

## Effektorzellaktivierung

# Rekrutierung von Natürlichen Killerzellen durch optimierte Immunliganden

AMMELIE SVEA BOJE<sup>1</sup>, KATJA KLAUSZ<sup>1</sup>, LUKAS PEKAR<sup>2</sup>, CHRISTIAN KELLNER<sup>3</sup>, STEFAN ZIELONKA<sup>2</sup>, MATTHIAS PEIPP<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SEKTION FÜR ANTIKÖPERBASIERTE IMMUNTHERAPIE, KLINIK FÜR INNERE MEDIZIN II, UNIVERSITÄTSKLINIKUM SCHLESWIG-HOLSTEIN UND UNIVERSITÄT ZU KIEL

<sup>2</sup> PROTEIN ENGINEERING AND ANTIBODY TECHNOLOGIES, MERCK KGAA, DARMSTADT

<sup>3</sup> ABTEILUNG FÜR TRANSFUSIONSMEDIZIN, ZELLTHERAPEUTIKA UND HÄMOSTASEOLOGIE, KLINIKUM DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN, LMU MÜNCHEN

**NK cells emerged as promising immune cells for cancer therapy. Beyond antibody-based approaches triggering NK cell activity via the FcγRIIIa, also multifunctional approaches are being exploited to redirect NK cell cytotoxicity against malignant cells. In this respect, immunoligands which are fusion proteins composed of an antibody-derived targeting arm and a natural ligand for an activating receptor on NK cells show great promise in inducing effector cell activation against tumor cells.**

DOI: 10.1007/s12268-022-1836-0  
© Die Autorinnen und Autoren 2022

■ Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) wurden erstmals in den 1970er Jahren erwähnt und werden klassischerweise der angeborenen Immunität zugeschrieben. Diese Immunzellpopulation übernimmt eine wichtige Funktion in der frühen Immunabwehr und -überwachung, beispielsweise gegen Infektionserreger oder entartete Zellen. Im Gegensatz zu T-Zellen, welche Antigene spezifisch mittels dem hypervariablen T-Zellrezeptorrepertoires erkennen, diskriminieren NK-Zellen gesunde und gestresste Zellen durch ein komplexes Zusammenspiel von unterschiedlichen invariablen aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren sowie deren Liganden [1]. So exprimieren NK-Zellen beispielsweise unterschiedliche inhibitorische *Killer-Immunoglobulin-like Receptors* (KIRs) oder den inhibitorischen Rezeptor *Natural Killer Group 2A* (NKG2A), welche „sichere“ oder „selbst“-Liganden erkennen, die typischerweise von gesunden körpereigenen Zellen exprimiert werden [2]. Dagegen exprimieren NK-Zellen ebenfalls aktivierende Rezeptoren, wie beispielsweise die *Natural Cytotoxicity Receptors* (NCRs) NKp30 oder NKp46 sowie NKG2D, 2B4 und DNAM-1. Diese erkennen typischer-

weise Stress-induzierte Liganden infizierter oder transformierter Zellen, wie beispielsweise MIC-A/B, B7-H6 oder ULBP1-6 (**Abb. 1A**, [3]). Allerdings ist die proteolytische Spaltung (*shedding*) oder die Herabregulation dieser Liganden als eine Form von *tumor immune escape* beschrieben [3, 4].

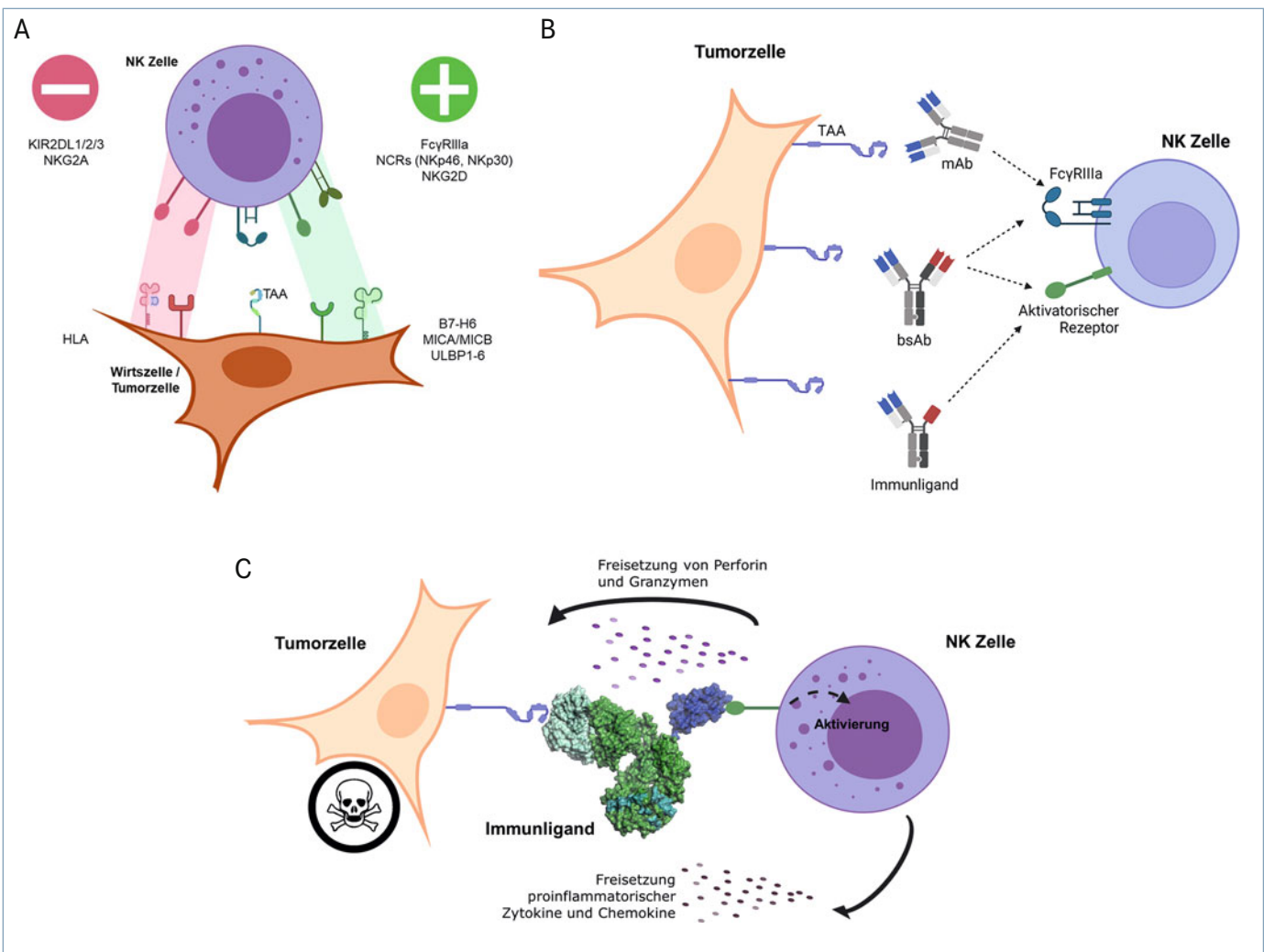
Darüber hinaus exprimieren NK-Zellen den Rezeptor Fcγreceptor IIIa (FcγRIIIa). Die Fc-vermittelte Bindung eines IgG-Antikörpers nach Antigenerkennung auf der Zielzelle bewirkt die effiziente Aktivierung des zytotoxischen Potenzials von NK-Zellen, ein Prozess der *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC) genannt wird. Die Kapazität eines Antikörpers, ADCC auszulösen, hängt allerdings von verschiedenen Faktoren ab, wie beispielsweise der Antigendichte auf der Zielzelle oder FcγRIIIa-Polymorphismen. Negativ beeinträchtigt wird diese außerdem durch Herunterregulation oder *shedding* des FcγRIIIa [1].

Die Aktivierung von NK-Zellen bewirkt in der Regel die Ausschüttung von Perforinen und Granzymen in die immunologische Synapse, wodurch die Lyse der Zielzelle eingeleitet wird. Eine weitere Form der NK-Zell-

vermittelten Tumorzelltötung besteht in der Aktivierung eines *death receptors* durch Expression von TRAIL oder CD95 [1]. Neben der direkten Zytotoxizität modulieren NK-Zellen nach Aktivierung die weitere Immunantwort, z. B. durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, Chemokine oder durch den *Crosstalk* mit anderen Zellen des Immunsystems wie T-Zellen, Makrophagen oder Dendritischen Zellen [5].

### Modulierung der NK-Zellaktivität zur Tumorthherapie

ADCC vermittelt durch NK-Zellen ist ein wichtiger Wirkmechanismus therapeutischer Antikörper für onkologische Indikationen [1, 5, 6]. Neben der klassischen Therapie mittels therapeutischer Antikörper gibt es seit einigen Jahren diverse Neuentwicklungen, um NK-Zellen effizienter in der Krebstherapie nutzbar zu machen. Viele dieser Ansätze werden bereits in klinischen Studien an Patienten getestet. Diese umfassen u. a. die adoptive Zelltherapie *ex vivo* expandierter und aktivierter NK-Zellen, teilweise in Kombination mit therapeutischen Antikörpern, die Nutzung *ex vivo* expandierter gentechnisch veränderter *chimeric antigen receptor* NK-Zellen, das Fc-Engineering therapeutischer Antikörper um spezifischer oder mit erhöhter Affinität gegenüber dem FcγRIIIa NK-Zellen aktivieren zu können sowie die Nutzung bispezifischer Antikörper zur gezielten NK-Zellrekrutierung, genannt *NK cell engager* (NKCE) [1, 5, 7]. Ein bispezifischer NKCE besteht üblicherweise aus einem Paratop oder mehreren Paratopen gerichtet gegen ein Tumor-assoziiertes Antigen (TAA), sowie einem oder mehreren Paratop(en), welche die Bindung an FcγRIIIa oder einen anderen aktivierenden Rezeptor der NK-Zelle vermitteln (**Abb. 1B**). Die simultane Bindung des bifunktionellen Moleküls sowohl an die Tumorzelle als auch an die NK-Zelle bewirkt die Formierung der lytischen Synapse, welche letztlich zur Lyse der Tumorzelle führt, sowie zur Modulation der weiteren Immunantwort.



▲ **Abb. 1:** Modulation der NK-Zellaktivierung durch Antikörperderivate. **A**, Aktivierung und Inhibition von NK-Zellen durch Integration der Signale von Wirtszell-exprimierten Liganden für aktivierende oder inhibitorische Rezeptoren. NK-Zellen verfügen über einen Satz an aktivierenden Rezeptoren wie beispielsweise FcγRIIIa, die *Natural Cytotoxicity Receptors* oder NKG2D sowie über diverse inhibitorische Rezeptoren (u. a. KIR2DL1 oder NKG2A). Tumorzellen und gestresste Zellen exprimieren Liganden für diese Rezeptoren (u. a. B7-H6 als Ligand für einen aktivierenden Liganden oder HLA-E für einen inhibitorischen Liganden). Die Integration dieser Signale entscheidet, ob eine NK-Zelle aktiviert wird oder nicht. TAA: Tumor-assoziiertes Antigen. **B**, Verschiedene Strategien für die Rekrutierung und Tumor-spezifische Aktivierung von NK-Zellen. Durch den Einsatz eines monoklonalen Antikörpers (mAb) kann die Tumorzelle spezifisch über das Tumor-assoziierte Antigen (TAA) gebunden werden. Durch den Fc-Teil des Antikörpers kann anschließend die NK-Zelle über die Bindung an FcγRIIIa aktiviert werden (oben). Ein bispesifischer Antikörper (bsAb) besteht aus zwei unterschiedlichen Paratopen und kann simultan an das TAA sowie entweder an FcγRIIIa oder an einen anderen aktivierenden Rezeptor binden und somit die NK-Zelle aktivieren (Mitte). Ein Immunligand besteht aus einem Paratop gerichtet gegen ein TAA sowie aus einem Liganden für einen aktivierenden Rezeptor der NK-Zelle und kann ebenfalls durch simultane Bindung diese aktivieren. **C**, Durch Bindung eines Immunliganden an die Tumorzelle wird diese artifiziell mit dem Liganden für den aktivierenden Rezeptor dekoriert und es kommt zur Ausbildung der lytischen Synapse. Dies führt zur Freisetzung von Perforin und Granzymen, welche die Lyse der Tumorzelle bewirken. Weiterhin sekretiert die NK-Zelle proinflammatorische Zytokine sowie Chemokine, welche die Immunantwort modulieren. Alle Abbildungen generiert mittels [www.biorender.com](http://www.biorender.com) sowie mittels [pyMOL v0.99](http://pyMOL.v0.99) (Teilabbildung C).

### NK-Zellaktivierung mittels Immunliganden

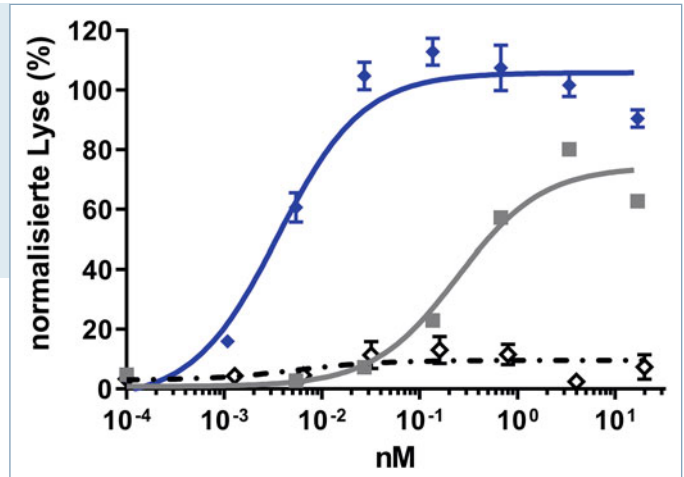
Immunliganden sind bifunktionelle Moleküle zur spezifischen Effektorzellaktivierung und können als alternative NKCEs betrachtet werden. Hierbei wird ein Paratop gegen ein TAA fusioniert an einen Liganden für einen aktivierenden Rezeptor der NK-Zelle. Durch Bindung an die Tumorzelle wird diese mit dem Liganden dekoriert und die lytische Synapse kann ausgebildet werden (**Abb. 1C**, [8]). Bislang wurden Immunliganden basie-

rend auf unterschiedliche TAAs sowie aktivierenden Rezeptoren auf NK-Zellen konstruiert, u. a. wurden hierzu Liganden von NKG2D, NKp30 oder NKp80 genutzt. So konnte beispielsweise bereits in frühen Arbeiten gezeigt werden, dass eine Fusion von ULBP2, einem der Liganden von NKG2D und einem CD138-gerichteten Antikörperderivat, die effiziente Tötung von Myelomzellen durch NK-Zellen vermittelt [9]. Dieses Konzept, die *Induced-Self*-Erkennung von Tumorzellen durch NK-Zellen nachzuahmen, kann-

ten wir und andere Gruppen weiter untermauern [10]. So wurden durch CD20-gerichtete Antikörperfragmente mit ULBP2 einem Liganden für NKG2D oder B7-H6 dem Liganden für NKp30 fusioniert und Lymphomzellen nach Bindung der Moleküle auf deren Oberfläche für NK-Zell-vermittelte Lyse sensibilisiert [10].

In einer von unseren Gruppen kürzlich veröffentlichten Studie konnten wir zeigen, dass eine Fusion aus einem EGFR-gerichteten Paratop an die extrazelluläre Domäne von

► **Abb. 2:** Optimierte Immunliganden lösen zielgerichtetes NK-Zell-vermitteltes Abtöten von Tumorzellen aus. Mit  $\text{Cr}^{51}$  markierte Tumorzellen wurden in Anwesenheit steigender Konzentrationen verschiedener Immunliganden zusammen mit NK-Zellen inkubiert. Nach 4h wurde die Freisetzung von  $\text{Cr}^{51}$  als Maß für das Abtöten der Tumorzellen gemessen. Blaue Kurve = optimierter Immunligand; graue Kurve = nicht-optimierter Immunligand; schwarz-gestrichelte Kurve = Kontrolle. Die Daten zeigen normalisierte Mittelwerte +/- Standardfehler des Mittelwerts aus 3 unabhängigen Versuchen.



B7-H6, ebenfalls die effiziente NK-Zell-vermittelte Eliminierung von EGFR-überexprimierenden Tumorzellen bewirkt [11]. Durch eine Kombination aus rationalem *Design* und *Yeast Surface Display* haben wir darüber hinaus die Affinität von B7-H6 gegen NKp30 signifikant erhöht und konnten belegen, dass Immunliganden basierend auf den Affinitäts-optimierten Varianten eine enorm verbesserte Lysekapazität gegen EGFR-exprimierende Tumorzellen aufweisen (**Abb. 2**). Weiterhin zeigten diese Varianten auch eine verstärkte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine

nach simultaner Bindung, was *in vivo* zu einer gezielten Tumorerkrankung führen könnte [11].

Diese Arbeiten könnten die Grundlage für neue immuntherapeutische Ansätze in der Krebstherapie bilden.

#### Danksagung

Wir bedanken uns bei allen Kollegen und Kolleginnen, welche an der Generierung und am Engineering von bi- und multifunktionalen Molekülen für die Effektorzellrekrutierung beteiligt sind und waren:

Hier steht  
eine Anzeige.

 Springer

Britta Lipinski, Jasmin Zimmermann, Paul Arras, Simon Krahl, Daniel Klewinghaus, Brian Rabinovich, Harald Kolmar, Han Byul Yoo, Tushar Gupta, Bernhard Valldorf, Sven Poetzsch, Rinat Zaynagetdinov, Yanping Xiao, Daniela Wesch, Hans-Heinrich Oberg, Steffen Krohn, Carina Lynn Gehlert, Britta von Below sowie Anja Muskulus und viele andere. ■

## Literatur

- [1] Peipp M, Klausz K, Boje AS et al. (2022) Immunotherapeutic targeting of activating natural killer cell receptors and their ligands in cancer. *Clin Exp Immunol*, 209:22–32
- [2] Demaria O, Cornen S, Daëron M, Morel Y et al. (2019) Harnessing innate immunity in cancer therapy. *Nature* 574:45–56
- [3] Quatrini L, Della Chiesa M, Sivori S et al. (2021) Human NK cells, their receptors and function, *Eur J Immunol* 51:1566–1579
- [4] Schlecker E, Fiegler N, Arnold A et al. (2014) Metalloprotease-Mediated Tumor Cell Shedding of B7-H6, the Ligand of the Natural Killer Cell-Activating Receptor NKp30. *Cancer Res* 74:3429–3440
- [5] 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
- [6] Gauthier L, Vivier E (2020) Boosting Cytotoxic Antibodies against Cancer. *Cell* 180:822–824
- [7] Crinier A, Narni-Mancinelli E, Ugolini S et al. (2020) SnapShot: Natural Killer Cells. *Cell* 180:1280–1280
- [8] Kellner C, Gramatzki M, Peipp M (2013) Promoting natural killer cell functions by recombinant immunoligands mimicking an induced self phenotype. *Oncoimmunology* 2:e24481
- [9] von Strandmann EP, Hansen HP, Reiners KS et al. (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* 107:1955–1962

[10] Kellner C, Günther, A, Humpe A et al. (2016) Enhancing natural killer cell-mediated lysis of lymphoma cells by combining therapeutic antibodies with CD20-specific immunoligands engaging NKG2D or NKp30. *Oncoimmunology* 5:e1058459

[11] Pekar L, Klausz K, Busch M et al. (2021) Affinity Maturation of B7-H6 Translates into Enhanced NK Cell-Mediated Tumor Cell Lysis and Improved Proinflammatory Cytokine Release of Bispecific Immunoligands via NKp30 Engagement. *J Immunol* 206:225–236

**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>.

## Korrespondenzadressen:

Prof. Dr. Matthias Peipp  
Sektion für Antikörperbasierte Immuntherapie  
Dr. Mildred Scheel Haus  
Klinik für Innere Medizin II  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Rosalind-Franklin-Straße 12  
D-24105 Kiel  
[Matthias.Peipp@uksh.de](mailto:Matthias.Peipp@uksh.de)

PD Dr. Stefan Zielonka  
Protein Engineering and Antibody Technologies  
Merck KGaA  
Frankfurter Straße 250  
D-64293 Darmstadt  
[stefan.zielonka@merckgroup.com](mailto:stefan.zielonka@merckgroup.com)

## ARBEITSGRUPPEN



Ammelie Svea Boje, Katja Klausz, Lukas Pekar (oben), Christian Kellner, Stefan Zielonka und Matthias Peipp (unten, v. l. n. r.)

Die Abteilung von Matthias Peipp beschäftigt sich mit der Generierung und den Effektermechanismen optimierter Antikörper und Antikörperderivate zur Verbesserung der Immuntherapie von Autoimmun- und Tumorerkrankungen.

Die Arbeitsgruppe von Stefan Zielonka bei Merck Healthcare KGaA beschäftigt sich mit der Generierung und dem Engineering von mono- und multifunktionalen Antikörperderivaten für unterschiedliche Indikationen u.a. im Bereich der Immunonkologie.