

Effektorzellaktivierung

Aktivierung natürlicher Killerzellen zur Behandlung von Tumorerkrankungen

JULIA HARWARDT¹, KATRIN SCHOENFELD¹, HARALD KOLMAR^{1,2*}

¹ INSTITUT FÜR ORGANISCHE CHEMIE UND BIOCHEMIE, TU DARMSTADT

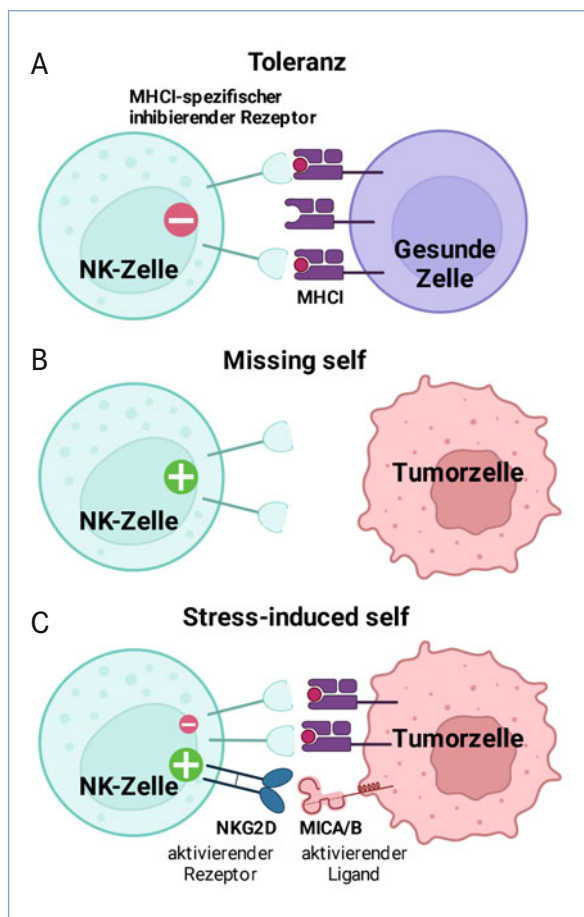
² CENTRE FOR SYNTHETIC BIOLOGY, TU DARMSTADT

Immunotherapy represents a promising tool significantly improving cancer outcomes. The concept of tumor recognition and elimination by harnessing the patients' immune system has recently been applied to cells of the innate immunity. Particularly, antibody-based NK cell engagers have been explored which specifically target tumor-associated antigens and simultaneously receptors on natural killer cells boosting the immune effector cells' cytolytic effect and further inducing a multicellular immune response.

DOI: 10.1007/s12268-023-2022-8

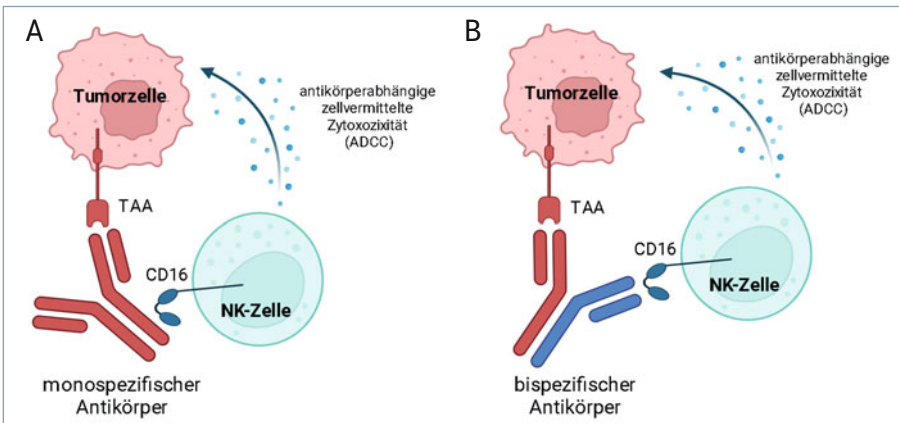
© Die Autorinnen und Autoren 2023

You find an English version of this article at www.biochemie-tud.de/Kolmar/NK_Cells.pdf.



◀ **Abb. 1:** Regulation der NK-Zellaktivierung durch ein dynamisches Gleichgewicht inhibitorischer und aktivierender Signale. **A**, Bei dem Mechanismus der Toleranz erkennen NK-Zellen körpereigene MHC-I-Rezeptoren auf gesunden Zellen mittels MHC-I-spezifischer inhibitorischer Rezeptoren, was die Aktivierung der NK-Zellen einschränkt. **B**, Der *missing self*-Mechanismus beschreibt die Erkennung von Zielzellen, die entweder kein oder (zu) wenig MHC-I exprimieren. Die Abwesenheit von inhibitorischen Signalen führt zur Aktivierung der NK-Zelle. **C**, Bei dem Mechanismus des *stress-induced self* wird die Präsentation aktivierender Antigene auf der Tumorzelloberfläche von NK-Zellen erkannt und resultiert trotz vorhandener MHC-I-vermittelter inhibitorischer Signale zur NK-Zellaktivierung. Erstellt mit BioRender.com.

■ Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gehören neben Makrophagen, Granulozyten, dendritischen Zellen, Monozyten und Mastzellen zum zellulären Teil des angeborenen Immunsystems und sind in der Lage, virusinfizierte Körperzellen und Tumorzellen zu erkennen und abzutöten. Sie besitzen – anders als Lymphozyten des erworbenen Immunsystems – keine spezifischen Rezeptoren für fremde Antigene, sondern erkennen virusinfizierte oder maligne entartete Zellen mittels zahlreicher invariabler inhibitorischer und aktivierender Rezeptoren. Dabei spielen MHC-Klasse-I-Moleküle (MHC: *major histocompatibility complex*) eine zentrale Rolle. MHC-I-Proteine sind normalerweise auf allen kernhaltigen Zellen vorhanden und präsentieren proteolytische Fragmente aus dem Arsenal der in der Zelle produzierten Proteine auf ihrer Zelloberfläche. Handelt es sich hierbei um zelleigene Peptidfragmente wird die Aktivität der NK-Zellen herunterreguliert (**Abb. 1A**). Der Verlust an MHC-Liganden für die NK-Zellrezeptoren von abnormalen Zellen führt zur Aufhebung der Inhibition und damit zur Aktivierung (*missing self*-Hypothese; **Abb. 1B**, [1]). Humane NK-Zellen besitzen zwei verschiedene Arten von Rezeptormolekülen für die spezifische MHC-I-Erkennung: KIRs (*killing immunoglobulin-like receptors*), die zur Immunglobulin-Familie gehören und die zur *C-type lectin like*-Familie gehörenden CD94/NKG2A-Heterodimere (NKG2A: *natural-killer group 2, member A*). NK-Zellen sind außerdem in der Lage, mittels aktivierender Rezeptoren Zellstress zu erkennen. Dabei werden die MHC-I-verbundenen Proteine MICA und MICB (*MHC class I chain-related protein A/B*) bei Stress, Schädigung, Infektion oder Transformation von Zellen induziert und auf der Oberfläche präsentiert, wodurch sie von NK-Zellen über den aktivierenden Rezeptor NKG2D (*natural-killer group 2, member D*) erkannt werden und als „*kill-me*“ Signal wirken (**Abb. 1C**). Weitere aktivierende NK-Zellrezeptoren sind die NCRs (*natural cytotoxicity receptors*) NKp46, NKp44, NKp30, die zur Immunglobulin-Familie gehören [2]. Die proteolytische



▲ **Abb. 2:** Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) als Mechanismus der NK-Zell-vermittelten Eliminierung von Tumorzellen. **A,** Quervernetzung einer Tumor- und NK-Zelle durch die Bindung des monospezifischen Antikörpers an eine Tumorzelle und die Bindung von CD16 an die Antikörper-Fc-Region. **B,** Quervernetzung einer Tumor- und NK-Zelle durch die Bindung eines Tumorantigens mit einem Arm und die Bindung von CD16 mit dem anderen Arm eines bispezifischen Antikörpers. Erstellt mit BioRender.com.

Spaltung (*shedding*) oder Herabregulation aktivierender Rezeptoren von der Tumorzelloberfläche ist ein weiterer Immunevasionsmechanismus. Überwiegen insgesamt die aktivierenden Signale, kommt es zur Degranulation der NK-Zelle, welche zur Ausschüttung von Perforinen und Granzymen führt und damit die Lyse der Zielzelle bewirkt. Weiterhin wird durch die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen die adaptive Immunantwort in Gang gesetzt [3].

ADCC als Schlüsselmechanismus der NK-Zell-vermittelten Eliminierung von Tumorzellen

Neben den aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren exprimieren NK-Zellen den Immunglobulin Fcγ-Rezeptor IIIa, auch als

CD16 bezeichnet, welcher mit niedriger Affinität an die Fc-Region des Immunglobulins G bindet. Durch die Bindung eines Antikörpers an ein Tumor-assoziiertes Antigen (TAA), welches ein Protein ist, das bei Tumoren auf der Zelloberfläche gehäuft vorkommt, werden über die Interaktion der IgG-Antikörper-Fc-Region an CD16 auf NK-Zellen Tumor- und NK-Zelle in räumliche Nähe gebracht, was die Ausbildung der lytischen Synapse bewirkt (**Abb. 2A**). Die anschließende Freisetzung von zytolytischen Mediatoren der NK-Zelle verursacht die Eliminierung der Tumorzelle. Dieser Mechanismus wird als antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) bezeichnet [4]. Klinische Studien haben gezeigt, dass ADCC zu einem großen Teil für den therapeutischen Effekt von eini-

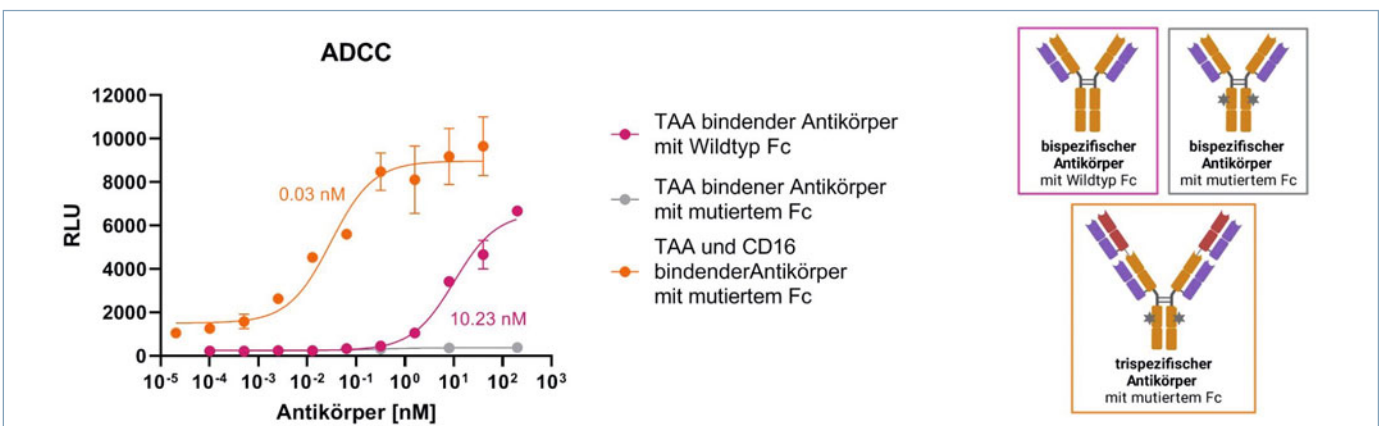
gen therapeutischen Antikörpern verantwortlich ist, z. B. Rituximab (Behandlung von Lymphomen), Cetuximab (Behandlung von Darmkrebs) und Trastuzumab (Behandlung von Brustkrebs) [5].

Multispezifische CD16-targetierende NK cell engager

Zur Erhöhung der Bindungsaffinität und damit der Zytotoxizität therapeutischer Antikörper wurden Moleküle entwickelt, die CD16 mit höherer Affinität binden als der Wildtyp Fc eines IgG-Antikörpers [6]. Zur Gewährleistung der Quervernetzung einer Tumor- und NK-Zelle binden die bispezifischen Moleküle, welche NKCE (*NK cell engager*) genannt werden, mit einem Arm CD16 auf der NK-Zelle und simultan mit dem anderen Arm ein TAA auf der Tumorzelle (**Abb. 2B**).

Um die Spezifität von Tumorzellen gegenüber gesundem Gewebe zu erhöhen und damit das Sicherheitsprofil des Antikörpers zu verbessern, hat unsere Arbeitsgruppe zwei trispezifische NKCEs erzeugt, welche neben CD16 EGFR (*epidermal growth factor receptor*) und PD-L1 (*programmed death-ligand 1*) targetieren. Damit sind sie Wachstumsfaktor- und Immuncheckpointinhibitor zugleich. Durch die Funktion als Immuncheckpointinhibitor blockieren die Antikörper einen Mechanismus der Tumorzelle, um der Erkennung durch das Immunsystem zu entkommen. Die Adressierung von zwei Zielmolekülen auf einer Tumorzelle ist neben der Verbesserung des Antikörpersicherheitsprofils insbesondere auch vorteilhaft, um einer Immunevasion entgegenzuwirken [7].

Die Generierung solcher Antikörper im multispezifischen Format ist nicht trivial,



▲ **Abb. 3:** ADCC-Zell-basierter Reporterassay. Der bispezifische TAA-bindende Antikörper, der mit dem Wildtyp Fc an CD16 bindet (pink) wurde mit dem bispezifischen TAA-bindenden Antikörper (grau) und dem trispezifischen TAA- und CD16-bindenden Antikörper (orange) verglichen, welche eine Mutation im Fc-Teil enthalten, die die Bindung an CD16 verhindert. Erstellt mit BioRender.com.

denn sie erfordert in den meisten Fällen die Herstellung zweier verschiedener schwerer und leichter Ketten, welche sich korrekt paarweise assemblieren müssen. Eine Heterodimerisierung der schweren Ketten kann durch die Einführung weniger Aminosäureaustausche in beiden Ketten forciert werden (*knob-into-hole*-Technologie, [8]). Für die korrekte Paarung der leichten Kette verfolgt unsere Arbeitsgruppe einen vereinfachten Ansatz, bei dem nur eine einzige leichte Kette (*common light chain*) verwendet wird. Dies wird dadurch möglich, dass unsere Antikörperbibliotheken aus Tierimmunisierungen gezielt nach solchen Bindern durchmustert werden, bei denen für die Bindung des Zielproteins nur die schwere Kette verantwortlich ist, während die leichte Kette eine stabilisierende Rolle einnimmt [9].

Sowohl der Antikörper basierend auf einer asymmetrischen 2+1-Architektur [10] als auch das Molekül, welches auf einer symmetrischen 2+2-Architektur beruht [11], haben nur eine leichte Kette. Die 2+1-Variante (Daten nicht gezeigt) und das 2+2-Molekül (**Abb. 3**) weisen einen potenten ADCC-Effekt auf, sind gut herstellbar und zeigen günstige physikochemische Eigenschaften.

Die potente abtötende Wirkung gegenüber Tumorzellen, welche durch die trispezifischen Antikörper vermittelt wird, zeigt das Anwendungspotenzial solcher Moleküle. Während die Entwicklung tri- und tetraspezifischer NK-Zell-aktivierender Antikörper auf dem Weg in die klinische Anwendung noch nicht weit fortgeschritten ist, befindet sich eine Vielzahl bispezifischer NKCEs in verschiedenen Phasen der klinischen Erprobung. Die pharmazeutische Industrie setzt hohe Erwartungen in die Immuntherapie. Die kommenden Jahre werden zeigen, bei welchen Tumorerkrankungen sich die erhofften therapeutischen Effekte zeigen und ob das Wirkprofil durch den Einsatz multispezifischer Antikörper weiter verbessert werden kann. ■

Literatur

- [1] Ljunggren HG, Kärre K (1990) In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11: 237–244
- [2] Abel AM, Yang C, Thakar MS et al. (2018) Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol* 9: 1869
- [3] Demaria O, Gauthier L, Debroas G et al. (2021) Natural killer cell engagers in cancer immunotherapy: Next generation of immuno-oncology treatments. *Eur J Immunol* 51: 1934–1942

1934–1942

- [4] Gómez Román VR, Murray JC, Weiner LM (2014) Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC). In: Ackerman ME, Nimmerjahn F (Hrsg.) *Antibody Fc*. Academic Press, Massachusetts, 1–27
- [5] Weng WK, Levy R (2003) Two Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polymorphisms Independently Predict Response to Rituximab in Patients With Follicular Lymphoma. *J Clin Oncol* 21: 3940–3947
- [6] Moore GL, Bautista C, Pong E et al. (2011) A novel bispecific antibody format enables simultaneous bivalent and monovalent co-engagement of distinct target antigens. *MAbs* 3: 546–557
- [7] Huang S, van Duijnhoven SMJ, Sijts AJAM et al. (2020) Bispecific antibodies targeting dual tumor-associated antigens in cancer therapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 146: 3111–3122
- [8] Ridgway JBB, Presta LG, Carter P (1996) 'Knobs-into-holes' engineering of antibody C H 3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng Des Sel* 9: 617–621
- [9] Elter A, Bogen JP, Habermann J et al. (2021) Vom Huhn abgeleitete Antikörper für Diagnostik und Immuntherapie. *BIOspektrum* 27: 500–504
- [10] Bogen JP, Carrara SC, Fiebig D et al. (2021). Design of a Trispecific Checkpoint Inhibitor and Natural Killer Cell Engager Based on a 2 + 1 Common Light Chain Antibody Architecture. *Front Immunol* 12: 669496
- [11] Harwardt J, Carrara SC, Bogen JP et al. (2023) Generation of a symmetrical trispecific NK cell engager based on a two-in-one antibody. *Front Immunol* 14: 1170042

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Harald Kolmar
Angewandte Biochemie
Technische Universität Darmstadt
Peter-Grünberg-Straße 4
D-64287 Darmstadt
Harald.Kolmar@TU-Darmstadt.de

ARBEITSGRUPPE



Julia Harwardt, Katrin Schoenfeld und Harald Kolmar (v.l.n.r.)

Die Arbeitsgruppe Angewandte Biochemie befindet sich seit 2005 am Fachbereich Chemie der TU Darmstadt. Dort arbeiten die Doktorandinnen Julia Harwardt und Katrin Schoenfeld zusammen an verschiedenen Projekten des Immunengineerings. Ein Schwerpunkt der gemeinsamen Arbeit liegt dabei auf der Generierung von vom Huhn-abgeleiteter multispezifischer Antikörper zur selektiven Tumorerkennung und NK-Zell Aktivierung.

Hier steht eine Anzeige.

 Springer