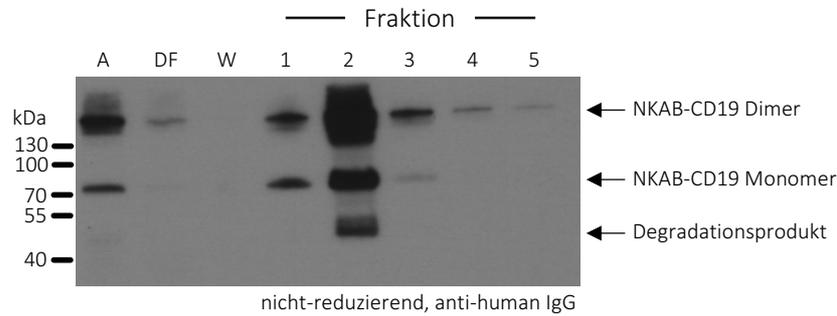


Abbildung 4.37. Expression und Reinigung des bispezifischen Moleküls NKAB-CD19. Um nach der Reinigung mittels Protein-G-Affinitätschromatographie NKAB-CD19 enthaltende Fraktionen zu identifizieren, wurde eine SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen und ein anschließender Immunoblot durchgeführt. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe eines humanen IgG4-Fc-spezifischen Sekundärantikörpers. Das Molekül lag sowohl als Monomer (ca. 80 kDa) als auch als Dimer (ca. 160 kDa) vor. Zudem wurde ein potenzielles Degradationsprodukt von ca. 50 kDa identifiziert. A: Auftrag, DF: Durchfluss, W: Waschfraktion.

Zunächst wurde die Bindung von NKAB-CD19 an die CD19⁺ Leukämie-Zelllinie SEM und an NKG2D-exprimierende NKAR-NK-92 Zellen mikroskopisch analysiert (60-fache Vergrößerung). Dabei wurden Zellkerne mit Hoechst (pink), das Zytoplasma mit CFSE (blau) und mit APC-konjugiertes NKAB-CD19 über direkte Fluoreszenz (grün) detektiert. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass NKAB-CD19 sowohl an CD19-exprimierende (SEM) als auch an NKG2D-exprimierende Zellen (NKAR-NK-92) spezifisch binden kann und sich über die Zelloberfläche verteilt anlagert (**Abbildung 4.38; A**). Neben der mikroskopischen Analyse wurde die Bindung vom NKAB-CD19 an NKG2D-exprimierende Effektorzellen und CD19⁺ Zielzellen auch durchflusszytometrisch bestimmt. Eine NKG2D-spezifische Bindung von NKAB-CD19 konnte dabei anhand der Bindung an die NKG2D⁺ Effektor-Zelllinien NK-92, NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 bestätigt werden (**Abbildung 4.38; B**). Die Spezifität für CD19 zeigte sich durch die Bindung an CD19-exprimierende Lymphom- (Raji) und Leukämie-Zelllinien (SEM und Nalm-6), während CD19⁻ K562 Zellen nicht gebunden wurden (**Abbildung 4.38; C**).

Ergebnisse

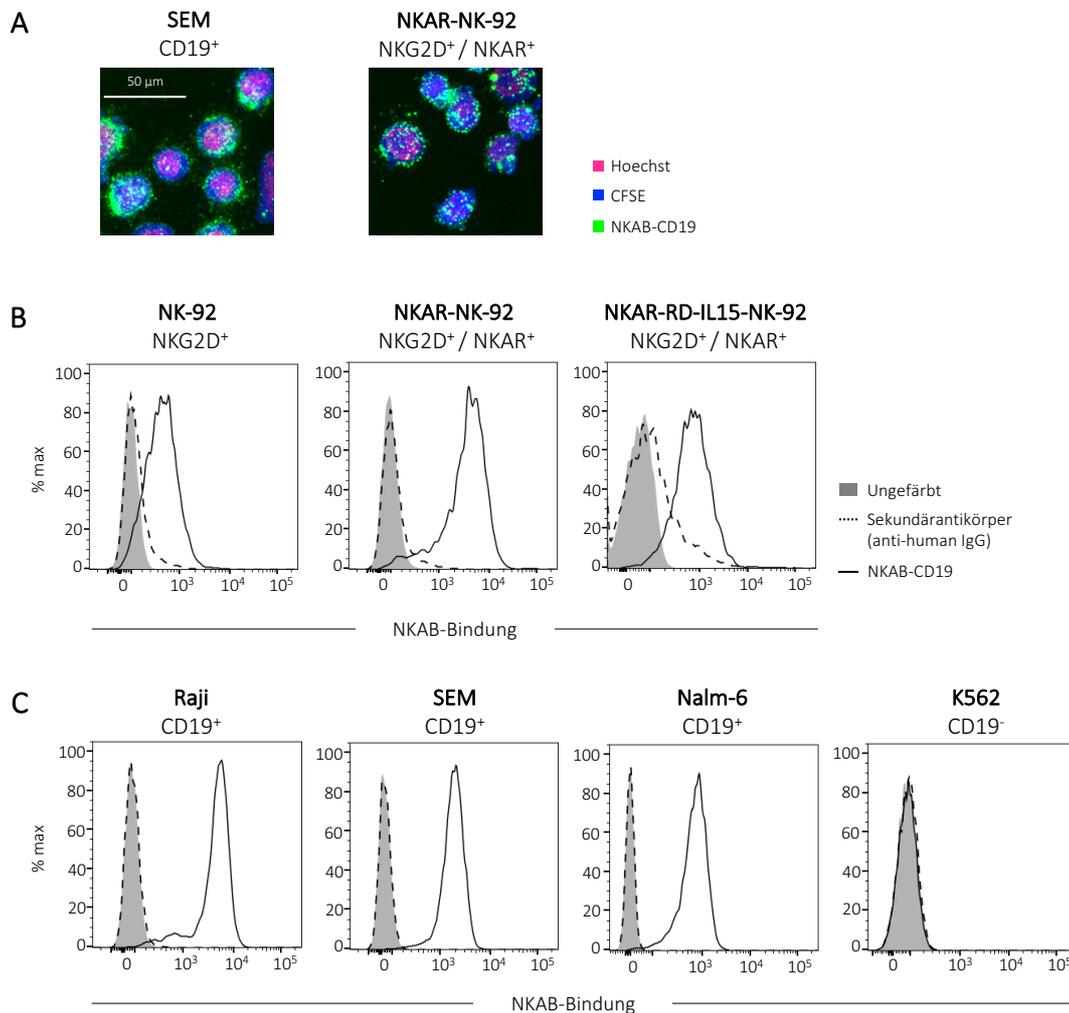


Abbildung 4.38. Analyse der NKAB-CD19 Bindung. (A) Mikroskopische Analyse der Bindung von NKAB-CD19 an die CD19⁺ Leukämie-Zelllinie SEM und NKG2D⁺ NKAR-NK-92 Effektorzellen. Der Zellkern wurde mit Hoechst (pink) und das Zytoplasma mit CFSE (blau) gefärbt. Die Bindung von direkt mit APC-konjugiertem NKAB-CD19 ist in grün gezeigt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des konfokalen Mikroskops CQ-1 bei einer 60-fachen Vergrößerung. **(B, C) Durchflusszytometrische Analyse der NKAB-CD19 Bindung.** Die Bindung von NKAB-CD19 an **(B)** NKG2D-exprimierende Effektorzellen und **(C)** CD19-positive und -negative Tumor-Zelllinien wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrollen dienten ungefärbte oder lediglich mit Sekundärintikörper gefärbte Zellen.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die Zugabe von NKAB-CD19 das zytotoxische Potenzial von parentalen NK-92, NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen gegenüber CD19-exprimierenden Lymphom- und Leukämie-Zelllinien bei einem E:T Verhältnis von 5:1 beeinflusst. In Zytotoxizitätsassays führte dabei die Zugabe von 25, 50 oder 100 ng/ml NKAB-CD19 zu einer deutlichen und statistisch signifikanten Steigerung der spezifischen Lyse von Raji Zellen sowohl in Kombination mit parentalen NK-92 als auch NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen (**Abbildung 4.39; A**). Eine maximale Steigerung zeigte sich dabei bei einer Konzentration von 50 ng/ml NKAB-CD19 (NK-92: $43,8 \pm 1,7\%$; NKAR-NK-92: $43,3 \pm 2,1\%$; NKAR-RD-IL15-NK-92: $46,7 \pm 5,1\%$), wohingegen höhere

Ergebnisse

Konzentrationen des Moleküls (> 50 ng/ml) wie zuvor mit anderen NKAB-Molekülen beobachtet zu einer Reduktion der spezifischen Lyse führten. Beim Vergleich der natürlichen Zytotoxizität der verschiedenen Effektor-Zelllinien (ohne NKAB-CD19) gegenüber Raji Zellen ergab sich eine signifikant höhere Lyse durch NK-92 Zellen ($29,0 \pm 0,4\%$), während NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen ein geringeres zytotoxisches Potenzial aufwiesen ($16,3 \pm 0,7\%$ und $20,7 \pm 0,8\%$). Gegenüber CD19⁺ Leukämiezellen (SEM) wurde im Fall parentaler NK-92 Zellen lediglich nach Zugabe von 25 ng/ml NKAB-CD19 eine geringe ($8 \pm 1,7\%$), aber statistisch signifikante Steigerung der spezifischen Lyse erzielt. Im Gegensatz hierzu wurde durch die Kombination von NKAR-NK-92 Zellen mit 100 ng/ml NKAB-CD19 die spezifische Tumorzell-Lyse auf bis zu $37,3 \pm 5,9\%$ gesteigert. Dabei wurde anders als bei Raji Zellen keine Reduktion der spezifischen Lyse bei NKAB-Konzentrationen über 50 ng/ml beobachtet (**Abbildung 4.39; B**). Der Vergleich der spezifischen Lyse von Raji und SEM Zellen weist dabei auf eine generell höhere Sensitivität der Raji Zellen gegenüber NK-Zell-vermittelter Zytotoxizität hin.

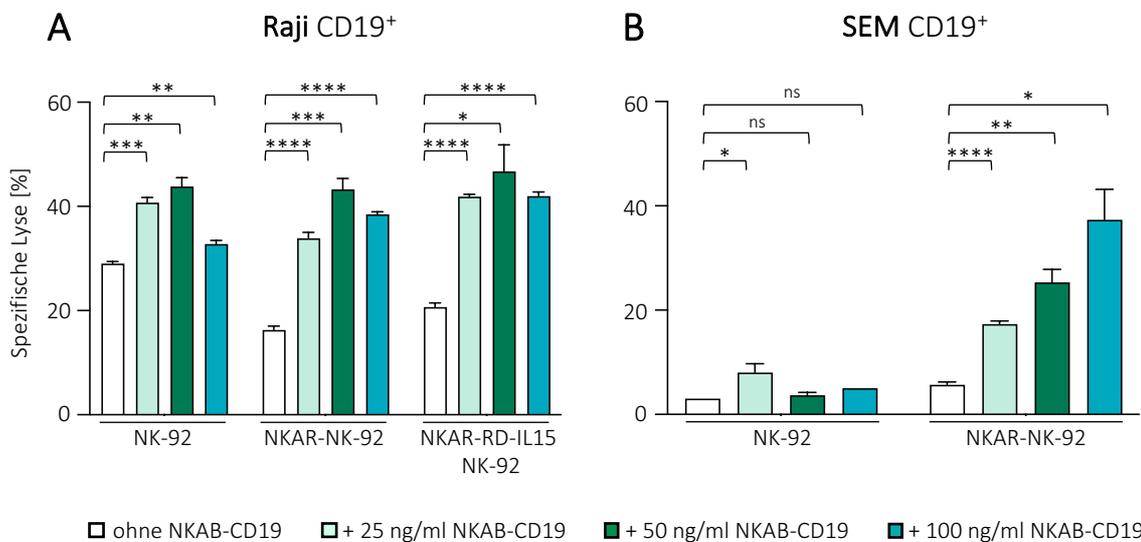


Abbildung 4.39. Zytotoxische Aktivität parentaler NK-92 und NKG2D-CAR-exprimierender NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen in Kombination mit NKAB-CD19 gegenüber CD19-positiven Lymphom- und Leukämie-Zelllinien. Die Lymphom-Zelllinie Raji (A) und die Leukämie-Zelllinie SEM (B) wurden mit parentalen NK-92 und NKAR-NK-92 Zellen (Effektorzellen) in einem E:T Verhältnis von 5:1 und steigenden NKAB-CD19 Konzentrationen kokultiviert. Raji Zellen wurden unter gleichen Bedingungen zusätzlich mit NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen inkubiert. Nach 3-stündiger Inkubation wurde die spezifische Lyse der Tumorzellen durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

4.7.2 Ableitung und funktionelle Charakterisierung des bispezifischen Antikörpers NKAB-CD20

Auch die Sequenz des NKAB-CD20 Molekül wurde zunächst *in silico* generiert und nach cDNA-Synthese in das Expressionsplasmid pcDNA3 unter der Kontrolle des CMV-Promotors eingebracht (pcDNA3-NKAB-CD20). Dabei setzt sich die NKAB-CD20 Sequenz aus der auch in den anderen NKAB-Molekülen genutzten NKG2D-Bindungsstelle (scFv(Kyk2.0)) und einer über eine Gelenkregion, die Fc-Domäne des humanen IgG4 (CH2 und CH3) und einen (G₄S)₂ Peptid-Linker verknüpften CD20-spezifischen Domäne zusammen. Hierfür wurde das scFv-Antikörperfragment Leu16 eingesetzt (Müller et al., 2008). Um sicherzustellen, dass NKAB-CD20 nach seiner Expression aus der Zelle geschleust wird, wurde der eigentlichen NKAB-Sequenz ein N-terminales Signalpeptid vorgelagert (**Abbildung 4.40; A**). Eine schematische Darstellung des Moleküls als Disulfid-verknüpftes Homodimer ist in **Abbildung 4.40; B** gezeigt.

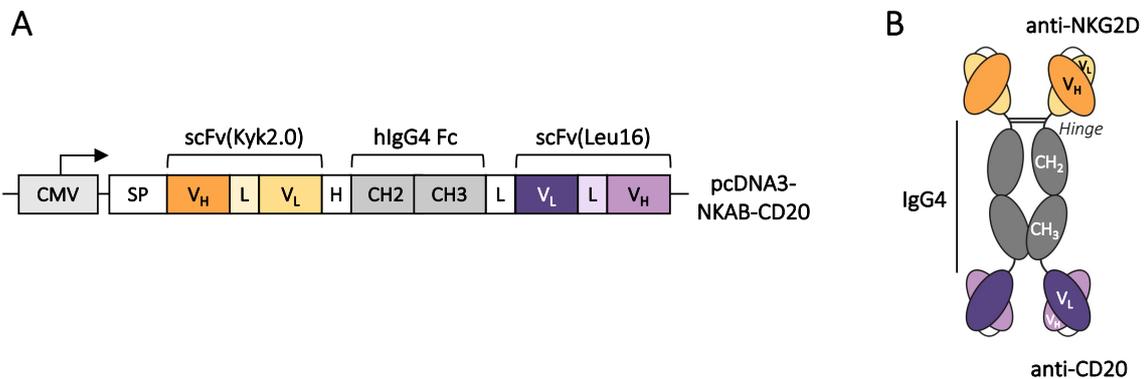


Abbildung 4.40. Aufbau des bispezifischen Antikörpers NKAB-CD20. (A) Zusammensetzung der NKAB-CD20 Sequenz. Das in das Expressionsplasmid pcDNA3 eingebrachte NKAB-CD20 Konstrukt (pcDNA3-NKAB-CD20) steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors und trägt am N-Terminus ein Signalpeptid. Daran anschließend folgt eine NKG2D-spezifische scFv-Domäne (Kyk2.0), die über die Gelenkregion (H), den Fc-Teil des humanen IgG4 (CH2 und CH3) und einen (G₄S)₂ Peptid-Linker an das C-terminale scFv-Antikörperfragment spezifisch für CD20 (Leu16) geknüpft ist. **(B) Schematische Darstellung des NKAB-CD20 Moleküls.** Das Molekül ist als Homodimer dargestellt. Ausgebildete Disulfidbrücken innerhalb der Gelenkregion zweier NKAB-CD20 Monomere sind mit Linien angedeutet. scFv: *single-chain fragment variable*, IgG: Immunglobulin G, CMV: CMV-Promotor, SP: Signalpeptid, V_H variable Domäne der schweren Antikörperkette, V_L: variable Domäne der leichten Antikörperkette, H: Gelenkregion, Fc: Fragment-kristallisierbare Region eines Antikörpers, L: GS-Linker.

Ergebnisse

Wie zuvor für NKAB-CD19 beschrieben, wurde NKAB-CD20 rekombinant als sekretiertes Protein in Expi293F Zellen produziert und mittels Protein-G-Affinitätschromatographie aus dem Zellkulturüberstand gereinigt. Um die proteinhaltigen Fraktionen zu identifizieren, wurde zunächst eine SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Anschließend wurden NKAB-CD20 Moleküle im Immunoblot mit Hilfe eines HRP-gekoppelten anti-human IgG Antikörpers detektiert (**Abbildung 4.41**). In den Fraktionen 1-3 zeigten sich dabei je zwei deutliche Banden, die der monomeren (80 kDa) und dimeren (160 kDa) Form von NKAB-CD20 entsprechen. Dabei lässt die stärkere Ausprägung der 160 kDa Bande darauf schließen, dass das Molekül zu einem größeren Anteil als Dimer vorlag. Wie bereits bei NKAB-CD19 beobachtet, enthielt Fraktion 2 die größte Menge an Protein. Hier waren neben den Banden des NKAB-CD20 Monomers und Dimers weitere Banden zu erkennen, bei denen es sich sehr wahrscheinlich um Degradationsprodukte handelte, die nur bei Beladung des Gels mit einer hohen Proteinmenge nachzuweisen waren. Die Fraktionen 1-3 wurden vereint und zum Pufferaustausch über Nacht dialysiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt und das gereinigte NKAB-CD20 Molekül in den nachfolgenden Versuchen eingesetzt.

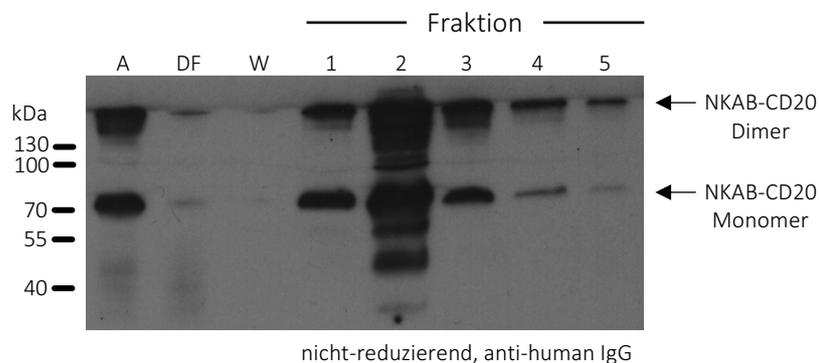


Abbildung 4.41. Expression und Reinigung des bispezifischen Moleküls NKAB-CD20. Um nach der Reinigung mittels Protein-G-Affinitätschromatographie NKAB-CD20 enthaltende Fraktionen zu identifizieren, wurde eine SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen und ein anschließender Immunoblot durchgeführt. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe eines humanen IgG4-Fc-spezifischen Sekundärantikörpers. Das Molekül lag sowohl als Monomer (ca. 80 kDa) als auch als Dimer (ca. 160 kDa) vor. Zudem wurden potenzielle Degradationsprodukte identifiziert. A: Auftrag, DF: Durchfluss, W: Waschfraktion.

Die Bindung von APC-gekoppeltem NKAB-CD20 an CD20-exprimierende Lymphomzellen (Raji) und NKG2D⁺ NKAR-NK-92 Zellen wurde mikroskopisch bei einer 60-fachen Vergrößerung mit dem konfokalen Mikroskop CQ1 untersucht. Während Zellkerne mit Hoechst (pink) und das Zytoplasma mit CFSE (blau) detektiert wurden, erfolgte der Nachweis von NKAB-CD20 über direkte Fluoreszenzmessung (grün). Die dabei erhaltenen Daten zeigten, dass NKAB-CD20 sowohl an CD20-exprimierende (Raji) als auch an NKG2D-positive Zellen (NKAR-NK-92) spezifisch bindet und sich über die Zelloberfläche verteilt anlagert (**Abbildung 4.42; A**). Anschließend wurde die spezifische Bindung von

Ergebnisse

NKAB-CD20 an NKG2D-exprimierende Effektorzellen (**Abbildung 4.42; B**) und CD20⁺ Lymphom- (Raji) und Leukämie- (BV-173) Zellen (**Abbildung 4.42; C**) durchflusszytometrisch bestätigt. Zudem wurde keine Bindung von NKAB-CD20 an CD20-negative Leukämiezellen (SEM), die als Kontrolle eingesetzt wurden, beobachtet.

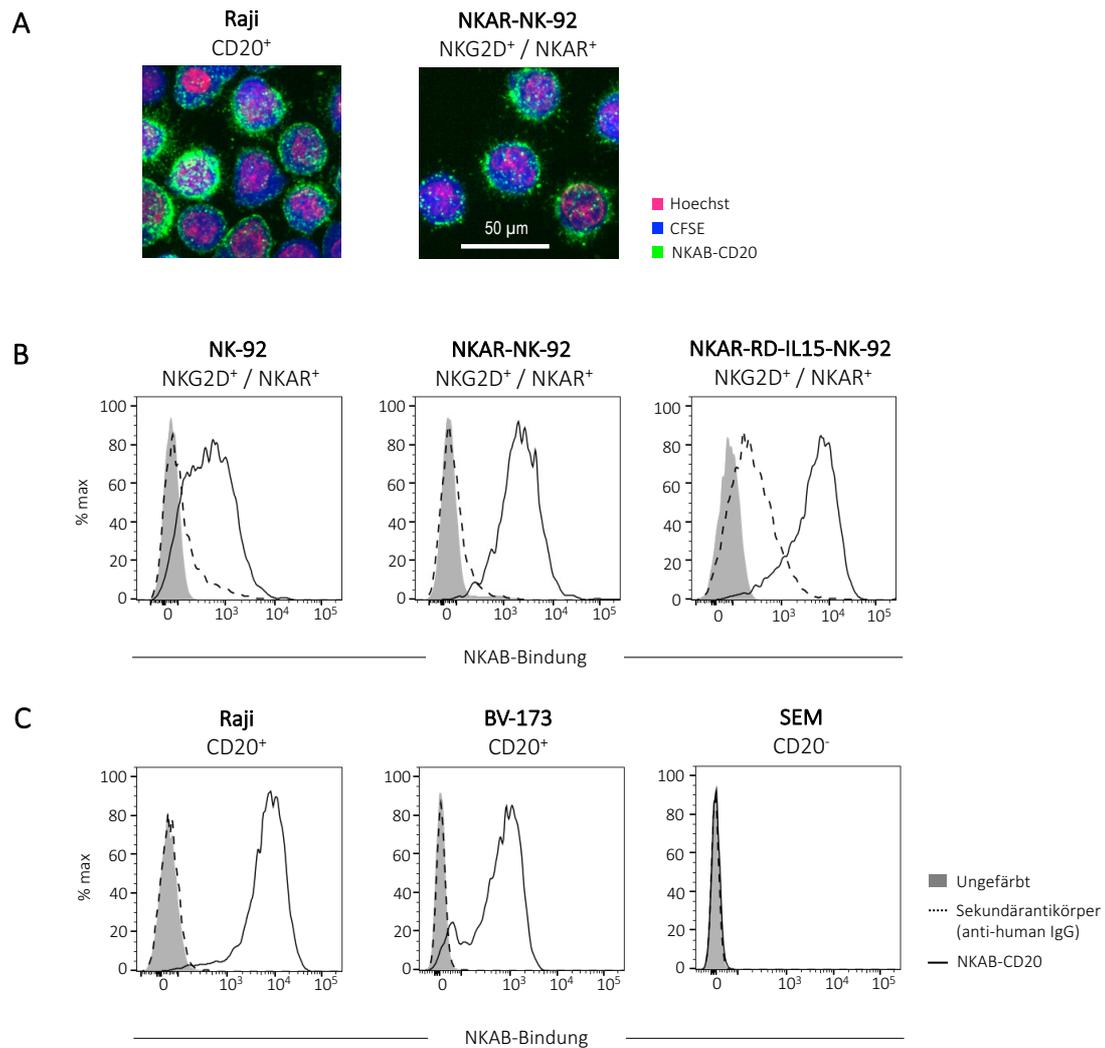


Abbildung 4.42. Analyse der NKAB-CD20 Bindung. (A) Mikroskopische Analyse der Bindung von NKAB-CD20 an die CD20⁺ Lymphom-Zelllinie Raji und NKG2D⁺ NKAR-NK-92 Effektorzellen. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (pink) und das Zytoplasma mit CFSE (blau) gefärbt. Die Bindung von direkt mit APC-konjugiertem NKAB-CD20 ist in grün gezeigt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des konfokalen Mikroskops CQ-1 bei einer 60-fachen Vergrößerung. **(B, C) Durchflusszytometrische Analyse der NKAB-CD20 Bindung.** Die Bindung von NKAB-CD20 an **(B)** NKG2D-exprimierende Effektorzellen und **(C)** CD20-positive und -negative Tumor-Zelllinien wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrollen dienten ungefärbte oder lediglich mit Sekundäntikörper gefärbte Zellen.

Ergebnisse

Der Einfluss von NKAB-CD20 auf die spezifische Zytotoxizität von parentalen NK-92, NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-Zellen gegen CD20-exprimierende Tumor-Zelllinien (Raji und Daudi) wurde in Zytotoxizitätsassays bei einem E:T Verhältnis von 5:1 untersucht (**Abbildung 4.43**). Mit steigender Konzentration an NKAB-CD20 (25-100 ng/ml) zeigte sich dabei eine erhöhte spezifische Lyse der CD20⁺ Raji Zellen durch alle drei Effektor-Zelllinien. Im Vergleich zu NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen wiesen parentale NK-92 Zellen in Abwesenheit von NKAB-CD20 ein höheres zytotoxisches Potenzial gegenüber Raji Zellen auf. Die höchsten Lyse-Raten wurden bei einer Konzentration von 50 ng/ml NKAB-CD20 (NK-92: 49,7 ± 2,1%; NKAR-NK-92: 62,9 ± 1,5%; NKAR-RD-IL15-NK-92: 63,3 ± 1,4%) erzielt. Höhere Konzentrationen an NKAB-CD20 führten wie bereits für NKAB-CD19 gezeigt zu einer leichten Reduktion der Zytotoxizität (**Abbildung 4.43; A**). Auch gegenüber der CD20⁺ Lymphom-Zelllinie Daudi zeigten sowohl NK-92 (49,3 ± 3,8%) als auch NKAR-NK-92-Zellen (40,7 ± 1,2%) eine verhältnismäßig hohe natürliche Zytotoxizität in Abwesenheit von NKAB-CD20. Dennoch wurde die spezifische Lyse der Zielzellen durch die Zugabe von NKAB-CD20 deutlich auf 69,0 ± 2,0% (NK-92) bzw. 80,0 ± 1,0% (NKAR-NK-92) gesteigert (**Abbildung 4.43; B**).

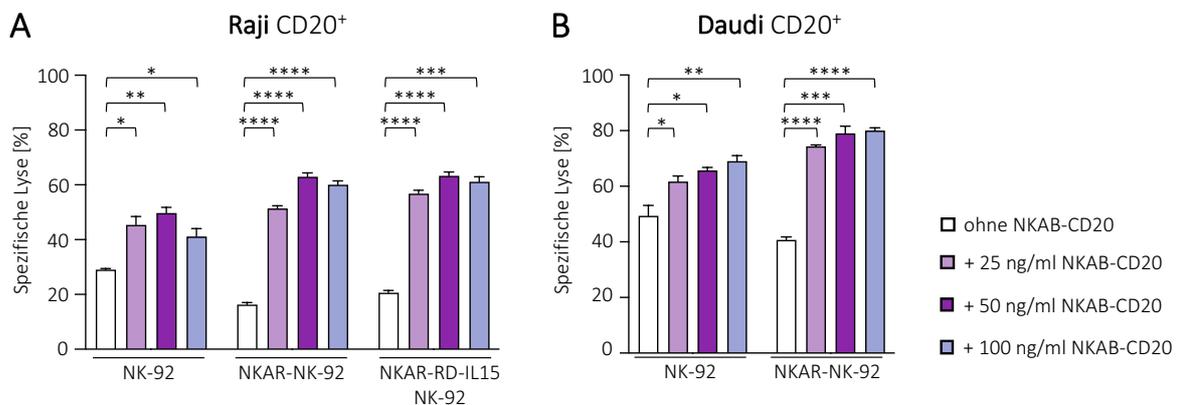


Abbildung 4.43. Zytotoxische Aktivität parentaler NK-92 und NKG2D-CAR-exprimierender NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen in Kombination mit NKAB-CD20 gegenüber CD20-positiven Lymphom-Zelllinien. Die Lymphom-Zelllinien Raji (**A**) und Daudi (**B**) wurden mit parentalen NK-92 und NKAR-NK-92 Zellen (Effektorzellen) bei einem E:T Verhältnis von 5:1 in Gegenwart steigender NKAB-CD20 Konzentrationen inkubiert. Raji Zellen wurden unter gleichen Bedingungen zusätzlich mit NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen inkubiert. Nach 3 Stunden wurde die spezifische Lyse der Tumorzellen durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SD dreier unabhängiger Experimente. *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001; ****: p < 0,0001.

Um abzuklären, ob NKAB-CD19 und NKAB-CD20 in Abwesenheit von Zielzellen bereits eine Stimulation und damit ungerichtete Aktivierung der NK-92 Zellen bewirken, wurden Degranulationsassays durchgeführt. Hierbei wurde der Effekt löslicher NKAB-Moleküle auf NKAR-NK-92 Zellen in Ab- oder Anwesenheit der Zielzellen BV-173 (CD19⁺CD20⁺) und Raji (CD19⁺CD20⁺) analysiert. Als Positivkontrollen für die Degranulation dienten die Koinkubation der Effektorzellen mit der NK-

Ergebnisse

sensitiven Zielzelllinie K562 und die Stimulation mit PMA/Ionomycin. Die Aktivierung der NK-Zellen wurde durch die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression des Degranulations-Markers CD107a bestimmt. Zwischen unstimulierten und mit in Lösung vorliegenden NKAB-CD20 oder NKAB-CD19 (100 ng/ml) Molekülen inkubierten NKAR-NK-92 Zellen wurde dabei kein Unterschied hinsichtlich des Anteils an CD107a-positiven Zellen festgestellt. Die Anwesenheit Antigen-exprimierender Zielzellen führte hingegen zu einer umfassenden Degranulation der NK-Zellen (BV-173 + NKAB-CD19: $60,5 \pm 6,7\%$; + NKAB-CD20: $67,9 \pm 1,0\%$; Raji + NKAB-CD19: $61,8 \pm 1,9\%$; + NKAB-CD20: $71,4 \pm 1,3\%$). Hohe Anteile CD107a-positiver NKAR-NK-92 Zellen wurden auch nach Stimulation mit der MHC-I negativen Leukämie-Zelllinie K562 ($76,4 \pm 5,2\%$) oder mit PMA/Ionomycin erreicht ($83,7 \pm 1,9\%$) (**Abbildung 4.44**). Diese Ergebnisse weisen nach, dass selbst hohe Konzentrationen der NKAB-Moleküle in Lösung in Abwesenheit von passenden Zielzellen nicht zu einer unspezifischen Aktivierung der Effektorzellen führen. Durch die spezifische Bindung an Lymphom- und Leukämiezellen ermöglichen sie jedoch die Kreuzvernetzung mit NKAR-exprimierenden NK-92 Zellen und lösen deren Degranulation aus.

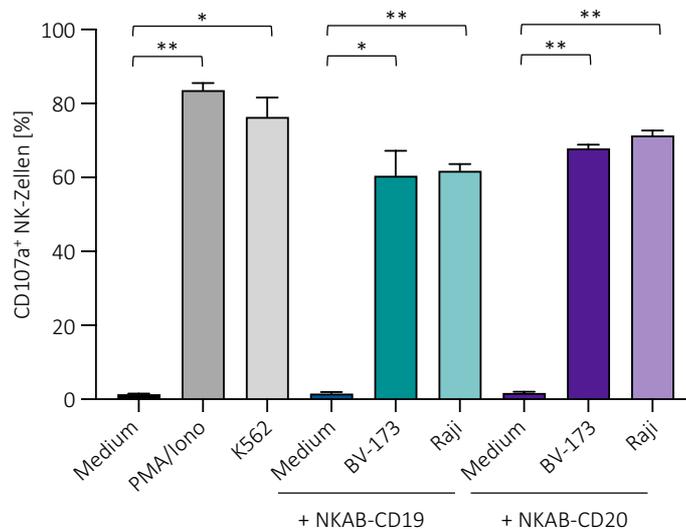


Abbildung 4.44. Degranulationsassay zur Bestimmung der NKAR-NK-92 Aktivierung. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an CD107a⁺ NKAR-NK-92 Zellen nach 3-stündiger Inkubation mit 50 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin, K562 Zellen (Positivkontrollen), Medium (Negativkontrolle) oder 100 ng/ml NKAB-CD19 oder NKAB-CD20 allein oder in Kombination mit Antigen-positiven Tumorzell-Linien (BV-173 und Raji). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

4.7.3 Zytotoxisches Potenzial von primären NK-Zellen in Kombination mit NKAB-CD19 und NKAB-CD20

Hinsichtlich eines möglichen zukünftigen Einsatzes in Patienten ist es von großem Interesse abzuklären, ob durch die NKAB-Moleküle nicht nur adoptiv verabreichte NKAR-NK-92 Zellen, sondern auch körpereigene NK-Zellen aktiviert werden können. Um erste Hinweise zur Wirkung von NKAB-Molekülen auf primäre humane NK-Zellen zu erlangen, wurden zunächst NK-Zellen aus dem Blut von gesunden Spendern isoliert. Nach 4-tägiger Kultivierung in Medium für primäre NK-Zellen (Tabelle 2.12) wurde die Reinheit der gewonnenen Zellpopulationen durch die Oberflächenfärbung von CD3 und CD56 (**Abbildung 4.45; A**) sowie CD16 und NKG2D (**Abbildung 4.45; B**) durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei lag die Reinheit der isolierten NK-Zellen nach 4-tägiger Kultivierung bei 96% (CD3⁺CD56⁺ Population). Zusätzlich exprimierten 95% der Zellen NKG2D und CD16. Lediglich bei 4% der NKG2D-positiven Zellen wurde keine CD16 Expression festgestellt. Die in **Abbildung 4.45** gezeigten Daten eines Spenders sind repräsentativ für die isolierten NK-Zellen von insgesamt drei Spendern, welche für die nachfolgenden Untersuchungen eingesetzt wurden.

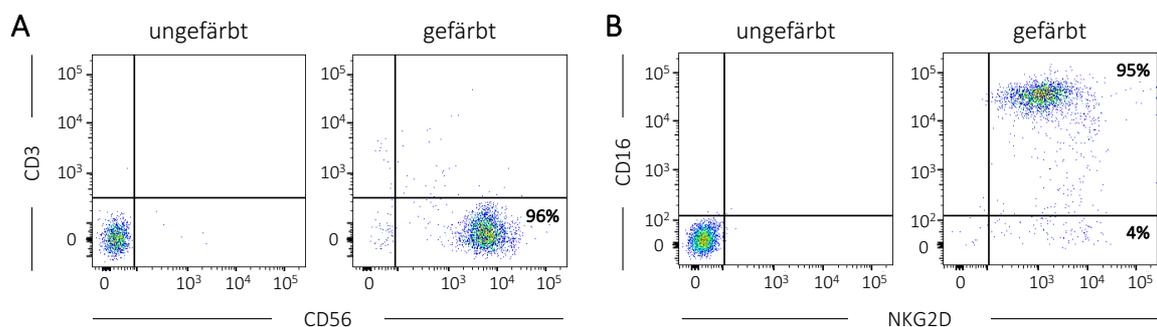


Abbildung 4.45. Charakterisierung von primären NK-Zellen. Durchflusszytometrische Analyse primärer NK-Zellen eines repräsentativen Spenders hinsichtlich der CD3- und CD56- (**A**) und CD16- und NKG2D-Expression (**B**) 4 Tage nach Isolation.

Zur Bestätigung der Bindung der NKAB-Moleküle an NKG2D-exprimierende primäre NK-Zellen wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Repräsentativ für zwei Spender ist in **Abbildung 4.46; A** die Bindung von NKAB-CD19 und NKAB-CD20 an primäre NK-Zellen gezeigt. Neben der Bindung von NKAB-CD19 und NKAB-CD20 an die NK-Zellen wurde auch deren Einfluss auf die Zytotoxizität der Effektorzellen gegenüber CD19⁺CD20⁺ Raji Zellen untersucht. Dazu wurden primäre NK-Zellen und Raji Zellen bei einem E:T Verhältnis von 20:1 in Anwesenheit von 50 ng/ml der NKAB-Moleküle inkubiert und anschließend wurde der Anteil lysierter Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Das zytotoxische Potenzial der NK-Zellen der drei Spender wurde dabei sowohl durch NKAB-CD19 als auch NKAB-CD20 signifikant erhöht. Allerdings führte NKAB-CD20 verglichen mit

Ergebnisse

NKAB-CD19 generell zu einer höheren NK-Zell Aktivierung (**Abbildung 4.46; B**). Dies war auch in den vorherigen Versuchen mit den NK-Zelllinien NK-92, NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 der Fall (siehe **Abbildung 4.39; A** und **Abbildung 4.43; A**).

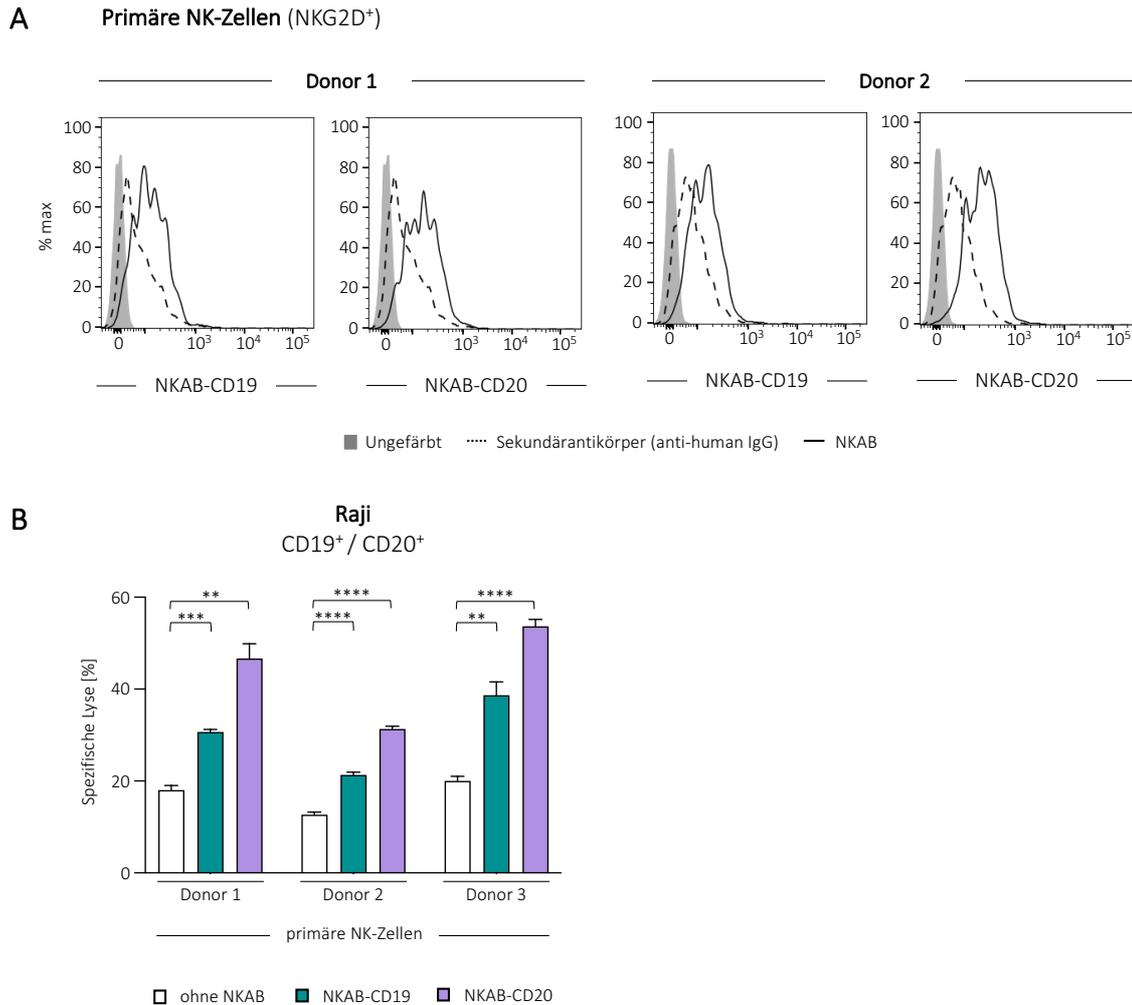


Abbildung 4.46. Funktionelle Analyse von NKAB-CD19 und NKAB-CD20 in Kombination mit primären NK-Zellen. (A) Analyse der Bindung von NKAB-CD19 und NKAB-CD20. Die Bindung von NKAB-CD19 und NKAB-CD20 an NKG2D-positive, primäre NK-Zellen (pNK) zweier Donoren wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrollen dienten ungefärbte oder lediglich mit Sekundärantikörper gefärbte Zellen. **(B) Zytotoxische Aktivität von primären NK-Zellen in Kombination mit NKAB-CD19 oder NKAB-CD20 gegenüber CD19- und CD20-exprimierenden Lymphomzellen.** Die Lymphom-Zelllinie Raji wurde mit pNK-Zellen in einem E:T Verhältnis von 20:1 und 50 ng/ml (0,32 nM) NKAB-CD19 oder NKAB-CD20 inkubiert. Nach 3 Stunden wurde die spezifische Lyse der Tumorzellen durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

4.7.4 Zusammenfassung der Abschnitte 4.7.1 bis 4.7.3

Die Abschnitte 4.7.1 bis 4.7.3 beschreiben die Ableitung, Expression, Reinigung und funktionelle Analyse der gegen CD19 und CD20 gerichteten Moleküle NKAB-CD19 und NKAB-CD20. Beide Proteine zeigten eine spezifische Bindung sowohl an primäre NK-Zellen, NK-92 sowie die NK-92 Derivate NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 als auch an Antigen-exprimierende Tumor-Zelllinien. Zudem vermittelten NKAB-CD19 und NKAB-CD20 eine gesteigerte Zytotoxizität der genetisch modifizierten NK-92 Zelllinien und der primären NK-Zellen gegenüber Antigen-positiven Leukämie- und Lymphom-Zelllinien. Die durchgeführten Degranulationsassays zeigten zudem, dass NKAB-CD19 und NKAB-CD20 in Abwesenheit von Ziel-Zellen keine ungerichtete Aktivierung der NK-Zellen auslösen. Dies ist ein wichtiger Sicherheitsaspekt dieses Therapieansatzes.

4.8 Ableitung und funktionelle Charakterisierung eines NKG2D-bindenden bispezifischen Antikörper mit Selektivität für murines CD19

Im Hinblick auf eine zukünftige Erprobung des Ansatzes im Tiermodell wurde ein NKAB-mCD19 Molekül entwickelt, das mit der Bindungsstelle am N-Terminus das murine Antigen CD19 (mCD19) erkennt. Am C-Terminus trägt das Molekül das scFv-Antikörperfragment Kyk2.0, das spezifisch mit humanem NKG2D interagiert. Dies ermöglicht die Untersuchung in Kombination mit NKAR-NK-92 Zellen auch bei einem Einsatz mit murinen Tumorzellen *in vitro* oder syngenen Leukämie- und Lymphommodellen in immunkompetenten Tieren.

Wie die zuvor beschriebenen NKAB-Moleküle wurde die Sequenz von NKAB-mCD19 zunächst *in silico* generiert. Als N-terminale mCD19-Bindungsstelle wurde dabei die scFv-Domäne abgeleitet von dem Antikörper 1D3 eingesetzt (Rive et al., 2022). Danach folgt eine Gelenkregion, die Fc-Domäne des humanen IgG4 (CH2 und CH3), ein (G₄S)₂ Peptid-Linker und die NKG2D-bindende Domäne in Form des scFv-Antikörperfragments Kyk2.0. Auch hier war der NKAB-Sequenz für die Sekretion des exprimierten NKAB-Moleküls in den Zellkulturüberstand ein Signalpeptid vorgelagert. Die synthetisierte Sequenz wurde in das Expressionsplasmid pcDNA3 unter der Kontrolle des CMV-Promotors eingebracht (pcDNA3-NKAB-mCD19) (**Abbildung 4.47; A**). Eine schematische Darstellung des Moleküls als Disulfid-verknüpftes Homodimer ist in **Abbildung 4.47; B** gezeigt.

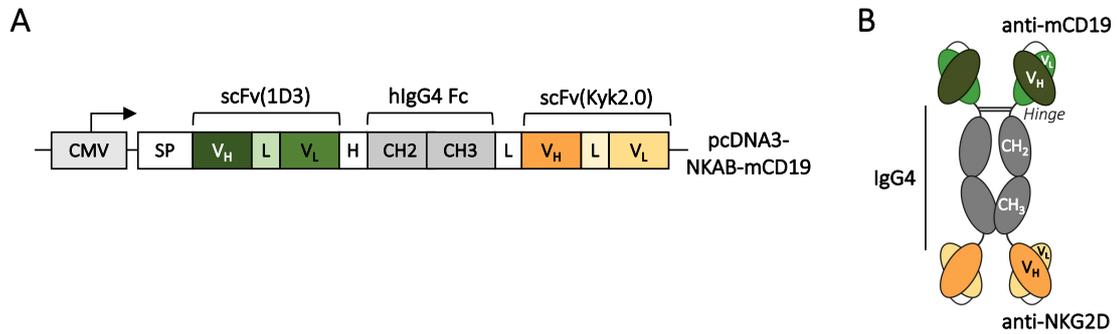


Abbildung 4.47. Aufbau des bispezifischen Antikörpers NKAB-mCD19. (A) Zusammensetzung der NKAB-mCD19 Sequenz. Das in das Expressionsplasmid pcDNA3 eingebrachte NKAB-mCD19 Konstrukt (pcDNA3-NKAB-mCD19) steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors und trägt am N-Terminus ein Signalpeptid. Anschließend folgt eine für murines CD19 (mCD19) spezifische scFv-Domäne (1D3), die über die Gelenkregion (H), den Fc-Teil des humanen IgG4 (CH2 und CH3) und einen (G₄S)₂ Peptid-Linker an das C-terminale scFv-Antikörperfragment spezifisch für NKG2D (Kyk2.0) geknüpft ist. **(B) Schematische Darstellung des NKAB-mCD19 Moleküls.** Das Molekül ist als Homodimer dargestellt. Ausgebildete Disulfidbrücken innerhalb der Gelenkregion zweier NKAB-mCD19 Monomere sind mit Linien angedeutet. scFv: *single-chain fragment variable*, IgG: Immunglobulin G, CMV: CMV-Promotor, SP: Signalpeptid, V_H: variable Domäne der schweren Antikörperkette, V_L: variable Domäne der leichten Antikörperkette, H: Gelenkregion, Fc: Fragment-kristallisierbare Region eines Antikörpers, L: GS-Linker.

Um rekombinantes NKAB-mCD19 aus dem Zellkulturüberstand zu isolieren, wurde eine Protein-G-Affinitätschromatographie durchgeführt. Die dabei gewonnenen, NKAB-mCD19 enthaltenden Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen und anschließendem Immunoblot analysiert (**Abbildung 4.48; A**). Wie im Fall der zuvor untersuchten NKAB-Moleküle lag NKAB-mCD19 vorwiegend als Dimer vor. Die proteinhaltigen Fraktionen 2 und 3 wurden vereint, über Nacht dialysiert und die Proteinkonzentration wurde bestimmt (**Abbildung 4.48; A**). Anschließend wurde die Funktionalität des Moleküls zunächst hinsichtlich der Bindung an Effektor- und Zielzellen durchflusszytometrisch überprüft. Dabei konnte eine spezifische Bindung von NKAB-mCD19 an NKG2D/NKAR-exprimierende NK-92 Zellen (**Abbildung 4.48; B**) und murine, mCD19⁺ A20 Lymphomzellen bestätigt werden. Raji Zellen, welche humanes CD19 exprimieren aber negativ für murines CD19 sind, wurden dagegen wie erwartet nicht von NKAB-mCD19 gebunden (**Abbildung 4.48; C**).

Ergebnisse

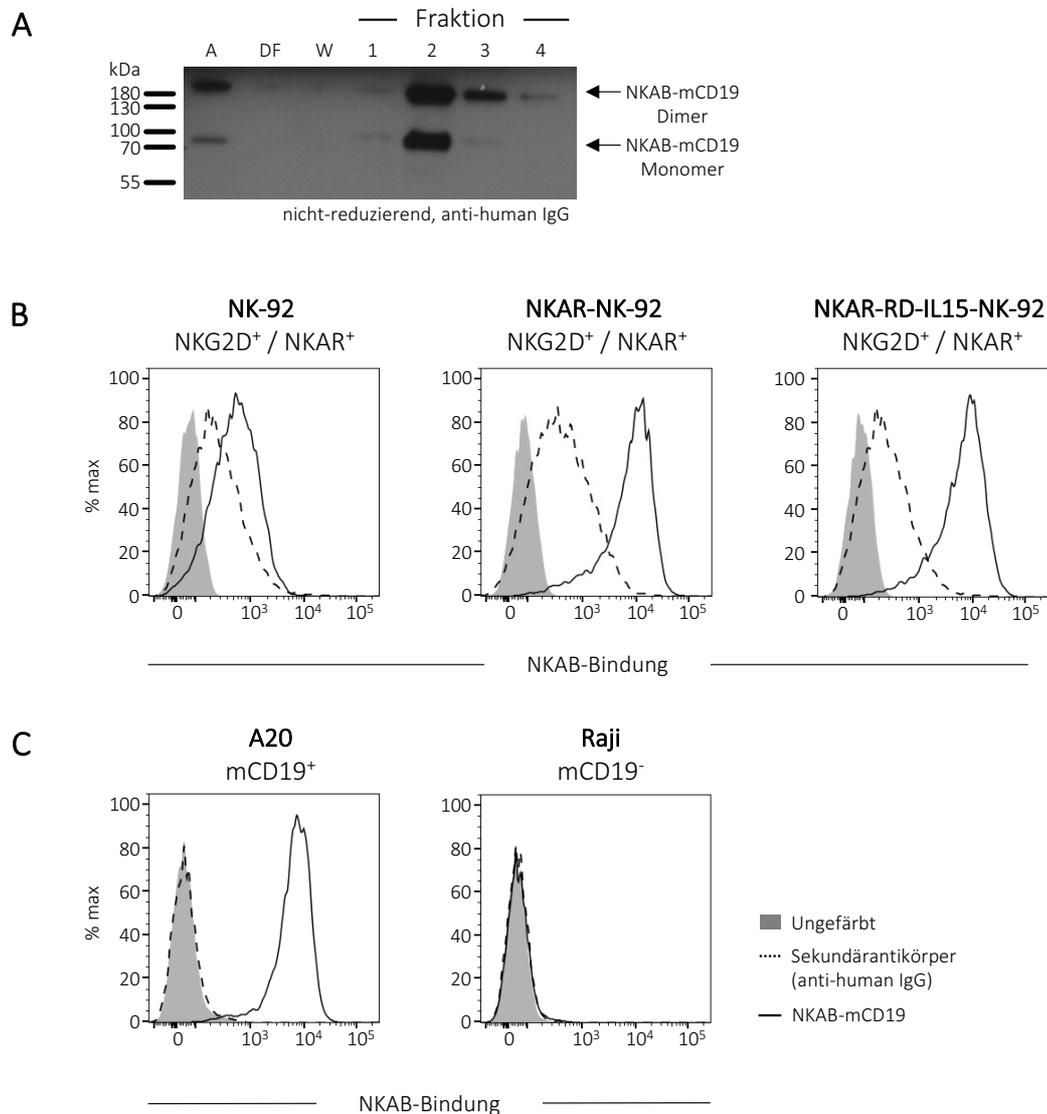


Abbildung 4.48. Expression und funktionelle Charakterisierung von NKAB-mCD19. (A) Expression und Reinigung des bispezifischen Moleküls NKAB-mCD19. Um nach der Reinigung mittels Protein-G-Affinitätschromatographie NKAB-mCD19 enthaltende Fraktionen zu identifizieren, wurde eine SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen und ein anschließender Immunoblot durchgeführt. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe eines humanen IgG4-Fc-spezifischen Sekundäntikörpers. Das Molekül lag sowohl als Monomer (ca. 80 kDa) als auch als Dimer (ca. 160 kDa) vor. A: Auftrag, DF: Durchfluss, W: Waschfraktion. **(B, C) Bindung von NKAB-mCD19 an NK- und Lymphomzellen.** Die Bindung von NKAB-mCD19 an **(B)** NKG2D/NKAR-exprimierende Effektorzellen und **(C)** mCD19-positive und -negative Tumorzellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrollen dienten ungefärbte oder lediglich mit Sekundäntikörper gefärbte Zellen.

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung wurde die durch NKAB-mCD19 vermittelte Zytotoxizität gegenüber murinen A20 Zellen in Kombination mit parentalen NK-92 und NKAR-NK-92 Zellen bei einem E:T Verhältnis von 5:1 untersucht. Dabei wurde die Zytotoxizität von beiden Effektor-Zelllinien in Abhängigkeit von der eingesetzten NKAB-mCD19 Konzentration gesteigert. Die zytotoxische Aktivität parentaler NK-92 Zellen gegenüber A20 Zellen war bei diesen Versuchen im

Ergebnisse

Vergleich zu der von NKAR-NK-92 Zellen sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von NKAB-mCD19 geringer ausgeprägt. Im Fall von NKAR-NK-92 Zellen wurde ab einer NKAB-mCD19 Konzentration von 50 ng/ml ein Plateau der spezifischen Lyse erreicht (**Abbildung 4.49**). Dies macht es wenig wahrscheinlich, dass mit höheren Konzentrationen eine weitere Steigerung der Aktivität erreicht werden kann.

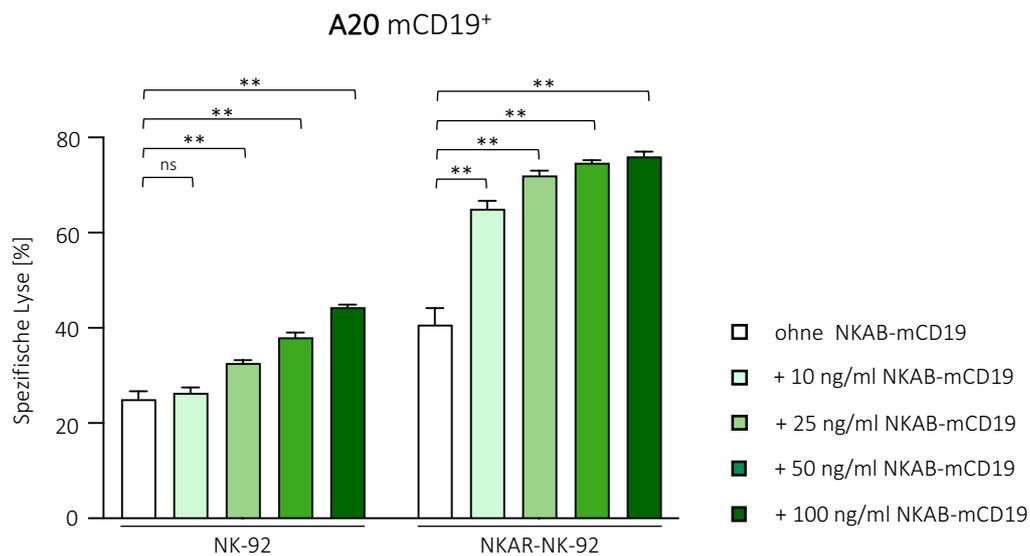


Abbildung 4.49. Zytotoxische Aktivität von NK-92 und NKAR-NK-92 Zellen in Kombination mit NKAB-mCD19 gegenüber mCD19-exprimierenden A20 Lymphomzellen. Die murine Lymphom-Zelllinie A20 wurde mit parental NK-92 und NKAR-NK-92 Zellen (Effektorzellen) in einem E:T Verhältnis von 5:1 in Gegenwart steigender NKAB-mCD19 Konzentrationen für 3 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die spezifische Lyse der Tumorzellen durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. ns: $p > 0,05$; **: $p < 0,01$.

Nachfolgend wurde der Einfluss von NKAB-mCD19 auf die Aktivität primärer humaner NK-Zellen von gesunden Spendern analysiert. Dabei wurde zunächst die Bindung des Moleküls an die Oberfläche der NKG2D-positiven primären NK-Zellen bestätigt (**Abbildung 4.50; A**). In darauf folgenden Zytotoxizitätsassays zeigte sich eine signifikante Steigerung der spezifischen Lyse mCD19-exprimierender A20 Zellen durch primäre NK-Zellen bei einem E:T Verhältnis von 20:1 in Anwesenheit von 50 ng/ml NKAB-mCD19 für alle drei untersuchten Spender (Donor 1: $18,1 \pm 1,3\%$; Donor 2: $13,8 \pm 0,3\%$; Donor 3: $46,8 \pm 0,2\%$). Die Zugabe von NKAB-CD19, das spezifisch an humanes CD19 bindet, hatte dagegen keinen Effekt (**Abbildung 4.50; B**). Abhängig vom individuellen Spender war die Zytotoxizität primärer NK-Zellen nach Aktivierung durch NKAB-mCD19 im Vergleich zu NKAR-NK-92 weniger ausgeprägt (**Abbildung 4.49**). Dies lässt sich durch die geringere NKG2D-Expression der Effektorzellen erklären.

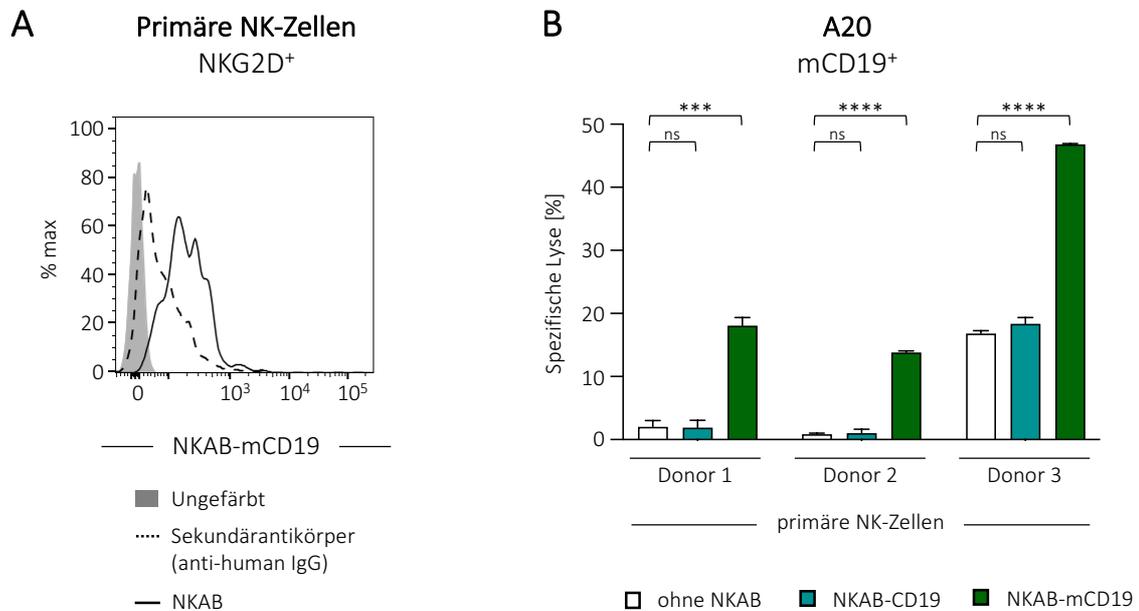


Abbildung 4.50. Funktionelle Analyse von NKAB-mCD19 in Kombination mit primären NK-Zellen. (A) Analyse der Bindung von NKAB-mCD19. Die Bindung von NKAB-mCD19 an NKG2D-positive primäre humane NK-Zellen eines repräsentativen gesunden Spenders wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrollen dienten ungefärbte oder lediglich mit Sekundärintikörper gefärbte Zellen. **(B) Zytotoxische Aktivität von primären NK-Zellen in Kombination mit NKAB-mCD19 gegenüber mCD19-exprimierenden murinen Lymphomzellen.** Die murine Lymphom-Zelllinie A20 wurde mit pNK-Zellen in einem E:T Verhältnis von 20:1 und 50 ng/ml (0,32 nM) NKAB-mCD19 inkubiert. Zum Vergleich wurde NKAB-CD19 eingesetzt. Nach 3 Stunden wurde die spezifische Lyse der Tumorzellen durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD dreier unabhängiger Experimente. ns: $p > 0,05$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

Zusammenfassung des Abschnitts 4.8

Abschnitt 4.8 beschreibt die Generierung eines NKAB-mCD19 Moleküls mit Spezifität für NKG2D und murines CD19. Neben der Bindung an seine Zielstrukturen vermittelte NKAB-mCD19 eine gesteigerte Zytotoxizität von parentalen und NKAR-modifizierten NK-92 Zellen sowie primären NK-Zellen gegenüber der mCD19-exprimierenden murinen Lymphom-Zelllinie A20. Entsprechend erscheint dieses Molekül geeignet, um in nachfolgenden Arbeiten Kombinationstherapien mit NKAB-mCD19 und NKAR-NK-92 Zellen in immunkompetenten Leukämie- und Lymphom-Mausmodellen zu untersuchen.

5 Diskussion

Während der Karzinogenese entwickeln maligne Zellen vielfältige Mechanismen, um sich der Immunüberwachung zu entziehen. Sie weisen zudem häufig eine hohe genetische Heterogenität auf, was die Identifizierung geeigneter Zielstrukturen für die Entwicklung von Krebsimmuntherapien erschwert. Darüber hinaus werden bestimmte Tumor-assoziierte Antigene auch in gesundem Gewebe exprimiert. Dies erhöht das Risiko von unerwünschten Nebenwirkungen bei Therapieansätzen mit Ausrichtung gegen diese TAAs. Eine vielversprechende Zielstruktur in der Immuntherapie stellen daher NKG2D-Liganden dar. Diese werden auf Krebszellen unterschiedlichster Tumorentitäten hochreguliert, während sie in der Regel nicht in gesundem Gewebe vorzufinden sind (Lanier, 2015). Der korrespondierende Rezeptor NKG2D wird von Immuneffektorzellen wie T- und NK-Zellen exprimiert und ermöglicht die Erkennung und Eliminierung NKG2D-L-positiver Zellen (Raulet, 2003). Allerdings können Krebszellen der NKG2D-vermittelten Immunüberwachung entkommen, indem sie die Expression von NKG2D-L auf der Zelloberfläche beispielsweise durch proteolytische Abspaltung herunterregulieren. Dies kann die Effektivität von Behandlungsansätzen, die auf NKG2D-L ausgerichtet sind, einschränken (Duan et al., 2019). Zur Überwindung solcher *Immune escape* Mechanismen wurden modulare Immuntherapeutika entwickelt, welche auf bi- und trispezifischen Antikörpern beruhen. Diese besitzen eine duale Bindungsfähigkeit und können somit gleichzeitig an Immuneffektor- und Tumorzellen binden und eine zielgerichtete Immunantwort initiieren. Aufgrund der breiten Anwendbarkeit, der für viele bisherige Moleküle bereits gezeigten Sicherheit in der Anwendung und der zunehmenden Bedeutung von NK-Zellen in der Krebsimmuntherapie gewinnt der Einsatz von bispezifischen und trispezifischen *Natural killer cell engagers* (NKCE), die natürliche Killerzellen durch Bindung an CD16 oder andere endogene NK-Zell-Rezeptoren wie NKG2D mit Krebszellen in Kontakt bringen, zunehmend an Interesse und klinischer Relevanz (Blunt & Khakoo, 2024; El-Khoueiry et al., 2023; Gauthier et al., 2023; Peipp et al., 2022; Phung et al., 2021). Unter anderem befinden sich derzeit zwei bispezifische *Engager* mit Spezifität für CD16 und EGFR (NCT04259450) oder CD123 (NCT05817058) in einer klinischen Phase I/II bzw. klinischen Phase I Studie. Auch trispezifische NKCEs, die neben NKG2D und CD16 ErbB2 (HER2) (NCT04143711), CD33 (NCT04789655) oder EGFR (NCT05597839) erkennen, werden in Phase I und I/II Studien auf ihre Wirksamkeit gegenüber hämatologischen und soliden Tumorerkrankungen geprüft (Vivier et al., 2024).

5.1 Kombination von NKG2D-CAR-exprimierenden NK-92 Zellen (NKAR-NK-92) und einem bispezifischen NKAB-Molekül (NKAB-ErbB2) als modularer Behandlungsansatz

In vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde ein bispezifischer Antikörper (NKAB-ErbB2) generiert, welcher durch eine duale Spezifität den aktivierenden Rezeptor NKG2D auf Immuneffektorzellen und das TAA ErbB2 auf Antigen-positiven Tumorzellen binden kann. Dabei ist das am N-Terminus befindliche NKG2D-spezifische scFv(Kyk2.0)-Antikörperfragment über eine Gelenkregion und die CH2- und CH3-Domänen eines IgG4-Antikörpers mit der ErbB2-spezifischen scFv(FRP5)-Bindungsdomäne verbunden. Disulfidbrücken in der Gelenkregion ermöglichen so die Dimerisierung zweier NKAB-Moleküle (C. Zhang et al., 2021). Das resultierende tetravalente Molekül vermittelte eine effiziente und spezifische Lyse Antigen-positiver Tumorzellen durch NKG2D-exprimierende Immuneffektorzellen. Zur möglichen Verstärkung der durch NKAB-Moleküle vermittelten Eliminierung von Tumorzellen wurde die klinisch relevante NK-Zelllinie NK-92 mit einem NKG2D-basierten CAR (NKAR) modifiziert und funktionell charakterisiert. Dieses NKAR-Molekül besteht aus der extrazellulären Domäne des NKG2D-Rezeptors (Aminosäuren 82-216), welche über einen $(G_4S)_2$ Linker und ein Myc-Tag an eine CD8 α -Gelenkregion und die Transmembran- und intrazelluläre Domäne von CD3 ξ geknüpft ist. Die durch endogene NKG2D-L oder NKAB-Moleküle vermittelte anti-Tumor Aktivität von NKAR-exprimierenden Effektorzellen war im Vergleich zu parentalen NK-92 Zellen, welche moderate Mengen an endogenem NKG2D exprimieren, stärker ausgeprägt. Dies lässt sich auf die höhere Expression des NKG2D-abgeleiteten CAR-Moleküls und auf Unterschiede in der Signaltransduktion der Rezeptoren zurückführen. Während im Fall von endogenem humanem NKG2D die Assoziation mit DAP10 für die Signaltransduktion notwendig ist, sind in dem in dieser Arbeit eingesetzten NKAR-Molekül die extrazelluläre Bindungsdomäne des NKG2D-Rezeptors und die intrazelluläre Signaltransduktionsdomäne von CD3 ξ in einem Molekül direkt verknüpft (C. Zhang et al., 2021). Darüber hinaus enthält DAP10 nur ein einzelnes YXNM-Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv, während die im NKAR enthaltene CD3 ζ Signaldomäne drei ITAMs trägt. Zusammen könnte dies zu einer schnelleren und verstärkten Signaltransduktion beitragen (Wu et al., 1999). NK-Zellen von Krebspatienten zeigen oft einen erschöpften Phänotyp mit verminderter NKG2D-Expression, der sich unter anderem auf die von Tumorzellen proteolytisch abgespaltenen, löslichen NKG2D-L (sNKG2D-L) und die nach deren Bindung an NKG2D einhergehende Internalisierung und/oder Degradation des Rezeptors zurückführen lässt (Judge et al., 2020; Song et al., 2006). Die ektopische Expression eines NKG2D-basierten CARs wie NKAR könnte einen solchen *Immune escape* Mechanismus möglicherweise überwinden. Verschiedene Studien zeigten zudem, dass durch Tumorzellen

sekretiertes TGF- β und durch Immunzellen produziertes IFN- γ die Oberflächenexpression von endogenem NKG2D auf Lymphozyten vermindert (Lee et al., 2004; Schwinn et al., 2009). Dies verdeutlicht die Relevanz eines stabil exprimierten Rezeptors in Form des NKAR weiter. Das Potenzial von NKG2D-exprimierenden Effektorzellen spiegelt sich auch durch bereits experimentell in der Klinik eingesetzte NKG2D-CAR-T-Zellen zur Behandlung verschiedener hämatologischer Malignitäten wider. Allerdings sind in diesem Zusammenhang auch Sicherheitsbedenken aufgetreten. In der KEYNOTE-B79-Phase-Ib-Studie mit allogenen NKG2D-CAR-T-Zellen, welche mit einem NKG2D-CAR ähnlich dem im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten NKAR-Molekül modifiziert wurden, traten bei Patienten mit kolorektalem Krebs (NCT04991948) fatale Nebenwirkungen auf (Sallman et al., 2023). Daraufhin wurde die Rekrutierung von Patienten eingestellt. Im Gegensatz zu T-Zellen weisen NK- und CAR-NK-Zellen, welche auch in einer allogenen Umgebung ohne Auslösung einer GvHD eingesetzt werden können, ein besseres Nebenwirkungsprofil auf (Liu et al., 2020; Maskalenko et al., 2022). Die Ergebnisse einer Pilotstudie mit Patienten mit kolorektalem Karzinom legen nahe, dass dieser Sicherheitsvorteil auch für NKG2D-CAR-modifizierte NK-Zellen gilt (Xiao et al., 2019).

In funktionellen *in vitro* Analysen war das bispezifische NKAB-ErbB2 Molekül in der Lage, sowohl endogen NKG2D-exprimierende primäre Immunzellen als auch mit einem NKAR modifizierte primäre T-Zellen oder NK-92 Zellen mit ErbB2-exprimierenden Tumorzellen zu vernetzen und dadurch die Lyse der malignen Zellen durch die Effektor-Lymphozyten zu induzieren. Zudem wurde in Zytotoxizitätsassays in Gegenwart von löslichem MICA (sMICA) als Modell für proteolytisch abgespaltene NKG2D-L festgestellt, dass selbst eine im Vergleich zu NKAB-ErbB2 100-fach höhere Konzentration an sMICA keinen Einfluss auf die NKAB-ErbB2 vermittelte zytotoxische Aktivität von NKAR-NK-92 Zellen hatte (C. Zhang et al., 2021). Weiterhin konnte die Effektivität einer NKAB/NKAR-basierten Kombinationstherapie in einem murinen *in vivo* Gliommodell nachgewiesen werden, bei welchem in einem Großteil der behandelten Tiere eine vollständige Abstoßung der Tumorzellen zu beobachten war. Zusammenfassend weisen diese Erkenntnisse auf einen vielversprechenden Behandlungsansatz hin, der sich vor allem bei Patienten als vorteilhaft erweisen könnte, die aufgrund von *Immune escape* Mechanismen wie der proteolytischen Abspaltung von NKG2D-L nicht auf eine allein auf NKG2D-basierende Immuntherapie ansprechen.

Zur weiteren Optimierung des Kombinationsansatzes wurden in dieser Arbeit NKAR-NK-92 Zellen durch die ektopische Expression des IL-15 Superagonisten RD-IL15 weiter modifiziert. In den dabei durchgeführten *in vitro* Untersuchungen zeigte der eingesetzte IL-15 Superagonist RD-IL15 nach Expression in NKAR-NK-92 Zellen eine Wirkung sowohl auf sekretierende Zellen selbst als auch auf umgebende primäre Immunzellen. Außerdem wurden neue NKAB-Moleküle mit Spezifität für

weitere Zielantigene zur Behandlung unterschiedlicher Tumorentitäten generiert und funktionell charakterisiert. Dabei wurde die Struktur der NKAB-Moleküle ursprünglich so gewählt, dass die Tumorspezifität durch den Austausch des entsprechenden scFv-Antikörperfragments flexibel angepasst werden kann. Um darüber hinaus die generelle Flexibilität des NKAB-Designs zu prüfen, wurden die Bindungsdomänen am N- und C-Terminus des prototypischen NKAB-ErbB2 Moleküls getauscht. Dabei wurden keine von der Anordnung der Bindungsdomänen abhängigen Unterschiede in der NKAB-vermittelten Eliminierung von ErbB2-exprimierenden Tumorzellen durch NKAR-NK-92 Zellen festgestellt (C. Zhang et al., 2021). Weitere Versuche zur Optimierung der NKAB-Moleküle und die erfolgreiche Erweiterung des NKAB-Repertoires durch den Austausch der Tumor-spezifischen Domäne bestätigt die hohe Flexibilität des Ansatzes. Die in dieser Arbeit erstmals generierten NKAB-Moleküle NKAB-EGFR, NKAB-CD19 und NKAB-CD20 waren in der Lage, die Lyse Antigen-exprimierender Zellen sowohl in Kombination mit NKAR-NK-92 Derivaten als auch primären NK-Zellen zu vermitteln. Zudem wurde untersucht, ob sich diese experimentelle Therapie dazu eignet, auch Tumorpopulationen mit heterogener Antigenexpression durch eine geeignete Kombination von NKAB-Molekülen gezielt zu beseitigen. Dabei führten NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR in Kombination zusammen mit NKAR-Effektorzellen zur Eliminierung von Tumormischkulturen.

5.2 Optimierung des prototypischen NKAB-ErbB2 Moleküls

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst untersucht, inwiefern das prototypische NKAB-ErbB2 Molekül (**Abbildung 4.11**) in seiner Funktion weiter optimiert werden kann. Dafür wurden die Positionen der NKG2D- und ErbB2-spezifischen Bindungsdomänen innerhalb des Moleküls und die Orientierung der variablen Domänen der leichten (V_L) und schweren (V_H) Antikörperketten innerhalb des scFv-Fragments getauscht (**Abbildung 4.14**). Die abgeleiteten Moleküle (NKAB-ErbB2, NKAB-ErbB2_2, NKAB-ErbB2 rev und NKAB-ErbB2 rev_2) ließen sich in vergleichbaren Mengen in Expi293F Zellen produzieren und aus dem Kulturüberstand aufreinigen. Zudem wurde in Immunoblot-Analysen der gereinigten Moleküle festgestellt, dass diese vorwiegend als Dimere und nur zu einem geringen Anteil als Monomere vorlagen (**Abbildung 4.15**). In Durchflusszytometer-basierten Bindungsassays wurde zudem bestätigt, dass alle Moleküle sowohl NKG2D auf NK-Zellen als auch ErbB2 auf Tumorzellen binden können (**Abbildung 4.16**). Die Berechnung der $\Delta MFIs$ deuten jedoch darauf hin, dass NKAB-Moleküle mit $V_H V_L$ -Orientierung innerhalb der scFv(Kyk2.0)-Domäne schlechter an NKAR/NKG2D auf NKAR-NK-92 Zellen binden (**Abbildung 4.16**). Diese Unterschiede wirkten sich allerdings in nachfolgenden Zytotoxizitätsassays nicht aus, in denen die NKAB-vermittelte Lyse von MDA-MB453 Zellen in Anwesenheit aller NKAB-ErbB2 Varianten vergleichbar war (**Abbildung 4.17**). Prinzipiell ist eine hohe Affinität von Antikörpermolekülen nicht immer

gleichbedeutend mit einer verbesserten Wirkung. So weisen Untersuchungen in *in vitro* und *in vivo* Modellen darauf hin, dass eine hohe Bindungsstärke unter Umständen zu einer verminderten Selektivität führt und sich der jeweilige Antikörper mit einer höheren Wahrscheinlichkeit auch an seine Zielstruktur auf gesundem Gewebe anlagert (Mazor et al., 2015, 2017). Zusätzlich kann eine starke Antikörperbindung mit einhergehender reduzierter Dissoziationsrate die Anhäufung eines Antikörpers in der Tumorperipherie bewirken, auch bekannt als *Binding site barrier* (Beckman et al., 2007). Dies wurde beispielsweise in *in vivo* Studien mit Radionuklid-gekoppelten Antikörpern mit variierender Affinität für ErbB2 gezeigt, in denen Antikörper mit geringerer Affinität vermehrt in das Tumorgewebe penetrierten, während sich Antikörper mit höherer Affinität hauptsächlich in der Peripherie ansammelten (Adams et al., 2001; Rudnick et al., 2011). Diese Beobachtungen sind vor allem von Relevanz für die Wahl der passenden Tumor-bindenden Domäne. Aber auch eine hohe Affinität gegenüber NKG2D kann unter Umständen mit Nachteilen verbunden sein. So erscheint es denkbar, dass sich NKAB-Moleküle aufgrund einer zu starken Bindung nicht von Effektorzellen lösen und NKG2D dauerhaft blockieren, sodass eine zusätzlich mögliche Interaktion mit NKG2D-L verhindert wird. Auch könnte dies, wie für lösliche Liganden beobachtet, die Internalisierung oder Degradation des Rezeptors bewirken. Zusammenfassend zeigten die hier erhaltenen Ergebnisse, dass das Format der bispezifischen NKAB-Moleküle ein hohes Maß an Flexibilität aufweist. Um durch den Einsatz des hier bearbeiteten Kombinationsansatzes möglicherweise auch eine endogene Immunantwort im Patienten zu fördern, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, das immunmodulatorische Zytokin IL-15 in Form des IL-15 Superagonisten RD-IL15 in das System zu integrieren.

5.3 Steigerung der anti-Tumor Aktivität von Immunzellen durch RD-IL15

5.3.1 Die Rolle von IL-15 in der Krebsimmuntherapie

Zytokine spielen eine zentrale Rolle in der Kommunikation zwischen Immunzellen und kontrollieren somit eine Vielzahl von Effektorfunktionen. IL-15 ist ein pleiotropes Zytokin, welches wie IL-2 zur *common γ chain* (γ c) Familie gehört und unter anderem die Entwicklung und Aktivierung von NK-Zellen und die Proliferation und das Überleben von T-Zellen fördert (Burton et al., 1994; Grabstein et al., 1994; Tagaya et al., 1996). Aufgrund seiner immunstimulatorischen Wirkung wurde das verwandte IL-2 erstmals als Monotherapie für die Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem metastasierendem Nierenzellkarzinom und Melanom eingesetzt (Fyfe et al., 1995; Rosenberg et al., 1994). Jedoch wurden dabei nur moderate Effekte erzielt. Neben einer Schwächung der Immunantwort aufgrund der stimulatorischen Wirkung von IL-2 auf T_{reg} Zellen ist die IL-2 Therapie aufgrund der hohen Dosierung auch teilweise mit schwerwiegenden Nebenwirkungen wie einem Kapillar-

lecksyndrom oder einem Lungenödem verbunden (Shah et al., 2021). Darüber hinaus liegt die Halbwertszeit von IL-2 *in vivo* im Bereich von Minuten (Konrad et al., 1990; Lotze et al., 1985). Um die Limitierungen einer IL-2 basierten Immuntherapie zu überwinden, wurden weitere Zytokine hinsichtlich ihres Nutzens für die Krebstherapie untersucht. Aufmerksamkeit erregte dabei das IL-2 in seiner Struktur und Funktion ähnliche Zytokin IL-15 (Budagian et al., 2006). Im Gegensatz zu IL-2 weist IL-15 ein besseres Sicherheitsprofil und ein vorteilhaftes Wirkspektrum auf. So wurde in Patienten nach IL-15 Therapie kein Kapillarlecksyndrom beobachtet. Auch der Einfluss von IL-15 auf die Expansion von regulatorischen T-Zellen und den AICD (*Activation-induced cell death*) ist im Vergleich zu IL-2 weniger ausgeprägt (Waldmann et al., 2011; Zhou et al., 2022).

Obwohl in einer ersten klinischen Phase I Studie nach systemischer Bolusinjektion von rekombinantem IL-15 in Patienten mit metastasierendem Nierenzellkarzinom oder Melanom vielversprechende Ergebnisse wie beispielsweise eine gesteigerte Zahl an CD8-positiven Gedächtniszellen und NK-Zellen beobachtet wurde, war die IL-15 vermittelte anti-Tumor Wirkung nur gering (Conlon et al., 2015). Daher zielen neuere Strategien auf eine Optimierung des IL-15 Moleküls mit verbesserter Pharmakokinetik ab. Dabei wurden IL-15-basierte Behandlungsansätze um IL-15-Superagonisten erweitert, welche in präklinischen Modellen zu einer gesteigerten anti-Tumor Wirkung des Zytokins beitragen und in klinischen Studien vielversprechende Ergebnisse zeigten. Ein solcher IL-15 Superagonist (ANKTIVA, N-803) wurde vor Kurzem zur Behandlung von nicht-muskulinvasivem Harnblasenkarzinom durch die FDA zugelassen (siehe nachfolgenden Abschnitt 5.3.2) (Guo et al., 2017; ImmunityBio, 2024)

5.3.2 Der optimierte IL-15 Superagonist RD-IL15

Wie oben aufgeführt, zeigte die Behandlung von Krebspatienten mit rekombinantem IL-15 nur geringe therapeutische Effekte, was sich unter anderem auf die kurze Halbwertszeit des IL-15 Moleküls von etwa 2,5 Stunden zurückführen lässt (Atallah-Yunes & Robertson, 2022; Conlon et al., 2015). Maßgeblich an der Stabilität von IL-15 beteiligt ist die Rezeptoruntereinheit IL-15R α , die bereits im endoplasmatischen Retikulum von IL-15 produzierenden Zellen einen Komplex mit IL-15 bildet und als solcher an die Oberfläche transportiert wird (Jabri & Abadie, 2015; Knudson et al., 2020). Die Präsentation des IL-15/IL-15R α -Komplexes erfolgt anschließend in membrangebundener Form (Waldmann, 2006). Abgeleitet von der natürlichen Transpräsentation des Zytokins IL-15 wurden IL-15/IL-15R α -Fusionsproteine, auch bezeichnet als IL-15 Superagonisten, entwickelt. Aufgrund ihres strukturellen Aufbaus weisen IL-15 Superagonisten vielversprechende Vorteile gegenüber monomerem IL-15 auf, wie beispielsweise die Aufrechterhaltung hoher IL-15 Konzentrationen

nach *in vivo* Applikation bedingt durch eine verlängerte Halbwertszeit von etwa 12 Stunden wie in Rhesusaffen gezeigt (Bergamaschi et al., 2018). Eine weitere Modifikation erfolgte bei der Generierung des IL-15-Superagonisten N-803 (ehemals ALT-803), welcher sich aus der für die Zytokinbindung relevanten Sushi-Domäne des IL-15R α (IL-15R α_{31-107}), einer IL-15-Mutante (IL-15_{N72D}) und der IgG1-Fc Domäne zusammensetzt. Die veränderte Aminosäuresequenz, bei welcher Asparagin an Position 72 durch Aspartat ersetzt ist, vermittelt eine gesteigerte Bioaktivität bedingt durch eine erhöhte Bindungsaffinität zum IL-15-*Intermediate affinity*-Rezeptor auf der Oberfläche von Effektor T-Zellen, T-Gedächtniszellen und NK-Zellen (Bergamaschi et al., 2012; Zhu et al., 2009). In einer klinischen Phase I Studie (NCT01885897) konnte N-803 noch 7 Tage nach subkutaner Injektion im Serum von Patienten nachgewiesen werden und eine gesteigerte Aktivierung, Proliferation und Expansion von NK-Zellen und CD8⁺ T-Zellen hervorrufen. Die Proliferation von regulatorischen T-Zellen wurde nicht beeinflusst (Romee et al., 2018). Zudem wurde bei der Behandlung von fortgeschrittenen soliden Tumorerkrankungen ein Anstieg der Zahl an NK-Zellen nach Injektion von N-803 in Patienten mit einem Melanom, Nierenkarzinom, Kopf-Hals-Tumor oder Lungenkarzinom beobachtet (NCT01727076) (Margolin et al., 2018). Auch in einer klinischen Phase II/III Studie zur Behandlung von nicht-muskelinvasivem Harnblasenkarzinom (NCT03022825) konnte durch den Einsatz von N-803 in Kombination mit BCG (Bacille Calmette-Guérin) in 71% der behandelten Patienten ein *Complete Response* von durchschnittlich 26,6 Monaten Dauer erzielt werden (Chamie et al., 2022). Dies resultierte in der Zulassung der Kombinationstherapie durch die FDA (ImmunityBio, 2024). Beruhend auf den vielversprechenden klinischen Daten des IL-15 Superagonisten N-803 wurde in unserer Arbeitsgruppe der Einfluss des IL-15 Superagonisten RD-IL15 auf NK-Zellen und umliegende Immunzellen untersucht (Bodden et al., 2023). RD-IL15 setzt sich wie N-803 aus der Sushi-Domäne des IL-15R α (IL-15R α_{31-107}) und IL-15_{N72D} zusammen, enthält jedoch keine Fc-Domäne (**Abbildung 1.5**). In ersten *in vitro* Versuchen wurde RD-IL15 in GD2-spezifischen CAR-NK-92 Zellen koexprimiert und in den Überstand sekretiert. Dabei ermöglichte RD-IL15 das Wachstum der Produzentenzellen in Abwesenheit von IL-2 und stimulierte zudem in parakriner Weise die Proliferation und Zytotoxizität benachbarter Immunzellen. Aufgrund der immunmodulatorischen Wirkung von RD-IL15 und seines Beitrags zum Überleben von NK-92 Zellen wurde der IL-15 Superagonist in dieser Arbeit auch in das modulare NKAB/NKAR-System integriert.

5.3.3 Generierung von NKAB-Molekülen mit RD-IL15-Domäne

Einer der in dieser Arbeit verfolgten Ansätze das NKAB/NKAR-System mit RD-IL15 zu erweitern, beruhte auf der Verknüpfung der RD-IL15 Domäne mit der N-terminalen NKG2D-Bindungsdomäne des prototypischen NKAB-ErbB2 Moleküls über einen kurzen Peptidlinker (RD-IL15-NKAB-ErbB2) (**Abbildung 4.18**). Dieser Ansatz ähnelt den sogenannten TriKE (*Trispecific NK cell engager*) Molekülen, welche neben einer CD16- und Tumorantigen-bindenden Domäne zusätzlich eine IL-15-Domäne integrieren (Arvindam et al., 2018; Vallera et al., 2016). Die Effektivität eines solchen Moleküls mit Spezifität für CD16 und CD33 konnte beispielweise in *in vitro* Assays gezeigt werden, in denen das trispezifische Molekül im Vergleich zu dem entsprechenden bispezifischen Molekül ohne IL-15-Domäne zu einer gesteigerten Zytokinproduktion, Zytotoxizität und Degranulation von NK-Zellen gegenüber einer CD33-positiven AML-Zelllinie beitrug sowie ein verbessertes Überleben und eine erhöhte Proliferation der primären NK-Zellen induzierte (Vallera et al., 2016). Darüber hinaus förderte der Einsatz von TriKEs in präklinischen Tiermodellen die anti-Tumor Antwort von humanen NK-Zellen sowohl gegenüber systemisch applizierten humanen AML-Zellen als auch Ovarialkarzinom-Zellen, die intraperitoneal verabreicht wurden (Vallera et al., 2016, 2020). Basierend auf diesen Beobachtungen wurde in dieser Arbeit überprüft, ob das RD-IL15-NKAB-ErbB2 Molekül ebenfalls zu einer gesteigerten Effektorfunktion von NK-92 Zellen beitragen kann. Sowohl in seiner Fähigkeit, an NKG2D und ErbB2 zu binden, als auch der Vermittlung der Lyse von ErbB2-exprimierenden Tumorzellen durch NKAR-NK-92 Zellen, war das neu generierte Molekül mit dem prototypischen NKAB-ErbB2 Molekül vergleichbar (**Abbildung 4.19**). Allerdings zeigte sich in einem Proliferationsassay, dass RD-IL15-NKAB-ErbB2 den Entzug von IL-2 im Wachstumsmedium nicht vollständig kompensieren konnte. Im Vergleich zu NK-92 Zellen, die in Medium mit IL-2 kultiviert wurden, war bei Zellen, die nur mit dem RD-IL15-NKAB-Molekül supplementiert wurden, eine verringerte Proliferation zu beobachten (**Abbildung 4.20; C**). Eine naheliegende Erklärung wäre eine fehlende biologische Aktivität des Moleküls. Jedoch konnte diese in einer Immunoblot-Analyse bestätigt werden. Dabei war in Zelllysaten von RD-IL15-NKAB-ErbB2-stimulierten NKAR-NK-92 Zellen, die in Abwesenheit von IL-2 und IL-15 kultiviert wurden, eine Phosphorylierung von STAT5 detektierbar. Dies weist eine durch RD-IL15 vermittelte Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs nach (**Abbildung 4.20; A**). Daher ist es wahrscheinlicher, dass die eingesetzte Konzentration im Proliferationsassay nicht ausreichend war, um einen mit IL-2 vergleichbaren Effekt zu erzielen. In der Tat waren die in diesen Experimenten gewählten Stoffmengen von IL-2 (0,4 nM) und RD-IL15-NKAB-ErbB2 (0,1 nM) unterschiedlich. Zudem wäre es möglich, dass RD-IL15-NKAB-ErbB2 in diesem Versuchsansatz durch die Bindung an NKG2D/NKAR auf NKAR-NK-92 Zellen keine RD-IL15 vermittelte Wirkung entfalten kann, wodurch der Effekt des RD-IL15-NKAB im Vergleich zu IL-2 schwächer

ausfällt. Neben dem vorteilhaften immunstimulatorischen und antitumoralen Effekt von IL-15, birgt die systemische Gabe des Zytokins in hohen Dosierungen jedoch auch das Risiko einer Toxizität aufgrund einer ausgelösten Entzündungsreaktion. Daher wurde in dieser Arbeit als Alternative zu RD-IL15-NKAB-ErbB2 ein weiterer Ansatz entwickelt, der auf der Sekretion von RD-IL15 durch CAR-modifizierte NK-92 Zellen beruht.

5.3.4 Generierung von RD-IL15-exprimierenden CAR-NK Zellen

Für die Generierung von RD-IL15 sekretierenden NKAR-NK-92 Zellen wurde die bereits publizierte NKAR-Sequenz (C. Zhang et al., 2021) über eine P2A-Schnittstelle mit der Sequenz von RD-IL15 verknüpft und in das Transferplasmid pSIEW eingebracht (pS-NKAR-RD-IL15-IEW) (**Abbildung 4.1**). Anschließend erfolgte die Transduktion von NK-92 Zellen mit entsprechenden lentiviralen Vektorpartikeln. NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie-basierter Zellsortierung anhand des Markerproteins angereichert, und die NKAR-Expression von NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen durchflusszytometrisch (NKG2D und EGFP-Expression) und mit Hilfe einer Immunoblot-Analyse (CD3 ξ) vergleichend untersucht (**Abbildung 4.3**). Erwartungsgemäß wurde im Fall von NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen ein im Vergleich zur parentalen NK-92 Zelllinie gesteigertes NKG2D-Signal festgestellt, was sich auf die Expression der CAR-Konstrukte zurückführen lässt. Dies bestätigte sich auch durch die Expression des Markerproteins EGFP in modifizierten NK-92 Zellen. Auch wenn die NKG2D- und EGFP-Signale in durchflusszytometrischen Analysen zwischen den Zell-Derivaten vergleichbar waren, wurden in Immunoblot-Analysen leichte Unterschiede in der Menge an NKAR Gesamtprotein festgestellt. Abgesehen von der Bande von endogen exprimierten CD3 ξ -CD3 ξ Homodimeren waren die NKAR Homo- und NKAR-CD3 ξ Heterodimeren entsprechenden Banden in RD-IL15 sekretierenden NKAR-NK-92 Zellen etwas schwächer ausgeprägt. In nachfolgenden funktionellen Analysen in Form von *in vitro* Zytotoxizitätsassays zeigten beide NKAR-NK-92 Derivate dennoch eine vergleichbare natürliche Zytotoxizität gegenüber K562 Zellen, eine ähnliche NKAR-vermittelte Zytotoxizität gegen NKG2D-L positive MDA-MB468 Mammakarzinomzellen und eine gleichwertige NKAB-vermittelte Zytotoxizität gegenüber ErbB2-exprimierenden MDA-MB453 Mammakarzinomzellen (**Abbildung 4.4, Abbildung 4.13**).

5.3.5 Autokrine Wirkung von ektopisch exprimiertem RD-IL15

Wie auch bei primären NK-Zellen ist das Wachstum und Überleben der immortalisierten Zelllinie NK-92 abhängig von Zytokinen (Romee et al., 2014). Generell erfolgt die Kultivierung von NK-92 Zellen dabei mit IL-2, wobei die Zellen innerhalb weniger Tage nach Zytokin-Entzug eingeschränkte Effektorfunktionen und eine gesteigerte Apoptose aufweisen (Klingemann, 2023; Nowakowska et al., 2018; Zhang et al., 2008). Um die Abhängigkeit von exogen zugeführtem IL-2 zu umgehen, wurden bereits NK-92 Derivate wie beispielsweise NK-92MI Zellen generiert, welche humanes IL-2 selbst produzieren und somit unabhängig von einer exogenen Zytokin-Supplementierung sind (Tam, Maki, et al., 1999). Gleichbleibende Effektorfunktionen und eine uneingeschränkte Proliferation von NK-92 Zellen konnten außerdem erzielt werden, wenn IL-2 im Kulturmedium durch IL-15 ersetzt wurde (Törnroos et al., 2019). Frühere Arbeiten unserer Gruppe zeigten darüber hinaus, dass auch genetisch modifizierte NK-92 Zellen mit ektopischer IL-15 oder RD-IL15 Expression unabhängig von exogenen Zytokinen sind (Bodden et al., 2023; Sahm et al., 2012). Entsprechend wurde nach dem Nachweis von RD-IL15 im Kulturüberstand von NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen auch die autokrine Wirkung des IL-15 Superagonisten analysiert.

Für die Quantifizierung des von modifizierten NK-92 Zellen sekretierten RD-IL15 wurde ein ELISA mit konditioniertem Kulturüberstand durchgeführt. Dafür wurde zunächst ein Expressionsplasmid generiert, welches die Produktion von rekombinantem RD-IL15 in Expi293F Zellen ermöglichte (**Abbildung 4.5**). Das aufgereinigte Protein wurde anschließend für die Erstellung einer Standardkurve verwendet. Während von NKAR-NK-92 Zellen erwartungsgemäß kein RD-IL15 sekretiert wurde, konnte bei NKAR-RD-IL-15-NK-92 Zellen in Abhängigkeit von der Zellzahl ein linearer Anstieg der RD-IL15 Konzentration detektiert werden (**Abbildung 4.6**). Beachtenswert ist zudem, dass RD-IL15 auch an den IL-2R β / γ c Komplex bindet. Dies wurde bereits in vorherigen Arbeiten der Gruppe durch die Oberflächenfärbung von IL-15 auf RD-IL15 sekretierenden CAR-NK-92 Zellen gezeigt (Bodden et al., 2023). Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass höhere Mengen an RD-IL15 von NKAR-RD-IL15-Zellen sekretiert werden, ein Teil davon jedoch nicht in den Überstand übergeht, sondern von den NK-Zellen selbst aufgebraucht wird. Nach dem Nachweis von RD-IL15 im Zellkulturüberstand wurde nachfolgend untersucht, inwiefern das sekretierte RD-IL15 biologisch aktiv ist und seine stimulatorische Wirkung auf produzierende NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen entfalten kann. Dafür wurde die Aktivierung des nachgeschalteten JAK/STAT-Signalwegs in einer Immunoblot-Analyse untersucht. Durch die Bindung von RD-IL15 an den *Intermediate affinity*-Rezeptor werden die Januskinasen JAK1 und JAK3 aktiviert, die entweder mit der IL-2/IL15R β - (JAK1) oder γ c-Untereinheit (JAK3) interagieren. Dies führt zur Rekrutierung des Transkriptionsfaktors STAT5 und dessen

Phosphorylierung. STAT5 ist der maßgebliche Regulator für die Entwicklung, Reifung, Funktion und das Überleben von NK-Zellen (Gotthardt et al., 2019). Im Anschluss an die Phosphorylierung erfolgt die Ausbildung von STAT5 Dimeren und deren Translokation in den Zellkern, wo sie durch die Bindung an ihre Zielsequenzen Einfluss auf die Genexpression nehmen (**Abbildung 4.7; A**) (Yang & Lundqvist, 2020). Durch den Nachweis von pSTAT5 in NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen können dementsprechend Erkenntnisse hinsichtlich der biologischen Aktivität von RD-IL15 und der autokrinen Stimulation der Produzentenzellen gewonnen werden. Während pSTAT5 nicht in Lysaten von NKAR-NK-92 Zellen, die in Abwesenheit von IL-2 kultiviert wurden, detektiert werden konnte, war ein deutlicher Anstieg von phosphoryliertem STAT5 in NKAR-RD-IL15-NK-92 Lysaten zu erkennen (**Abbildung 4.7; B**). Auch in Proliferations- und Vitalitätsassays, in denen NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen ohne IL-2 kultiviert wurden, konnte die biologische Aktivität von sekretiertem RD-IL15 bestätigt werden. Während NKAR-NK-92 Zellen in Abwesenheit von IL-2 eine verminderte Proliferation und Vitalität aufwiesen, waren diese bei NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen kultiviert ohne IL-2 mit denen von NKAR-NK-92 Zellen in IL-2-haltigem Kulturmedium vergleichbar (**Abbildung 4.8**). Sowohl die Immunoblot-Analyse als auch der Proliferations- und Vitalitätsassay zeigten, dass NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen durch die ektopische Expression von RD-IL15 das Fehlen von exogen zugeführtem IL-2 oder IL-15 kompensieren können. In einer früheren Arbeit wurde beschrieben, dass eine langanhaltende *in vitro* Stimulation mit rekombinantem IL-15 zur Erschöpfung von primären NK-Zellen führen kann (Felices et al., 2018). Ein solcher Effekt wurde in Arbeiten unserer Gruppe anhand der Analyse von Oberflächenmarkern auf RD-IL15 sekretierenden CAR-NK-92 Zellen nicht festgestellt (Bodden et al., 2023; Kiefer et al., 2024). Unterschiedliche Parameter können auf einen dysfunktionalen Phänotyp von NK-Zellen hindeuten, so zum Beispiel eine reduzierte IFN- γ , Granzym B oder TNF α Expression (Judge et al., 2020) sowie eine veränderte Oberflächenexpression von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren und Liganden. Für die Charakterisierung eines möglicherweise durch RD-IL15 vermittelten erschöpften Phänotyps wurde dabei unter anderem die Expression von NKp30 und NKG2D/NKAR (aktivierend) sowie TIGIT (inhibierend) überprüft. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede in den Expressionsniveaus zwischen NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen festgestellt (Kiefer et al., 2024). Auch in weiteren Versuchen der Arbeitsgruppe, in denen RD-IL15 sekretierende GD2-spezifische CAR-NK-92 Zellen zusätzlich vor der Analyse mit der MHC-I negativen Zielzelllinie K562 oder GD2-positiven Lymphomzellen koinkubiert wurden, wurde keine gesteigerte Expression von inhibierenden Oberflächenrezeptoren und Liganden beobachtet (Bodden et al., 2023). Interessanterweise wurde in beiden Fällen dagegen eine signifikant niedrigere Oberflächenexpression des inhibitorischen Moleküls NKG2A auf RD-IL15 sekretierenden Zellen nachgewiesen. Auch zeigten NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen eine mit NKAR-NK-92 Zellen vergleichbare natürliche und CAR-vermittelte Zytotoxizität gegenüber unterschiedlichen Tumor-Zell-

linien in An- oder Abwesenheit von NKAB-Molekülen, was ebenfalls gegen einen erschöpften Phänotyp ausgelöst durch die Stimulierung mit RD-IL15 spricht (**Abbildung 4.4; A und B, Abbildung 4.13; B**).

IL-15 hat als proinflammatorisches Zytokin einen nachweislichen Effekt auf die Proliferation und das Überleben von CD8⁺ T-, NKT-, $\gamma\delta$ T- und NK-Zellen (Becknell & Caligiuri, 2005; Lodolce et al., 2002). Daneben wurde aber auch in *in vitro* Versuchen ein wachstumsfördernder Einfluss auf IL-15 Rezeptor-exprimierende maligne Zellen, bspw. Leukämie- und Myelom-Zellen, festgestellt (Tinhofer et al., 2000; Yamada et al., 1998). Ähnliche Erkenntnisse wurden in *in vivo* Studien gewonnen, in denen unter anderem rekombinantes, humanes IL-15 die Proliferation humaner Melanomzellen steigerte oder die Überexpression von löslichem, murinem IL-15 die Entstehung einer fatalen lymphatischen Leukämie förderte (Barzegar et al., 1998; Fehniger et al., 2001). Solche schwerwiegenden Effekte wurden beim Einsatz von IL-15 oder N-803 im Menschen allerdings bisher nicht beobachtet. Jedoch führte der IL-15-Superagonist N-803 bei kontinuierlicher systemischer Gabe in Kombination mit einer allogenen NK-Zell Transplantation zu einer Aktivierung von CD8⁺ Empfänger-T-Zellen, die die Abstoßung der Spender-NK-Zellen begünstigte (Berrien-Elliott et al., 2022). Der in dieser Arbeit verfolgte Ansatz der Koexpression von NKAR und RD-IL15 bietet im Gegensatz zur systemischen Gabe von IL-15 oder einem IL-15 Superagonisten den Vorteil, dass RD-IL15 durch NKAR-NK-92 Zellen nur lokal begrenzt und wahrscheinlich in vergleichsweise geringer Menge sekretiert wird, sodass das Risiko einer Überstimulierung unterschiedlicher Immunzellen deutlich reduziert ist. Des Weiteren werden NK-92 Zellen in klinischen Studien zur Vermeidung von sekundären Lymphomen bestrahlt, wodurch ihre Proliferation gehemmt und ihre Zytotoxizität und Zytokinsekretion zeitlich begrenzt ist (Maki et al., 2004; Navarrete-Galvan et al., 2022). Unsere Gruppe zeigte in einer früheren Arbeit, dass die Zahl an lebensfähigen ErbB2-spezifischen CAR-NK-92 Zellen (NK-92/5.28.z) nach einer Bestrahlung mit 10 Gy schrittweise abnahm und diese nach 5 Tagen nicht mehr nachweisbar waren (Schönfeld et al., 2015). Auch bei dem Einsatz bestrahlter NK-92/5.28.z Zellen in der CAR2BRAIN Phase I Studie wurden keine Hinweise auf eine Langzeitpersistenz der CAR-NK-92 Zellen festgestellt (Burger et al., 2023). Da auch NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen bei einem klinischen Einsatz bestrahlt werden müssten und somit in ihrer Persistenz begrenzt wären, ließen sich mögliche RD-IL15 vermittelte Nebenwirkungen durch Aussetzen der Therapie wohl rasch kontrollieren.

Neben vielversprechenden Ergebnissen in präklinischen Mausmodellen zur Behandlung von primären und metastasierenden Krebserkrankungen, in denen durch die Gabe von IL-15 eine erhöhte antitumorale Aktivität von NK-Zellen ausgelöst und ein verlängertes Überleben erzielt werden konnte (Gillgrass et al., 2014; Gillgrass et al., 2015; Kobayashi et al., 2005; Zhang et al., 2009), wurden auch in einer klinischen Phase I/II Studie (NCT03056339) durch die Koexpression von IL-15 in

primären CAR-NK Zellen beeindruckende Therapieerfolge erzielt. Dabei führte die Behandlung CD19-positiver B-Zell-Malignitäten mit IL-15 sekretierenden CD19-spezifischen CAR-NK Zellen zu hohen Ansprechraten und vollständigen Remissionen, während keine IL-15-bedingten schwerwiegenden Nebenwirkungen verzeichnet wurden. Interessanterweise konnten CAR-exprimierende NK-Zellen bis zu einem Jahr nach der Behandlung in überlebenden Patienten nachgewiesen werden, was sich wahrscheinlich vor allem auf das von den transplantierten NK-Zellen produzierte IL-15 zurückführen lässt (E. Liu et al., 2020; Marin et al., 2024).

5.3.6 Parakrine Wirkung von RD-IL15 auf benachbarte Immunzellen

Aus vorangegangenen Arbeiten unserer Gruppe ist bereits bekannt, dass NK-92 Zellen nicht nur eine direkte zytolytische Aktivität gegenüber Tumorzellen aufweisen, sondern durch die Sekretion von Zytokinen auch immunmodulatorische Effektorfunktionen ausüben und damit eine endogene Immunantwort gegen Tumoren auslösen oder unterstützen können (Zhang et al., 2016). Folglich könnten auch IL-15-exprimierende NK-92 Zellen die anti-Tumor Aktivität umliegender Immunzellen weiter fördern. Um zu überprüfen, ob sekretiertes RD-IL15 neben der autokrinen Stimulation auch einen Einfluss auf benachbarte Immunzellen hat, wurden Transwell-Assays durchgeführt, in denen primäre humane Lymphozyten getrennt durch eine Membran mit NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen kultiviert wurden. Dabei wurde der Effekt von sekretiertem RD-IL15 sowohl auf das proliferative Potenzial von CD8-positiven T-Zellen als auch die Zytotoxizität von PBMCs untersucht.

Für den Transwell-basierten Zytotoxizitätsassay wurden PBMCs eines gesunden Spenders isoliert und ohne direkten Zell-Zell-Kontakt mit NKAR-RD-IL15-NK-92 oder NKAR-NK-92 Zellen kultiviert. Anschließend wurde die NK-Zell-sensitive Leukämie-Zelllinie K562 zu den stimulierten PBMCs gegeben und die spezifische Lyse bestimmt. PBMCs, die in Anwesenheit von RD-IL15 sekretierenden NKAR-NK-92 Zellen kultiviert wurden, zeigten dabei im Vergleich zu unstimulierten Zellen und mit NKAR-NK-92 inkubierten PBMCs eine signifikant gesteigerte Zytotoxizität gegenüber K562 Zellen. Zwischen RD-IL15 und mit rekombinantem IL-15 stimulierten PBMCs wurde hingegen kein signifikanter Unterschied beobachtet (**Abbildung 4.9; B**). Diese Ergebnisse zeigen, dass von NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen sekretiertes RD-IL15 in der Lage ist, PBMCs in parakriner Weise zu stimulieren und ihre Effektorfunktionen zu verstärken. Dabei lässt sich die Lyse der Tumorzellen vor allem auf primäre NK-Zellen innerhalb der PBMCs zurückführen, welche durch die Abwesenheit von MHC-Klasse-I Molekülen auf der Oberfläche von K562 Zellen entsprechend der *Missing self*-Hypothese aktiviert werden.

In einer gemischten Lymphozytenreaktion (GLR) wurde der Effekt von sekretiertem RD-IL15 auf die Proliferation von CD8-positiven T-Zellen analysiert. Dazu wurden PBMCs zweier gesunder Spender isoliert. Effektorzellen wurden für die Nachverfolgung ihrer Proliferation mit CFSE gefärbt, während Stimulatorzellen nach einer CD3-Depletion bestrahlt wurden. Anschließend wurden die Zellen gemischt, in Transwelleinsätze ausgesät und mit NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen für 7 Tage kokultiviert (**Abbildung 4.10; A**). Als Kontrollen dienten unstimulierte PBMCs, PBMCs kultiviert mit NKAR-NK-92 Zellen oder rekombinantem IL-15, und entsprechende Ansätze mit Stimulatorzellen. Sowohl unstimulierte und durch allogene Zellen stimulierte, als auch mit NKAR-NK-92 Zellen kokultivierte CD8-positiv T-Zellen proliferierten kaum. Durch die Sekretion von RD-IL15 durch NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen stieg der prozentuale Anteil proliferierender CD8⁺ T-Zellen gegenüber der Kokultur mit NKAR-NK-92 Zellen signifikant an. Auch wenn dieser Effekt durch die Anwesenheit von allogenen Stimulatorzellen zusätzlich verstärkt wurde, machen diese Beobachtungen dennoch deutlich, dass die Proliferation von CD8-positiven T-Zellen durch sekretiertes RD-IL15, selbst in Abwesenheit eines durch Stimulatorzellen vermittelten weiteren Aktivierungssignals, positiv beeinflusst wird. Zwischen CD8-positiven T-Zellen, welche in Anwesenheit von allogenen Zellen zusammen mit rekombinantem IL-15 oder mit von NK-Zellen sekretierten löslichen Faktoren stimuliert wurden, wurde dagegen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich ihrer Proliferation festgestellt (**Abbildung 4.10; B**).

Die in den Transwell-basierten Assays gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass RD-IL15 von NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen in ausreichenden Mengen sezerniert wurde, um neben der autokrinen Stimulation auch benachbarte primäre Lymphozyten zu aktivieren. Dies könnte eine verstärkte immunmodulatorische Aktivität der NK-92 Zellen auf endogene Immunzellen im Tumormikromilieu bewirken. In einem präklinischen immunkompetenten Mausmodell wurde bei der Behandlung von GL261/ErbB2 Glioblastomen durch die mehrmalige intrakranielle Applikation von ErbB2-spezifischen CAR-NK-92 Zellen (NK-92/5.28.z) ohne ektopische RD-IL15 Expression neben einer initialen Tumorabstoßung bereits in fünf von acht Mäusen ein langanhaltender Effekt auf das endogene Immunsystem beobachtet (Zhang et al., 2016). Obwohl CAR-NK-92 Zellen in immunkompetenten Mäusen rasch abgestoßen werden, entwickelten die geheilten Mäuse bei einem *Rechallenge* mit GL261/ErbB2 Zellen an Tag 126 keine neuen Tumoren. Darüber hinaus wurden in dem Serum der Mäuse IgG-Moleküle mit Reaktivität gegenüber GL161/ErbB2 sowie GL261 Zellen nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass sich die durch die Behandlung induzierte endogene Immunantwort nicht nur auf das CAR-spezifische Antigen begrenzt, sondern sich generell gegen die Glioblastomzellen richtet. Ein zweiter *Rechallenge* von Mäusen, bei denen zuvor CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen depletiert wurden, führte dagegen zum Anwachsen neuer Tumoren. Dies weist darauf hin, dass die durch die Behandlung mit NK-92/5.28.z ausgelöste Immunität nicht nur durch Antikörper, sondern auch durch T-Gedächtniszellen vermittelt

wird. Auch die Behandlung mit NKAR-NK-92 Zellen und NKAB-ErbB2 führte im syngenen Mausmodell mit subkutan wachsenden Glioblastomen zur Induktion einer endogenen anti-Tumor Immunantwort mit nachweisbaren Konzentrationen an GL261/ErbB2- und GL261-reaktiven IgG-Molekülen (C. Zhang et al., 2021). Diese Effekte könnten durch RD-IL15 weiter verstärkt werden. IL-15 nimmt neben seiner Wirkung auf die Expansion von zytotoxischen T-Effektorzellen auch Einfluss auf die Proliferation und das Überleben von CD8⁺ T-Gedächtniszellen, wie in IL-15^{-/-} und IL-15R α ^{-/-} *knock-out* Mäusen gezeigt (Becker et al., 2002; Goldrath et al., 2002; Nolz & Richer, 2020; Schluns et al., 2002; Tan et al., 2002). Darüber hinaus führte die Stimulation von CD8-positiven Gedächtniszellen durch IL-15 oder eine TCR-Aktivierung *in vitro* zu vergleichbaren Effekten auf die Proliferation, Genexpression und Synthese von Effektormolekülen wie IFN- γ , Granzym B und Perforin (Liu et al., 2002). Eine gesteigerte Zytotoxizität und erhöhte Expression von Perforin und Granzym B nach IL-15 Stimulation wurde zudem in Gewebe-residenten T-Gedächtniszellen gezeigt (Cheuk et al., 2017). Beruhend auf diesen Erkenntnissen und der nachgewiesenen Wirkung von RD-IL15 auf CD8-positive T-Zellen könnte das Einbringen von RD-IL15 sekretierenden NKAR-NK-92 Zellen vor allem bei einer mehrmaligen Applikation der Zellen eine langanhaltende nachfolgende Immunantwort fördern und die Eliminierung von Tumorzellen durch T-Zellen unterstützen. Zudem wurde in einem präklinischen Mausmodell eine gesteigerte NKG2D-Expression nach Behandlung mit IL-15 beobachtet (Zhang et al., 2018). Ähnliche durch sekretiertes RD-IL15 vermittelte Effekte in Patienten könnten die Rekrutierung und Aktivierung endogener NK-Zellen durch bispezifische NKAB-Antikörper fördern.

5.4 Das NKAB/NKAR-System als modularer immuntherapeutischer Ansatz

Ein Problem bei der Behandlung von Krebserkrankungen mit zielgerichteten Immuntherapien stellt die mögliche Heterogenität der Expression geeigneter Tumor-assoziiertes Antigene im Tumorgewebe dar. So kann ein therapeutischer Ansatz, der lediglich ein bestimmtes Antigen zum Ziel hat, in diesem Fall nicht alle Zellen eines Tumors eliminieren. Darüber hinaus begünstigt ein fortwährender therapiebedingter Selektionsdruck das Auswachsen von Zellen, die das ursprünglich exprimierte Zielantigen verloren haben. Dies verhindert eine effektive Kontrolle des Tumorwachstums (El-Sayes et al., 2021). Um auf diese Aspekte reagieren zu können und die Therapie gegebenenfalls patientenspezifisch anzupassen, wurde der experimentelle Kombinationsansatz aus NKAR-exprimierenden Effektorzellen und in ihrer Struktur flexiblen NKAB-Molekülen entwickelt. Inwiefern sich dieses Konzept tatsächlich als modulares System erweist, wurde in dieser Arbeit näher untersucht.

5.4.1 NKAB-EGFR

Dazu wurde der bereits erprobte Ansatz aus NKAB-ErbB2 und NKG2D-CAR-exprimierenden NK-Zellen um weitere NKAB-Moleküle mit zusätzlichen Spezifitäten wie beispielsweise EGFR erweitert. Für die Generierung eines entsprechenden bispezifischen Antikörpers wurde die ErbB2-spezifische scFv-Domäne des etablierten NKAB-ErbB2 rev Moleküls durch das von Cetuximab abgeleitete EGFR-spezifische Antikörperfragment scFv(225) ersetzt (**Abbildung 4.21**) (Genßler et al., 2016). Dieses bindet an die Ektodomäne III des EGF-Rezeptors und erkennt daher neben EGFR auch die mutierte Variante EGFRvIII (Hartmann et al., 2010; S. Li et al., 2005; Wels et al., 1995). Cetuximab ist ein monoklonaler Antikörper, der für die Behandlung von metastasierenden kolorektalen Karzinomen und Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich als Monotherapie oder in Kombination mit Chemo- oder Strahlentherapie zugelassen ist (Chidharla et al., 2023). Bereits in früheren Arbeiten unserer Gruppe wurde gezeigt, dass NK-92-Zellen, die ein von Cetuximab-abgeleitetes CAR-Molekül exprimierten (NK-92/225.28.z), eine hohe zytotoxische Aktivität gegen EGFR-positive Gliomzellen aufweisen (Genßler et al., 2016). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine selektive Zytotoxizität auch durch das EGFR-spezifische NKAB-Molekül und NKG2D-exprimierende Effektorzellen vermittelt werden kann. Zunächst wurde die duale Spezifität von NKAB-EGFR durch die Bindung an NKAR/NKG2D-exprimierende NK-92 Zellen und EGFR-positive Glioblastom- und Mammakarzinomzellen bestätigt. Die EGFR-negative Zielzelllinie K562 wurde hingegen nicht von NKAB-EGFR Molekülen gebunden (**Abbildung 4.22**). Wie zuvor für NKAB-ErbB2 gezeigt, konnte auch durch den Einsatz von NKAB-EGFR die Aktivität von NKAR-NK-92 Zellen gegenüber Antigen-positiven Tumorzellen gesteigert werden (**Abbildung 4.23**). Darüber hinaus wurde mittels Zeitraffer-Mikroskopie der Effekt von NKAB-EGFR auf primäre Lymphozyten und deren Aktivität gegenüber EGFR-positiven MDA-MB468 Zellen untersucht (**Abbildung 4.26**). Bereits zu Beginn des Versuches waren erste Zellkontakte zwischen NKAB-bedeckten Zielzellen und primären NK-Zellen zu erkennen, die dann in der Lyse der Zielzellen resultierten. Eine durch T-Zellen vermittelte Eliminierung von Tumorzellen wurde in diesem Versuch nicht beobachtet, was sich vermutlich auf die Kultivierungsbedingungen zurückführen lässt. Isolierte PBMCs wurden in Medium supplementiert mit IL-2 und IL-15 kultiviert. Obwohl beide Zytokine auch einen Einfluss auf T-Zellen haben, fehlte in diesem Fall die normalerweise für die *ex vivo* Expansion und initiale Aktivierung von T-Zellen eingesetzte Stimulierung mit CD3- und CD28-spezifischen Antikörpern (Sudarsanam et al., 2022). Dies könnte die ausbleibende Aktivität primärer T-Lymphozyten erklären. In einem *in vitro* Zytotoxizitätsassay konnten die in der mikroskopischen Analyse gewonnenen Erkenntnisse bestätigt und quantifiziert werden. Auch hier führte der Einsatz von NKAB-EGFR zu einer gesteigerten spezifischen Lyse von MDA-MB468 Zellen durch primäre NK-Zellen (**Abbildung 4.27**). Diese Ergebnisse zeigen die Fähigkeit von NKAB-EGFR, nicht nur

die Zytotoxizität von NKAR-exprimierenden NK-92 Zellen, sondern auch von NKG2D-positiven primären NK-Zellen zu vermitteln. Dies könnte in einer klinischen Situation von Vorteil sein. Des Weiteren wurde in einem Degranulationsassay die Oberflächenexpression von CD107a auf NKAR-NK-92 Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Lipidschicht der lytischen Granula enthält das Membranprotein CD107a, welches nach der Fusion der Granula mit der Zellmembran auf der Oberfläche nachweisbar ist. Dementsprechend korreliert die CD107a-Oberflächenexpression mit der zytotoxischen Aktivität der analysierten Zellen. Der hier durchgeführte Assay wurde mit NKAR-NK-92 Zellen und NKAB-EGFR in An- und Abwesenheit von EGFR-exprimierenden Mammakarzinomzellen durchgeführt. Dabei wurde beobachtet, dass hohe Konzentrationen des NKAB-Moleküls in Abwesenheit von Zielzellen mit entsprechender Antigenexpression keine unspezifische Aktivierung von Effektorzellen induzieren. Lediglich die Kreuzvernetzung von Ziel- und Effektorzellen durch NKAB-Moleküle führte zur spezifischen Degranulation von NKAR-NK-92 Zellen (**Abbildung 4.25**), was einen wichtigen Sicherheitsaspekt des Therapieansatzes darstellt.

Neben Genamplifikation und Überexpression von EGFR treten in verschiedenen Krebsarten auch weitere *Gain of function*-Mutationen des Rezeptors auf. Dabei ist die beim Glioblastom häufigste EGFR-Mutante die konstitutiv aktive Variante EGFRvIII. Durch eine Tumor-spezifische Mutation sind die Exons 2-7 deletiert, was den Verlust von 267 Aminosäuren innerhalb der extrazellulären Domäne und damit einhergehend, eine ausbleibende Ligandenbindung zur Folge hat (Gan et al., 2013). Obwohl EGFRvIII konstitutiv aktiv ist, fällt die intrazelluläre Signalweiterleitung im Vergleich zu der von durch natürliche Liganden aktiviertem EGFR deutlich schwächer aus. Jedoch reicht diese aus, um entsprechenden Tumorzellen einen Wachstumsvorteil zu verleihen. Darüber hinaus zeigten verschiedene Studien, dass die Internalisierung des aktivierten Rezeptors und/oder die Herunterregulierung der Rezeptorexpression durch die Konformationsänderung von EGFRvIII im Gegensatz zu EGFR ausbleibt (Hwang et al., 2011; Schmidt et al., 2003). EGFRvIII lässt sich in 25-64% der Glioblastome nachweisen, nicht jedoch in gesundem Gewebe. Dabei ist die Expression von EGFRvIII mit einem signifikant verkürzten Überleben der Patienten assoziiert (Aldape et al., 2004; Heimberger et al., 2005; Jose et al., 2020; Shinojima et al., 2003). Interessanterweise wurde zudem gezeigt, dass in etwa 50% der Glioblastome mit amplifiziertem EGFR-Gen EGFRvIII koexprimiert wird (Hwang et al., 2011; Shinojima et al., 2003; Wong et al., 1992). So könnten Therapien, die sowohl auf das Tumor-assoziierte Antigen EGFR und das Neoantigen EGFRvIII abzielen, einen Vorteil gegenüber monospezifischen Ansätzen bieten. Dies wird gestützt von den Ergebnissen einer klinischen Studie zur Behandlung von Glioblastom-Patienten mit einem EGFRvIII-spezifischen Peptidvakzin. Dabei zeigte sich, dass nachfolgend EGFRvIII-positiv Tumorzell-Subpopulationen effektiv eliminiert wurden. Jedoch traten anschließend Rezidive auf, die EGFRvIII-negativ waren, aber nach wie vor

EGFR exprimierten (Sampson et al., 2010). Dies legt nahe, dass eine lediglich auf EGFRvIII abzielende Therapie das Auswachsen EGFRvIII-negativer Tumorzellvarianten fördert. Eine weitere, erst kürzlich veröffentlichte frühe Phase I Studie (NCT05660369) zur Behandlung von Patienten mit einem wiederkehrenden Glioblastom zielte auf die gleichzeitige Erkennung von EGFR und EGFRvIII ab. Dabei wurden sogenannte CARv3-TEAM-E T-Zellen intraventrikulär in den Patienten appliziert (Choi et al., 2024). Neben der Expression eines EGFRvIII-spezifischen CAR sekretieren diese Zellen ein *T-cell-engaging antibody molecule* (TEAM) mit Spezifität für EGFR und CD3 (Choi et al., 2019). In den drei behandelten Patienten wurde bereits nach einmaliger Gabe der CARv3-TEAM-E T-Zellen eine rapide Tumorregression beobachtet, die bei einem der Patienten 150 Tage nach der Applikation noch immer anhielt. In zwei Patienten war das Therapieansprechen allerdings nicht von Dauer, mit Zeichen eines Rezidivs 2-4 Wochen nach der Behandlung (Choi et al., 2024). Auch die zuvor eingeführten, in unserer Arbeitsgruppe generierten, dualspezifischen CAR-NK-Zellen (NK-92/225.28.z) zeigten in einem orthotopen Xenograftmodell im Vergleich zu monospezifischen CARs, die entweder eine Spezifität nur für EGFR (NK-92/R1.28.z) oder EGFRvIII (NK-92/MR1-1.28.z) aufwiesen, eine deutlich gesteigerte anti-Tumor Antwort gegenüber einer gemischten Tumorphilpopulation aus EGFR- und EGFRvIII-exprimierenden LNT-229 Glioblastomzellen, welches sich in einem verlängerten Überleben der entsprechenden Tiere äußerte (Genßler et al., 2016).

Durch den Einsatz des scFv-Antikörperfragments 225 wies auch das NKAB-EGFR Molekül wie erwartet eine Spezifität für EGFR und EGFRvIII auf. Dies wurde in Versuchen mit murinen Glioblastomzellen (GL261), die jeweils einen der beiden Rezeptoren nach lentiviralem Gentransfer stabil exprimierten, bestätigt (**Abbildung 4.28**). Jedoch waren Unterschiede im Ausmaß der spezifischen Lyse der Zielzellen erkennbar. GL261/EGFR Zellen wurden dabei im Vergleich zu GL261/EGFRvIII Zellen in einem höheren Maß lysiert. Außerdem wurde die durch NKAR-NK-92 Zellen vermittelte Lyse von GL261/EGFR Zellen bereits bei niedrigeren NKAB-EGFR Konzentrationen erreicht (**Abbildung 4.29, Abbildung 4.30**). Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in der Sensitivität der GL261 Varianten gegenüber der NKAB-vermittelten Zytotoxizität von NKAR-NK-92 Zellen ist das unterschiedliche Expressionsniveau von EGFR und EGFRvIII, welches sich auch in Bindungsassays mit NKAB-EGFR zeigte (**Abbildung 4.28**). Obwohl EGFRvIII-exprimierende GL261 Zellen im Vergleich zu GL261/EGFR Zellen in einem geringeren Maß eliminiert wurden, wurde dennoch auch hier eine signifikant gesteigerte Lyse mit dem Kombinationsansatz aus NKAB-EGFR und NKAR-NK-92 Derivaten erzielt. Dies erscheint wichtig, da sich EGFRvIII-positive Tumorzellen gegenüber anderen Behandlungsansätzen wie einer Chemotherapie, Bestrahlung oder Therapie mit Cetuximab als weitestgehend resistent erwiesen haben (Cavenee, 2002; Fukai et al., 2008; Heimberger et al., 2005; Jutten et al., 2009; Schmidt et al., 2003; Sok et al., 2006). Darüber hinaus stellt ein gleichzeitig gegen EGFR

und EGFRvIII gerichteter Ansatz, wie zuvor für die dualspezifischen NK-92/225.28.z CAR-NK-Zellen beschrieben, eine vielversprechende Möglichkeit dar, um das Auswachsen von EGFR- oder EGFRvIII-negativen Tumorphpopulation aufgrund der therapiebedingten Selektion zu verhindern. Dies ist für die hier beschriebene Kombinationstherapie aus NKAB-EGFR und NKAR-exprimierenden Zellen allerdings noch in weiterführenden *in vivo* Experimenten zu prüfen. Hinsichtlich des Sicherheitsprofils einer auf EGFR abzielenden Therapie wurden in klinischen Studien mit EGFR-spezifischen CAR-T-Zellen, trotz EGFR-Expression im gesunden Gewebe (Uhlén et al., 2015), nur milde bis moderate *on-Target/off-Tumor* Effekte beobachtet (Feng et al., 2017; Guo et al., 2018; Y. Liu et al., 2020). Auch EGFRvIII-spezifische CAR-T-Zellen wurden bereits in klinischen Studien zur Behandlung von Glioblastompatienten erprobt (Goff et al., 2019; O'Rourke et al., 2017). Die Infusion von anti-EGFRvIII CAR-T-Zellen zusammen mit intravenöser IL-2 Gabe resultierte dabei in zwei Patienten in einer schweren Hypoxie. Einer der beiden Patienten verstarb aufgrund der Nebenwirkungen (Goff et al., 2019). Im Gegensatz dazu erwies sich die Applikation EGFRvIII-spezifischer CAR-T-Zellen in einer weiteren Studie zur Behandlung von Patienten mit einem Glioblastom als gut verträglich und sicher, ohne Hinweise auf eine *off-Tumor* Toxizität oder ein CRS (O'Rourke et al., 2017). Die hier beobachteten Nebenwirkungen lassen sich zum Teil auf die klonale Expansion und Persistenz der T-Zellen zurückführen. Im Gegensatz dazu ist die Halbwertszeit der NKAB-Moleküle deutlich kürzer, sodass bei durch Beendigung der Infusion dauerhafte Nebenwirkungen voraussichtlich vermieden werden können. Fatale Effekte wie in der zuvor beschriebenen Studie mit EGFRvIII-CAR-T-Zellen sind bei dem Einsatz von NKAB-EGFR daher nicht zu erwarten.

Durch den Einsatz von stabil EGFR, EGFRvIII und/oder ErbB2 exprimierenden murinen Glioblastomzellen als Modell für NKG2D-L negative Zellen wurde deutlich, dass NKAR-NK-92 Derivate in der Lage sind, Tumorzellen trotz fehlender Ligandenexpression in Gegenwart eines geeigneten NKAB-Moleküls zu eliminieren (**Abbildung 4.29, Abbildung 4.30**). Dies könnte in einer klinischen Situation von Vorteil sein, in der Krebszellen der NKG2D-vermittelten Immunüberwachung durch proteolytische Abspaltung und/oder Herunterregulierung von NKG2D-L entgehen (Groh et al., 2002; Ibáñez-Navarro et al., 2023; Paczulla et al., 2019; Salih et al., 2002). Darüber hinaus können NKAR-NK-92 Zellen NKG2D-L positive Tumorzellen, hier für MDA-MB468 gezeigt, auch ohne Mitwirken eines passenden NKAB-Moleküls erkennen und eliminieren (**Abbildung 4.4**). Antigen-exprimierende und gleichzeitig NKG2D-L positive Tumorzellen weisen somit zwei mögliche Zielstrukturen für den hier beschriebenen Kombinationsansatz aus NKAB-Molekülen und NKAR-NK-92 Derivaten auf. Immuntherapien basierend auf bispezifischen Antikörpern zeichnen sich durch eine hohe Flexibilität aus und ermöglichen den patientenspezifischen Einsatz von Antikörpermolekülen. Daher wurde in dieser Arbeit auch der therapeutische Effekt einer Kombinationstherapie mit unterschiedlichen

NKABs (hier: NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR) auf nachgebildete Tumoren mit heterogener Antigenexpression untersucht.

5.4.2 Kombinationstherapie mit NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR

ErbB2 und EGFR gehören beide der Familie der ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinasen an, welche nach Aktivierung zelluläre Prozesse wie die Proliferation und Differenzierung stimulieren. Eine Überexpression oder Dysregulation fördert daher die Entwicklung von Tumorerkrankungen, wobei ErbB2 und EGFR vor allem bei Brustkrebs häufig gemeinsam auftreten (Hsu & Hung, 2016; Park et al., 2010). Beispielsweise wurde in immunhistochemischen Untersuchungen von insgesamt 48 Biopsien ErbB2-positiver Mammakarzinome in einem Drittel der Proben eine Koexpression von EGFR nachgewiesen. Zudem wurde in diesen Patientinnen (12/15) im Vergleich zu Patientinnen mit einem triple-negativen (7/14) oder nur ErbB2-positiven (6/19) Mammakarzinom ein erhöhtes Vorkommen an Metastasen in den Lymphknoten detektiert (Henjes et al., 2012). In einer weiteren Studie wurde außerdem gezeigt, dass überexprimiertes ErbB2 eine Rolle bei der Entwicklung von Resistenzen gegenüber EGFR-spezifischen Antikörpern in Patienten mit einem kolorektalen Karzinom spielt (Yonesaka et al., 2011). Ähnliche Beobachtungen wurden in Untersuchungen mit Glioblastom-Stammzellen gemacht, in denen die Inhibition des EGFR-Signalweges durch Cetuximab oder die Reduktion von EGF im Kulturmedium durch die Aktivierung von ErbB2 und ErbB3 kompensiert wurde (Clark et al., 2012). Es wird auch vermutet, dass eine erhöhte EGFR-Expression die Resistenzbildung gegenüber ErbB2-spezifischen Therapien begünstigt (Dua et al., 2010). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass eine gleichzeitig auf ErbB2 und EGFR abzielende Therapie bei bestimmten Tumorentitäten von Bedeutung sein könnte. So wurde in einer *in vitro* Studie gezeigt, dass der Einsatz von zwei ErbB2-spezifischen Antikörpern (Trastuzumab und Pertuzumab) zusammen mit Erlotinib, einem selektiven Inhibitor der Tyrosinkinase-Domäne des EGF-Rezeptors, im Vergleich zu einer Monotherapie zu einer verminderten Vitalität von EGFR-*high*/ErbB2-positiven Brustkrebszellen führte (Henjes et al., 2012).

Inwiefern auch eine Kombination von NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR Vorteile bei der Eliminierung von doppelt-positiven Tumorzellen aufweist, wurde zunächst mit genetisch modifizierten GL261 Zellen überprüft, die sowohl humanes ErbB2 als auch EGFR bzw. EGFRvIII exprimierten. Dabei wurden doppelt-positive GL261 Zellen bereits in Anwesenheit eines einzelnen NKAB-Moleküls effektiv von NKAR-NK-92 Derivaten eliminiert, ohne additiven Effekt der Kombination von zwei NKABs (**Abbildung 4.32, Abbildung 4.34**). Dies lässt sich auf die in diesem Experiment eingesetzten Konzentrationen der einzelnen NKAB-Moleküle zurückführen. Diese reichten bereits aus, um die maximal mögliche Lyse der Zielzellen zu erreichen, wie in Zytotoxizitätsassays mit GL261/EGFR (**Abbildung 4.29**) oder

GL261/EGFRvIII (**Abbildung 4.30**) Zellen bei steigenden NKAB-EGFR Konzentrationen gezeigt. Um einen möglichen additiven Effekt der Kombination von NKABs gegenüber doppelt-positiven GL261 Zellen in *in vitro* Assays nachzuweisen, könnten in zukünftigen Untersuchungen geringere Mengen der jeweiligen NKAB-Moleküle eingesetzt werden.

Als klinisch voraussichtlich relevantere Situation wurde nachfolgend durch das Mischen von Gliomzellen mit unterschiedlicher Antigenexpression die Heterogenität von soliden Tumorerkrankungen nachgebildet. Anschließend wurde untersucht, ob die Kombination unterschiedlicher NKAB-Moleküle einen der Monotherapie überlegenen Therapieeffekt aufweist. Dafür wurden genetisch modifizierte ErbB2- und EGFR- oder EGFRvIII-exprimierende GL261 Zellen mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Markern gefärbt, welche nachfolgend eine Diskriminierung und Vitalitätsbestimmung der individuellen Zellerivate in durchflusszytometrischen Analysen ermöglichten. In Anwesenheit von NKAB-EGFR und NKAB-ErbB2 wurden die Mischkulturen von GL261/EGFR- und GL261/ErbB2 Zellen von NKAR-NK-92 Derivaten effektiv lysiert, wohingegen NKAB-EGFR und NKAB-ErbB2 allein lediglich die Abtötung der jeweiligen, das respektive Antigen exprimierenden Zielzellsubpopulation vermittelten. Damit wurde durch die Kombination der beiden Moleküle tatsächlich ein im Vergleich zur Monotherapie additiver Effekt bezüglich der Eliminierung der Mischkultur durch NKAR-NK-92 Derivate erzielt (**Abbildung 4.33**). Auch im Fall von Kokulturen aus GL261/EGFRvIII und GL261/ErbB2 Zellen wurde durch den Einsatz von zwei NKAB-Molekülen und NKG2D-CAR exprimierenden NK-92 Zellen eine signifikante Steigerung der spezifischen Lyse erzielt. Jedoch war diese bei GL261/EGFRvIII Zellen im Vergleich zu GL261/EGFR Zellen erneut geringer (Vgl. **Abbildung 4.33**), und die Kombination beider NKAB-Moleküle resultierte nicht in einem deutlichen additiven Effekt (**Abbildung 4.35**). Dies entspricht der zuvor gemachten Beobachtung einer reduzierten Aktivität von NKAR-exprimierenden Effektorzellen gegenüber EGFRvIII-exprimierenden GL261 Zellen in Gegenwart von NKAB-EGFR, die sich vermutlich auf das geringere Expressionsniveau von EGFRvIII im Vergleich zu EGFR zurückführen lässt (**Abbildung 4.28, Abbildung 4.30**). Eine weitere Erklärung könnte eine unterschiedliche Affinität von NKAB-EGFR für EGFR und EGFRvIII sein. Durch die Diskriminierung von GL261/ErbB2 und GL261/EGFR oder GL261/EGFRvIII in den Mischkulturen wurde deutlich, dass in der Anwesenheit eines NKAB-Moleküls (NKAB-ErbB2 oder NKAB-EGFR) nur Zellen mit der entsprechenden Antigenexpression lysiert wurden, während Tumorzellen, welche negativ für das respektive Antigen waren, trotz ihrer Nähe zu Antigen-positiven Tumorzellen unberührt blieben. Dies unterstreicht die hohe Spezifität des NKAB/NKAR-Ansatzes und bekräftigt dessen Potenzial für eine personalisierte Krebstherapie.

5.4.3 Ableitung von NKAB-CD19 und NKAB-CD20 zur Behandlung von B-Zell-Malignomen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Behandlungsansatzes für hämatologische Malignitäten der B-Zell-Linie. Sowohl CD19 als auch CD20 werden abhängig vom Differenzierungsgrad auf der Oberfläche von gesunden und malignen B-Zellen exprimiert und bereits als Zielstrukturen in unterschiedlichen Krebsimmuntherapien eingesetzt. Neben derzeit vier von der FDA und EMA zugelassenen CD19-spezifischen CAR-Produkten für die Behandlung hämatologischer Tumorerkrankungen wird CD19 auch als Zielantigen für bispezifische Antikörper genutzt, die wie im Fall des für die Behandlung von B-ALL durch die FDA und EMA klinisch zugelassenen Antikörpers Blinatumomab neben CD19 auf Lymphom- und Leukämiezellen, CD3 auf T-Zellen binden (Benjamin & Stein, 2016). Auch eine kürzlich durchgeführte klinische Phase I/II Studie (NCT03056339) mit primären CD19-spezifischen CAR-NK-Zellen zeigte vielversprechende Ergebnisse bei der Behandlung von Patienten mit rezidivierenden oder refraktären B-Zell-Lymphomen oder Leukämien. Neben einer Gesamtansprechrate von 48,6% 100 Tage nach der Verabreichung, lag das Gesamtüberleben der Patienten nach einem Jahr bei 68%, wobei die Erkrankung bei 32% der Patienten nicht weiter fortgeschritten war (Marin et al., 2024). Das B-Lymphozyten-Antigen CD20 ist bei 90% der B-Zell-Lymphome exprimiert (Casan et al., 2018; Tan Su Yin et al., 2022). Neben Rituximab, dem erstmals für die Therapie von Krebserkrankungen zugelassenen CD20-spezifischen monoklonalen Antikörper, wurden bereits eine Reihe von CD20-spezifischen CAR-T-Zellen zur Behandlung von B-Zell-Leukämien und -Lymphomen erfolgreich in klinischen Studien erprobt (Liang et al., 2021; Till et al., 2008, 2012; Zhang et al., 2016).

Aufgrund der nachgewiesenen Eignung von CD19 und CD20 als Zielantigene für B-Zell-Lymphome und Leukämien wurden für die Untersuchung des experimentellen Ansatzes aus NKAR-NK-92 Zellen und NKAB-Molekülen zur Behandlung von B-Zell-Malignomen in dieser Arbeit CD19- und CD20-spezifische NKAB-Moleküle generiert. Alle derzeit klinisch zugelassenen CD19-spezifischen CAR-T-Zellprodukte nutzen als Zellerkennungsdomäne den Antikörper FMC63 (Seigner et al., 2023). Auch in vorherigen Arbeiten unserer Gruppe wurden anti-CD19 CAR-NK-92 Zellen (NK-92/63.28.z) basierend auf diesem Antikörper generiert (Oelsner et al., 2017). Dabei waren die erzeugten Zellen in der Lage, CD19-exprimierende Lymphom- und Leukämiezellen im Vergleich zu parentalen NK-92 effizient zu beseitigen, und führten in einem Mausmodell zu einem verlangsamten Krankheitsverlauf (Oelsner et al., 2017). Auch für die Generierung CD19-spezifischer NKAB-Moleküle wurde hier zunächst ein von dem monoklonalen Antikörper FMC63 abgeleitetes scFv-Antikörperfragment eingesetzt. Allerdings ließen sich FMC63-basierte NKAB-CD19 Moleküle trotz Testung verschiedener Protein-Designs nur in geringen Mengen exprimieren und führten zu einer Vielzahl an Degradations-

produkten (Daten nicht gezeigt). In einer *in vivo* Studie, in der unterschiedliche scFv-Antikörperfragmente für die Entwicklung von CD19-CAR-T-Zellen analysiert wurden, zeigten CD19-spezifische CAR-T-Zellen mit einem Antikörperfragment abgeleitet von dem monoklonalen Antikörper 4G7 eine vergleichbare anti-Tumor Aktivität wie FMC63-CAR-T-Zellen (Kang et al., 2020). Daher wurde 4G7 für die Generierung eines alternativen NKAB-CD19 Moleküls ausgewählt (**Abbildung 4.36**). Weiterhin wurde ein CD20-spezifisches NKAB-Molekül generiert, das von der Bindungsdomäne des Antikörpers Leu16 abgeleitet ist (**Abbildung 4.40**) (Müller et al., 2008). Beide NKAB-Moleküle konnten in ausreichenden Mengen aus dem Kulturüberstand transient transfizierter Expi293F Zellen gewonnen und nachfolgend in gereinigter Form für funktionelle Analysen eingesetzt werden (**Abbildung 4.37, Abbildung 4.41**). Ihre Bindung an NKAR/NKG2D-positive Effektorzellen und Antigen-exprimierende Lymphom- und Leukämiezellen, nicht aber an Antigen-negative Zellen, bestätigte in durchflusszytometrischen Analysen ihre Spezifität (**Abbildung 4.38, Abbildung 4.42**). Wie auch NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR waren die generierten CD19- und CD20-spezifischen NKAB-Moleküle in der Lage, in Zytotoxizitätsassays eine signifikant gesteigerte Lyse Antigen-positiver Zielzellen durch parentale und NKAR-NK-92 Derivate zu vermitteln (**Abbildung 4.39, Abbildung 4.43**). Während bei steigender NKAB-Konzentration zunächst ein Anstieg in der spezifischen Lyse beobachtet wurde, führten höhere Konzentrationen an NKAB-CD19 und NKAB-CD20 zu einem Abfall der Lyse. Dies war zuvor auch bei NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR der Fall (**Abbildung 4.13, Abbildung 4.23**), und lässt sich vermutlich darauf zurückzuführen, dass im Überschuss vorliegende NKAB-Moleküle lediglich an Effektor- oder Zielzellen binden und somit eine produktive Quervernetzung von Effektor- und Zielzellen blockiert wird. NKAB-CD19 und NKAB-CD20 interagierten auch mit primären NK-Zellen, wodurch Lymphomzellen (Raji) effektiv eliminiert wurden (**Abbildung 4.46**). In Degranulationsassays mit löslichen NKAB-Molekülen wurde zudem gezeigt, dass eine CD107a-Exposition auf NK-Zellen lediglich in Anwesenheit von Tumorzellen erfolgt, nicht aber in deren Abwesenheit (**Abbildung 4.44**). Dies verdeutlicht erneut, dass für die Aktivierung von NK-Zellen mit NKAB-Molekülen eine Kreuzvernetzung mit Antigen-positiven Tumorzellen nötig ist und selbst hohe NKAB-Konzentrationen in Lösung keine ungerichtete Aktivierung von NK-Zellen induzieren. Durch den Einsatz von NKAB-CD20 wurde eine im Gegensatz zu NKAB-CD19 gesteigerte Lyse von doppel-positiven Raji Zellen erzielt. Die Färbung der Lymphom-Zelllinie mit einem CD19- und CD20-spezifischen Antikörper und anschließende Analyse am Durchflusszytometer deutet auf ein gesteigertes Expressionsniveau von CD20 im Vergleich zu CD19 hin (Daten nicht gezeigt), was den beobachteten Unterschied in der NKAB-vermittelten Lyse von Raji Zellen durch NKAB-CD19 und NKAB-CD20 erklären kann. Auch wäre es möglich, dass sich die CD19- und CD20-spezifischen NKAB-Moleküle in der Affinität zu ihrem Zielantigen unterscheiden. Ein weiterer beachtenswerter Aspekt ist der Einfluss der Lokalisation des jeweiligen Ziel-Epitops. In *in vitro* Versuchen mit Mesothelin-

spezifischen Antikörpern, die unterschiedliche Regionen des Glykoproteins binden, induzierten Antikörpermoleküle mit einem Epitop nahe der Zellmembran im Vergleich zu Antikörpern mit einem weiter von der Zelloberfläche entfernten Epitop eine gesteigerte ADCC (Hatterer et al., 2020). Auch in einer *in vitro* Studie mit BiTE-Molekülen mit Spezifität für das häufig in humanen Melanomzellen überexprimierte Oberflächenantigen MCSP (*Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan*) und CD3 waren BiTEs, deren Epitop sich nah an der Zelloberfläche befand, effektiver darin, die T-Zell-vermittelte Lyse von MCSP-exprimierenden Zelllinien zu induzieren. Unterschiede aufgrund verschiedener Affinitäten der unterschiedlichen BiTEs konnten dabei ausgeschlossen werden (Bluemel et al., 2010)

Obwohl mit CD19-spezifischen CAR-T-Zellprodukten bahnbrechende Erfolge bei der Behandlung von Patienten mit refraktären und rezidivierenden B-Zell-Malignitäten erzielt wurden, erleiden 30-50% der in Remission befindlichen Patienten meist innerhalb eines Jahres wieder einen Rückfall (Kailayangiri et al., 2020; N. N. Shah & Fry, 2019). Eine mögliche Ursache für das erneute Auftreten der Erkrankung nach CAR-T-Zell-Behandlung stellt der Verlust des Zielantigens auf Tumorzellen dar. Dabei wurde sowohl ein Auswachsen von weiterhin CD19-positiven Leukämie- und Lymphomzellen als auch von CD19-negativen Zellen (20-30% der Patienten) beobachtet (Shah & Fry, 2019). Im Fall des Auswachsens von Antigen-negativen Tumorzellpopulationen könnte der modulare Ansatz mit NKAB-Molekülen von Vorteil sein. So ließen sich die eingesetzten NKAB-Moleküle entsprechend der Veränderung des Tumorantigenprofils auswählen.

Auch im Fall von CD19- und CD20-spezifischen NKAB-Molekülen wäre es denkbar, diese, ähnlich zu NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR, in Kombination einzusetzen. Erste Hinweise hinsichtlich des Potenzials einer solchen Therapie lieferte eine klinische Studie zur Behandlung von Patienten mit einem rezidierten oder refraktären NHL, in der autologe naive oder *memory* T-Zellen mit einem CAR ausgestattet wurden, der sowohl ein CD19- als auch CD20-spezifisches scFv-Antikörperfragment trägt. Dabei zeigten 9 von 10 Patienten eine verminderte Tumorlast, davon 7 eine vollständige Remission (Larson et al., 2023). In weiterführenden Versuchen könnte daher, vergleichbar mit der zuvor beschriebenen Kombinationstherapie aus NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR, der Effekt von NKAB-CD19 und NKAB-CD20 gegenüber doppelt-positiven Tumorzellen oder Kokulturen mit heterogener Antigenexpression analysiert werden.

Trotz vielversprechender *in vitro* Daten hinsichtlich des NKAB-CD19 oder NKAB-CD20 basierten Kombinationsansatzes mit NKAR-NK-92 Zellen stellt die klinische Translation solcher neuartiger Therapien eine große Herausforderung dar. Es muss vor allem gewährleistet sein, dass Sicherheitsaspekte eines Produkts zuvor ausreichend untersucht und potenzielle Nebenwirkungen realistisch

eingeschätzt wurden. Aufgrund der nahezu universellen Expression von CD19 und CD20 auf B-Zellen führen CD19- und CD20-spezifische Immuntherapien wie beispielsweise CAR-T-Zellen oder der monoklonale Antikörper Rituximab in behandelten Patienten zu einer zeitweise auftretenden B-Zell-Aplasie, einhergehend mit einer Hypogammaglobulinämie (Kailayangiri et al., 2020; St.Clair, 2010). Auch wenn es sich hierbei um eine relevante Begleiterscheinung der Therapien handelt, stellt diese keine lebensbedrohliche Nebenwirkung dar. So kann eine Hypogammaglobulinämie mit einer Immunglobulin-Ersatztherapie behandelt werden. Im Gegensatz zu einer langanhaltenden B-Zell-Depletion von mehreren Jahren nach Therapie mit CD19-CAR-T-Zellen (in 25-38% der Patienten) (Cappell et al., 2020; Chong et al., 2021; Locke et al., 2019, 2022), vermittelte Rituximab keine derart lange Eliminierung von B-Zellen in Lymphom-Patienten (McLaughlin et al., 2016). Bereits 9-12 Monate nach Rituximab-Gabe waren erneut physiologische Konzentrationen an B-Zellen nachweisbar. Da Plasmablasten CD19 exprimieren, nicht jedoch CD20, liegt die Vermutung nahe, dass insbesondere gegen CD19 gerichtete Antikörper zu einer verminderten Immunglobulin-Produktion beitragen. Der Vergleich von Rituximab (anti-CD20) und dem BiTE Blinatumomab (anti-CD19) zeigte jedoch keine nennenswerten Unterschiede im Immunglobulinspiegel behandelter Patienten (Zugmaier et al., 2014). Im Fall des Kombinationsansatzes aus NKAB-CD19 oder NKAB-CD20 und NKAR-NK-92 Derivaten wäre ein mit Rituximab und Blinatumomab vergleichbarer Effekt zu erwarten. Eine langanhaltende Depletion, wie nach einer CAR-T-Zelltherapie beobachtet, erscheint hingegen unwahrscheinlich.

5.5 Ausblick

Das in dieser Arbeit untersuchte und weiter optimierte modulare System aus NKAR-exprimierenden NK-92 Derivaten und NKAB-Molekülen unterschiedlicher Spezifität zeigte in den durchgeführten umfassenden Untersuchungen eine hochspezifische und sehr effektive antitumorale Aktivität gegenüber Antigen-exprimierenden Tumorzellen *in vitro*. Neben dem Zusammenspiel mit genetisch modifizierten NK-92 Zellen waren NKAB-Moleküle zudem in der Lage, auch eine Tumorzell-Lyse durch primäre humane NK-Zellen zu vermitteln. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass eine Kombination aus NKAB-Molekülen unterschiedlicher Spezifität (NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR) gegenüber doppelt-positiven Tumorzellen und Tumor-Kokulturen mit heterogener Antigenexpression wirksam ist. Für alle untersuchten NKAB-Moleküle konnte gezeigt werden, dass NKAR-NK-92 Zellen nicht ungerichtet durch hohe Konzentrationen an löslichen bispezifischen Antikörpern aktiviert werden, sondern dafür die Bindung an Antigen-exprimierende Tumorzellen notwendig ist. Dies stellt einen wichtigen Sicherheitsaspekt dieses experimentellen Therapieansatzes dar. Zur Erweiterung der Funktionalität der zellulären Komponente des Kombinationsansatzes wurde der NKG2D-

basierte CAR NKAR zusammen mit dem IL-15 Superagonisten RD-IL15 in NK-92 Zellen exprimiert. Dabei wirkte das von den Zellen sekretierte RD-IL15 sowohl in autokriner Weise auf die genetisch modifizierten NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen selbst als auch parakrin auf umgebende Immunzellen.

Um die Verträglichkeit der Kombinationstherapie noch weiter zu verbessern und *on-Target/off-Tumor* Effekte zu vermeiden, wäre es vor allem für die Behandlung von soliden Tumoren denkbar, NKAB-Moleküle zu entwickeln, die erst im Tumormikromilieu ihre Funktionalität entfalten und somit nicht an ihre Zielstrukturen in gesundem Gewebe binden. Ein Ansatz könnte dabei die Maskierung der Antigenbindungsstelle durch ein Peptid sein, das erst aufgrund eines sauren pH-Wertes oder durch Metalloproteasen im Tumormikromilieu abgespalten wird und dadurch die Antigen-spezifische Domäne freigibt (Autio et al., 2020). Die Wirkung eines solchen Antikörpers wird bereits in Form des *Probody EGFR x CD3 T cell engagers* in einer klinischen Studie (NCT05387265) zur Behandlung von fortgeschrittenen soliden Tumoren erprobt, nachdem in präklinischen Studien vielversprechende Erfolge erzielt werden konnten (Boustany et al., 2018, 2022). Neben der weiteren Optimierung von NKAR-exprimierenden Effektorzellen und bispezifischen NKAB-Molekülen stellt auch die pharmakologische Modulation von Tumoren einen potenziellen Ansatzpunkt zur Steigerung des Therapieerfolges dar. Dabei könnten geeignete Wirkstoffe zur Erhöhung der NKG2D-L Expression auf Tumorzellen oder der Einsatz von Proteaseinhibitoren zur Vermeidung der proteolytischen Abspaltung von NKG2D-L eine Rolle spielen. Eine klinisch relevante Steigerung der Ligandenexpression wurde unter anderem in AML-Patienten nach der Behandlung mit All-trans-Retinsäure (*All-trans-retinoic acid*, ATRA) oder dem Histon-Deacetylase-Inhibitor Valproinsäure beobachtet (Poggi et al., 2009). Auch Reagenzien, die die Abspaltung von NKG2D-L hemmen, könnten einen Vorteil für den hier beschriebenen experimentellen Ansatz bieten. Mögliche Substanzen sind dabei zum Beispiel ADAM10 Proteaseinhibitoren, die bereits in einer Vielzahl von präklinischen Studien in Modellen unterschiedlicher Tumorerkrankungen eingesetzt werden (Smith et al., 2020). Bereits in der klinischen Erprobung befindet sich auch ein Antikörper, der durch seine Bindung an die $\alpha 3$ -Domäne der MICA/B-Liganden eine proteolytische Abspaltung durch Metalloproteasen verhindert (NCT05117476) (Wang et al., 2023). Da NKAR-exprimierende NK-92 Zellen NKG2D-L positive Tumorzellen auch ohne das Mitwirken von NKAB-Molekülen eliminieren können, könnte die stabile Expression dieser Liganden auf der Zelloberfläche die Aktivität von NKAR-NK-92 Derivaten auch unabhängig von NKAB-Molekülen steigern.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der Funktionalität des Therapieansatzes aus NKAB-Molekülen und NKAR-Effektorzellen in *in vitro* Analysen. Aufbauend auf den hier erarbeiteten Daten wird der Fokus nachfolgender Arbeiten auf der Erprobung in geeigneten Maus-

modellen gerichtet sein. Dies bietet die Möglichkeit, die Wirkung der experimentellen Behandlung in einem lebenden Organismus zu beurteilen. Im Fall von immunkompetenten Mäusen ließen sich zudem erste Erkenntnisse zur zusätzlichen Beeinflussung des endogenen Immunsystems der Wirtstiere gewinnen. Dabei könnten Versuche dieser Art Aufschluss darüber geben, inwiefern sekretiertes RD-IL15 auch *in vivo* einen Effekt auf benachbarte endogene Immunzellen ausübt. Für die *in vivo* Analyse von NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR zur Behandlung solider Tumoren bietet sich dabei das bereits in unserer Arbeitsgruppe mit subkutan wachsenden GL261/ErbB2 Glioblastomzellen etablierte syngene C57BL/6N Mausmodell an (C. Zhang et al., 2021). Da sich der Einsatz von NKAB-CD19 und NKAB-CD20 auf hämatologische Tumorerkrankungen beschränkt, wäre es in diesem Fall sinnvoll, ein metastasierendes Tumormodell zu etablieren. Vorherige Arbeiten der Gruppe mit CD19-spezifischen CAR-NK-92 Zellen wurden beispielsweise mit Raji Zellen in immundefizienten NSG-Mäusen durchgeführt (Oelsner et al., 2017). Ähnliche Versuche mit den hier etablierten NKAB-CD19 und NKAB-CD20 Molekülen sind bereits in Planung. Für den Transfer des Ansatzes in immunkompetente Mäuse erscheint es möglich, Tumorzellen murinen Ursprungs genetisch so zu modifizieren, dass sie ektopisch humanes CD19 oder CD20 exprimieren. Um alternativ die Wirkung eines NKAB-Moleküls in immunkompetenten Mäusen unter physiologischen Bedingungen untersuchen und den Einfluss auf das endogene Immunsystem besser abschätzen zu können, wurde zudem das Molekül NKAB-mCD19 mit Spezifität für murines CD19 entwickelt. Dieses trägt neben einer mCD19-spezifischen Domäne das prototypische NKG2D-spezifische scFv-Antikörperfragment und zeigte in Kombination mit NKAR-NK-92 Zellen eine gesteigerte Zytotoxizität gegenüber endogen mCD19-exprimierenden murinen A20 Lymphomzellen (**Abbildung 4.49, Abbildung 4.50**). In einem anderen Projekt der Arbeitsgruppe werden gegenwärtig neue Bindungsdomänen entwickelt, die neben humanem NKG2D auch den endogenen murinen NKG2D-Rezeptor erkennen und aktivieren. In Verbindung mit der hier charakterisierten mCD19-spezifischen Domäne könnten so auch neue NKAB-Moleküle abgeleitet werden, die neben NKAR-NK-92 Zellen in entsprechenden syngen Mausmodellen auch endogene murine NK-Zellen gegen Lymphom- und Leukämiezellen aktivieren. Es ist durchaus zu erwarten, dass solche *in vivo* Experimente die in den hier vorgelegten Ergebnissen gezeigte hohe Selektivität und antitumorale Aktivität von NKAB-Molekülen zusammen mit primären, endogen NKG2D exprimierenden Lymphozyten oder NKAR-modifizierten Effektorzellen bestätigen. Nachfolgend erscheint dann eine relativ rasche Übertragung dieses Ansatzes in frühe klinische Studien denkbar und sinnvoll.

6 Literaturverzeichnis

- Abel, A. M., Yang, C., Thakar, M. S., & Malarkannan, S. (2018). Natural killer cells: Development, maturation, and clinical utilization. *Frontiers in Immunology*, *9*(AUG).
<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.01869/FULL>
- Abel, E. L., & DiGiovanni, J. (2015). Environmental Carcinogenesis. *The Molecular Basis of Cancer: Fourth Edition*, 103-128.e2. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4066-6.00007-X>
- Adams, G. P., Schier, R., McCall, A. M., Simmons, H. H., Horak, E. M., Alpaugh, R. K., Marks, J. D., & Weiner, L. M. (2001). High Affinity Restricts the Localization and Tumor Penetration of Single-Chain Fv Antibody Molecules 1. *CANCER RESEARCH*, *61*, 4750–4755.
<http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/61/12/4750/2486333/4750.pdf>
- Adamson, E. D. (1987). Oncogenes in development. *Development (Cambridge, England)*, *99*(4), 449–471. <https://doi.org/10.1242/DEV.99.4.449>
- Albinger, N., Hartmann, J., & Ullrich, E. (2021). Current status and perspective of CAR-T and CAR-NK cell therapy trials in Germany. *Gene Therapy 2021 28:9*, *28*(9), 513–527.
<https://doi.org/10.1038/s41434-021-00246-w>
- Aldape, K. D., Ballman, K., Furth, A., Buckner, J. C., Giannini, C., Burger, P. C., Scheithauer, B. W., Jenkins, R. B., & James, C. D. (2004). Immunohistochemical detection of EGFRvIII in high malignancy grade astrocytomas and evaluation of prognostic significance. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *63*(7), 700–707.
<https://doi.org/10.1093/JNEN/63.7.700>
- Alter, G., Malenfant, J. M., & Altfeld, M. (2004). CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of Immunological Methods*, *294*(1–2), 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.08.008>
- Ames, B. N., Gold, L. S., & Willett, W. C. (1995). The causes and prevention of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(12), 5258–5265.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.92.12.5258>
- Anfossi, N., André, P., Guia, S., Falk, C. S., Roetynck, S., Stewart, C. A., Bresó, V., Frassati, C., Reviron, D., Middleton, D., Romagné, F., Ugolini, S., & Vivier, E. (2006). Human NK Cell Education by Inhibitory Receptors for MHC Class I. *Immunity*, *25*(2), 331–342.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.06.013>
- Arai, S., Meagher, R., Swearingen, M., Myint, H., Rich, E., Martinson, J., & Klingemann, H. (2008). Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial. *Cytotherapy*, *10*(6), 625–632.
<https://doi.org/10.1080/14653240802301872>
- Armeanu, S., Bitzer, M., Lauer, U. M., Venturelli, S., Pathil, A., Krusch, M., Kaiser, S., Jobst, J., Smirnow, I., Wagner, A., Steinle, A., & Salih, H. R. (2005). Natural killer cell-mediated lysis of hepatoma cells via specific induction of NKG2D ligands by the histone deacetylase inhibitor sodium valproate. *Cancer Research*, *65*(14), 6321–6329. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4252>
- Arvindam, U. S., van Hauten, P., Hallstrom, C., Valleria, D. A., Dolstra, H., Miller, J. S., & Felices, M. (2018). CD16-IL15-CLEC12A Trispecific Killer Engager (TriKE) Drives NK Cell Expansion, Activation, and Antigen Specific Killing of Cancer Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Blood*, *132*(Supplement 1), 1454–1454. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2018-99-117150>
- Ashiru, O., Boutet, P., Fernández-Messina, L., Agüera-González, S., Skepper, J. N., Valés-Gómez, M., & Reyburn, H. T. (2010). Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA*008 that is shed by tumor cells in exosomes. *Cancer Research*,

- 70(2), 481–489. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1688/655459/P/NATURAL-KILLER-CELL-CYTOTOXICITY-IS-SUPPRESSED-BY>
- Atallah-Yunes, S. A., & Robertson, M. J. (2022). Cytokine Based Immunotherapy for Cancer and Lymphoma: Biology, Challenges and Future Perspectives. *Frontiers in Immunology*, *13*, 872010. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.872010/BIBTEX>
- Autio, K. A., Boni, V., Humphrey, R. W., & Naing, A. (2020). Probody Therapeutics: An Emerging Class of Therapies Designed to Enhance On-Target Effects with Reduced Off-Tumor Toxicity for Use in Immuno-Oncology. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *26*(5), 984–989. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1457>
- Bachmann, M. (2019). The UniCAR system: A modular CAR T cell approach to improve the safety of CAR T cells. *Immunology Letters*, *211*, 13–22. <https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2019.05.003>
- Baeuerle, P. A., & Reinhardt, C. (2009). Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy. *Cancer Research*, *69*(12), 4941–4944. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0547/655159/P/BISPECIFIC-T-CELL-ENGAGING-ANTIBODIES-FOR-CANCER>
- Baker, M. P., Reynolds, H. M., Lumicisi, B., & Bryson, C. J. (2010). Immunogenicity of protein therapeutics: The key causes, consequences and challenges. *Self/Nonself*, *1*(4), 314–322. <https://doi.org/10.4161/SELF.1.4.13904>
- Baraganõ Raneros, A., Martín-Palanco, V., Fernandez, A. F., Rodriguez, R. M., Fraga, M. F., Lopez-Larrea, C., & Suarez-Alvarez, B. (2014). Methylation of NKG2D ligands contributes to immune system evasion in acute myeloid leukemia. *Genes & Immunity* *2015 16:1*, *16*(1), 71–82. <https://doi.org/10.1038/gene.2014.58>
- Barrow, A. D., Martin, C. J., & Colonna, M. (2019). The natural cytotoxicity receptors in health and disease. *Frontiers in Immunology*, *10*(MAY), 451720. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.00909/BIBTEX>
- Barth, S., & Naran, K. (2022). TIM-3: a tumor-associated antigen beyond checkpoint inhibition? *Immunotherapy Advances*, *2*(1), 1–3. <https://doi.org/10.1093/IMMADV/LTAC021>
- Barzegar, C., Meazza, R., Pereno, R., Pottin-Clemenceau, C., Scudeletti, M., Brouty-Boyé, D., Doucet, C., Taoufik, Y., Ritz, J., Musselli, C., Mishal, Z., Jasmin, C., Indiveri, F., Ferrini, S., & Azzarone, B. (1998). IL-15 is produced by a subset of human melanomas, and is involved in the regulation of markers of melanoma progression through juxtacrine loops. *Oncogene*, *16*(19), 2503–2512. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201775>
- Basar, R., Daher, M., & Rezvani, K. (2020). Next-generation cell therapies: the emerging role of CAR-NK cells. *Hematology: The American Society of Hematology Education Program*, *2020*(1), 570. <https://doi.org/10.1182/HEMATOLOGY.2020002547>
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., & Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, *285*(5428), 727–729. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.285.5428.727/ASSET/EE8A8440-F621-400E-8331-93D6993B7827/ASSETS/GRAPHIC/SE3097717004.JPEG>
- Baumeister, S. H., Murad, J., Werner, L., Daley, H., Trebeden-Negre, H., Gicobi, J. K., Schmucker, A., Reder, J., Sentman, C. L., Gilham, D. E., Lehmann, F. F., Galinsky, I., DiPietro, H., Cummings, K., Munshi, N. C., Stone, R. M., Neubergh, D. S., Soiffer, R., Dranoff, G., ... Nikiforow, S. (2019). Phase I Trial of Autologous CAR T Cells Targeting NKG2D Ligands in Patients with AML/MDS and Multiple Myeloma. *Cancer Immunology Research*, *7*(1), 100–112. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0307>

- Becker, T. C., John Wherry, E., Boone, D., Murali-Krishna, K., Antia, R., Ma, A., & Ahmed, R. (2002). Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *195*(12), 1541–1548. <https://doi.org/10.1084/JEM.20020369>
- Beckman, R. A., Weiner, L. M., & Davis, H. M. (2007). Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors. *Cancer*, *109*(2), 170–179. <https://doi.org/10.1002/CNCR.22402>
- Becknell, B., & Caligiuri, M. A. (2005). Interleukin-2, Interleukin-15, and Their Roles in Human Natural Killer Cells. *Advances in Immunology*, *86*, 209–239. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(04\)86006-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(04)86006-1)
- Benjamin, J. E., & Stein, A. S. (2016). The role of blinatumomab in patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Therapeutic Advances in Hematology*, *7*(3), 142. <https://doi.org/10.1177/2040620716640422>
- Bergamaschi, C., Bear, J., Rosati, M., Beach, R. K., Alicea, C., Sowder, R., Chertova, E., Rosenberg, S. A., Felber, B. K., & Pavlakis, G. N. (2012). Circulating IL-15 exists as heterodimeric complex with soluble IL-15R α in human and mouse serum. *Blood*, *120*(1), e1. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-10-384362>
- Bergamaschi, C., Watson, D. C., Valentin, A., Bear, J., Peer, C. J., Figg, W. D., Felber, B. K., & Pavlakis, G. N. (2018). Optimized administration of hetIL-15 expands lymphocytes and minimizes toxicity in rhesus macaques. *Cytokine*, *108*, 213–224. <https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2018.01.011>
- Berrien-Elliott, M. M., Becker-Hapak, M., Cashen, A. F., Jacobs, M., Wong, P., Foster, M., McClain, E., Desai, S., Pence, P., Cooley, S., Brunstein, C., Gao, F., Abboud, C. N., Uy, G. L., Westervelt, P., Jacoby, M. A., Pusic, I., Stockerl-Goldstein, K. E., Schroeder, M. A., ... Fehniger, T. A. (2022). Systemic IL-15 promotes allogeneic cell rejection in patients treated with natural killer cell adoptive therapy. *Blood*, *139*(8), 1177–1183. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.2021011532>
- Bhat, R., & Watzl, C. (2007). Serial killing of tumor cells by human natural killer cells--enhancement by therapeutic antibodies. *PloS One*, *2*(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0000326>
- Bluemel, C., Hausmann, S., Fluhr, P., Sriskandarajah, M., Stallcup, W. B., Baeuerle, P. A., & Kufer, P. (2010). Epitope distance to the target cell membrane and antigen size determine the potency of T cell-mediated lysis by BiTE antibodies specific for a large melanoma surface antigen. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *59*(8), 1197–1209. <https://doi.org/10.1007/S00262-010-0844-Y/FIGURES/6>
- Blunt, M. D., & Khakoo, S. I. (2024). Harnessing natural killer cell effector function against cancer. *Immunotherapy Advances*, *4*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1093/IMMADV/LTAD031>
- Bodden, M., Häcker, A., Röder, J., Kiefer, A., Zhang, C., Bhatti, A., Pfeifer, J., Ullrich, E., Kühnel, I., & Wels, W. S. (2023). Co-Expression of an IL-15 Superagonist Facilitates Self-Enrichment of GD2-Targeted CAR-NK Cells and Mediates Potent Cell Killing in the Absence of IL-2. *Cancers*, *15*. <https://doi.org/10.3390/cancers15>
- Borchers, M. T., Harris, N. L., Wesselkamper, S. C., Vitucci, M., & Cosman, D. (2006). NKG2D ligands are expressed on stressed human airway epithelial cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, *291*(2), 222–231. <https://doi.org/10.1152/AJPLUNG.00327.2005/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH50070645930006.JPG>
- Bourgeois, M., Bailly, C., Frindel, M., Guerard, F., Chérel, M., Faivre-Chauvet, A., Kraeber-Bodéré, F., & Bodet-Milin, C. (2017). Radioimmunoconjugates for treating cancer: recent advances and

- current opportunities. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 17(7), 813–819.
<https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1322577>
- Boustany, L. M., LaPorte, S. L., Wong, L., White, C., Vinod, V., Shen, J., Yu, W., Koditek, D., Winter, M. B., Moore, S. J., Mei, L., Diep, L., Huang, Y., Liu, S., Vasiljeva, O., West, J., Richardson, J., Irving, B., Belvin, M., & Kavanaugh, W. M. (2022). A Probody T Cell-Engaging Bispecific Antibody Targeting EGFR and CD3 Inhibits Colon Cancer Growth with Limited Toxicity. *Cancer Research*, 82(22), 4288–4298. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-2483>
- Boustany, L. M., Wong, L., White, C. W., Diep, L., Huang, Y., Liu, S., Richardson, J. H., Kavanaugh, W. M., & Irving, B. A. (2018). Abstract A164: EGFR-CD3 bispecific Probody™ therapeutic induces tumor regressions and increases maximum tolerated dose >60-fold in preclinical studies. *Molecular Cancer Therapeutics*, 17(1_Supplement), A164–A164.
<https://doi.org/10.1158/1535-7163.TARG-17-A164>
- Boyiadzis, M., Agha, M., Redner, R. L., Sehgal, A., Im, A., Hou, J. Z., Farah, R., Dorritie, K. A., Raptis, A., Lim, S. H., Wang, H., Lapteva, N., Mei, Z., Butterfield, L. H., Rooney, C. M., & Whiteside, T. L. (2017). Phase 1 clinical trial of adoptive immunotherapy using “off-the-shelf” activated natural killer cells in patients with refractory and relapsed acute myeloid leukemia. *Cytotherapy*, 19(10), 1225–1232. <https://doi.org/10.1016/J.JCYT.2017.07.008>
- Boyiadzis, M. M., Dhodapkar, M. V., Brentjens, R. J., Kochenderfer, J. N., Neelapu, S. S., Maus, M. V., Porter, D. L., Maloney, D. G., Grupp, S. A., Mackall, C. L., June, C. H., & Bishop, M. R. (2018). Chimeric antigen receptor (CAR) T therapies for the treatment of hematologic malignancies: Clinical perspective and significance. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 6(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1186/S40425-018-0460-5/TABLES/2>
- Brandt, C. S., Baratin, M., Yi, E. C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C. D., Kaifu, T., Chabannon, C., Moretta, A., West, R., Xu, W. F., Vivier, E., & Levin, S. D. (2009). The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(7), 1495–1503.
<https://doi.org/10.1084/JEM.20090681>
- Brentjens, R. J., & Curran, K. J. (n.d.). *Novel cellular therapies for leukemia: CAR-modified T cells targeted to the CD19 antigen*. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2012.1.143>
- Brudno, J. N., & Kochenderfer, J. N. (2019). Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. *Blood Reviews*, 34, 45–55.
<https://doi.org/10.1016/J.BLRE.2018.11.002>
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H. G., & Long, E. O. (2006). Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*, 107(1), 159–166. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2005-04-1351>
- Budagian, V., Bulanova, E., Paus, R., & Bulfone-Paus, S. (2006). IL-15/IL-15 receptor biology: A guided tour through an expanding universe. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 17(4), 259–280. <https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2006.05.001>
- Burger, M. C., Forster, M. T., Romanski, A., Straßheimer, F., Macas, J., Zeiner, P. S., Steidl, E., Herkt, S., Weber, K. J., Schupp, J., Lun, J. H., Strecker, M. I., Wlotzka, K., Cakmak, P., Opitz, C., George, R., Mildenerger, I. C., Nowakowska, P., Zhang, C., ... Wels, W. S. (2023). Intracranial injection of natural killer cells engineered with a HER2-targeted chimeric antigen receptor in patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncology*, 25(11), 2058–2071.
<https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOAD087>
- Burger, M. C., Zhang, C., Harter, P. N., Romanski, A., Strassheimer, F., Senft, C., Tonn, T., Steinbach, J. P., & Wels, W. S. (2019). CAR-Engineered NK Cells for the Treatment of Glioblastoma:

- Turning Innate Effectors Into Precision Tools for Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 10, 2683. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.02683>
- Burnet, M. (1957). Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *British Medical Journal*, 1(5022), 779–786. <https://doi.org/10.1136/BMJ.1.5022.779>
- Burton, J. D., Bamford, R. N., Peters, C., Grant, A. J., Kurys, G., Goldman, C. K., Brennan, J., Roessler, E., & Waldmann, T. A. (1994). A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(11), 4935–4939. <https://doi.org/10.1073/PNAS.91.11.4935>
- Campbell, J. J., Qin, S., Unutmaz, D., Soler, D., Murphy, K. E., Hodge, M. R., Wu, L., & Butcher, E. C. (2001). Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(11), 6477–6482. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.166.11.6477>
- Cao, Y., Marcucci, E. C., & Budde, L. E. (2023). Mosunetuzumab and lymphoma: latest updates from 2022 ASH annual meeting. *Journal of Hematology & Oncology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/S13045-023-01462-0>
- Cappell, K. M., Sherry, R. M., Yang, J. C., Goff, S. L., Vanasse, D. A., McIntyre, L., Rosenberg, S. A., & Kochenderfer, J. N. (2020). Long-Term Follow-Up of Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 38(32), 3805–3815. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.01467>
- Carpenito, C., Milone, M. C., Hassan, R., Simonet, J. C., Lakhali, M., Suhoski, M. M., Varela-Rohena, A., Haines, K. M., Heitjan, D. F., Albelda, S. M., Carroll, R. G., Riley, J. L., Pastan, I., & June, C. H. (2009). Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 3360–3365. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0813101106>
- Carr, J. W., Hausken, D. W., Fraser, Z. E., Stofko-Hahn, I. D. C., Scott, R. E., Wang, J. D. J., Salter, L.-Y., Macdonald, M. W., Greengard, F., Jen, P., Nairn, A. C., Stevens, C. F., Swope, S., Moss, S. J., Blackstone, C. D., Hagan, R. L., FASEB, M. D., Chivria, J. C., Mcknight, G. S. J., ... Lohmann, S. M. (1994). Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 1994 368:6474, 368(6474), 856–859. <https://doi.org/10.1038/368856a0>
- Carrega, P., & Ferlazzo, G. (2012). Natural killer cell distribution and trafficking in human tissues. *Frontiers in Immunology*, 3(NOV), 37048. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2012.00347/BIBTEX>
- Carter, P. J. (2006). Potent antibody therapeutics by design. *Nature Reviews Immunology* 2006 6:5, 6(5), 343–357. <https://doi.org/10.1038/nri1837>
- Casan, J. M. L., Wong, J., Northcott, M. J., & Opat, S. (2018). Anti-CD20 monoclonal antibodies: reviewing a revolution. In *Human Vaccines and Immunotherapeutics* (Vol. 14, Issue 12, pp. 2820–2841). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1508624>
- Casucci, M., Falcone, L., Camisa, B., Norelli, M., Porcellini, S., Stornaiuolo, A., Ciceri, F., Traversari, C., Bordignon, C., Bonini, C., & Bondanza, A. (2018). Extracellular NGFR Spacers Allow Efficient Tracking and Enrichment of Fully Functional CAR-T Cells Co-Expressing a Suicide Gene. *Frontiers in Immunology*, 9(MAR). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.00507>
- Cavenee, W. K. (2002). Genetics and new approaches to cancer therapy. *Carcinogenesis*, 23(5), 683–686. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/23.5.683>

- Cerwenka, A., & Lanier, L. L. (2001). Natural killer cells, viruses and cancer. *Nature Reviews Immunology* 2001 1:1, 1(1), 41–49. <https://doi.org/10.1038/35095564>
- Chamie, K., Chang, S. S., Kramolowsky, E., Gonzalgo, M. L., Agarwal, P. K., Bassett, J. C., Bjurlin, M., Cher, M. L., Clark, W., Cowan, B. E., David, R., Goldfischer, E., Guru, K., Jalkut, M. W., Kaffenberger, S. D., Kaminetsky, J., Katz, A. E., Koo, A. S., Sexton, W. J., ... Soon-Shiong, P. (2022). IL-15 Superagonist NAI in BCG-Unresponsive Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *NEJM Evidence*, 2(1). <https://doi.org/10.1056/EVIDOA2200167>
- Chan, W. K., Kang, S., Youssef, Y., Glankler, E. N., Barrett, E. R., Carter, A. M., Ahmed, E. H., Prasad, A., Chen, L., Zhang, J., Benson, D. M., Caligiuri, M. A., & Yu, J. (2018). A CS1-NKG2D Bispecific Antibody Collectively Activates Cytolytic Immune Cells against Multiple Myeloma. *Cancer Immunology Research*, 6(7), 776–787. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-17-0649>
- Chandran, S. S., & Klebanoff, C. A. (2019). T cell receptor-based cancer immunotherapy: Emerging efficacy and pathways of resistance. *Immunological Reviews*, 290(1), 127. <https://doi.org/10.1111/IMR.12772>
- Chen, L., & Flies, D. B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology* 2013 13:4, 13(4), 227–242. <https://doi.org/10.1038/nri3405>
- Chen, Z., Chen, L., Baker, K., Olszak, T., Zeissig, S., Huang, Y. H., Kuo, T. T., Mandelboim, O., Beauchemin, N., Lanier, L. L., & Blumberg, R. S. (2011). CEACAM1 dampens antitumor immunity by down-regulating NKG2D ligand expression on tumor cells. *Journal of Experimental Medicine*, 208(13), 2633–2640. <https://doi.org/10.1084/JEM.20102575>
- Chesney, J., Lewis, K. D., Kluger, H., Hamid, O., Whitman, E., Thomas, S., Wermke, M., Cusnir, M., Domingo-Musibay, E., Phan, G. Q., Kirkwood, J. M., Hassel, J. C., Orloff, M., Larkin, J., Weber, J., Furness, A. J. S., Khushalani, N. I., Medina, T., Egger, M. E., ... Sarnaik, A. (2022). Efficacy and safety of lifileucel, a one-time autologous tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) cell therapy, in patients with advanced melanoma after progression on immune checkpoint inhibitors and targeted therapies: pooled analysis of consecutive cohorts of the C-144-01 study. *J Immunother Cancer*, 10, 5755. <https://doi.org/10.1136/jitc-2022-005755>
- Cheuk, S., Schlums, H., Gallais S  r  zal, I., Martini, E., Chiang, S. C., Marquardt, N., Gibbs, A., Detlofsson, E., Introini, A., Forkel, M., H  g, C., Tjernlund, A., Micha  lsson, J., Folkersen, L., Mj  sberg, J., Blomqvist, L., Ehrstr  m, M., St  hle, M., Bryceson, Y. T., & Eidsmo, L. (2017). CD49a Expression Defines Tissue-Resident CD8+ T Cells Poised for Cytotoxic Function in Human Skin. *Immunity*, 46(2), 287–300. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.01.009>
- Chidharla, A., Parsi, M., & Kasi, A. (2023). Cetuximab. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459293/>
- Chitadze, G., Lettau, M., Bhat, J., Wesch, D., Steinle, A., F  rst, D., Mytilineos, J., Kalthoff, H., Janssen, O., Oberg, H. H., & Kabelitz, D. (2013). Shedding of endogenous MHC class I-related chain molecules A and B from different human tumor entities: Heterogeneous involvement of the “a disintegrin and metalloproteases” 10 and 17. *International Journal of Cancer*, 133(7), 1557–1566. <https://doi.org/10.1002/IJC.28174>
- Chmielewski, M., & Abken, H. (2015). TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 15(8), 1145–1154. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1046430>
- Chmielewski, M., Hombach, A. A., & Abken, H. (2013). Antigen-Specific T-Cell Activation Independently of the MHC: Chimeric Antigen Receptor-Redirected T Cells. *Frontiers in Immunology*, 4(NOV). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2013.00371>
- Chmielewski, M., Kopecky, C., Hombach, A. A., & Abken, H. (2011). IL-12 release by engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can effectively muster an antigen-independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression. *Cancer*

- Research*, 71(17), 5697–5706. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0103/649836/AM/IL-12-RELEASE-BY-ENGINEERED-T-CELLS-EXPRESSING>
- Cho, J. H., Collins, J. J., & Wong, W. W. (2018). Universal Chimeric Antigen Receptors for Multiplexed and Logical Control of T Cell Responses. *Cell*, 173(6), 1426-1438.e11. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2018.03.038>
- Choi, B. D., Gerstner, E. R., Frigault, M. J., Leick, M. B., Mount, C. W., Balaj, L., Nikiforow, S., Carter, B. S., Curry, W. T., Gallagher, K., & Maus, M. V. (2024). Intraventricular CARv3-TEAM-E T Cells in Recurrent Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. https://doi.org/10.1056/NEJMOA2314390/SUPPL_FILE/NEJMOA2314390_DATA-SHARING.PDF
- Choi, B. D., Yu, X., Castano, A. P., Bouffard, A. A., Schmidts, A., Larson, R. C., Bailey, S. R., Boroughs, A. C., Frigault, M. J., Leick, M. B., Scarfò, I., Cetrulo, C. L., Demehri, S., Nahed, B. V., Cahill, D. P., Wakimoto, H., Curry, W. T., Carter, B. S., & Maus, M. V. (2019). CAR-T cells secreting BiTEs circumvent antigen escape without detectable toxicity. *Nature Biotechnology* 2019 37:9, 37(9), 1049–1058. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0192-1>
- Chong, E. A., Ruella, M., & Schuster, S. J. (2021). Five-Year Outcomes for Refractory B-Cell Lymphomas with CAR T-Cell Therapy. *New England Journal of Medicine*, 384(7), 673–674. https://doi.org/10.1056/NEJMC2030164/SUPPL_FILE/NEJMC2030164_DISCLOSURES.PDF
- Clark, P. A., Iida, M., Treisman, D. M., Kalluri, H., Ezhilan, S., Zorniak, M., Wheeler, D. L., & Kuo, J. S. (2012). Activation of Multiple ERBB Family Receptors Mediates Glioblastoma Cancer Stem-like Cell Resistance to EGFR-Targeted Inhibition. *Neoplasia*, 14(5), 420-IN13. <https://doi.org/10.1596/NEO.12432>
- Clayton, A., Mitchell, J. P., Court, J., Linnane, S., Mason, M. D., & Tabi, Z. (2008). Human Tumor-Derived Exosomes Down-Modulate NKG2D Expression. *The Journal of Immunology*, 180(11), 7249–7258. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.180.11.7249>
- Comber, J. D., & Philip, R. (2014). MHC class I antigen presentation and implications for developing a new generation of therapeutic vaccines. *Therapeutic Advances in Vaccines*, 2(3), 77–89. <https://doi.org/10.1177/2051013614525375>
- Conlon, K. C., Lugli, E., Welles, H. C., Rosenberg, S. A., Fojo, A. T., Morris, J. C., Fleisher, T. A., Dubois, S. P., Perera, L. P., Stewart, D. M., Goldman, C. K., Bryant, B. R., Decker, J. M., Chen, J., Worthy, T. A., Figg, W. D., Peer, C. J., Sneller, M. C., Lane, H. C., ... Waldmann, T. A. (2015). Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(1), 74–82. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.3329>
- Cooper, G. M. (2000). *The Development and Causes of Cancer*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., & Caligiuri, M. A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*, 22(11), 633–640. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02060-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02060-9)
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Turner, S. C., Chen, K. S., Ghaheri, B. A., Ghayur, T., Carson, W. E., & Caligiuri, M. A. (2001). Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. *Blood*, 97(10), 3146–3151. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V97.10.3146>
- Creelan, B. C., & Antonia, S. J. (2019). The NKG2A immune checkpoint — a new direction in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2019 16:5, 16(5), 277–278. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0182-8>

- Cullen, S. P., Brunet, M., & Martin, S. J. (2010). Granzymes in cancer and immunity. *Cell Death & Differentiation* 2010 17:4, 17(4), 616–623. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.206>
- Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M. L., Knutson, K. L., ... Zou, W. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine*, 10(9), 942–949. <https://doi.org/10.1038/NM1093>
- Curio, S., Jonsson, G., & Marinović, S. (2021). A summary of current NKG2D-based CAR clinical trials. *Immunotherapy Advances*, 1(1), 1–8. <https://doi.org/10.1093/IMMADV/LTAB018>
- De Andrade, L. F., En Tay, R., Pan, D., Luoma, A. M., Ito, Y., Badrinath, S., Tsoucas, D., Franz, B., May, K. F., Harvey, C. J., Kobold, S., Pyrdol, J. W., Yoon, C., Yuan, G. C., Hodi, F. S., Dranoff, G., & Wucherpfennig, K. W. (2018). Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 359(6383), 1537–1542. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAO0505>
- De Andrade, L. F., Kumar, S., Luoma, A. M., Ito, Y., Da Silva, P. H. A., Pan, D., Pyrdol, J. W., Yoon, C. H., & Wucherpfennig, K. W. (2020). Inhibition of MICA and MICB Shedding Elicits NK-Cell-Mediated Immunity against Tumors Resistant to Cytotoxic T Cells. *Cancer Immunology Research*, 8(6), 769–780. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0483>
- Demoulin, B., Cook, W. J., Murad, J., Graber, D. J., Sentman, M. L., Loney, C., Gilham, D. E., Sentman, C. L., & Agaugue, S. (2017). Exploiting natural killer group 2D receptors for CAR T-cell therapy. *Future Oncology (London, England)*, 13(18), 1593–1605. <https://doi.org/10.2217/FON-2017-0102>
- Dobrovina, E. S., Dobrovin, M. M., Vider, E., Sisson, R. B., O'Reilly, R. J., Dupont, B., & Vyas, Y. M. (2003). Evasion from NK Cell Immunity by MHC Class I Chain-Related Molecules Expressing Colon Adenocarcinoma. *The Journal of Immunology*, 171(12), 6891–6899. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.171.12.6891>
- Dua, R., Zhang, J., Nhonthachit, P., Penuel, E., Petropoulos, C., & Parry, G. (2010). EGFR over-expression and activation in high HER2, ER negative breast cancer cell line induces trastuzumab resistance. *Breast Cancer Research and Treatment*, 122(3), 685–697. <https://doi.org/10.1007/S10549-009-0592-X>
- Duan, S., Guo, W., Xu, Z., He, Y., Liang, C., Mo, Y., Wang, Y., Xiong, F., Guo, C., Li, Y., Li, X., Li, G., Zeng, Z., Xiong, W., & Wang, F. (2019). Natural killer group 2D receptor and its ligands in cancer immune escape. *Molecular Cancer*, 18(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12943-019-0956-8/FIGURES/5>
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology* 2002 3:11, 3(11), 991–998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>
- Dunn, G. P., Koebel, C. M., & Schreiber, R. D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology* 2006 6:11, 6(11), 836–848. <https://doi.org/10.1038/nri1961>
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology*, 22, 329–360. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.22.012703.104803>
- Eagle, R. A., & Trowsdale, J. (2007). Promiscuity and the single receptor: NKG2D. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 7, Issue 9, pp. 737–744). <https://doi.org/10.1038/nri2144>

- Ecker, D. M., Jones, S. D., & Levine, H. L. (2015). The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs*, 7(1), 9–14. <https://doi.org/10.4161/19420862.2015.989042>
- Ehrlich, P. (1909). *Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung*.
- El-Khoueiry, A. B., Rivas, D., Lee, S.-H., Thomas, J. S., Kim, Y. J., Cervantes, A., Saavedra, O., Shim, B. Y., Kohlhas, L., Hintzen, G., Emig, M., & Nava-Parada, P. (2023). Leveraging innate immunity with AFM24, a novel CD16A and epidermal growth factor receptor (EGFR) bispecific innate cell engager: Interim results for the non-small cell lung cancer (NSCLC) cohort. https://doi.org/10.1200/JCO.2023.41.16_suppl.2533, 41(16_suppl), 2533–2533. https://doi.org/10.1200/JCO.2023.41.16_SUPPL.2533
- El-Sayes, N., Vito, A., & Mossman, K. (2021). Tumor heterogeneity: A great barrier in the age of cancer immunotherapy. In *Cancers* (Vol. 13, Issue 4, pp. 1–14). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers13040806>
- Eppihimer, M. J., Gunn, J., Freeman, G. J., Greenfield, E. A., Chernova, T., Erickson, J., & Leonard, J. P. (2002). Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 9(2), 133–145. <https://doi.org/10.1038/SJ/MN/7800123>
- Eshhar, Z., Waks, T., Gkoss, G., & Schindler, D. G. (1993). Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(2), 720–724. <https://doi.org/10.1073/PNAS.90.2.720>
- Esser, R., Müller, T., Stefes, D., Kloess, S., Seidel, D., Gillies, S. D., Aperlo-Iffland, C., Huston, J. S., Uherek, C., Schönfeld, K., Tonn, T., Huebener, N., Lode, H. N., Koehl, U., & Wels, W. S. (2012). NK cells engineered to express a GD2 -specific antigen receptor display built-in ADCC-like activity against tumour cells of neuroectodermal origin. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(3), 569–581. <https://doi.org/10.1111/J.1582-4934.2011.01343.X>
- Fan, J., Shi, J., Zhang, Y., Liu, J., An, C., Zhu, H., Wu, P., Hu, W., Qin, R., Yao, D., Shou, X., Xu, Y., Tong, Z., Wen, X., Xu, J., Zhang, J., Fang, W., Lou, J., Yin, W., & Chen, W. (2022). NKG2D discriminates diverse ligands through selectively mechano-regulated ligand conformational changes. *The EMBO Journal*, 41(2). https://doi.org/10.15252/EMBJ.2021107739/SUPPL_FILE/EMBJ2021107739-SUP-0005-MOVIEEV4.ZIP
- Farag, S. S., Fehniger, T. A., Ruggeri, L., Velardi, A., & Caligiuri, M. A. (2002). Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood*, 100(6), 1935–1947. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2002-02-0350>
- Fehniger, T. A., Suzuki, K., Ponnappan, A., VanDeusen, J. B., Cooper, M. A., Florea, S. M., Freud, A. G., Robinson, M. L., Durbin, J., & Caligiuri, M. A. (2001). Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 193(2), 219–231. <https://doi.org/10.1084/JEM.193.2.219>
- Feins, S., Kong, W., Williams, E. F., Milone, M. C., & Fraietta, J. A. (2019). An introduction to chimeric antigen receptor (CAR) T-cell immunotherapy for human cancer. *American Journal of Hematology*, 94(S1), S3–S9. <https://doi.org/10.1002/AJH.25418>
- Felices, M., Lenvik, A. J., McElmurry, R., Chu, S., Hinderlie, P., Bendzick, L., Geller, M. A., Tolar, J., Blazar, B. R., & Miller, J. S. (2018). Continuous treatment with IL-15 exhausts human NK cells via a metabolic defect. *JCI Insight*, 3(3). <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.96219>

- Felices, M., Lenvik, T. R., Davis, Z. B., Miller, J. S., & Vallera, D. A. (2016). Generation of BiKEs and TriKEs to improve NK cell-mediated targeting of tumor cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1441, 333. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3684-7_28
- Feng, K. chao, Guo, Y. lei, Liu, Y., Dai, H. ren, Wang, Y., Lv, H. yan, Huang, J. hua, Yang, Q. ming, & Han, W. dong. (2017). Cocktail treatment with EGFR-specific and CD133-specific chimeric antigen receptor-modified T cells in a patient with advanced cholangiocarcinoma. *Journal of Hematology & Oncology*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S13045-016-0378-7>
- Fenis, A., Demaria, O., Gauthier, L., Vivier, E., & Narni-Mancinelli, E. (2024). New immune cell engagers for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 2024, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41577-023-00982-7>
- Fernández-Messina, L., Ashiru, O., Boutet, P., Agüera-González, S., Skepper, J. N., Reyburn, H. T., & Valés-Gómez, M. (2010). Differential mechanisms of shedding of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NKG2D ligands. *Journal of Biological Chemistry*, 285(12), 8543–8551. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.045906>
- Finton, K. A., & Strong, R. K. (2012). Structural insights into activation of antiviral NK cell responses. *Immunological Reviews*, 250(1), 239–257. <https://doi.org/10.1111/J.1600-065X.2012.01168.X>
- Flugel, C. L., Majzner, R. G., Krenciute, G., Dotti, G., Riddell, S. R., Wagner, D. L., & Abou-el-Enein, M. (2023). Overcoming on-target, off-tumour toxicity of CAR T cell therapy for solid tumours. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 20(1), 49–62. <https://doi.org/10.1038/S41571-022-00704-3>
- Foeng, J., Comerford, I., & McColl, S. R. (2022). Harnessing the chemokine system to home CAR-T cells into solid tumors. *Cell Reports. Medicine*, 3(3). <https://doi.org/10.1016/J.XCRM.2022.100543>
- Foltz, J. A., Hess, B. T., Bachanova, V., Bartlett, N. L., Berrien-Elliott, M. M., McClain, E., Becker-Hapak, M., Foster, M., Schappe, T., Kahl, B., Mehta-Shah, N., Cashen, A. F., Marin, N. D., McDaniels, K., Moreno, C., Mosior, M., Gao, F., Griffith, O. L., Griffith, M., ... Fehniger, T. A. (2021). Phase I Trial of N-803, an IL15 Receptor Agonist, with Rituximab in Patients with Indolent Non-Hodgkin Lymphoma. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 27(12), 3339–3350. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-4575>
- Fucà, G., Spagnoletti, A., Ambrosini, M., de Braud, F., & Di Nicola, M. (2021). Immune cell engagers in solid tumors: promises and challenges of the next generation immunotherapy. *ESMO Open*, 6(1), 100046. <https://doi.org/10.1016/J.ESMOOP.2020.100046>
- Fuchs, A., Cella, M., Kondo, T., & Colonna, M. (2005). Paradoxical inhibition of human natural interferon-producing cells by the activating receptor NKp44. *Blood*, 106(6), 2076–2082. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2004-12-4802>
- Fuertes, M. B., Girart, M. V., Molinero, L. L., Domaica, C. I., Rossi, L. E., Barrio, M. M., Mordoh, J., Rabinovich, G. A., & Zwirner, N. W. (2008). Intracellular Retention of the NKG2D Ligand MHC Class I Chain-Related Gene A in Human Melanomas Confers Immune Privilege and Prevents NK Cell-Mediated Cytotoxicity. *The Journal of Immunology*, 180(7), 4606–4614. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.180.7.4606>
- Fukai, J., Nishio, K., Itakura, T., & Koizumi, F. (2008). Antitumor activity of cetuximab against malignant glioma cells overexpressing EGFR deletion mutant variant III. *Cancer Science*, 99(10), 2062–2069. <https://doi.org/10.1111/J.1349-7006.2008.00945.X>
- Fyfe, G., Fisher, R. I., Rosenberg, S. A., Sznol, M., Parkinson, D. R., & Louie, A. C. (1995). Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the*

- American Society of Clinical Oncology*, 13(3), 688–696.
<https://doi.org/10.1200/JCO.1995.13.3.688>
- Gan, H. K., Cvrljevic, A. N., & Johns, T. G. (2013). The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered. *The FEBS Journal*, 280(21), 5350–5370.
<https://doi.org/10.1111/FEBS.12393>
- Garber, K. (2019). Pursuit of tumor-infiltrating lymphocyte immunotherapy speeds up. *Nature Biotechnology*, 37(9), 969–971. <https://doi.org/10.1038/D41587-019-00023-6>
- Garcia Borrega, J., Gödel, P., Rüger, M. A., Onur, Ö. A., Shimabukuro-Vornhagen, A., Kochanek, M., & Böll, B. (2019). In the Eye of the Storm: Immune-mediated Toxicities Associated With CAR-T Cell Therapy. *HemaSphere*, 3(2). <https://doi.org/10.1097/HS9.000000000000191>
- Garcia, J., Hurwitz, H. I., Sandler, A. B., Miles, D., Coleman, R. L., Deurloo, R., & Chinot, O. L. (2020). Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer Treatment Reviews*, 86, 102017.
<https://doi.org/10.1016/J.CTRV.2020.102017>
- Garg, A. D., Dudek, A. M., & Agostinis, P. (2013). Cancer immunogenicity, danger signals, and DAMPs: what, when, and how? *BioFactors (Oxford, England)*, 39(4), 355–367.
<https://doi.org/10.1002/BIOF.1125>
- Gargett, T., & Brown, M. P. (2014). The inducible caspase-9 suicide gene system as a “safety switch” to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells. *Frontiers in Pharmacology*, 5(OCT). <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2014.00235>
- Gauthier, L., Virone-Oddos, A., Beninga, J., Rossi, B., Nicolazzi, C., Amara, C., Blanchard-Alvarez, A., Gourdin, N., Courta, J., Basset, A., Agnel, M., Guillot, F., Grondin, G., Bonnevaux, H., Bauchet, A. L., Morel, A., Morel, Y., Chiron, M., & Vivier, E. (2023). Control of acute myeloid leukemia by a trifunctional NKp46-CD16a-NK cell engager targeting CD123. *Nature Biotechnology* 2023 41:9, 41(9), 1296–1306. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01626-2>
- Genßler, S., Burger, M. C., Zhang, C., Oelsner, S., Mildenerger, I., Wagner, M., Steinbach, J. P., & Wels, W. S. (2016). Dual targeting of glioblastoma with chimeric antigen receptor-engineered natural killer cells overcomes heterogeneity of target antigen expression and enhances antitumor activity and survival. *Oncotarget*, 5(4).
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1119354>
- Ghetie, M. A., Podar, E. M., Ilgen, A., Gordon, B. E., Uhr, J. W., & Vitetta, E. S. (1997). Homodimerization of tumor-reactive monoclonal antibodies markedly increases their ability to induce growth arrest or apoptosis of tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(14), 7509–7514.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.94.14.7509>
- Gianni, L., Eiermann, W., Semiglazov, V., Lluch, A., Tjulandin, S., Zambetti, M., Moliterni, A., Vazquez, F., Byakhov, M. J., Lichinitser, M., Climent, M. A., Ciruelos, E., Ojeda, B., Mansutti, M., Bozhok, A., Magazzù, D., Heinzmann, D., Steinseifer, J., Valagussa, P., & Baselga, J. (2014). Neoadjuvant and adjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (NOAH): follow-up of a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *The Lancet. Oncology*, 15(6), 640–647. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70080-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70080-4)
- Gillgrass, A. E., Chew, M. V., Krneta, T., & Ashkar, A. A. (2015). Overexpression of IL-15 promotes tumor destruction via NK1.1+ cells in a spontaneous breast cancer model. *BMC Cancer*, 15(1).
<https://doi.org/10.1186/S12885-015-1264-3>
- Gillgrass, A., Gill, N., Babian, A., & Ashkar, A. A. (2014). The Absence or Overexpression of IL-15 Drastically Alters Breast Cancer Metastasis via Effects on NK Cells, CD4 T Cells, and

- Macrophages. *The Journal of Immunology*, 193(12), 6184–6191.
<https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1303175>
- Girardi, M., Oppenheim, D. E., Steele, C. R., Lewis, J. M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R. E., & Hayday, A. C. (2001). Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5542), 3031–3035.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1063916>
- Goff, S. L., Morgan, R. A., Yang, J. C., Sherry, R. M., Robbins, P. F., Restifo, N. P., Feldman, S. A., Lu, Y. C., Lu, L., Zheng, Z., Xi, L., Epstein, M., McIntyre, L. S., Malekzadeh, P., Raffeld, M., Fine, H. A., & Rosenberg, S. A. (2019). Pilot trial of adoptive transfer of chimeric antigen receptor-Transduced t cells targeting egfrviii in patients with glioblastoma. *Journal of Immunotherapy*, 42(4), 126–135. <https://doi.org/10.1097/CJI.0000000000000260>
- Goldrath, A. W., Sivakumar, P. V., Glaccum, M., Kennedy, M. K., Bevan, M. J., Benoist, C., Mathis, D., & Butz, E. A. (2002). Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 195(12), 1515–1522.
<https://doi.org/10.1084/JEM.20020033>
- Gong, J., Maki, G., & Klingemann, H. (1994). Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia*.
- Gotthardt, D., Trifinopoulos, J., Sexl, V., & Putz, E. M. (2019). JAK/STAT Cytokine Signaling at the Crossroad of NK Cell Development and Maturation. *Frontiers in Immunology*, 10, 491611.
<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.02590/BIBTEX>
- Grabstein, K. H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M. A., Ahdieh, M., Johnson, L., Alderson, M. R., Watson, J. D., Anderson, D. M., & Giri, J. G. (1994). Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5161), 965–968.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8178155>
- Grimm, E. A., Mazumder, A., Zhang, H. Z., & Rosenberg, S. A. (1982). Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 155(6), 1823–1841. <https://doi.org/10.1084/JEM.155.6.1823>
- Grimm, E. A., Ramsey, K. M., Mazumder, A., Wilson, D. J., Djeu, J. Y., & Rosenberg, S. A. (1983). Lymphokine-activated killer cell phenomenon. II. Precursor phenotype is serologically distinct from peripheral T lymphocytes, memory cytotoxic thymus-derived lymphocytes, and natural killer cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 157(3), 884–897.
<https://doi.org/10.1084/JEM.157.3.884>
- Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M., & Spies, T. (1996). Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(22), 12445–12450.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.93.22.12445>
- Groh, V., Rhinehart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M. S., Riddell, S. R., & Spies, T. (2001). Costimulation of CD8 $\alpha\beta$ T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nature Immunology* 2001 2:3, 2(3), 255–260. <https://doi.org/10.1038/85321>
- Groh, V., Wu, J., Yee, C., & Spies, T. (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002 419:6908, 419(6908), 734–738.
<https://doi.org/10.1038/nature01112>
- Guerra, N., Tan, Y. X., Joncker, N. T., Choy, A., Gallardo, F., Xiong, N., Knoblaugh, S., Cado, D., Greenberg, N. R., & Raulet, D. H. (2008). NKG2D-deficient mice are defective in tumor

- surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity*, 28(4), 571–580.
<https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2008.02.016>
- Guo, Y., Feng, K., Liu, Y., Wu, Z., Dai, H., Yang, Q., Wang, Y., Jia, H., & Han, W. (2018). Phase I Study of Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in Patients with EGFR-Positive Advanced Biliary Tract Cancers. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 24(6), 1277–1286. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0432>
- Guo, Y., Luan, L., Patil, N. K., & Sherwood, E. R. (2017). Immunobiology of the IL-15-IL-15R α Complex as an Antitumor and Antiviral Agent. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 38, 10.
<https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2017.08.002>
- Guzman, G., Reed, M. R., Bielamowicz, K., Koss, B., & Rodriguez, A. (2023). CAR-T Therapies in Solid Tumors: Opportunities and Challenges. *Current Oncology Reports*, 25(5), 479.
<https://doi.org/10.1007/S11912-023-01380-X>
- Hainsworth, J. D. (2002). Rituximab as first-line and maintenance therapy for patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma: Interim follow-up of a multicenter phase II trial. *Seminars in Oncology*, 29(1S2), 25–29. <https://doi.org/10.1053/sonc.2002.30154>
- Ham, H., Medlyn, M., & Billadeau, D. D. (2022). Locked and Loaded: Mechanisms Regulating Natural Killer Cell Lytic Granule Biogenesis and Release. *Frontiers in Immunology*, 13.
<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.871106>
- Han, K. ping, Zhu, X., Liu, B., Jeng, E., Kong, L., Yovandich, J. L., Vyas, V. V., Marcus, W. D., Chavaillez, P. A., Romero, C. A., Rhode, P. R., & Wong, H. C. (2011). IL-15:IL-15 receptor alpha superagonist complex: High-level co-expression in recombinant mammalian cells, purification and characterization. *Cytokine*, 56(3), 804–810. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.09.028>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hartmann, C., Müller, N., Blaukat, A., Koch, J., Benhar, I., & Wels, W. S. (2010). Peptide mimotopes recognized by antibodies cetuximab and matuzumab induce a functionally equivalent anti-EGFR immune response. *Oncogene* 2010 29:32, 29(32), 4517–4527.
<https://doi.org/10.1038/onc.2010.195>
- Hatterer, E., Chauchet, X., Richard, F., Barba, L., Moine, V., Chatel, L., Broyer, L., Pontini, G., Bautzova, T., Juan, F., Calloud, S., Bosson, N., Charreton, M., Masternak, K., Buatois, V., & Shang, L. (2020). Targeting a membrane-proximal epitope on mesothelin increases the tumoricidal activity of a bispecific antibody blocking CD47 on mesothelin-positive tumors. *MAbs*, 12(1). <https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1739408>
- Hawkins, E. R., D'souza, R. R., & Klampatsa, A. (2021). Armored CAR T-Cells: The Next Chapter in T-Cell Cancer Immunotherapy. *Biologics : Targets & Therapy*, 15, 95–105.
<https://doi.org/10.2147/BTT.S291768>
- Hayes, C. (2020). Cellular immunotherapies for cancer. *Irish Journal of Medical Science (1971 -)* 2020 190:1, 190(1), 41–57. <https://doi.org/10.1007/S11845-020-02264-W>
- Haynes, N. M., Trapani, J. A., Teng, M. W. L., Jackson, J. T., Cerruti, L., Jane, S. M., Kershaw, M. H., Smyth, M. J., & Darcy, P. K. (2002). Single-chain antigen recognition receptors that costimulate potent rejection of established experimental tumors. *Blood*, 100(9), 3155–3163.
<https://doi.org/10.1182/blood-2002-04-1041>
- Hedlund, M., Nagaeva, O., Kargl, D., Baranov, V., & Mincheva-Nilsson, L. (2011). Thermal- and Oxidative Stress Causes Enhanced Release of NKG2D Ligand-Bearing Immunosuppressive Exosomes in Leukemia/Lymphoma T and B Cells. *PLOS ONE*, 6(2), e16899.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0016899>

- Heimberger, A. B., Hlatky, R., Suki, D., Yang, D., Weinberg, J., Gilbert, M., Sawaya, R., & Aldape, K. (2005). Prognostic effect of epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma multiforme patients. *Clinical Cancer Research*, *11*(4), 1462–1466. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1737>
- Henjes, F., Bender, C., Von Der Heyde, S., Braun, L., Mannsperger, H. A., Schmidt, C., Wiemann, S., Hasmann, M., Aulmann, S., Beissbarth, T., & Korf, U. (2012). Strong EGFR signaling in cell line models of ERBB2-amplified breast cancer attenuates response towards ERBB2-targeting drugs. *Oncogenesis*, *1*(7). <https://doi.org/10.1038/oncsis.2012.16>
- Herberman, R. B. (1998). Lymphokine-Activated Killer (LAK) Cells. *Encyclopedia of Immunology*, 1627–1631. <https://doi.org/10.1006/RWEI.1999.0416>
- Herberman, R. B., Nunn, M. E., Holden, H. T., & Lavrin, D. H. (1975). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *International Journal of Cancer*, *16*(2), 230–239. <https://doi.org/10.1002/IJC.2910160205>
- Hilpert, J., Grosse-Hovest, L., Grünebach, F., Buechele, C., Nuebling, T., Raum, T., Steinle, A., & Salih, H. R. (2012). Comprehensive Analysis of NKG2D Ligand Expression and Release in Leukemia: Implications for NKG2D-Mediated NK Cell Responses. *The Journal of Immunology*, *189*(3), 1360–1371. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1200796>
- Holubec, L., Polivka, J., Safanda, M., Karas, M., & Liska, V. (2016). The Role of Cetuximab in the Induction of Anticancer Immune Response in Colorectal Cancer Treatment. *Anticancer Research*, *36*(9), 4421–4426. <https://doi.org/10.21873/ANTICANRES.10985>
- Houchins, J. P., Yabe, T., McSherry, C., & Bach, F. H. (1991). DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *173*(4), 1017–1020. <https://doi.org/10.1084/JEM.173.4.1017>
- Hoyos, V., Savoldo, B., Quintarelli, C., Mahendravada, A., Zhang, M., Vera, J., Heslop, H. E., Rooney, C. M., Brenner, M. K., & Dotti, G. (2010). Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia*, *24*(6), 1160–1170. <https://doi.org/10.1038/LEU.2010.75>
- Hsu, J. L., & Hung, M. C. (2016). The role of HER2, EGFR, and other receptor tyrosine kinases in breast cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, *35*(4), 575–588. <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9649-6>
- Hu, W., Wang, G., Huang, D., Sui, M., & Xu, Y. (2019). Cancer immunotherapy based on natural killer cells: Current progress and new opportunities. *Frontiers in Immunology*, *10*(MAY), 436512. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.01205/BIBTEX>
- Huan, T., Guan, B., Li, H., Tu, X., Zhang, C., & Tang, B. (2023). Principles and current clinical landscape of NK cell engaging bispecific antibody against cancer. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, *19*(2). <https://doi.org/10.1080/21645515.2023.2256904>
- Hudspeth, K., Silva-Santos, B., & Mavilio, D. (2013). Natural Cytotoxicity Receptors: Broader Expression Patterns and Functions in Innate and Adaptive Immune Cells. *Frontiers in Immunology*, *4*(MAR). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2013.00069>
- Hwang, Y., Chumbalkar, V., Latha, K., & Bogler, O. (2011). Forced dimerization increases the activity of ΔEGFR/EGFRvIII and enhances its oncogenicity. *Molecular Cancer Research : MCR*, *9*(9), 1199–1208. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0229>
- Ibáñez-Navarro, M., Fernández, A., Escudero, A., Estes, G., Campos-Silva, C., Navarro-Aguadero, M. Á., Leivas, A., Caracuel, B. R., Rodríguez-Antolín, C., Ortiz, A., Navarro-Zapata, A., Mestre-

- Durán, C., Izquierdo, M., Balaguer-Pérez, M., Ferreras, C., Martínez-López, J., Valés-Gómez, M., Pérez-Martínez, A., & Fernández, L. (2023). NKG2D-CAR memory T cells target pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia in vitro and in vivo but fail to eliminate leukemia initiating cells. *Frontiers in Immunology*, *14*. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1187665>
- Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). The roles of IFN γ in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *13*(2), 95–109. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(01\)00038-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(01)00038-7)
- ImmunityBio Announces FDA Approval of ANKTIVA[®], First-in-Class IL-15 Receptor Agonist for BCG-Unresponsive Non-Muscle Invasive Bladder Cancer - ImmunityBio.* (n.d.). Retrieved April 23, 2024, from <https://immunitybio.com/immunitybio-announces-fda-approval-of-anktiva-first-in-class-il-15-receptor-agonist-for-bcg-unresponsive-non-muscle-invasive-bladder-cancer/>
- Ines Kühnel, T. T. W. S. W. (n.d.). *Engineered NK Cell Lines and their Application for Cancer Immunotherapy.*
- Jabri, B., & Abadie, V. (2015). IL-15 functions as a danger signal to regulate tissue-resident T cells and tissue destruction. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 15, Issue 12, pp. 771–783). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri3919>
- Jamieson, A. M., Diefenbach, A., McMahon, C. W., Xiong, N., Carlyle, J. R., & Raulet, D. H. (2002). The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity*, *17*(1), 19–29. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00333-3](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00333-3)
- Jensen, M. C., Popplewell, L., Cooper, L. J., DiGiusto, D., Kalos, M., Ostberg, J. R., & Forman, S. J. (2010). Antitransgene rejection responses contribute to attenuated persistence of adoptively transferred CD20/CD19-specific chimeric antigen receptor redirected T cells in humans. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, *16*(9), 1245–1256. <https://doi.org/10.1016/J.BBMT.2010.03.014>
- Jin, J., Gkitsas, N., Fellowes, V. S., Ren, J., Feldman, S. A., Hinrichs, C. S., Stroncek, D. F., & Highfill, S. L. (2018). Enhanced clinical-scale manufacturing of TCR transduced T-cells using closed culture system modules. *Journal of Translational Medicine*, *16*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12967-018-1384-Z/FIGURES/7>
- Jin, S., Sun, Y., Liang, X., Gu, X., Ning, J., Xu, Y., Chen, S., & Pan, L. (2022). Emerging new therapeutic antibody derivatives for cancer treatment. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/S41392-021-00868-X>
- Jones, B. S., Lamb, L. S., Goldman, F., & Di Stasi, A. (2014). Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer. *Frontiers in Pharmacology*, *5*. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2014.00254>
- Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics* *2002* 3:6, *3*(6), 415–428. <https://doi.org/10.1038/nrg816>
- Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S., & Winter, G. (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* *1986* 321:6069, *321*(6069), 522–525. <https://doi.org/10.1038/321522a0>
- Jose, W. M., Munirathnam, V., Narendranath, V., Philip, A., & Keechilat, P. (2020). Frequency and Prognosis of Epidermal Growth Factor Receptor Variant III Mutations in Glioblastoma Multiforme among Indian Patients: A Single-Institution Study. *South Asian Journal of Cancer*, *9*(3), 126. <https://doi.org/10.1055/S-0041-1723078>
- Judge, S. J., Murphy, W. J., & Canter, R. J. (2020). Characterizing the Dysfunctional NK Cell: Assessing the Clinical Relevance of Exhaustion, Anergy, and Senescence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 519676. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.00049/BIBTEX>

- Jutten, B., Dubois, L., Li, Y., Aerts, H., Wouters, B. G., Lambin, P., Theys, J., & Lammering, G. (2009). Binding of cetuximab to the EGFRvIII deletion mutant and its biological consequences in malignant glioma cells. *Radiotherapy and Oncology : Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, *92*(3), 393–398. <https://doi.org/10.1016/J.RADONC.2009.06.021>
- Kailayangiri, S., Altvater, B., Wiebel, M., Jamitzky, S., & Rossig, C. (2020). Overcoming Heterogeneity of Antigen Expression for Effective CAR T Cell Targeting of Cancers. *Cancers*, *12*(5). <https://doi.org/10.3390/CANCERS12051075>
- Kalos, M., Levine, B. L., Porter, D. L., Katz, S., Grupp, S. A., Bagg, A., & June, C. H. (2011). T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Science Translational Medicine*, *3*(95). <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.3002842>
- Kang, C. H., Kim, Y., Lee, H. K., Lee, S. M., Jeong, H. G., Choi, S. U., & Park, C. H. (2020). Identification of Potent CD19 scFv for CAR T Cells through scFv Screening with NK/T-Cell Line. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(23), 1–12. <https://doi.org/10.3390/IJMS21239163>
- Kato, N., Tanaka, J., Sugita, J., Toubai, T., Miura, Y., Iyata, M., Syono, Y., Ota, S., Kondo, T., Asaka, M., & Imamura, M. (2007). Regulation of the expression of MHC class I-related chain A, B (MICA, MICB) via chromatin remodeling and its impact on the susceptibility of leukemic cells to the cytotoxicity of NKG2D-expressing cells. *Leukemia* *2007 21:10*, *21*(10), 2103–2108. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404862>
- Keam, S. J. (2024). Lifileucel: First Approval. *Molecular Diagnosis & Therapy* *2024*, 1–6. <https://doi.org/10.1007/S40291-024-00708-Y>
- Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual Review of Immunology*, *26*, 677–704. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.26.021607.090331>
- Kellner, C., Gramatzki, M., & Peipp, M. (2013). Promoting natural killer cell functions by recombinant immunoligands mimicking an induced self phenotype. *Oncoimmunology*, *2*(6). <https://doi.org/10.4161/ONCI.24481>
- Kellner, C., Günther, A., Humpe, A., Repp, R., Klausz, K., Derer, S., Valerius, T., Ritgen, M., Brüggemann, M., van de Winkel, J. G. J., Parren, P. W. H. I., Kneba, M., Gramatzki, M., & Peipp, M. (2015). Enhancing natural killer cell-mediated lysis of lymphoma cells by combining therapeutic antibodies with CD20-specific immunoligands engaging NKG2D or NKp30. *Oncoimmunology*, *5*(1). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1058459>
- Kennedy, P. R., Vallera, D. A., Ettestad, B., Hallstrom, C., Kodal, B., Todhunter, D. A., Bendzick, L., Hinderlie, P., Walker, J. T., Pulkrabek, B., Pastan, I., Kratzke, R. A., Fujioka, N., Miller, J. S., & Felices, M. (2023). A tri-specific killer engager against mesothelin targets NK cells towards lung cancer. *Frontiers in Immunology*, *14*. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1060905>
- Kerbauy, L. N., Marin, N. D., Kaplan, M., Banerjee, P. P., Berrien-Elliott, M. M., Becker-Hapak, M., Basar, R., Foster, M., Melo, L. G., Neal, C. C., McClain, E., Daher, M., Nunez Cortes, A. K., Desai, S., Lim, F. W. I., Mendt, M. C., Schappe, T., Li, L., Shaim, H., ... Rezvani, K. (2021). Combining AFM13, a bispecific CD30/CD16 antibody, with cytokine-activated blood and cord blood-derived NK cells facilitates CAR-like responses against CD30+ malignancies. *Clinical Cancer Research*, *27*(13), 3744–3756. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-0164/672191/AM/COMBINING-AFM13-A-BISPECIFIC-CD30-CD16-ANTIBODY>
- Kershaw, M. H., Westwood, J. A., Parker, L. L., Wang, G., Eshhar, Z., Mavroukakis, S. A., White, D. E., Wunderlich, J. R., Canevari, S., Rogers-Freezer, L., Chen, C. C., Yang, J. C., Rosenberg, S. A., & Hwu, P. (2006). A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for

- ovarian cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 12(20 Pt 1), 6106–6115. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1183>
- Khong, H. T., & Restifo, N. P. (2002). Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nature Immunology* 2002 3:11, 3(11), 999–1005. <https://doi.org/10.1038/ni1102-999>
- Kiefer, A., Prüfer, M., Röder, J., Serrahima, J. P., Bodden, M., Kühnel, I., Oberoi, P., & Wels, W. S. (2024). Dual Targeting of Glioblastoma Cells with Bispecific Killer Cell Engagers Directed to EGFR and ErbB2 (HER2) Facilitates Effective Elimination by NKG2D-CAR-Engineered NK Cells. *Cells* 2024, Vol. 13, Page 246, 13(3), 246. <https://doi.org/10.3390/CELLS13030246>
- Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., & Wigzell, H. (1975). “Natural” killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *European Journal of Immunology*, 5(2), 117–121. <https://doi.org/10.1002/EJL.1830050209>
- Klingemann, H. (2014). Are natural killer cells superior CAR drivers? *Oncoimmunology*, 3(4). <https://doi.org/10.4161/ONCI.28147>
- Klingemann, H. (2023). The NK-92 cell line-30 years later: its impact on natural killer cell research and treatment of cancer. *Cytotherapy*, 25(5), 451–457. <https://doi.org/10.1016/J.JCYT.2022.12.003>
- Knudson, K. M., Hodge, J. W., Schlom, J., & Gameiro, S. R. (2020). Rationale for IL-15 superagonists in cancer immunotherapy. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 20(7), 705–709. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1738379>
- Kobayashi, H., Dubois, S., Sato, N., Sabzevari, H., Sakai, Y., Waldmann, T. A., & Tagaya, Y. (2005). Role of trans-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance. *Blood*, 105(2), 721–727. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2003-12-4187>
- Koguchi, Y., Hoen, H. M., Bambina, S. A., Rynning, M. D., Fuerstenberg, R. K., Curti, B. D., Urba, W. J., Milburn, C., Bahjat, F. R., Korman, A. J., & Bahjat, K. S. (2015). Serum Immunoregulatory Proteins as Predictors of Overall Survival of Metastatic Melanoma Patients Treated with Ipilimumab. *Cancer Research*, 75(23), 5084–5092. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2303>
- Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975 256:5517, 256(5517), 495–497. <https://doi.org/10.1038/256495a0>
- Konrad, M. W., Hemstreet, G., Hersh, E. M., Mansell, P. W. A., Mertelsmann, R., Kolitz, J. E., & Bradley, E. C. (1990). Pharmacokinetics of Recombinant Interleukin 2 in Humans. *CANCER RESEARCH*, 50. <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/50/7/2009/2442950/cr0500072009.pdf>
- Krieg, S., & Ullrich, E. (2013). Novel immune modulators used in hematology: impact on NK cells. *Frontiers in Immunology*, 3(JAN). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2012.00388>
- Kruse, P. H., Matta, J., Ugolini, S., & Vivier, E. (2014). Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunology and Cell Biology*, 92(3), 221–229. <https://doi.org/10.1038/ICB.2013.98>
- Krzewski, K., & Coligan, J. E. (2012). Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Frontiers in Immunology*, 3(NOV), 35037. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2012.00335/BIBTEX>
- Labani-Motlagh, A., Israelsson, P., Ottander, U., Lundin, E., Nagaev, I., Nagaeva, O., Dehlin, E., Baranov, V., & Mincheva-Nilsson, L. (2016). Differential expression of ligands for NKG2D and DNAM-1 receptors by epithelial ovarian cancer-derived exosomes and its influence on NK cell

- cytotoxicity. *Tumor Biology*, 37(4), 5455–5466. <https://doi.org/10.1007/S13277-015-4313-2/FIGURES/5>
- Labrijn, A. F., Janmaat, M. L., Reichert, J. M., & Parren, P. W. H. I. (2019). Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. *Nature Reviews Drug Discovery* 2019 18:8, 18(8), 585–608. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0028-1>
- Langers, I., Renoux, V. M., Thiry, M., Delvenne, P., & Jacobs, N. (2012). Natural killer cells: role in local tumor growth and metastasis. *Biologics : Targets & Therapy*, 6, 73. <https://doi.org/10.2147/BTT.S23976>
- Lanier, L. L. (2004). NK CELL RECOGNITION. <https://doi.org/10.1146/Annurev.Immunol.23.021704.115526>, 23, 225–274. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.23.021704.115526>
- Lanier, L. L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nature Immunology*, 9(5), 495. <https://doi.org/10.1038/NI1581>
- Lanier, L. L. (2015). NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunology Research*, 3(6), 575–582. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0098>
- Lanier, L. L., Corliss, B., Wu, J., & Phillips, J. H. (1998). Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity*, 8(6), 693–701. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80574-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80574-9)
- Lanier, L. L., Le, A. M., Civin, C. I., Loken, M. R., & Phillips, J. H. (1986). The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 136(12), 4480–4486. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.136.12.4480>
- Larson, S. M., Walthers, C. M., Ji, B., Ghafouri, S. N., Naparstek, J., Trent, J., Chen, J. M., Roshandell, M., Harris, C., Khericha, M., Schweppe, T., Berent-Maoz, B., Gosliner, S. B., Almakari, A., Ceja, M. A., Allen-Auerbach, M. S., Said, J., Nawaly, K., Mead, M., ... Chen, Y. Y. (2023). CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptor (CAR) in Naive/Memory T Cells for the Treatment of Relapsed or Refractory Non-Hodgkin Lymphoma. *Cancer Discovery*, 13(3), 580–597. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-22-0964>
- Lasek, W. (2022). Cancer immunoediting hypothesis: history, clinical implications and controversies. *Central-European Journal of Immunology*, 47(2), 168. <https://doi.org/10.5114/CEJI.2022.117376>
- Laskowski, T. J., Biederstädt, A., & Rezvani, K. (2022). Natural killer cells in antitumour adoptive cell immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 2022 22:10, 22(10), 557–575. <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00491-0>
- Law, T. M., Motzer, R. J., Mazumdar, M., Sell, K. W., Walther, P.], Khan, A., Vlamis, V., Vogelzang, N.], & Bajorin, D. F. (1995). *Phase 111 Randomized Trial of Interleukin-2 with or without Lymphokine-Activated Killer Cells in the Treatment of Patients with Advanced Renal Cell Carcinoma*. <https://doi.org/10.1002/1097-0142>
- Lazarova, M., & Steinle, A. (2019). Impairment of NKG2D-Mediated Tumor Immunity by TGF-β. *Frontiers in Immunology*, 10(November), 2689. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02689>
- Lazarova, M., Wels, W. S., & Steinle, A. (2020). Arming cytotoxic lymphocytes for cancer immunotherapy by means of the NKG2D/NKG2D-ligand system. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 20(12), 1491–1501. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1803273>
- Lee, J.-C., Lee, K.-M., Kim, D.-W., & Heo, D. S. (2004). Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *Journal of*

- Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(12), 7335–7340.
<https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.172.12.7335>
- Lee, N., Llano, M., Carretero, M., Akiko-Ishitani, Navarro, F., López-Botet, M., & Geraghty, D. E. (1998). HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(9), 5199–5204. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.5199>
- Lerner, E. C., Woroniecka, K. I., D'Anniballe, V. M., Wilkinson, D. S., Mohan, A. A., Lorrey, S. J., Waibl-Polania, J., Wachsmuth, L. P., Miggelbrink, A. M., Jackson, J. D., Cui, X., Raj, J. A., Tomaszewski, W. H., Cook, S. L., Sampson, J. H., Patel, A. P., Khasraw, M., Gunn, M. D., & Fecci, P. E. (2023). CD8+ T cells maintain killing of MHC-I-negative tumor cells through the NKG2D–NKG2DL axis. *Nature Cancer*. <https://doi.org/10.1038/s43018-023-00600-4>
- Levi-Schaffer, F., & Mandelboim, O. (2018). Inhibitory and Coactivating Receptors Recognising the Same Ligand: Immune Homeostasis Exploited by Pathogens and Tumours. *Trends in Immunology*, 39(2), 112. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2017.10.001>
- Li, P., Katirai, F., Zheng, F., & Gong, F. (2011). Recycling and reutilization of cytotoxic molecules, a new type of energy conservation of NK cells? *Medical Hypotheses*, 76(2), 293–295. <https://doi.org/10.1016/J.MEHY.2010.10.027>
- Li, S., Schmitz, K. R., Jeffrey, P. D., Wiltzius, J. J. W., Kussie, P., & Ferguson, K. M. (2005). Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell*, 7(4), 301–311. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.03.003>
- Liang, A., Ye, S., Li, P., Huang, J., Zhu, S., Yao, X., Zhou, L., Xu, Y., Zhu, J., Zheng, C., Chen, S., Lan, L., Lv, X., Wei, Y., Humphries, M., & Yao, Y. (2021). Safety and efficacy of a novel anti-CD20 chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy in relapsed/refractory (r/r) B-cell non-Hodgkin lymphoma (B-NHL) patients after failing CD19 CAR-T therapy. https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.2508, 39(15_suppl), 2508–2508. https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.15_SUPPL.2508
- Lieberman, J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nature Reviews. Immunology*, 3(5), 361–370. <https://doi.org/10.1038/NRI1083>
- Lin, F., Stuckert, A., Tat, C., Moeller, K., White, M., Ruggieri, L., Zhang, H., Lindsay, H., Baxter, P., Malbari, F., Aldave, G., Chintagumpala, M., Parsons, D. W., Brenner, M., Heslop, H., Rooney, C., & Omer, B. (2023). IMMU-15. PHASE I TRIAL OF GD2.CART-CELLS AUGMENTED WITH A CONSTITUTIVELY ACTIVE INTERLEUKIN-7 RECEPTOR (C7R) FOR TREATMENT OF HIGH-GRADE PEDIATRIC CNS TUMORS. *Neuro-Oncology*, 25(Supplement_1), i52–i53. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOAD073.202>
- Lindner, S. E., Johnson, S. M., Brown, C. E., & Wang, L. D. (2020). Chimeric antigen receptor signaling: Functional consequences and design implications. *Science Advances*, 6(21). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAZ3223>
- Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., & Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR Journal*, 46(3), 258–268. <https://doi.org/10.1093/ILAR.46.3.258>
- Little, M., Kipriyanov, S. M., Le Gall, F., & Moldenhauer, G. (2000). Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. *Immunology Today*, 21(8), 364–370. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01668-6](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01668-6)
- Liu, D., Xu, L., Yang, F., Li, D., Gong, F., & Xu, T. (2005). Rapid biogenesis and sensitization of secretory lysosomes in NK cells mediated by target-cell recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(1), 123. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0405737102>

- Liu, E., Marin, D., Banerjee, P., Macapinlac, H. A., Thompson, P., Basar, R., Nassif Kerbauy, L., Overman, B., Thall, P., Kaplan, M., Nandivada, V., Kaur, I., Nunez Cortes, A., Cao, K., Daher, M., Hosing, C., Cohen, E. N., Kebriaei, P., Mehta, R., ... Rezvani, K. (2020). Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *New England Journal of Medicine*, 382(6), 545–553. https://doi.org/10.1056/NEJMOA1910607/SUPPL_FILE/NEJMOA1910607_DATA-SHARING.PDF
- Liu, K., Catalfamo, M., Li, Y., Henkart, P. A., & Weng, N. P. (2002). IL-15 mimics T cell receptor crosslinking in the induction of cellular proliferation, gene expression, and cytotoxicity in CD8+ memory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(9), 6192–6197. <https://doi.org/10.1073/PNAS.092675799>
- Liu, Y., Guo, Y., Wu, Z., Feng, K., Tong, C., Wang, Y., Dai, H., Shi, F., Yang, Q., & Han, W. (2020). Anti-EGFR chimeric antigen receptor-modified T cells in metastatic pancreatic carcinoma: A phase I clinical trial. *Cytotherapy*, 22(10), 573–580. <https://doi.org/10.1016/J.JCYT.2020.04.088>
- Lizana-Vasquez, G. D., Torres-Lugo, M., Dixon, R. B., Powderly, J. D., & Warin, R. F. (2023). The application of autologous cancer immunotherapies in the age of memory-NK cells. *Frontiers in Immunology*, 14, 1167666. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1167666/BIBTEX>
- Ljunggren, H. G., & Kärre, K. (1990). In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology Today*, 11(7), 237–244. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(90\)90097-S](https://doi.org/10.1016/0167-5699(90)90097-S)
- Locke, F. L., Ghobadi, A., Jacobson, C. A., Miklos, D. B., Lekakis, L. J., Oluwole, O. O., Lin, Y., Braunschweig, I., Hill, B. T., Timmerman, J. M., Deol, A., Reagan, P. M., Stiff, P., Flinn, I. W., Farooq, U., Goy, A., McSweeney, P. A., Munoz, J., Siddiqi, T., ... Neelapu, S. S. (2019). Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial. *The Lancet. Oncology*, 20(1), 31–42. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30864-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30864-7)
- Locke, F. L., Miklos, D. B., Jacobson, C. A., Perales, M.-A., Kersten, M.-J., Oluwole, O. O., Ghobadi, A., Rapoport, A. P., McGuirk, J., Pagel, J. M., Muñoz, J., Farooq, U., van Meerten, T., Reagan, P. M., Sureda, A., Flinn, I. W., Vandenberghe, P., Song, K. W., Dickinson, M., ... Westin, J. R. (2022). Axicabtagene Ciloleucel as Second-Line Therapy for Large B-Cell Lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, 386(7), 640–654. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2116133>
- Lodolce, J. P., Burkett, P. R., Koka, R. M., Boone, D. L., & Ma, A. (2002). Regulation of lymphoid homeostasis by interleukin-15. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 13(6), 429–439. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(02\)00029-1](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(02)00029-1)
- Long, E. O., Sik Kim, H., Liu, D., Peterson, M. E., & Rajagopalan, S. (2013). Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annual Review of Immunology*, 31, 227–258. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-020711-075005>
- Lotze, M. T., Frana, L. W., Sharrow, S. O., Robb, R. J., & Rosenberg, S. A. (1985). In vivo administration of purified human interleukin 2. I. Half-life and immunologic effects of the Jurkat cell line-derived interleukin 2. *The Journal of Immunology*, 134(1), 157–166. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.134.1.157>
- Lutz, S., Klausz, K., Albici, A. M., Ebinger, L., Sellmer, L., Teipel, H., Frenzel, A., Langner, A., Winterberg, D., Krohn, S., Hust, M., Schirrmann, T., Dübel, S., Scherließ, R., Humpe, A., Gramatzki, M., Kellner, C., & Peipp, M. (2023). Novel NKG2D-directed bispecific antibodies enhance antibody-mediated killing of malignant B cells by NK cells and T cells. *Frontiers in Immunology*, 14, 1227572. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1227572/BIBTEX>

- Maasho, K., Opoku-Anane, J., Marusina, A. I., Coligan, J. E., & Borrego, F. (2005). Cutting Edge: NKG2D Is a Costimulatory Receptor for Human Naive CD8+ T Cells. *The Journal of Immunology*, 174(8), 4480–4484. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.174.8.4480>
- Maki, G., Klingemann, H. G., Martinson, J. A., & Tam, Y. K. (2004). Factors Regulating the Cytotoxic Activity of the Human Natural Killer Cell Line, NK-92. *https://Home.Liebertpub.Com/Scd*, 10(3), 369–383. <https://doi.org/10.1089/152581601750288975>
- Maki, G., Tam, Y. K., Berkahn, L., & Klingemann, H. G. (2003). Ex vivo purging with NK-92 prior to autografting for chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplantation* 2003 31:12, 31(12), 1119–1125. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1704117>
- Maloney, D. G., Grillo-Ló Pez, A. J., White, C. A., Bodkin, D., Schilder, R. J., Neidhart, J. A., Janakiraman, N., Foon, K. A., Liles, T.-M., Dallaire, B. K., Wey, K., Royston, I., Davis, T., & Levy, R. (1997). IDEC-C2B8 (Rituximab) Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy in Patients With Relapsed Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma MoAbs against a variety of tumor surface antigens have shown activity in the treatment of patients with low-grade NHL. Unmodified murine MoAbs have included custom.
- Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T. I., Bushkin, Y., Davis, D. M., Strominger, J. L., Yewdell, J. W., & Porgador, A. (2001). Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature*, 409(6823), 1055–1060. <https://doi.org/10.1038/35059110>
- Margolin, K., Morishima, C., Velcheti, V., Miller, J. S., Lee, S. M., Silk, A. W., Holtan, S. G., Lacroix, A. M., Fling, S. P., Kaiser, J. C., Egan, J. O., Jones, M., Rhode, P. R., Rock, A. D., Cheever, M. A., Wong, H. C., & Ernstoff, M. S. (2018). Phase I Trial of ALT-803, A Novel Recombinant IL15 Complex, in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 24(22), 5552–5561. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0945>
- Marin, D., Li, Y., Basar, R., Rafei, H., Daher, M., Dou, J., Mohanty, V., Dede, M., Nieto, Y., Uprety, N., Acharya, S., Liu, E., Wilson, J., Banerjee, P., Macapinlac, H. A., Ganesh, C., Thall, P. F., Bassett, R., Ammari, M., ... Rezvani, K. (2024). Safety, efficacy and determinants of response of allogeneic CD19-specific CAR-NK cells in CD19+ B cell tumors: a phase 1/2 trial. *Nature Medicine* 2024, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02785-8>
- Marin-Acevedo, J. A., Kimbrough, E. M. O., & Lou, Y. (2021). Next generation of immune checkpoint inhibitors and beyond. *Journal of Hematology & Oncology* 2021 14:1, 14(1), 1–29. <https://doi.org/10.1186/S13045-021-01056-8>
- Maskalenko, N. A., Zhigarev, D., & Campbell, K. S. (2022). Harnessing natural killer cells for cancer immunotherapy: dispatching the first responders. *Nature Reviews Drug Discovery* 2022 21:8, 21(8), 559–577. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00413-7>
- Mattes, M. J., Michel, R. B., Goldenberg, D. M., & Sharkey, R. M. (2009). Induction of Apoptosis by Cross-Linking Antibodies Bound to Human B-Lymphoma Cells: Expression of Annexin V Binding Sites on the Antibody Cap. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 24(2), 185. <https://doi.org/10.1089/CBR.2008.0567>
- Mazor, Y., Hansen, A., Yang, C., Chowdhury, P. S., Wang, J., Stephens, G., Wu, H., & Dall'Acqua, W. F. (2015). Insights into the molecular basis of a bispecific antibody's target selectivity. *MAbs*, 7(3), 461–469. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1022695>
- Mazor, Y., Sachsenmeier, K. F., Yang, C., Hansen, A., Filderman, J., Mulgrew, K., Wu, H., & Dall'Acqua, W. F. (2017). Enhanced tumor-targeting selectivity by modulating bispecific antibody binding affinity and format valence. *Scientific Reports* 2017 7:1, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep40098>

- McLaughlin, P., Grillo-López, A. J., Link, B. K., Levy, R., Czuczman, M. S., Williams, M. E., Heyman, M. R., Bence-Bruckler, I., White, C. A., Cabanillas, F., Jain, V., Ho, A. D., Lister, J., Wey, K., Shen, D., & Dallaire, B. K. (2016). Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.8.2825*, 16(8), 2825–2833.
<https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.8.2825>
- Mitra, A., Barua, A., Huang, L., Ganguly, S., Feng, Q., & He, B. (2023). From bench to bedside: the history and progress of CAR T cell therapy. *Frontiers in Immunology*, 14, 1188049.
<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1188049/BIBTEX>
- Morandi, F., & Airoidi, I. (2022). HLA-G and Other Immune Checkpoint Molecules as Targets for Novel Combined Immunotherapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6).
<https://doi.org/10.3390/IJMS23062925>
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Cristina, M., Biassoni, R., & Moretta, L. (2001). Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annual Review of Immunology*, 19, 197–223.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.197>
- Morrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. A., & Oi, V. T. (1984). Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(21), 6851–6855.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.81.21.6851>
- Morvan, M. G., & Lanier, L. L. (2015). NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nature Reviews Cancer* 2016 16:1, 16(1), 7–19. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.5>
- Moscarelli, J., Zahavi, D., Maynard, R., & Weiner, L. M. (2022). The Next Generation of Cellular Immunotherapy: CAR-NK Cells. *Transplantation and Cellular Therapy*, 28(10), 650.
<https://doi.org/10.1016/J.JTCT.2022.06.025>
- Mukherjee, N., Julián, E., Torrelles, J. B., & Svatek, R. S. (2021). Effects of Mycobacterium bovis Calmette et Guérin (BCG) in oncotherapy: Bladder cancer and beyond. *Vaccine*, 39(50), 7332.
<https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2021.09.053>
- Mullard, A. (2015). FDA approves first bispecific. *Nature Publishing Group*.
<https://doi.org/10.1038/nrd4531>
- Müller, D. (2012). Targeted cancer immunotherapy: Mimicking physiological trans-presentation of IL-15. *Oncoimmunology*, 1(7), 1213–1214. <https://doi.org/10.4161/ONCI.20824>
- Müller, N., Hartmann, C., Genßler, S., Koch, J., Kinner, A., Grez, M., & Wels, W. S. (2014). A bispecific transmembrane antibody simultaneously targeting intra- and extracellular epitopes of the epidermal growth factor receptor inhibits receptor activation and tumor cell growth. *International Journal of Cancer*, 134(11), 2547–2559. <https://doi.org/10.1002/IJC.28585>
- Müller, T., Uherek, C., Maki, G., Chow, K. U., Schimpf, A., Klingemann, H. G., Tonn, T., & Wels, W. S. (2008). Expression of a CD20-specific chimeric antigen receptor enhances cytotoxic activity of NK cells and overcomes NK-resistance of lymphoma and leukemia cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, 57(3), 411–423. <https://doi.org/10.1007/S00262-007-0383-3>
- Murphy, K., & Weaver, C. (2018). Janeway Immunologie. *Janeway Immunologie*.
<https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4>
- Mustafa, S., Koran, S., & AlOmair, L. (2022). Insights Into the Role of Matrix Metalloproteinases in Cancer and its Various Therapeutic Aspects: A Review. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9.
<https://doi.org/10.3389/FMOLB.2022.896099>

- Nanbakhsh, A., Pochon, C., Mallavialle, A., Amsellem, S., Bourhis, J. H., & Chouaib, S. (2014). c-Myc regulates expression of NKG2D ligands ULBP1/2/3 in AML and modulates their susceptibility to NK-mediated lysis. *Blood*, *123*(23), 3585–3595. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2013-11-536219>
- Natsume, A., In, M., Takamura, H., Nakagawa, T., Shimizu, Y., Kitajima, K., Wakitani, M., Ohta, S., Satoh, M., Shitara, K., & Niwa, R. (2008). Engineered Antibodies of IgG1/IgG3 Mixed Isotype with Enhanced Cytotoxic Activities. *Cancer Research*, *68*(10), 3863–3872. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6297>
- Nausch, N., & Cerwenka, A. (2008). NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene* *2008* *27*:45, *27*(45), 5944–5958. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.272>
- Navarrete-Galvan, L., Guglielmo, M., Cruz Amaya, J., Smith-Gagen, J., Lombardi, V. C., Merica, R., & Hudig, D. (2022). Optimizing NK-92 serial killers: gamma irradiation, CD95/Fas-ligation, and NK or LAK attack limit cytotoxic efficacy. *Journal of Translational Medicine*, *20*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12967-022-03350-6/TABLES/2>
- Neelapu, S. S., Tummala, S., Kebriaei, P., Wierda, W., Gutierrez, C., Locke, F. L., Komanduri, K. V., Lin, Y., Jain, N., Daver, N., Westin, J., Gulbis, A. M., Loghin, M. E., De Groot, J. F., Adkins, S., Davis, S. E., Rezvani, K., Hwu, P., & Shpall, E. J. (2017). Chimeric antigen receptor T-cell therapy — assessment and management of toxicities. *Nature Reviews Clinical Oncology* *2017* *15*:1, *15*(1), 47–62. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.148>
- Nishimura, H., Agata, Y., Kawasaki, A., Sato, M., Imamura, S., Minato, N., Yagita, H., Nakano, T., & Honjo, T. (1996). Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4-CD8-) thymocytes. *International Immunology*, *8*(5), 773–780. <https://doi.org/10.1093/INTIMM/8.5.773>
- Nolz, J. C., & Richer, M. J. (2020). Control of memory CD8+ T cell longevity and effector functions by IL-15. *Molecular Immunology*, *117*, 180. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2019.11.011>
- Nowakowska, P., Romanski, A., Miller, N., Odendahl, M., Bonig, H., Zhang, C., Seifried, E., Wels, W. S., & Tonn, T. (2018). Clinical grade manufacturing of genetically modified, CAR-expressing NK-92 cells for the treatment of ErbB2-positive malignancies. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, *67*(1), 25–38. <https://doi.org/10.1007/S00262-017-2055-2>
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science (New York, N.Y.)*, *194*(4260), 23–28. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.959840>
- Ober, R. J., Radu, C. G., Ghetie, V., & Ward, E. S. (2001). Differences in promiscuity for antibody–FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. *International Immunology*, *13*(12), 1551–1559. <https://doi.org/10.1093/INTIMM/13.12.1551>
- O'Donnell, J. S., Teng, M. W. L., & Smyth, M. J. (2018). Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* *2018* *16*:3, *16*(3), 151–167. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0142-8>
- Oelsner, S., Friede, M. E., Zhang, C., Wagner, J., Badura, S., Bader, P., Ullrich, E., Ottmann, O. G., Klingemann, H., Tonn, T., & Wels, W. S. (2017). Continuously expanding CAR NK-92 cells display selective cytotoxicity against B-cell leukemia and lymphoma. *Cytotherapy*, *19*(2), 235–249. <https://doi.org/10.1016/J.JCYT.2016.10.009>
- Oelsner, S., Waldmann, A., Billmeier, A., Röder, J., Lindner, A., Ullrich, E., Marschalek, R., Dotti, G., Jung, G., Große-Hovest, L., Oberoi, P., Bader, P., & Wels, W. S. (2019). Genetically engineered CAR NK cells display selective cytotoxicity against FLT3-positive B-ALL and inhibit in vivo leukemia growth. *International Journal of Cancer*, *145*(7), 1935–1945. <https://doi.org/10.1002/IJC.32269>

- Omer, B., Shum, T., Foster, J., Parikh, K., Tat, C., Shekar, M., Vivekananthan, A., Mehta, B., Zhang, H., Thakkar, S. G., Naik, S., Heslop, H. E., Brenner, M. K., & Rooney, C. M. (2022). *Phase I Trial of GD2.CAR T Cells Combined with a Novel Interleukin-7 Signal Modulator*. Tandem Meetings. <https://tandem.confex.com/tandem/2022/meetingapp.cgi/Paper/19347>
- Orange, J. S. (2008). Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nature Reviews. Immunology*, 8(9), 713. <https://doi.org/10.1038/NRI2381>
- O'Rourke, D. M., Nasrallah, M. P., Desai, A., Melenhorst, J. J., Mansfield, K., Morrisette, J. J. D., Martinez-Lage, M., Brem, S., Maloney, E., Shen, A., Isaacs, R., Mohan, S., Plesa, G., Lacey, S. F., Navenot, J. M., Zheng, Z., Levine, B. L., Okada, H., June, C. H., ... Maus, M. V. (2017). A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Science Translational Medicine*, 9(399). <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAA0984>
- Ostromov, D., Fekete-Drimusz, N., Saborowski, M., Kühnel, F., & Woller, N. (2018). CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(4), 689. <https://doi.org/10.1007/S00018-017-2686-7>
- Paczulla, A. M., Rothfelder, K., Raffel, S., Konantz, M., Steinbacher, J., Wang, H., Tandler, C., Mbarga, M., Schaefer, T., Falcone, M., Nievergall, E., Dörfel, D., Hanns, P., Passweg, J. R., Lutz, C., Schwaller, J., Zeiser, R., Blazar, B. R., Caligiuri, M. A., ... Lengerke, C. (2019). Absence of NKG2D ligands defines leukaemia stem cells and mediates their immune evasion. *Nature*, 572(7768), 254–259. <https://doi.org/10.1038/S41586-019-1410-1>
- Page, A., Chuvin, N., Valladeau-Guilemond, J., & Depil, S. (2024). Development of NK cell-based cancer immunotherapies through receptor engineering. *Cellular & Molecular Immunology* 2024 21:4, 21(4), 315–331. <https://doi.org/10.1038/s41423-024-01145-x>
- Page, D. B., Postow, M. A., Callahan, M. K., Allison, J. P., & Wolchok, J. D. (2014). Immune modulation in cancer with antibodies. *Annual Review of Medicine*, 65, 185–202. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MED-092012-112807>
- Pan, K., Farrukh, H., Chitpepu, V. C. S. R., Xu, H., Pan, C. xian, & Zhu, Z. (2022). CAR race to cancer immunotherapy: from CAR T, CAR NK to CAR macrophage therapy. In *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* (Vol. 41, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02327-z>
- Pan, M., Wang, F., Nan, L., Yang, S., Qi, J., Xie, J., Shao, S., zou, H., Wang, M., Sun, F., & Zhang, J. (2023). α VEGFR2-MICA fusion antibodies enhance immunotherapy effect and synergize with PD-1 blockade. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, 72(4), 969–984. <https://doi.org/10.1007/S00262-022-03306-1>
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews. Cancer*, 12(4), 252–264. <https://doi.org/10.1038/NRC3239>
- Park, J. R., DiGiusto, D. L., Slovak, M., Wright, C., Naranjo, A., Wagner, J., Meechoovet, H. B., Bautista, C., Chang, W. C., Ostberg, J. R., & Jensen, M. C. (2007). Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 15(4), 825–833. <https://doi.org/10.1038/SJ.MT.6300104>
- Park, S., Cho, E., Shin, Y., Hong, S., Lee, M., Park, Y., Nam, S., Yang, J., & Choi, Y. (2010). Clinical impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) coexpression in early breast cancer with human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) overexpression. https://doi.org/10.1200/Jco.2010.28.15_suppl.E21081, 28(15_suppl), e21081–e21081. https://doi.org/10.1200/JCO.2010.28.15_SUPPL.E21081

- Paschen, A., Sucker, A., Hill, B., Moll, I., Zapatka, M., Xuan, D. N., Geok, C. S., Gutmann, I., Hassel, J., Becker, J. C., Steinle, A., Schadendorf, D., & Ugurel, S. (2009). Differential clinical significance of individual NKG2D ligands in melanoma: Soluble ULBP2 as an indicator of poor prognosis superior to S100B. *Clinical Cancer Research*, *15*(16), 5208–5215. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0886/347293/P/DIFFERENTIAL-CLINICAL-SIGNIFICANCE-OF-INDIVIDUAL>
- Paszkiwicz, P. J., Fräßle, S. P., Srivastava, S., Sommermeyer, D., Hudecek, M., Drexler, I., Sadelain, M., Liu, L., Jensen, M. C., Riddell, S. R., & Busch, D. H. (2016). Targeted antibody-mediated depletion of murine CD19 CAR T cells permanently reverses B cell aplasia. *The Journal of Clinical Investigation*, *126*(11), 4262–4272. <https://doi.org/10.1172/JCI84813>
- Patel, S. P., & Kurzrock, R. (2015). PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Molecular Cancer Therapeutics*, *14*(4), 847–856. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0983>
- Paul, S., & Lal, G. (2017). The molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, *8*(SEP), 290728. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.01124/BIBTEX>
- Pazina, T., Shemesh, A., Brusilovsky, M., Porgador, A., & Campbell, K. S. (2017). Regulation of the Functions of Natural Cytotoxicity Receptors by Interactions with Diverse Ligands and Alterations in Splice Variant Expression. *Frontiers in Immunology*, *8*(MAR). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.00369>
- Pegram, H. J., Andrews, D. M., Smyth, M. J., Darcy, P. K., & Kershaw, M. H. (2011). Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunology and Cell Biology*, *89*(2), 216–224. <https://doi.org/10.1038/ICB.2010.78>
- Peipp, M., Klausz, K., Boje, A. S., Zeller, T., Zielonka, S., & Kellner, C. (2022). Immunotherapeutic targeting of activating natural killer cell receptors and their ligands in cancer. In *Clinical and Experimental Immunology* (Vol. 209, Issue 1, pp. 22–32). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/cei/uxac028>
- Pfeifer Serrahima, J., Zhang, C., Oberoi, P., Bodden, M., Röder, J., Arndt, C., Feldmann, A., Kiefer, A., Prüfer, M., Kühnel, I., Tonn, T., Bachmann, M., & Wels, W. S. (2023). Multivalent adaptor proteins specifically target NK cells carrying a universal chimeric antigen receptor to ErbB2 (HER2)-expressing cancers. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *72*(9), 2905–2918. <https://doi.org/10.1007/S00262-023-03374-X/FIGURES/6>
- Phung, S. K., Miller, J. S., & Felices, M. (2021). Bi-specific and Tri-specific NK Cell Engagers: The New Avenue of Targeted NK Cell Immunotherapy. *Molecular Diagnosis & Therapy*, *25*(5), 577–592. <https://doi.org/10.1007/S40291-021-00550-6>
- Poggi, A., Catellani, S., Garuti, A., Pierri, I., Gobbi, M., & Zocchi, M. R. (2009). Effective in vivo induction of NKG2D ligands in acute myeloid leukaemias by all-trans-retinoic acid or sodium valproate. *Leukemia*, *23*(4), 641–648. <https://doi.org/10.1038/LEU.2008.354>
- Ponath, V., Hoffmann, N., Bergmann, L., Mäder, C., Alhamwe, B. A., Preußner, C., & Strandmann, E. P. von. (2021). Secreted Ligands of the NK Cell Receptor NKp30: B7-H6 Is in Contrast to BAG6 Only Marginally Released via Extracellular Vesicles. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(4), 1–11. <https://doi.org/10.3390/IJMS22042189>
- Prager, I., Liesche, C., Van Ooijen, H., Urlaub, D., Verron, Q., Sandström, N., Fasbender, F., Claus, M., Eils, R., Beaudouin, J., Önfelt, B., & Watzl, C. (2019). NK cells switch from granzyme B to death receptor-mediated cytotoxicity during serial killing. *The Journal of Experimental Medicine*, *216*(9), 2113. <https://doi.org/10.1084/JEM.20181454>

- Prager, I., & Watzl, C. (2019). Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *Journal of Leukocyte Biology*, 105(6), 1319–1329. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0718-269R>
- Presta, L. G. (2006). Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(5–6), 640–656. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2006.01.026>
- Qin, S. S., Melucci, A. D., Chacon, A. C., & Prieto, P. A. (2021). Adoptive T Cell Therapy for Solid Tumors: Pathway to Personalized Standard of Care. *Cells*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/CELLS10040808>
- Quezada, S. A., Peggs, K. S., Simpson, T. R., & Allison, J. P. (2011). Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: from tumor tolerance to eradication. *Immunological Reviews*, 241(1), 104. <https://doi.org/10.1111/J.1600-065X.2011.01007.X>
- Radosavljevic, M., Cuillerier, B., Wilson, M. J., Clément, O., Wicker, S., Gilfillan, S., Beck, S., Trowsdale, J., & Bahram, S. (2002). A cluster of ten novel MHC class I related genes on human chromosome 6q24.2-q25.3. *Genomics*, 79(1), 114–123. <https://doi.org/10.1006/geno.2001.6673>
- Ramírez-Labrada, A., Pesini, C., Santiago, L., Hidalgo, S., Calvo-Pérez, A., Oñate, C., Andrés-Tovar, A., Garzón-Tituaña, M., Uranga-Murillo, I., Arias, M. A., Galvez, E. M., & Pardo, J. (2022). All About (NK Cell-Mediated) Death in Two Acts and an Unexpected Encore: Initiation, Execution and Activation of Adaptive Immunity. *Frontiers in Immunology*, 13, 896228. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.896228/BIBTEX>
- Ran, G. he, Lin, Y. qing, Tian, L., Zhang, T., Yan, D. mei, Yu, J. hua, & Deng, Y. cai. (2022). Natural killer cell homing and trafficking in tissues and tumors: from biology to application. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41392-022-01058-Z>
- Raulet, D. H. (2003). Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nature Reviews Immunology* 2003 3:10, 3(10), 781–790. <https://doi.org/10.1038/nri1199>
- Raynaud, A., Desrumeaux, K., Vidard, L., Termine, E., Baty, D., Chames, P., Vigne, E., & Kerfelec, B. (2020). Anti-NKG2D single domain-based antibodies for the modulation of anti-tumor immune response. *Oncoimmunology*, 10(1). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1854529>
- Reusing, S. B., Vallera, D. A., Manser, A. R., Vatrín, T., Bhatia, S., Felices, M., Miller, J. S., Uhrberg, M., & Babor, F. (2021). CD16xCD33 Bispecific Killer Cell Engager (BiKE) as potential immunotherapeutic in pediatric patients with AML and biphenotypic ALL. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 70(12), 3701–3708. <https://doi.org/10.1007/S00262-021-03008-0>
- Rimawi, M. F., Schiff, R., & Osborne, C. K. (2015). Targeting HER2 for the Treatment of Breast Cancer. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Med-042513-015127>, 66, 111–128. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MED-042513-015127>
- Rive, C. M., Yung, E., Dreolini, L., Brown, S. D., May, C. G., Woodsworth, D. J., & Holt, R. A. (2022). Selective B cell depletion upon intravenous infusion of replication-incompetent anti-CD19 CAR lentivirus. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 26, 4. <https://doi.org/10.1016/J.OMTM.2022.05.006>
- RKI. (2019). *RKI – Krebs in Deutschland – 2019/2020*.
- Robinson, T. O., & Schluns, K. S. (2017). The potential and promise of IL-15 in immuno-oncogenic therapies. *Immunology Letters*, 190, 159–168. <https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2017.08.010>
- Rohaán, M. W., Wilgenhof, S., & Haanen, J. B. A. G. (2019). Adoptive cellular therapies: the current landscape. *Virchows Archiv*, 474(4), 449. <https://doi.org/10.1007/S00428-018-2484-0>

- Romee, R., Cooley, S., Berrien-Elliott, M. M., Westervelt, P., Verneris, M. R., Wagner, J. E., Weisdorf, D. J., Blazar, B. R., Ustun, C., DeFor, T. E., Vivek, S., Peck, L., DiPersio, J. F., Cashen, A. F., Kylo, R., Musiek, A., Schaffer, A., Anadkat, M. J., Rosman, I., ... Miller, J. S. (2018). First-in-human phase 1 clinical study of the IL-15 superagonist complex ALT-803 to treat relapse after transplantation. *Blood*, *131*(23), 2515–2527. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2017-12-823757>
- Romee, R., Leong, J. W., & Fehniger, T. A. (2014). Utilizing Cytokines to Function-Enable Human NK Cells for the Immunotherapy of Cancer. *Scientifica*, *2014*, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2014/205796>
- Rosenberg, S. (1985). Lymphokine-activated killer cells: A new approach to immunotherapy of cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *75*(4), 595–603. <https://doi.org/10.1093/JNCI/75.4.595>
- Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Leitman, S., Chang, A. E., Ettinghausen, S. E., Matory, Y. L., Skibber, J. M., Shiloni, E., Vetto, J. T., Seipp, C. A., Simpson, C., & Reichert, C. M. (1985). Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *The New England Journal of Medicine*, *313*(23), 1485–1492. <https://doi.org/10.1056/NEJM198512053132327>
- Rosenberg, S. A., Packard, B. S., Aebersold, P. M., Solomon, D., Topalian, S. L., Toy, S. T., Simon, P., Lotze, M. T., Yang, J. C., Seipp, C. A., Simpson, C., Carter, C., Bock, S., Schwartzentruber, D., Wei, J. P., & White, D. E. (1988). Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *The New England Journal of Medicine*, *319*(25), 1676–1680. <https://doi.org/10.1056/NEJM198812223192527>
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Sherry, R. M., Kammula, U. S., Hughes, M. S., Phan, G. Q., Citrin, D. E., Restifo, N. P., Robbins, P. F., Wunderlich, J. R., Morton, K. E., Laurencot, C. M., Steinberg, S. M., White, D. E., & Dudley, M. E. (2011). Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *17*(13), 4550–4557. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0116>
- Rosenberg, S. A., Yannelli, J. R., Yang, J. C., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Weber, J. S., Parkinson, D. R., Seipp, C. A., Einhorn, J. H., & White, D. E. (1994). Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *Journal of the National Cancer Institute*, *86*(15), 1159–1166. <https://doi.org/10.1093/JNCI/86.15.1159>
- Rothe, A., Jachimowicz, R. D., Borchmann, S., Madlener, M., Keßler, J., Reiners, K. S., Sauer, M., Hansen, H. P., Ullrich, R. T., Chatterjee, S., Borchmann, P., Yazaki, P., Koslowsky, T. C., Engert, A., Heukamp, L. C., Hallek, M., & Von Strandmann, E. P. (2014). The bispecific immunoligand ULBP2-aCEA redirects natural killer cells to tumor cells and reveals potent anti-tumor activity against colon carcinoma. *International Journal of Cancer*, *134*(12), 2829–2840. <https://doi.org/10.1002/IJC.28609>
- Rudnick, S. I., Lou, J., Shaller, C. C., Tang, Y., Klein-Szanto, A. J. P., Weiner, L. M., Marks, J. D., & Adams, G. P. (2011). Influence of affinity and antigen internalization on the uptake and penetration of Anti-HER2 antibodies in solid tumors. *Cancer Research*, *71*(6), 2250–2259. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2277>
- Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Volpi, I., Tosti, A., Perruccio, K., Urbani, E., Negrin, R. S., Martelli, M. F., & Velardi, A. (1999). Role of Natural Killer Cell Alloreactivity in HLA-Mismatched Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Blood*, *94*(1), 333–339. https://doi.org/10.1182/BLOOD.V94.1.333.413A31_333_339

- Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., Martelli, M. F., & Velardi, A. (2002). Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5562), 2097–2100. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1068440>
- Ruggeri, L., Parisi, S., Urbani, E., & Curti, A. (2015). Alloreactive natural killer cells for the treatment of acute myeloid leukemia: From stem cell transplantation to adoptive immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 6(OCT), 159077. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2015.00479/BIBTEX>
- Rundhaug, J. E., & Fischer, S. M. (2010). Cellular and Molecular Mechanisms of Tumor Promotion. *Comprehensive Toxicology, Second Edition*, 14, 311–333. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01416-0>
- Sahm, C., Schönfeld, K., & Wels, W. S. (2012). Expression of IL-15 in NK cells results in rapid enrichment and selective cytotoxicity of gene-modified effectors that carry a tumor-specific antigen receptor. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, 61(9), 1451–1461. <https://doi.org/10.1007/S00262-012-1212-X>
- Salih, H. R., Rammensee, H.-G., & Steinle, A. (2002). Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(8), 4098–4102. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.169.8.4098>
- Sallman, D. A., Brayer, J., Sagatys, E. M., Loney, C., Breman, E., Agaugué, S., Verma, B., Gilham, D. E., Lehmann, F. F., & Davila, M. L. (2018). NKG2D-based chimeric antigen receptor therapy induced remission in a relapsed/refractory acute myeloid leukemia patient. *Haematologica*, 103(9), e424–e426. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2017.186742>
- Sallman, D. A., Kerre, T., Havelange, V., Poiré, X., Lewalle, P., Wang, E. S., Brayer, J. B., Davila, M. L., Moors, I., Machiels, J. P., Awada, A., Alcantar-Orozco, E. M., Borissova, R., Braun, N., Dheur, M. S., Gilham, D. E., Loney, C., Lehmann, F. F., & Flament, A. (2023). CYAD-01, an autologous NKG2D-based CAR T-cell therapy, in relapsed or refractory acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndromes or multiple myeloma (THINK): haematological cohorts of the dose escalation segment of a phase 1 trial. *The Lancet. Haematology*, 10(3), e191–e202. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(22\)00378-7](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(22)00378-7)
- Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. (2002). The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Research*, 4(Suppl 3), S127. <https://doi.org/10.1186/AR567>
- Sampson, J. H., Heimberger, A. B., Archer, G. E., Aldape, K. D., Friedman, A. H., Friedman, H. S., Gilbert, M. R., Herndon, J. E., McLendon, R. E., Mitchell, D. A., Reardon, D. A., Sawaya, R., Schmittling, R. J., Shi, W., Vredenburgh, J. J., & Bigner, D. D. (2010). Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(31), 4722–4729. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.28.6963>
- Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S., & Longacre, M. (2013). Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 21087. <https://doi.org/10.3390/IJMS141021087>
- Savoldo, B., Ramos, C. A., Liu, E., Mims, M. P., Keating, M. J., Carrum, G., Kamble, R. T., Bollard, C. M., Gee, A. P., Mei, Z., Liu, H., Grilley, B., Rooney, C. M., Heslop, H. E., Brenner, M. K., & Dotti, G. (2011). CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(5), 1822–1826. <https://doi.org/10.1172/JCI46110>

- Schluns, K. S., Williams, K., Ma, A., Zheng, X. X., & Lefrançois, L. (2002). Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *168*(10), 4827–4831. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.168.10.4827>
- Schmidt, M. H. H., Furnari, F. B., Cavenee, W. K., & Bögl, O. (2003). Epidermal growth factor receptor signaling intensity determines intracellular protein interactions, ubiquitination, and internalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(11), 6505–6510. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1031790100>
- Schmiedel, D., & Mandelboim, O. (2018). NKG2D ligands-critical targets for cancer immune escape and therapy. *Frontiers in Immunology*, *9*(SEP), 393768. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.02040/BIBTEX>
- Schmohl, J. U., Felices, M., Oh, F., Lenvik, A. J., Lebeau, A. M., Panyam, J., Miller, J. S., & Vallera, D. A. (2017). Engineering of Anti-CD133 Trispecific Molecule Capable of Inducing NK Expansion and Driving Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity. *Cancer Research and Treatment*, *49*(4), 1140–1152. <https://doi.org/10.4143/CRT.2016.491>
- Schönfeld, K., Sahn, C., Zhang, C., Naundorf, S., Brendel, C., Odendahl, M., Nowakowska, P., Bönig, H., Köhl, U., Kloess, S., Köhler, S., Holtgreve-Grez, H., Jauch, A., Schmidt, M., Schubert, R., Kühlcke, K., Seifried, E., Klingemann, H. G., Rieger, M. A., ... Wels, W. S. (2015). Selective inhibition of tumor growth by clonal NK cells expressing an ErbB2/HER2-specific chimeric antigen receptor. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *23*(2), 330–338. <https://doi.org/10.1038/MT.2014.219>
- Schwinn, N., Vokhminova, D., Sucker, A., Textor, S., Striegel, S., Moll, I., Nausch, N., Tuettenberg, J., Steinle, A., Cerwenka, A., Schadendorf, D., & Paschen, A. (2009). Interferon- γ down-regulates NKG2D ligand expression and impairs the NKG2D-mediated cytotoxicity of MHC class I-deficient melanoma by natural killer cells. *International Journal of Cancer*, *124*(7), 1594–1604. <https://doi.org/10.1002/IJC.24098>
- Secchiari, F., Nuñez, S. Y., Sierra, J. M., Ziblat, A., Regge, M. V., Raffo Iraolagoitia, X. L., Rovegno, A., Ameri, C., Secin, F. P., Richards, N., Ríos Pita, H., Vitagliano, G., Rico, L., Mieggi, M., Frasccheri, F., Bonanno, N., Blas, L., Trotta, A., Friedrich, A. D., ... Zwirner, N. W. (2022). The MICA-NKG2D axis in clear cell renal cell carcinoma bolsters MICA as target in immuno-oncology. *Oncology*, *11*(1). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2022.2104991>
- Seigner, J., Zajc, C. U., Dötsch, S., Eigner, C., Laurent, E., Busch, D. H., Lehner, M., & Traxlmayr, M. W. (2023). Solving the mystery of the FMC63-CD19 affinity. *Scientific Reports* *2023* *13*:1, *13*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48528-0>
- Seimetz, D., Heller, K., & Richter, J. (2019). Approval of First CAR-Ts: Have we Solved all Hurdles for ATMPs? *Cell Medicine*, *11*, 215517901882278. <https://doi.org/10.1177/2155179018822781>
- Sennino, B., & McDonald, D. M. (2012). Controlling escape from angiogenesis inhibitors. *Nature Reviews. Cancer*, *12*(10), 699–709. <https://doi.org/10.1038/NRC3366>
- Sers, C., Kuner, R., Falk, C. S., Lund, P., Sueltmann, H., Braun, M., Buness, A., Ruschhaupt, M., Conrad, J., Mang-Fatehi, S., Stelnic, I., Krapfenbauer, U., Poustka, A., & Schäfer, R. (2009). Down-regulation of HLA Class I and NKG2D ligands through a concerted action of MAPK and DNA methyltransferases in colorectal cancer cells. *International Journal of Cancer*, *125*(7), 1626–1639. <https://doi.org/10.1002/IJC.24557>
- Seshacharyulu, P., Ponnusamy, M. P., Haridas, D., Jain, M., Ganti, A. K., & Batra, S. K. (2012). Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. In *Expert Opinion on Therapeutic Targets* (Vol. 16, Issue 1, pp. 15–31). <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.648617>

- Shah, N. N., & Fry, T. J. (2019). Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 16(6), 372–385. <https://doi.org/10.1038/S41571-019-0184-6>
- Shah, N. R., Declouette, B., Ansari-Gilani, K., Alhomoud, M. S., Hoimes, C., Ramaiya, N. H., & Güler, E. (2021). High-dose interleukin-2 therapy related adverse events and implications on imaging. *Diagnostic and Interventional Radiology*, 27(5), 684. <https://doi.org/10.5152/DIR.2021.20503>
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410(6832), 1107–1111. <https://doi.org/10.1038/35074122>
- Shen, Y., Lu, C., Tian, W., Wang, L., Cui, B., Jiao, Y., Ma, C., Ju, Y., Zhu, L., Shao, C., Liu, X., Wang, J., Zhang, B., & Lu, Z. (2012). Possible association of decreased NKG2D expression levels and suppression of the activity of natural killer cells in patients with colorectal cancer. *International Journal of Oncology*, 40(4), 1285–1290. <https://doi.org/10.3892/IJO.2011.1315/HTML>
- Shimasaki, N., Jain, A., & Campana, D. (2020). NK cells for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Drug Discovery* 2020 19:3, 19(3), 200–218. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0052-1>
- Shinojima, N., Tada, K., Shiraishi, S., Kamiryo, T., Kochi, M., Nakamura, H., Makino, K., Saya, H., Hirano, H., Kuratsu, J.-I., Oka, K., Ishimaru, Y., & Ushio, Y. (2003). Prognostic Value of Epidermal Growth Factor Receptor in Patients with Glioblastoma Multiforme 1. *CANCER RESEARCH*, 63, 6962–6970. <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/63/20/6962/2509276/ch2003006962.pdf>
- Shiroishi, M., Tsumoto, K., Amano, K., Shirakihara, Y., Colonna, M., Braud, V. M., Allan, D. S. J., Makadze, A., Rowland-Jones, S., Willcox, B., Jones, E. Y., Van Der Merwe, P. A., Kumagai, I., & Maenaka, K. (2003). Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15), 8856–8861. <https://doi.org/10.1073/pnas.1431057100>
- Sindaco, P., Pandey, H., Isabelle, C., Chakravarti, N., Brammer, J. E., Porcu, P., & Mishra, A. (2023). The role of interleukin-15 in the development and treatment of hematological malignancies. In *Frontiers in immunology* (Vol. 14, p. 1141208). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1141208>
- Sivori, S., Vacca, P., Del Zotto, G., Munari, E., Mingari, M. C., & Moretta, L. (2019). Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cellular & Molecular Immunology* 2019 16:5, 16(5), 430–441. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0206-4>
- Slamon, D., Eiermann, W., Robert, N., Pienkowski, T., Martin, M., Press, M., Mackey, J., Glaspy, J., Chan, A., Pawlicki, M., Pinter, T., Valero, V., Liu, M.-C., Sauter, G., von Minckwitz, G., Visco, F., Bee, V., Buyse, M., Bendahmane, B., ... Crown, J. (2011). Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 365(14), 1273–1283. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA0910383>
- Smith, T. M., Tharakan, A., & Martin, R. K. (2020). Targeting ADAM10 in Cancer and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, 11, 520584. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.00499/BIBTEX>
- Smits, N. C., & Sentman, C. L. (2016). Bispecific T-Cell Engagers (BiTEs) as Treatment of B-Cell Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 34(10), 1131. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.64.9970>
- Smyth, M. J., Godfrey, D. I., & Trapani, J. A. (2001). A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nature Immunology* 2001 2:4, 2(4), 293–299. <https://doi.org/10.1038/86297>

- Sok, J. C., Coppelli, F. M., Thomas, S. M., Lango, M. N., Xi, S., Hunt, J. L., Freilino, M. L., Graner, M. W., Wikstrand, C. J., Bigner, D. D., Gooding, W. E., Furnari, F. B., & Grandis, J. R. (2006). Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *12*(17), 5064–5073. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0913>
- Song, D. G., Ye, Q., Poussin, M., Harms, G. M., Figini, M., & Powell, D. J. (2012). CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells in vivo. *Blood*, *119*(3), 696–706. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-03-344275>
- Song, H., Kim, J. K., Cosman, D., & Choi, I. (2006). Soluble ULBP suppresses natural killer cell activity via down-regulating NKG2D expression. *Cellular Immunology*, *239*(1), 22–30. <https://doi.org/10.1016/J.CELLIMM.2006.03.002>
- Soriani, A., Borrelli, C., Ricci, B., Molfetta, R., Zingoni, A., Fionda, C., Carnevale, S., Abruzzese, M. P., Petrucci, M. T., Ricciardi, M. R., La Regina, G., Di Cesare, E., Lavia, P., Silvestri, R., Paolini, R., Cippitelli, M., & Santoni, A. (2017). p38 MAPK differentially controls NK activating ligands at transcriptional and post-transcriptional level on multiple myeloma cells. *Oncolmmunology*, *6*(1). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1264564>
- Soriani, A., Iannitto, M. L., Ricci, B., Fionda, C., Malgarini, G., Morrone, S., Peruzzi, G., Ricciardi, M. R., Petrucci, M. T., Cippitelli, M., & Santoni, A. (2014). Reactive Oxygen Species– and DNA Damage Response–Dependent NK Cell Activating Ligand Upregulation Occurs at Transcriptional Levels and Requires the Transcriptional Factor E2F1. *The Journal of Immunology*, *193*(2), 950–960. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1400271>
- Stambrook, P. J., Maher, J., & Farzaneh, F. (2017). Cancer Immunotherapy: Whence and Whither. *Molecular Cancer Research : MCR*, *15*(6), 635. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0427>
- St.Clair, E. W. (2010). Good and Bad Memories Following Rituximab Therapy. *Arthritis and Rheumatism*, *62*(1), 1. <https://doi.org/10.1002/ART.25039>
- Stephens, H. A. F. (2001). MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends in Immunology*, *22*(7), 378–385. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)01960-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)01960-3)
- Stern, M., & Herrmann, R. (2005). Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *54*(1), 11–29. <https://doi.org/10.1016/J.CRITREVONC.2004.10.011>
- Sterner, R. C., & Sterner, R. M. (2021). CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. In *Blood Cancer Journal* (Vol. 11, Issue 4). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00459-7>
- Stern-Ginossar, N., & Mandelboim, O. (2010). Receptors on NK cells. *Natural Killer Cells: Basic Science and Clinical Application*, 155–168. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370454-2.00011-9>
- Strecker, M. I., Wlotzka, K., Strassheimer, F., Roller, B., Ludmirski, G., König, S., Röder, J., Opitz, C., Alekseeva, T., Reul, J., Sevenich, L., Tonn, T., Wels, W. S., Steinbach, J. P., Buchholz, C. J., & Burger, M. C. (2022). AAV-mediated gene transfer of a checkpoint inhibitor in combination with HER2-targeted CAR-NK cells as experimental therapy for glioblastoma. *Oncolmmunology*, *11*(1). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2022.2127508>
- Sudarsanam, H., Buhmann, R., & Henschler, R. (2022). Influence of Culture Conditions on Ex Vivo Expansion of T Lymphocytes and Their Function for Therapy: Current Insights and Open

- Questions. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10.
<https://doi.org/10.3389/FBIOE.2022.886637>
- Sun, Y., Yu, X., Wang, X., Yuan, K., Wang, G., Hu, L., Zhang, G., Pei, W., Wang, L., Sun, C., & Yang, P. (2023). Bispecific antibodies in cancer therapy: Target selection and regulatory requirements. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 13(9), 3583–3597. <https://doi.org/10.1016/J.APSB.2023.05.023>
- Svoboda, J., Gerson, J. N., Landsburg, D. J., Chong, E. A., Barta, S. K., Dwivedy Nasta, S., Ruella, M., Hexner, E. O., Marshall, A., Leskowitz, R., Four, M., Shea, J., Matlawski, T., Cervini, A., Davis, M. M., Gohil, M., Scholler, J., Hasenmayer, D., Rojas Amortegui, J., ... June, C. H. (2022). Interleukin-18 Secreting Autologous Anti-CD19 CAR T-Cells (huCART19-IL18) in Patients with Non-Hodgkin Lymphomas Relapsed or Refractory to Prior CAR T-Cell Therapy. *Blood*, 140(Supplement 1), 4612–4614. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2022-162393>
- Swain, S. M., Miles, D., Kim, S. B., Im, Y. H., Im, S. A., Semiglazov, V., Ciruelos, E., Schneeweiss, A., Loi, S., Monturus, E., Clark, E., Knott, A., Restuccia, E., Benyunes, M. C., Cortés, J., Agajanian, R., Ahmad, R., Aktas, B., Alencar, V. H., ... Youn Oh, D. (2020). Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA): end-of-study results from a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *The Lancet. Oncology*, 21(4), 519–530. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30863-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30863-0)
- Tagaya, Y., Bamford, R. N., DeFilippis, A. P., & Waldmann, T. A. (1996). IL-15: A pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels. *Immunity*, 4(4), 329–336. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80246-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80246-0)
- Tam, Y. K., Maki, G., Miyagawa, B., Hennemann, B., Tonn, T., & Klingemann, H. G. (1999). Characterization of genetically altered, interleukin 2-independent natural killer cell lines suitable for adoptive cellular immunotherapy. *Human Gene Therapy*, 10(8), 1359–1373. <https://doi.org/10.1089/10430349950018030>
- Tam, Y. K., Miyagawa, B., Ho, V. C., & Klingemann, H. G. (1999). Immunotherapy of malignant melanoma in a SCID mouse model using the highly cytotoxic natural killer cell line NK-92. *Journal of Hematotherapy*, 8(3), 281–290. <https://doi.org/10.1089/106161299320316>
- Tam, Y. K., Miyagawa, B., Ho, V. C., & Klingemann, H. G. (2004). Immunotherapy of Malignant Melanoma in a SCID Mouse Model Using the Highly Cytotoxic Natural Killer Cell Line NK-92. <https://Home.Liebertpub.Com/Scd>, 8(3), 281–290. <https://doi.org/10.1089/106161299320316>
- Tan, G., Spillane, K. M., & Maher, J. (2023). The Role and Regulation of the NKG2D/NKG2D Ligand System in Cancer. *Biology 2023, Vol. 12, Page 1079*, 12(8), 1079. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY12081079>
- Tan, J. T., Ernst, B., Kieper, W. C., LeRoy, E., Sprent, J., & Surh, C. D. (2002). Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 195(12), 1523–1532. <https://doi.org/10.1084/JEM.20020066>
- Tan Su Yin, E., Xian Hu, Y., Huang, H., He Huang, C., & Hu, Y. (2022). The breakthrough and the future: CD20 chimeric antigen receptor T-cell therapy for hematologic malignancies. *ImmunoMedicine*, 2(1), e1039. <https://doi.org/10.1002/IMED.1039>
- Textor, S., Fiegler, N., Arnold, A., Porgador, A., Hofmann, T. G., & Cerwenka, A. (2011). Human NK cells are alerted to induction of p53 in cancer cells by upregulation of the NKG2D ligands ULBP1 and ULBP2. *Cancer Research*, 71(18), 5998–6009. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3211/649636/AM/HUMAN-NK-CELLS-ARE-ALERTED-TO-INDUCTION-OF-P53-IN>
- Thomas, L. (1982). On immunosurveillance in human cancer. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 55(3–4), 329. [/pmc/articles/PMC2596448/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2596448/)

- Till, B. G., Jensen, M. C., Wang, J., Chen, E. Y., Wood, B. L., Greisman, H. A., Qian, X., James, S. E., Raubitschek, A., Forman, S. J., Gopal, A. K., Pagel, J. M., Lindgren, C. G., Greenberg, P. D., Riddell, S. R., & Press, O. W. (2008). Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood*, *112*(6), 2261–2271. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2007-12-128843>
- Till, B. G., Jensen, M. C., Wang, J., Qian, X., Gopal, A. K., Maloney, D. G., Lindgren, C. G., Lin, Y., Pagel, J. M., Budde, L. E., Raubitschek, A., Forman, S. J., Greenberg, P. D., Riddell, S. R., & Press, O. W. (2012). CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. *Blood*, *119*(17), 3940–3950. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-10-387969>
- Tinhofer, I., Marschitz, I., Henn, T., Egle, A., & Greil, R. (2000). Expression of functional interleukin-15 receptor and autocrine production of interleukin-15 as mechanisms of tumor propagation in multiple myeloma. *Blood*, *95*(2), 610–618. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V95.2.610>
- Tomasello, E., Blery, M., Vely, E., & Vivier, E. (2000). Signaling pathways engaged by NK cell receptors: double concerto for activating receptors, inhibitory receptors and NK cells. *Seminars in Immunology*, *12*(2), 139–147. <https://doi.org/10.1006/SMIM.2000.0216>
- Tonn, T., Becker, S., Esser, R., Schwabe, D., & Seifried, E. (2001). Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*, *10*(4), 535–544. <https://doi.org/10.1089/15258160152509145>
- Tonn, T., Schwabe, D., Klingemann, H. G., Becker, S., Esser, R., Koehl, U., Suttorp, M., Seifried, E., Ottmann, O. G., & Bug, G. (2013). Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. *Cytotherapy*, *15*(12), 1563–1570. <https://doi.org/10.1016/J.JCYT.2013.06.017>
- Tormoen, G. W., Crittenden, M. R., & Gough, M. J. (2018). Role of the immunosuppressive microenvironment in immunotherapy. *Advances in Radiation Oncology*, *3*(4), 520. <https://doi.org/10.1016/J.ADRO.2018.08.018>
- Törnroos, H., Hägerstrand, H., & Lindqvist, C. (2019). Culturing the Human Natural Killer Cell Line NK-92 in Interleukin-2 and Interleukin-15 – Implications for Clinical Trials. *Anticancer Research*, *39*(1), 107–112. <https://doi.org/10.21873/ANTICANRES.13085>
- Trinchieri, G. (1995). Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annual Review of Immunology*, *13*, 251–276. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IY.13.040195.001343>
- Tutt, A. L., French, R. R., Illidge, T. M., Honeychurch, J., McBride, H. M., Penfold, C. A., Fearon, D. T., Parkhouse, R. M. E., Klaus, G. G. B., & Glennie, M. J. (1998). Monoclonal Antibody Therapy of B Cell Lymphoma: Signaling Activity on Tumor Cells Appears More Important Than Recruitment of Effectors. *The Journal of Immunology*, *161*(6), 3176–3185. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.161.6.3176>
- Tysnes, B. B., & Bjerkvig, R. (2007). Cancer initiation and progression: Involvement of stem cells and the microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1775*(2), 283–297. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2007.01.001>
- Uherek, C., Tonn, T., Uherek, B., Becker, S., Schnierle, B., Klingemann, H. G., & Wels, W. (2002). Retargeting of natural killer-cell cytolytic activity to ErbB2-expressing cancer cells results in efficient and selective tumor cell destruction. *Blood*, *100*(4), 1265–1273. https://doi.org/10.1182/BLOOD.V100.4.1265.H81602001265_1265_1273
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I. M., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szijarto, C. A. K., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanan, J. O., Hober, S., ... Pontén, F. (2015).

- Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6220). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1260419>
- Upshaw, J. L., Arneson, L. N., Schoon, R. A., Dick, C. J., Billadeau, D. D., & Leibson, P. J. (2006). NKG2D-mediated signaling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate and phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells. *Nature Immunology*, 7(5), 524–532. <https://doi.org/10.1038/NI1325>
- Uribe, M. L., Marrocco, I., & Yarden, Y. (2021). *EGFR in Cancer: Signaling Mechanisms, Drugs, and Acquired Resistance*. <https://doi.org/10.3390/cancers>
- Vallera, D. A., Felices, M., McElmurry, R., McCullar, V., Zhou, X., Schmohl, J. U., Zhang, B., Lenvik, A. J., Panoskaltsis-Mortari, A., Verneris, M. R., Tolar, J., Cooley, S., Weisdorf, D. J., Blazar, B. R., & Miller, J. S. (2016). IL15 Trispecific Killer Engagers (TriKE) Make Natural Killer Cells Specific to CD33+ Targets While Also Inducing Persistence, In Vivo Expansion, and Enhanced Function. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 22(14), 3440–3450. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2710>
- Vallera, D. A., Ferrone, S., Kodali, B., Hinderlie, P., Bendzick, L., Ettestad, B., Hallstrom, C., Zorko, N. A., Rao, A., Fujioka, N., Ryan, C. J., Geller, M. A., Miller, J. S., & Felices, M. (2020). NK-Cell-Mediated Targeting of Various Solid Tumors Using a B7-H3 Tri-Specific Killer Engager In Vitro and In Vivo. *Cancers*, 12(9), 1–18. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12092659>
- Van Hall, T., André, P., Horowitz, A., Ruan, D. F., Borst, L., Zerbib, R., Narni-Mancinelli, E., Van Der Burg, S. H., & Vivier, E. (2019). Monalizumab: inhibiting the novel immune checkpoint NKG2A. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 7(1), 263. <https://doi.org/10.1186/S40425-019-0761-3>
- Vaughan, T. J., Williams, A. J., Pritchard, K., Osbourn, J. K., Pope, A. R., Earnshaw, J. C., McCafferty, J., Hodits, R. A., Wilton, J., & Johnson, K. S. (1996). Human Antibodies with Sub-nanomolar Affinities Isolated from a Large Non-immunized Phage Display Library. *Nature Biotechnology* 1996 14:3, 14(3), 309–314. <https://doi.org/10.1038/nbt0396-309>
- Vinay, D. S., Ryan, E. P., Pawelec, G., Talib, W. H., Stagg, J., Elkord, E., Lichtor, T., Decker, W. K., Whelan, R. L., Kumara, H. M. C. S., Signori, E., Honoki, K., Georgakilas, A. G., Amin, A., Helferich, W. G., Boosani, C. S., Guha, G., Ciriolo, M. R., Chen, S., ... Kwon, B. S. (2015). Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*, 35, S185–S198. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2015.03.004>
- Vivier, E., Rebuffet, L., Narni-Mancinelli, E., Cornen, S., Igarashi, R. Y., & Fantin, V. R. (2024). Natural killer cell therapies. *Nature* 2024 626:8000, 626(8000), 727–736. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06945-1>
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nature Immunology* 2008 9:5, 9(5), 503–510. <https://doi.org/10.1038/ni1582>
- Vivier, E., & Ugolini, S. (2011). Natural killer cells: From basic research to treatments. *Frontiers in Immunology*, 2(JUN), 11720. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2011.00018/BIBTEX>
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics : TIG*, 9(4), 138–141. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(93\)90209-Z](https://doi.org/10.1016/0168-9525(93)90209-Z)
- Von Strandmann, E. P., Hansen, H. P., Reiners, K. S., Schnell, R., Borchmann, P., Merkert, S., Simhadri, V. R., Draube, A., Reiser, M., Purr, I., Hallek, M., & Engert, A. (2006). A novel bispecific protein (ULBP2-BB4) targeting the NKG2D receptor on natural killer (NK) cells and CD138 activates NK cells and has potent antitumor activity against human multiple myeloma in vitro and in vivo. *Blood*, 107(5), 1955–1962. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2005-05-2177>

- Waldman, A. D., Fritz, J. M., & Lenardo, M. J. (2020). A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nature Reviews Immunology* 20:11, 20(11), 651–668. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0306-5>
- Waldmann, T. A. (2006). The biology of interleukin-2 and interleukin-15: Implications for cancer therapy and vaccine design. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 6, Issue 8, pp. 595–601). <https://doi.org/10.1038/nri1901>
- Waldmann, T. A., Lugli, E., Roederer, M., Perera, L. P., Smedley, J. V., Macallister, R. P., Goldman, C. K., Bryant, B. R., Decker, J. M., Fleisher, T. A., Lane, H. C., Sneller, M. C., Kurlander, R. J., Kleiner, D. E., Pletcher, J. M., Figg, W. D., Yovandich, J. L., & Creekmore, S. P. (2011). Safety (toxicity), pharmacokinetics, immunogenicity, and impact on elements of the normal immune system of recombinant human IL-15 in rhesus macaques. *Blood*, 117(18), 4787–4795. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2010-10-311456>
- Wang, J. S., Gutierrez, M., Rasco, D. W., Melero Bermejo, I., Powderly, J. D., Hamilton, E. P., Millward, M., Arance, A. M., Stec, R., Moreno, V., Sharma, M., Lugowska, I. A., Shackleton, M. J., Frentzas, S., Janik, J. E., Liu, T., Shapiro, I., Whalen, K., Jones, J. A., & Spira, A. I. (2023). A phase 1 dose-escalation study to investigate the safety, efficacy, pharmacokinetics, and pharmacodynamic activity of cln-619 (Anti-MICA/B antibody) alone and in combination with pembrolizumab in patients with advanced solid tumors. https://doi.org/10.1200/JCO.2023.41.16_suppl.2532, 41(16_suppl), 2532–2532. https://doi.org/10.1200/JCO.2023.41.16_SUPPL.2532
- Wang, K., Xuan, Z., Liu, X., Zheng, M., Yang, C., & Wang, H. (2022). Immunomodulatory role of metalloproteinase ADAM17 in tumor development. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.1059376>
- Wang, Q., Chen, Y., Park, J., Liu, X., Hu, Y., Wang, T., McFarland, K., & Betenbaugh, M. J. (2019). Design and Production of Bispecific Antibodies. *Antibodies*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/ANTIB8030043>
- Ward, E. S., Zhou, J., Ghetie, V., & Ober, R. J. (2003). Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans. *International Immunology*, 15(2), 187–195. <https://doi.org/10.1093/INTIMM/DXG018>
- Watzl, C. (2003). *The NKG2D receptor and its ligands-recognition beyond the “missing self”?* www.elsevier.com/locate/micinf
- Watzl, C. (2014). How to trigger a killer: modulation of natural killer cell reactivity on many levels. *Advances in Immunology*, 124, 137–170. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800147-9.00005-4>
- Weinberg, R. A. (1994). Oncogenes and tumor suppressor genes. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 44(3), 18. <https://doi.org/10.3322/CANJCLIN.44.3.160>
- Weiner, G. J. (2015). Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nature Reviews Cancer* 2015 15:6, 15(6), 361–370. <https://doi.org/10.1038/nrc3930>
- Weinstein, I. B., & Joe, A. K. (2006). Mechanisms of Disease: oncogene addiction—a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nature Clinical Practice Oncology* 2006 3:8, 3(8), 448–457. <https://doi.org/10.1038/ncponc0558>
- Wels, W., Beerli, R., Hellmann, P., Schmidt, M., Marte, B. M., Kornilova, E. S., Hekele, A., Mendelsohn, J., Groner, B., & Hynes, N. E. (1995). EGF receptor and p185erbB-2-specific single-chain antibody toxins differ in their cell-killing activity on tumor cells expressing both receptor proteins. *International Journal of Cancer*, 60(1), 137–144. <https://doi.org/10.1002/IJC.2910600120>

- Williams, B. A., Law, A. D., Routy, B., denHollander, N., Gupta, V., Wang, X. H., Chaboureau, A., Viswanathan, S., & Keating, A. (2017). A phase I trial of NK-92 cells for refractory hematological malignancies relapsing after autologous hematopoietic cell transplantation shows safety and evidence of efficacy. *Oncotarget*, *8*(51), 89256–89268. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.19204>
- Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E., & Hoogenboom, H. R. (2003). Making Antibodies by Phage Display Technology. *Https://Doi.Org/10.1146/Annurev.Iy.12.040194.002245*, *12*, 433–455. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IY.12.040194.002245>
- Wong, A. J., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., Grzeschik, C. H., Humphrey, P. A., Bigner, D. S., & Vogelstein, B. (1992). Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(7), 2965–2969. <https://doi.org/10.1073/PNAS.89.7.2965>
- Woo, E. Y., Yeh, H., Chu, C. S., Schlienger, K., Carroll, R. G., Riley, J. L., Kaiser, L. R., & June, C. H. (2002). Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *168*(9), 4272–4276. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.168.9.4272>
- Wu, J., Song, Y., Bakker, A. B. H., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L. L., & Phillips, J. H. (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science (New York, N.Y.)*, *285*(5428), 730–732. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.285.5428.730>
- Wu, X., Tao, Y., Hou, J., Meng, X., & Shi, J. (2012). Valproic Acid Upregulates NKG2D Ligand Expression through an ERK-dependent Mechanism and Potentially Enhances NK Cell-mediated Lysis of Myeloma. *Neoplasia*, *14*(12), 1178–1189. <https://doi.org/10.1593/NEO.121236>
- Xiao, L., Cen, D., Gan, H., Sun, Y., Huang, N., Xiong, H., Jin, Q., Su, L., Liu, X., Wang, K., Yan, G., Dong, T., Wu, S., Zhou, P., Zhang, J., Liang, W., Ren, J., Teng, Y., Chen, C., & Xu, X. H. (2019). Adoptive Transfer of NKG2D CAR mRNA-Engineered Natural Killer Cells in Colorectal Cancer Patients. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *27*(6), 1114–1125. <https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2019.03.011>
- Yamada, Y., Sugawara, K., Hata, T., Tsuruta, K., Moriuchi, R., Maeda, T., Atogami, S., Murata, K., Fujimoto, K., Kohno, T., Tsukasaki, K., Tomonaga, M., Hirakata, Y., & Kamihira, S. (1998). Interleukin-15 (IL-15) Can Replace the IL-2 Signal in IL-2-Dependent Adult T-Cell Leukemia (ATL) Cell Lines: Expression of IL-15 Receptor α on ATL Cells. *Blood*, *91*(11), 4265–4272. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V91.11.4265>
- Yamamoto, K., Fujiyama, Y., Andoh, A., Bamba, T., & Okabe, H. (2001). Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in the human colon carcinoma cell line (CaCo-2). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1526*(1), 10–12. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(01\)00099-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(01)00099-X)
- Yamazaki, T., Akiba, H., Iwai, H., Matsuda, H., Aoki, M., Tanno, Y., Shin, T., Tsuchiya, H., Pardoll, D. M., Okumura, K., Azuma, M., & Yagita, H. (2002). Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *169*(10), 5538–5545. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.169.10.5538>
- Yan, Y., Steinherz, P., Klingemann, H.-G., Dennig, D., Childs, B. H., McGuirk, J., O, R. J., Bone Marrow Transplantation Service Y, R. Y., & Sloan, M. (1998). *Antileukemia Activity of a Natural Killer Cell Line against Human Leukemias*. *4*, 2859–2868. <http://aacrjournals.org/clincancerres/article-pdf/4/11/2859/2069869/2859.pdf>

- Yan, Y., Steinherz, P., Klingemann, H.-G., Dennig, D., Childs, B., McGuirk, J., O'Reilly, J., & Raji, N. (1998). Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemias. *Clinical Cancer Research*.
- Yang, Y., & Lundqvist, A. (2020). Immunomodulatory Effects of IL-2 and IL-15; Implications for Cancer Immunotherapy. *Cancers 2020, Vol. 12, Page 3586, 12(12)*, 3586. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12123586>
- Yonesaka, K., Zejnullahu, K., Okamoto, I., Satoh, T., Cappuzzo, F., Souglakos, J., Ercan, D., Rogers, A., Roncalli, M., Takeda, M., Fujisaka, Y., Philips, J., Shimizu, T., Maenishi, O., Cho, Y., Sun, J., Destro, A., Taira, K., Takeda, K., ... Jänne, P. A. (2011). Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Science Translational Medicine*, 3(99). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002442>
- Yuan, Q., Yu, H., Chen, J., Song, X., & Sun, L. (2020). ADAM10 promotes cell growth, migration, and invasion in osteosarcoma via regulating E-cadherin/ β -catenin signaling pathway and is regulated by miR-122-5p. *Cancer Cell International*, 20(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12935-020-01174-2/FIGURES/8>
- Zhang, B., Zhang, J., & Tian, Z. (2008). Comparison in the effects of IL-2, IL-12, IL-15 and IFN α on gene regulation of granzymes of human NK cell line NK-92. *International Immunopharmacology*, 8(7), 989–996. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2008.03.001>
- Zhang, C., Burger, M. C., Jennewein, L., Genßler, S., Schönfeld, K., Zeiner, P., Hattingen, E., Harter, P. N., Mittelbronn, M., Tonn, T., Steinbach, J. P., & Wels, W. S. (2016). ErbB2/HER2-Specific NK Cells for Targeted Therapy of Glioblastoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 108(5). <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJV375>
- Zhang, C., Oberoi, P., Oelsner, S., Waldmann, A., Lindner, A., Tonn, T., & Wels, W. S. (2017). Chimeric antigen receptor-engineered NK-92 cells: An off-the-shelf cellular therapeutic for targeted elimination of cancer cells and induction of protective antitumor immunity. *Frontiers in Immunology*, 8(MAY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00533>
- Zhang, C., Röder, J., Scherer, A., Bodden, M., Pfeifer Serrahima, J., Bhatti, A., Waldmann, A., Müller, N., Oberoi, P., & Wels, W. S. (2021). Bispecific antibody-mediated redirection of NKG2D-CAR natural killer cells facilitates dual targeting and enhances antitumor activity. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 9(10). <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-002980>
- Zhang, L., Kerkar, S. P., Yu, Z., Zheng, Z., Yang, S., Restifo, N. P., Rosenberg, S. A., & Morgan, R. A. (2011). Improving adoptive T cell therapy by targeting and controlling IL-12 expression to the tumor environment. *Molecular Therapy*, 19(4), 751–759. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.313>
- Zhang, L., Meng, Y., Feng, X., & Han, Z. (2022). CAR-NK cells for cancer immunotherapy: from bench to bedside. *Biomarker Research 2022 10:1*, 10(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/S40364-022-00364-6>
- Zhang, M., Lam, K. P., & Xu, S. (2023). Natural Killer Cell Engagers (NKCEs): a new frontier in cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 14, 1207276. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1207276/BIBTEX>
- Zhang, M., Wen, B., Anton, O. M., Yao, Z., Dubois, S., Ju, W., Sato, N., DiLillo, D. J., Bamford, R. N., Ravetch, J. V., & Waldmann, T. A. (2018). IL-15 enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by NK cells and macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(46), E10915–E10924. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1811615115/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Zhang, M., Yao, Z., Dubois, S., Ju, W., Müller, J. R., & Waldmann, T. A. (2009). Interleukin-15 combined with an anti-CD40 antibody provides enhanced therapeutic efficacy for murine

- models of colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(18), 7513–7518. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0902637106>
- Zhang, N., Wu, J., Wang, Q., Liang, Y., Li, X., Chen, G., Ma, L., Liu, X., & Zhou, F. (2023). Global burden of hematologic malignancies and evolution patterns over the past 30 years. *Blood Cancer Journal*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41408-023-00853-3>
- Zhang, W. Y., Wang, Y., Guo, Y. L., Dai, H. R., Yang, Q. M., Zhang, Y. J., Zhang, Y., Chen, M. X., Wang, C. M., Feng, K. C., Li, S. X., Liu, Y., Shi, F. X., Luo, C., & Han, W. D. (2016). Treatment of CD20-directed Chimeric Antigen Receptor-modified T cells in patients with relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma: an early phase IIa trial report. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 1. <https://doi.org/10.1038/SIGTRANS.2016.2>
- Zhang, Y., Wallace, D. L., De Lara, C. M., Ghattas, H., Asquith, B., Worth, A., Griffin, G. E., Taylor, G. P., Tough, D. F., Beverley, P. C. L., & Macallan, D. C. (2007). In vivo kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection. *Immunology*, 121(2), 258. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2567.2007.02573.X>
- Zhang, Z., Liu, S., Zhang, B., Qiao, L., Zhang, Y., & Zhang, Y. (2020). T Cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 17. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.00017>
- Zhang, Z., Miao, L., Ren, Z., Tang, F., & Li, Y. (2021). Gene-Edited Interleukin CAR-T Cells Therapy in the Treatment of Malignancies: Present and Future. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.718686>
- Zhou, Y., Husman, T., Cen, X., Tsao, T., Brown, J., Bajpai, A., Li, M., Zhou, K., & Yang, L. (2022). Interleukin 15 in Cell-Based Cancer Immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13). <https://doi.org/10.3390/IJMS23137311>
- Zhu, X., Marcus, W. D., Xu, W., Lee, H., Han, K., Egan, J. O., Yovandich, J. L., Rhode, P. R., & Wong, H. C. (2009). Novel Human Interleukin-15 Agonists. *The Journal of Immunology*, 183(6), 3598–3607. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901244>
- Zingoni, A., Molfetta, R., Fionda, C., Soriani, A., Paolini, R., Cippitelli, M., Cerboni, C., & Santoni, A. (2018). NKG2D and its ligands: “One for all, all for one.” *Frontiers in Immunology*, 9(MAR), 358323. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.00476/BIBTEX>
- Zolot, R. S., Basu, S., & Million, R. P. (2013). Antibody–drug conjugates. *Nature Reviews Drug Discovery* 2013 12:4, 12(4), 259–260. <https://doi.org/10.1038/nrd3980>
- Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J., Naldini, L., & Trono, D. (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. <http://www.nature.com/naturebiotechnology>
- Zugmaier, G., Topp, M. S., Alekar, S., Viardot, A., Horst, H. A., Neumann, S., Stelljes, M., Bargou, R. C., Goebeler, M., Wessiepe, D., Degenhard, E., Göckbuget, N., & Klinger, M. (2014). Long-term follow-up of serum immunoglobulin levels in blinatumomab-treated patients with minimal residual disease-positive B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer Journal* 2014 4:9, 4(9), e244–e244. <https://doi.org/10.1038/bcj.2014.64>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1. NKG2D-Rezeptor und seine Liganden.....	8
Abbildung 1.2. NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität.....	12
Abbildung 1.3. Strategien der Antikörper-basierten Krebsimmuntherapie.....	16
Abbildung 1.4. Schematischer Aufbau von chimären Antigenrezeptoren (CARs).....	21
Abbildung 1.5. Ableitung des IL-15 Superagonisten RD-IL15.....	28
Abbildung 1.6. Umleitung der NKG2D-vermittelten Tumorzell-Lyse.....	30
Abbildung 1.7. Kombinationsansatz aus bispezifischen Antikörpern (NKAB) und NKG2D-CAR-exprimierenden NKAR-NK-92 Zellen.....	31
Abbildung 3.1. Aufbau innerhalb der Blotting-Apparatur.....	61
Abbildung 3.2 Gewinnung von PBMCs mit Hilfe von Dichtegradientenzentrifugation.....	70
Abbildung 4.1. NKG2D-basierter chimärer Antigenrezeptor (NKAR).....	81
Abbildung 4.2. Durchflusszytometrische Analyse der EGFP-Expression in FACS-angereicherten, lentiviral transduzierten NKAR- und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen.....	82
Abbildung 4.3. NKAR-Expression in modifizierten NK-92 Zellen.....	83
Abbildung 4.4. Zytotoxizität parentaler und NKG2D-L spezifischer NKAR-NK-92 Zellen gegenüber Tumor-Zelllinien.....	84
Abbildung 4.5. Schematische Darstellung der RD-IL15 Sequenz im Expressionsplasmid pcDNA3.....	85
Abbildung 4.6. Sandwich-ELISA zur Quantifizierung von RD-IL15.....	85
Abbildung 4.7. Autokrine Stimulation RD-IL15-exprimierender NKAR-NK-92 Zellen.....	86
Abbildung 4.8. Auswirkung der Depletion von IL-2 auf die Vitalität und Proliferation von NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen.....	87
Abbildung 4.9. Effekt von sekretiertem RD-IL15 auf die Zytotoxizität von benachbarten Immunzellen.....	89
Abbildung 4.10. Effekt von sekretiertem RD-IL15 auf das Proliferationsverhalten von humanen CD8 ⁺ T-Zellen.....	90
Abbildung 4.11. Aufbau des prototypischen bispezifischen Antikörpers NKAB-ErbB2.....	93
Abbildung 4.12. Analyse der Zellbindung von NKAB-ErbB2.....	94
Abbildung 4.13. Zytotoxische Aktivität von NKAR-NK-92 Varianten gegenüber ErbB2-postiven Brustkrebszellen in Kombination mit NKAB-ErbB2.....	96
Abbildung 4.14. Schematische Darstellung von NKAB-ErbB2 Varianten.....	97
Abbildung 4.15. Immunoblot-Analyse gereinigter NKAB-ErbB2 Varianten.....	98
Abbildung 4.16. Analyse der Zellbindung von NKAB-ErbB2 Varianten.....	99
Abbildung 4.17. Zytotoxische Aktivität von parentalen NK-92 und NKAR-NK-92 Zellen in Kombination mit NKAB-ErbB2 Varianten.....	100
Abbildung 4.18. Struktur des bispezifischen Antikörpers RD-IL15-NKAB-ErbB2.....	101
Abbildung 4.19. Funktionalität des RD-IL15-NKAB-ErbB2 Moleküls.....	102
Abbildung 4.20. Biologische Aktivität von RD-IL15 gekoppelt an den bispezifischen Antikörper NKAB-ErbB2 (RD-IL15-NKAB-ErbB2).....	104
Abbildung 4.21. Aufbau des bispezifischen Antikörpers NKAB-EGFR.....	107
Abbildung 4.22. Durchflusszytometrische Analyse der Zellbindung von NKAB-EGFR.....	108
Abbildung 4.23. Zytotoxische Aktivität von parentalen NK-92 und NKAR-NK-92 Zellen in Kombination mit NKAB-EGFR gegenüber EGFR-exprimierenden Glioblastomzellen (T98G).....	109
Abbildung 4.24. Degranulation einer NK-Zelle nach Aktivierung.....	110

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 4.25. Degranulationsassay zur Bestimmung der NKAR-NK-92 Aktivierung.	111
Abbildung 4.26. Analyse der zytotoxischen Aktivität von primären NK-Zellen in Kombination mit NKAB-EGFR gegenüber EGFR-exprimierenden Brustkrebszellen (MDA-MB68) mittels Zeitraffer-Mikroskopie.	112
Abbildung 4.27. Zytotoxische Aktivität von primären NK-Zellen gegenüber EGFR-exprimierenden Mammakarzinomzellen (MDA-MB468) in Gegenwart von NKAB-EGFR.	113
Abbildung 4.28. Durchflusszytometrische Analyse der Bindung von NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR an transduzierte murine Glioblastomzellen (GL261).	115
Abbildung 4.29. Zytotoxische Aktivität von parentalen NK-92 und NKG2D-CAR-exprimierenden NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen in Kombination mit NKAB-EGFR gegenüber murinen GL261/EGFR Zellen.	115
Abbildung 4.30. Zytotoxische Aktivität von parentalen NK-92 und NKG2D-CAR-exprimierenden NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen in Kombination mit NKAB-EGFR gegenüber murinen GL261/EGFRvIII Zellen.	116
Abbildung 4.31. Durchflusszytometrische Analyse der Bindung von NKAB-EGFR und NKAB-ErbB2 an transduzierte murine Glioblastomzellen (GL261).	117
Abbildung 4.32. Zytotoxische Aktivität von parentalen NK-92 und NKG2D-CAR-exprimierenden NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen in Kombination mit NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR gegenüber murinen GL261-Varianten.	118
Abbildung 4.33. Duales Targeting von Tumor-Kokulturen mit einer Kombination aus NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR.	120
Abbildung 4.34. Zytotoxische Aktivität von parentalen NK-92 und NKG2D-CAR-exprimierenden NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen in Kombination mit NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR gegenüber murinen GL261-Varianten.	122
Abbildung 4.35. Duales Targeting von Tumor-Kokulturen mit einer Kombination aus NKAB-ErbB2 und NKAB-EGFR.	124
Abbildung 4.36. Aufbau des bispezifischen Antikörpers NKAB-CD19.	127
Abbildung 4.37. Expression und Reinigung des bispezifischen Moleküls NKAB-CD19.	128
Abbildung 4.38. Analyse der NKAB-CD19 Bindung.	129
Abbildung 4.39. Zytotoxische Aktivität parentaler NK-92 und NKG2D-CAR-exprimierender NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen in Kombination mit NKAB-CD19 gegenüber CD19-positiven Lymphom- und Leukämie-Zelllinien.	130
Abbildung 4.40. Aufbau des bispezifischen Antikörpers NKAB-CD20.	131
Abbildung 4.41. Expression und Reinigung des bispezifischen Moleküls NKAB-CD20.	132
Abbildung 4.42. Analyse der NKAB-CD20 Bindung.	133
Abbildung 4.43. Zytotoxische Aktivität parentaler NK-92 und NKG2D-CAR-exprimierender NKAR-NK-92 und NKAR-RD-IL15-NK-92 Zellen in Kombination mit NKAB-CD20 gegenüber CD20-positiven Lymphom-Zelllinien.	134
Abbildung 4.44. Degranulationsassay zur Bestimmung der NKAR-NK-92 Aktivierung.	135
Abbildung 4.45. Charakterisierung von primären NK-Zellen.	136
Abbildung 4.46. Funktionelle Analyse von NKAB-CD19 und NKAB-CD20 in Kombination mit primären NK-Zellen.	137
Abbildung 4.47. Aufbau des bispezifischen Antikörpers NKAB-mCD19.	139
Abbildung 4.48. Expression und funktionelle Charakterisierung von NKAB-mCD19.	140
Abbildung 4.49. Zytotoxische Aktivität von NK-92 und NKAR-NK-92 Zellen in Kombination mit NKAB-mCD19 gegenüber mCD19-exprimierenden A20 Lymphomzellen.	141
Abbildung 4.50. Funktionelle Analyse von NKAB-mCD19 in Kombination mit primären NK-Zellen.	142

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1. In dieser Arbeit verwendete Geräte und Apparaturen.....	34
Tabelle 2.2. Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	36
Tabelle 2.3. In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	37
Tabelle 2.4. Verwendete Puffer und Lösungen.....	38
Tabelle 2.5. In dieser Arbeit verwendete Kits.....	39
Tabelle 2.6. In dieser Arbeit verwendete rekombinante Proteine.....	40
Tabelle 2.7. In dieser Arbeit verwendete Antikörper und Nachweisreagenzien.....	42
Tabelle 2.8. In dieser Arbeit verwendete Plasmide.....	43
Tabelle 2.9. In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.....	45
Tabelle 2.10. Verwendete chemokompetente Bakterienstämme.....	48
Tabelle 2.11. Verwendete Bakterienmedien und Antibiotika.....	49
Tabelle 2.12. In dieser Arbeit verwendete Medien und Zusätze.....	50
Tabelle 2.13. In dieser Arbeit verwendete Zelllinien und die dazugehörigen Zellkulturmedien.....	51
Tabelle 3.1. PCR Reaktionsansatz.....	53
Tabelle 3.2. Reaktionsschritte der durchgeführten PCRs.....	53
Tabelle 3.3. Verwendete Komponenten zur Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese.....	55
Tabelle 3.4. <i>TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit: 12% SDS-Polyacrylamidgel</i>	60
Tabelle 3.5. Transfektionsansatz zur Herstellung von lentiviralen Vektorpartikeln.....	67

Abkürzungsverzeichnis

ϵ_λ	Extinktionskoeffizient	DC	<i>Dendritic cell</i>
°C	Grad Celsius	DDR	<i>DNA damage response</i>
2D/3D	zweidimensional/dreidimensional	DISC	<i>Death-inducing signal complex</i>
Abb.	Abbildung	DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>		
ADC	<i>Antibody-drug conjugates</i>	DMSO	Dimethylsulfoxid
ADCC	<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>	DNA	Desoxyribonukleinsäure
		dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
AF	Alexa Fluor	DRK	Deutsches rotes Kreuz
AICD	<i>Activation-induced cell death</i>	E:T	<i>Effector:Target</i>
ALL	Akute lymphatische Leukämie	E_λ	Extinktion
AML	Akute myeloische Leukämie	EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
APC	Allophycocyanin		
APS	Ammoniumperoxodisulfat	EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ATRA	<i>All-trans-retinoic acid</i>		
B-ALL	<i>B-cell acute lymphoblastic leukemia</i>	EGFRVIII	<i>Epidermal growth factor receptor variant III</i>
BCG	Bacille Calmette-Guérin		
BCMA	<i>B-cell maturation antigen</i>	ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>		
BiTE	<i>Bispecific T-cell engager</i>	EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
BiKE	<i>Bispecific killer cell engager</i>		
bp	Basenpaare	FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
BSA	Bovines Serumalbumin		
c	Stoffmengenkonzentration	Fas-L	Fas-Ligand
Ca.	circa	Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
CAR	Chimärer Antigenrezeptor	FcRn	Neonataler Fc-Rezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>	FcR γ	Fc-Rezeptor γ
CDC	<i>Complement-dependent cytotoxicity</i>	FCS	<i>Fetal calf serum</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>	FSC	<i>Forward scatter</i>
CDR	<i>Complementarity determining region</i>	FDA	<i>Food and drug administration</i>
CLP	<i>Common lymphoid progenitor</i>	Fwd	<i>Forward</i>
CMV	Zytomegalievirus	G	Erdbeschleunigung
CR	<i>Complete response</i>	GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
CRES	<i>T-cell-related encephalopathy syndrome</i>	GLR	Gemischte Lymphozytenreaktion
CRS	<i>Cytokine release syndrome</i>		
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i>	GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>		
CV	Calcein Violet AM	GMP	<i>Good manufacturing practice</i>
d	Schichtdicke	GMP	<i>Good manufacturing practice</i>
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>	Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
DAP-10/12	<i>DNAX-activation protein-10/12</i>		

Abkürzungsverzeichnis

GvHD	<i>Graft-versus-host disease</i>	MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>
GvL	<i>Graft-versus-leukemia</i>	Min	Minuten
Gy	Gray	ml	Milliliter
GzmB	Granzym B	mM	Millimolar
h	<i>Hours</i>	MMP	Matrix-Metalloprotease
H ₂ O	Wasser	NCR	<i>Natural cytotoxicity receptor</i>
HAMA	<i>Human anti-murine antibody</i>	ng	Nanogramm
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>	NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
HLA	Humanes Leukozytenantigen	NK	Natürliche Killer
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>	NKAB	<i>NKG2D-binding antibody</i>
HSC	<i>Hematopoietic stem cell</i>	NKAR	<i>NKG2D-based activating receptor</i>
ICANS	<i>Immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome</i>	NKCE	<i>Natural killer cell engager</i>
IFN- γ	Interferon- γ	NKG2D	<i>Natural killer group 2D</i>
Ig	Immunglobulin	NKG2D-L	<i>Natural Killer Group 2D-Liganden</i>
IL	Interleukin		
IL-15R	IL-15 Rezeptor	nM	Nanomolar
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie	NMIBC	<i>Non-muscle-invasive bladder cancer</i>
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>	ns	Nicht signifikant
Iono	Ionomycin	OD	Optische Dichte
iPS	Induzierte pluripotente Stammzellen	ORR	<i>Overall response rate</i>
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>	OS	<i>Overall survival</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>	P2A	Porcine Teschovirus-1 2A
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
JAK	Januskinase	PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
kb	Kilobasen	PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
kDa	Kilodalton	PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
KIR	<i>Killer cell immunoglobulin-like receptor</i>		
KLR	<i>Killer cell lectin-like receptor</i>	PD-L1	<i>Programmed cell death ligand 1</i>
kPa	Kilopascal	PE	Phycocerythrin
L	(G ₄ S) ₂ Linker	PEI	Polyethylenimin
l	Liter	PFA	Paraformaldehyd
LAG-3	<i>Lymphocyte-activation gene 3</i>	PFS	<i>Progression-free survival</i>
LAK	Lymphokin-aktivierte Killerzellen	pH	Pondus hydrogenii
LAMP1	<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i>	PI	Propidiumiodid
LB	Luria Bertani	PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
LIR	<i>Leukocyte immunoglobulin-like receptor</i>	PLC γ	Phospholipase C γ
M	Myc-Tag	PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
mAb	<i>Monoclonal antibody</i>	PVDF	Polyvinylidenfluorid

Abkürzungsverzeichnis

RD	Rezeptordomäne	T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
Rev	<i>Reverse</i>	TRUCK	<i>T cells redirected for universal cytokine killing</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>		
rpm	<i>Rounds per minute</i>	TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>	U	<i>Enzyme unit</i>
RT	Raumtemperatur	µg	Mikrogramm
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase	µl	Mikroliter
scFv	<i>Single-chain fragment variable</i>	ULBP	UL16-bindende Proteine
SD	<i>Standarddeviation</i>	V	Volt
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>	Vav1	<i>Vav guanine nucleotide exchange factor 1</i>
Sek	Sekunden		
SFFV	<i>Spleen focus-forming virus</i>	v/v	<i>volume/volume percent</i>
SHIP	<i>SH2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase</i>	VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
SHP-1/2	<i>SH2-containing protein tyrosine phosphatase-1/2</i>	VH	<i>Variable heavy</i>
SLP-76	<i>SH2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa</i>	VL	<i>Variable light</i>
sMICA	<i>Soluble MICA</i>	VSV	Vesikuläres Stomatitis-Virus
sNKG2D-L	<i>Soluble natural killer group 2D-Liganden</i>	ZAP-70	<i>Zeta-chain associated protein 70</i>
SP	Signalpeptid		
SSC	<i>Sideward scatter</i>		
STAT5	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>		
Syk	<i>Spleen tyrosin kinase</i>		
T _A	<i>Annealing-Temperatur</i>		
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen		
Tab.	Tabelle		
TAE	Tris-Acetat-EDTA		
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>		
TCR	<i>T cell receptor</i>		
TEAM	<i>T-cell-engaging antibody molecule</i>		
TEMED	Tetramethylethyldiamin		
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>		
TH	T-Helfer		
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten		
TIM-3	<i>T-cell immunoglobulin and mucin containing protein 3</i>		
TME	<i>Tumor microenvironment</i>		
TNF	Tumornekrosefaktor		
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>		

Publikationen

Veröffentlichungen

Kiefer A, Prüfer M, Röder J, Pfeifer Serrahima J, Bodden M, Kühnel I, Oberoi P, Wels WS. Dual Targeting of Glioblastoma Cells with Bispecific Killer Cell Engagers Directed to EGFR and ErbB2 (HER2) Facilitates Effective Elimination by NKG2D-CAR-Engineered NK Cells. *Cells*. 2024 Jan 28;13(3):246. doi: 10.3390/cells13030246. PMID: 38334638; PMCID: PMC10854564.

Bodden M, Häcker A, Röder J, Kiefer A, Zhang C, Bhatti A, Pfeifer Serrahima J, Ullrich E, Kühnel I, Wels WS. Co-Expression of an IL-15 Superagonist Facilitates Self-Enrichment of GD2-Targeted CAR-NK Cells and Mediates Potent Cell Killing in the Absence of IL-2. *Cancers (Basel)*. 2023 Aug 29;15(17):4310. doi: 10.3390/cancers15174310. PMID: 37686586; PMCID: PMC10486391.

Pfeifer Serrahima J, Zhang C, Oberoi P, Bodden M, Röder J, Arndt C, Feldmann A, Kiefer A, Prüfer M, Kühnel I, Tonn T, Bachmann M, Wels WS. Multivalent adaptor proteins specifically target NK cells carrying a universal chimeric antigen receptor to ErbB2 (HER2)-expressing cancers. *Cancer Immunol Immunother*. 2023 Sep;72(9):2905-2918. doi: 10.1007/s00262-023-03374-x. Epub 2023 Jan 23. PMID: 36688995; PMCID: PMC10412657.

Zhang C, Röder J, Scherer A, Bodden M, Pfeifer Serrahima J, Bhatti A, Waldmann A, Müller N, Oberoi P, Wels WS. Bispecific antibody-mediated redirection of NKG2D-CAR natural killer cells facilitates dual targeting and enhances antitumor activity. *J Immunother Cancer*. 2021 Oct;9(10):e002980. doi: 10.1136/jitc-2021-002980. PMID: 34599028; PMCID: PMC8488744.

Becker W, Scherer A, Faust C, Bauer DK, Scholtes S, Rao E, Hofmann J, Schauder R, Langer T. A fully automated three-step protein purification procedure for up to five samples using the NGC chromatography system. *Protein Expr Purif*. 2019 Jan;153:1-6. doi: 10.1016/j.pep.2018.08.003. Epub 2018 Aug 10. PMID: 30102973.

Abstracts

Roller, B., Reindl, L. M., Strassheimer, F., Ludmirski, G., Elleringmann, P., Kiefer, A., Röder, J., Steinbach, J. P., Wels, W. S., Ullrich, E., Burger, M. C. (2023) P06.10.A CAR-engineered primary NK cells show promising effects as targeted therapy against EGFR-positive Glioblastoma. *Neuro-Oncology* 25, DOI: 10.1093/neuonc/noad137.150

Ausgewählte Posterpräsentationen

Maren Prüfer, [Anne Kiefer](#), Ines Kühnel, Jordi Pfeifer Serrahima, Jasmin Röder, Winfried Wels (2023)
„Engineering chimeric antigen receptors with NK-cell activating domains to improve the efficacy of tumor-targeted NK cells” 20th Meeting of the Society for Natural Immunity, Oslo, Norwegen

[Anne Kiefer](#), Maren Prüfer, Congcong Zhang, Pranav Oberoi, Jordi Pfeifer Serrahima, Jasmin Röder, Ines Kühnel, Malena Bodden, Aline Häcker, Winfried S. Wels (2023)
“Combination of bispecific killer cell engagers and NKG2D-CAR effector cells for enhanced antitumor activity” 20th CIMT Annual Meeting, Mainz

Aline Häcker, Anja Waldmann, Jasmin Röder, Congcong Zhang, Anita Bhatti, Malena Bodden, Ines Kühnel, [Anne Kiefer](#), Nina Müller, Stefan Stein, Winfried S. Wels (2023)
“Modulation of the tumor microenvironment by genetically engineered CAR-NK cells” 20th CIMT Annual Meeting, Mainz

Jordi Pfeifer Serrahima*, [Anne Kiefer](#)*, Congcong Zhang, Ines Kühnel, Jasmin Röder¹, Pranav Oberoi, Winfried S. Wels (2023)
“Bispecific antibody-mediated redirection of NKG2D-CAR natural killer cells facilitates dual targeting and enhances antitumor activity” 4th Rhein Main Cancer Retreat (RMCR), Glashütten

[Anne Scherer](#), Congcong Zhang, Pranav Oberoi, Jordi Pfeifer Serrahima, Jasmin Röder, Malena Bodden, Aline Häcker, Ines Kühnel, Winfried S. Wels (2022)
“Bispecific antibody-mediated redirection of NKG2D-CAR natural killer cells facilitates dual targeting and enhances antitumor activity” 10th UCT Science Day, Frankfurt

Publikationen

Bastian Roller, Lisa Marie Reindl, Florian Strassheimer, Anne Scherer, Jasmin Röder, Joachim P Steinbach, Winfried S Wels, Evelyn Ullrich, Michael C Burger (2022)

“CAR-engineered primary NK cells show promising effects as a targeted therapy against EGFR-positive glioblastoma cells” 4th UCT Science Day, Frankfurt

Anne Scherer, Congcong Zhang, Pranav Oberoi, Jordi Pfeifer Serrahima, Jasmin Röder, Malena Bodden, Aline Häcker, Ines Kühnel, Winfried S. Wels (2022)

“Bispecific antibody-mediated redirection of NKG2D-CAR natural killer cells facilitates dual targeting and enhances antitumor activity” 19th Meeting of the Society for Natural Immunity, Bonita Springs, USA

Danksagung

Aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht.

Danksagung

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht.

