

# **Präklinische Evaluierung immuntherapeutischer Ansätze zur Optimierung von Tumorbehandlungen**

## **Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Samuel Holzmayer  
aus Reutlingen

Tübingen  
2024

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

26.02.2025

Dekan:

Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter/-in:

PD Dr. Melanie Märklin

2. Berichterstatter/-in:

Prof. Dr. Alexander Weber

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>6</b>
2.1	Immunsystem.....	6
2.1.1	Angeborene Immunität .....	6
2.1.1.1	NK-Zellen.....	7
2.1.2	Adaptive Immunität.....	8
2.1.2.1	T-Zellen .....	9
2.1.2.2	B-Zellen .....	10
2.1.2.3	Antikörper .....	11
2.2	Tumorimmunologie .....	13
2.3	Immuntherapie von Tumorerkrankungen.....	14
2.3.1	Immuntherapie mit monospezifischen Antikörpern .....	15
2.3.2	Immuntherapie mit bispezifischen Antikörpern .....	17
2.3.3	Immuntherapie mit Fusionsproteinen.....	19
2.4	Therapie der akuten lymphatischen Leukämie .....	20
2.5	Therapie von <i>triple</i> -negativem Brustkrebs .....	21
2.6	Therapie von Sarkomen.....	22
<b>3</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse</b> .....	<b>24</b>
4.1	Asciminib erhält die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität gegen leukämische Blasten .....	24
4.2	NKG2DL als Zielantigene für die bispezifischen Fusionsproteine NKG2DxCD16 und NKG2DxCD3 bei triple-negativem Brustkrebs .....	26
4.3	Der bispezifische B7-H3xCD3 Antikörper CC-3 induziert T-Zell-Immunität gegen Knochen- und Weichteilsarkome .....	27
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>29</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>52</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>54</b>
<b>9</b>	<b>Eigene Publikationen</b> .....	<b>55</b>
<b>10</b>	<b>Eigenanteil</b> .....	<b>57</b>
<b>11</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>59</b>

## 1 Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten wurden bedeutende Fortschritte in der Tumorthherapie erzielt. Dennoch bleibt die Entwicklung effektiver und zielgerichteter Therapien weiterhin eine Herausforderung. Die Kombination verschiedener Behandlungsmethoden hat sich als effektiv erwiesen, um das Überleben vieler Tumorpatienten zu verbessern. Selektivere Therapien wie Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) und Immuntherapien haben dazu beigetragen, die Belastung durch unselektive Chemotherapeutika zu reduzieren.

Im ersten Teil der Arbeit wurde der Einfluss der Kombinationstherapie BCR::ABL1 TKI mit dem CD20-Antikörper Rituximab, die zur Behandlung der B-ALL eingesetzt wird, auf NK-Zellen untersucht. Dabei wurde der Einfluss der TKIs auf die Aktivierung, Degranulation, Zytokin-Freisetzung sowie das zytotoxische Potential der NK-Zellen analysiert. Asciminib erwies sich als am besten für die Kombination geeignet, da es die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) gegenüber leukämischen Zelllinien nicht beeinträchtigte, während Dasatinib und Ponatinib tiefgreifende hemmende Effekte zeigten.

In der zweiten Arbeit wurde die Wirkungsweise der bispezifischen Fusionsproteine NKG2DxCD16 und NKG2DxCD3 zur Behandlung von *triple*-negativem Brustkrebs (TNBC) untersucht. Die Fusionsproteine zeigten eine signifikante Aktivierung und Degranulation von NK- und T-Zellen sowie eine erhöhte Freisetzung von Zytokinen und Effektorproteinen. Das NKG2DxCD3-Konstrukt zeigte eine stärkere und länger anhaltende Tumorkontrolle im Vergleich zu NKG2DxCD16. Die Studie zeigte auch, dass PBMCs von Patientinnen während einer aktiven Chemotherapie mit den Fusionsproteinen Tumorzellen effektiv eliminieren können.

Die dritte Arbeit charakterisierte den bispezifischen B7-H3xCD3-Antikörper CC-3 für die Behandlung von Knochen- und Weichteilsarkomen. Die Behandlung mit CC-3 induzierte eine zielzellrestringierte Aktivierung von T-Zellen, eine signifikante Freisetzung von Zytokinen und Effektorproteinen sowie eine starke Tumorlyse. Zudem konnte eine signifikante Proliferation und Differenzierung von T-Zellen zu Gedächtniszellen beobachtet werden. CC-3 zeigte eine ausgeprägte Tumoreradikation und wird derzeit in einer eigenen klinischen Studie zur Behandlung von Sarkomen evaluiert.

Zusammenfassend handelt es sich bei allen drei Therapieansätzen um neue immuntherapeutische Behandlungskonzepte, die einerseits noch Raum für zukünftige Optimierungen lassen, andererseits aber bereits jetzt das Potenzial haben, die Therapie verschiedener Tumorarten zu verbessern.

## Abstract

Significant progress has been made in tumor therapy in recent decades. However, the development of effective and targeted therapies remains a challenge. The combination of different treatment modalities has proven effective in improving the survival of many tumor patients. More selective therapies such as tyrosine kinase inhibitors (TKIs) and immunotherapies have helped to reduce the burden of non-selective chemotherapeutic agents.

In the first part of the study, the influence of the combination therapy with BCR::ABL1 TKI and the CD20 antibody Rituximab, which is used to treat B-ALL, on NK cells was investigated. The influence of the TKIs on NK cell activation, degranulation, cytokine release and cytotoxic potential was analyzed. Asciminib was found to be the most suitable for the combination as it did not affect the antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against leukemic cell lines, whereas dasatinib and ponatinib showed profound inhibitory effects.

The second study investigated the mode of action of the bispecific fusion proteins NKG2DxCD16 and NKG2DxCD3 for the treatment of triple negative breast cancer (TNBC). The fusion proteins showed significant activation and degranulation of NK and T cells as well as increased release of cytokines and effector proteins. The NKG2DxCD3 construct showed greater and longer lasting tumor control compared to NKG2DxCD16. The study also showed that patient PBMCs can effectively eliminate tumor cells during active chemotherapy with the fusion proteins.

The third study characterized the bispecific B7-H3xCD3 antibody CC-3 for the treatment of bone and soft tissue sarcomas. Treatment with CC-3 induced target cell-restricted activation of T cells, significant release of cytokines and effector proteins, and potent tumor lysis. In addition, significant proliferation and differentiation of T cells into memory cells was observed. CC-3 showed pronounced tumor eradication and is currently being evaluated in a separate clinical trial for the treatment of sarcomas.

In summary, all three therapeutic approaches are novel immunotherapeutic treatment concepts that leave room for future optimization, but already have the potential to improve the treatment of various tumor types.

## 2 Einleitung

### 2.1 Immunsystem

Der Begriff Immunsystem stammt aus dem Lateinischen (*immunis*: „rein“, „unberührt“), und seine Funktion besteht in der Abwehr von Schadstoffen, pathogenen Organismen, wie Bakterien, Parasiten, Pilzen oder Viren sowie malignen Zellveränderungen.<sup>1</sup> Dabei spielt die Fähigkeit des Immunsystems zwischen „Selbst“ und „Fremd“ zu unterscheiden eine entscheidende Rolle. Das Immunsystem umfasst eine Vielzahl hochspezialisierter Zellen, Gewebe und Proteinkomponenten, welche für die immunologische Erkennung körperfremder Strukturen, die Ausübung immunologischer Effektorfunktionen, die Regulation der Immunantwort, sowie die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses verantwortlich sind.<sup>2, 3</sup> Das Immunsystem vieler höherer Wirbeltiere lässt sich in eine humorale und zelluläre Komponente unterteilen. Der humorale Anteil (lateinisch *humor* bedeutet „Feuchtigkeit“, „Flüssigkeit“) umfasst lösliche Bestandteile wie das Komplementsystem, Antikörper, Lysozyme, Chemokine und Zytokine.<sup>2</sup> Die zellulären Bestandteile des Immunsystems, auch als Leukozyten bezeichnet, werden aus hämatopoetischen Stammzellen gebildet. Während der Differenzierung entstehen aus lymphatischen und myeloischen Progenitoren die verschiedenen Leukozyten, wie B-Zellen, T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sowie Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen (DC) und Mastzellen.<sup>1, 3</sup>

#### 2.1.1 Angeborene Immunität

Das angeborene Immunsystem fungiert als schneller Schutz des Organismus, wenn Pathogene die physikalischen, chemischen und natürlichen Schutzbarrieren der Epithelien überwunden haben.<sup>1</sup> Es dämmt die Ausbreitung von Infektionen ein und rekrutiert sowie aktiviert das adaptive Immunsystem am Ort der Infektion. Humorale Komponenten wie Lysozyme und das Komplementsystem reagieren auf bestimmte körperfremde Strukturen und führen zur Spaltung bzw. Porenbildung der Zellwand/-membran oder zur Opsonierung.<sup>4</sup> Die Zytokine und Chemokine spielen eine besondere Rolle bei der Signalübertragung zur Rekrutierung von Immunzellen sowie der Regulation der Immunantwort. Die zellulären Komponenten der angeborenen Immunantwort sind: DCs, Monozyten/Makrophagen, Granulozyten und NK-Zellen.<sup>5</sup> Sie erkennen molekulare Motive, die von Eukaryoten nicht exprimiert werden, über invariante Keimbahn kodierte Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs), sogenannte pathogen-assoziierte Membranproteine (*pattern associated membrane proteins*, PAMPs).<sup>6</sup> Dies ermöglicht insbesondere die Erkennung extrazellulärer Erreger. Zu den PRRs gehören die *Toll-like* Rezeptoren (TLRs), welche die Produktion von

Zytokinen und Chemokinen auslösen. Dazu gehört beispielsweise der Tumor-Nekrose-Faktor (*tumor necrosis factor*, TNF) von Makrophagen, der die Rekrutierung und Aktivierung des adaptiven Immunsystems zur Infektionsstelle bewirkt.<sup>7</sup>

Eine wesentliche Voraussetzung für das erfolgreiche Zusammenspiel von angeborenem und adaptivem Immunsystem ist die Antigenpräsentation. Dabei spielen antigenpräsentierende Zellen (*antigen presenting cells*, APCs) eine entscheidende Rolle. In diesem Zusammenhang sind insbesondere die DCs hervorzuheben, aber auch Monozyten und Makrophagen zählen zu den APCs des angeborenen Immunsystems.<sup>5</sup> Bei der Antigenpräsentation werden phagozytierte Pathogene zu Antigenen prozessiert und anschließend mit kostimulatorischen Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert.<sup>2, 3</sup>

Die Aufgaben der NK-Zellen werden im folgenden Abschnitt detailliert beschrieben.

### 2.1.1.1 NK-Zellen

Natürliche Killerzellen sind Teil des angeborenen Immunsystems und spielen mit ca. 5-10% der Lymphozyten eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung virusinfizierter, transformierter oder geschädigter Zellen.<sup>2</sup> NK-Zellen können ohne vorherige Sensibilisierung aktiviert werden, Zytokine freisetzen oder Zielzellen zytotoxisch attackieren.<sup>8</sup> Die Reaktivität der NK-Zellen wird durch ein komplexes Zusammenspiel von inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren reguliert. Die Balance zwischen diesen Signalen entscheidet darüber, ob die NK-Zelle eine Zielzelle angreift oder nicht. Wichtige inhibitorische Rezeptoren sind die Killerzell-immunglobulinähnlichen Rezeptoren (*Killer cell immunoglobulin-like receptors*, KIRs). Die Bindung an den Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I (*major histocompatibility complex class I*, MHC-I), der das immunologische „Selbst“ definiert, führt zu einer verminderten Aktivierbarkeit der NK-Zellen.<sup>8</sup> Umgekehrt führt eine „fehlende Selbst“ Definition (*missing self*) zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber aktivierenden Signalen. Unter den zahlreichen aktivierenden Rezeptoren ist der *natural killer group 2, member D* (NKG2D) Rezeptor wahrscheinlich einer der am besten untersuchten. Der NKG2D-Rezeptor interagiert mit den NKG2D-Liganden (NKG2DL), die auch als Stressliganden bezeichnet werden. Zu den NKG2DL gehören *MHC class I chain-related A and B* (MICA/MICB) und *UL-16 binding protein* (ULBP). Sie werden von infizierten und transformierten Zellen oder bei DNA-Schäden exprimiert.<sup>9, 10</sup> Die Aktivierung von NK-Zellen durch Stressliganden wie NKG2DLs wird als „induzierte Selbst“-Erkennung (*induced self*) bezeichnet.<sup>11</sup>

Aktiviert NK-Zellen setzen entweder Zytokine frei, oder erkennen und zerstören abnormale Zellen, indem sie zytotoxische Granula freisetzen. NK-Zellen können in zwei Populationen unterteilt werden: CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> und CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>. CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen modulieren

nach Aktivierung die adaptive Immunantwort durch die Sekretion von Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), ihre zytotoxischen Fähigkeiten sind jedoch begrenzt.<sup>12</sup> Sie kommen überwiegend in sekundären lymphoiden Geweben vor, ihr Anteil im zirkulierenden Blut beträgt nur 10% der NK-Zellpopulation.<sup>13</sup> Die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen sind mit zwei zytotoxischen Mechanismen ausgestattet. So können sie nach Aktivierung zytotoxische Granula sezernieren, die aus porenbildenden Proteinen wie Perforin und Granulysin sowie den proteolytischen Granzymen bestehen.<sup>13</sup> Alternativ kann die Induktion eines Apoptosesignals über Todesliganden der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Superfamilie, wie den FAS-Liganden oder *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) erfolgen, die an entsprechende Rezeptoren auf der Tumorzelle binden.<sup>14, 15</sup> Eine weitere wichtige Effektorfunktion ist die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (*antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC). Die Erkennung von antigengebundenen Antikörpern erfolgt über den hochspezifischen Fc $\gamma$ -Rezeptor III $\alpha$  (Fc $\gamma$ RIIIa, CD16 $\alpha$ ), was zu einer unmittelbaren Aktivierung und Freisetzung zytotoxischer Granula aus den NK-Zellen führt.<sup>16</sup>

### 2.1.2 Adaptive Immunität

Die adaptive Immunantwort setzt zeitlich verzögert zur angeborenen Immunantwort ein und erkennt hochspezifisch körperfremde oder maligne Antigene und wird daher als spezifische Abwehr bezeichnet.<sup>2, 3</sup> B- und T-Zellen repräsentieren den zellulären Anteil, lösliche Antikörper den humoralen Anteil. Die somatische Rekombination der V-D-J-Regionen ermöglicht bereits vor Antigenkontakt die Bildung eines großen Repertoires hochaffiner B-Zellrezeptoren (*B cell receptor*, BCR) und T-Zellrezeptoren (*T cell receptor*, TCR). Die Sicherung der Selbsttoleranz erfolgt durch eine positive und negative Selektion während der Reifung.<sup>17</sup> Die T-Zellen erkennen mit dem TCR Antigene, die auf MHC-I oder MHC-II präsentiert werden. B-Zellen hingegen können mit dem BCR an freie Antigene binden, ohne auf eine entsprechende Antigenpräsentation angewiesen zu sein. T-Helferzellen unterstützen die Aktivierung durch kostimulatorische Signale, wodurch die aktivierten B-Zellen zu Plasmazellen und reaktivierbaren Gedächtniszellen reifen.<sup>18</sup> Die Plasmazellen produzieren dann erhebliche Mengen antigenspezifischer Antikörper.<sup>2</sup>

Durch wiederholten Antigenkontakt entstehen aus aktivierten naiven B- oder T- Zellen langlebige Gedächtniszellen. Diese sorgen für eine schnelle Verfügbarkeit von hochspezifischen Effektorzellen und Antikörpern innerhalb kürzester Zeit und definieren das immunologische Gedächtnis. Darüber hinaus sind an den Schleimhautbarrieren sezernierte Antikörper in der Lage, Krankheitserreger zu neutralisieren, bevor es zu einer Infektion kommt. Auf diese Weise entsteht eine erworbene Immunität durch das adaptive Immunsystem, die über Jahre oder Jahrzehnte aufrechterhalten wird.<sup>19</sup>

### 2.1.2.1 T-Zellen

Die T-Zellen gehören zu den wichtigsten Effektorzellen der adaptiven Immunität. Das „T“ steht für Thymus, ein wichtiges Organ für die Reifung von T-Zellen.<sup>20</sup> T-Zellen erkennen und bekämpfen infizierte oder maligne Zellen, indem sie körperfremde oder entartete Antigene auf MHC mit Hilfe des TCRs erkennen.<sup>3</sup> Die Mehrheit der T-Zellen exprimiert den  $\alpha/\beta$ -TCR, der aus zwei kovalent verbundenen heterodimeren Polypeptiden besteht. Diese bestehen aus einer variablen Region zur Antigenerkennung, einer konstanten Immunglobulin-ähnlichen (C)-Domäne sowie einer kurzen zytoplasmatischen Domäne.<sup>21</sup> Die CD3-Adapterproteine stabilisieren den TCR-Rezeptorkomplex auf der Zelloberfläche und leiten bei der Aktivierung das Signal über das Immunrezeptor-Tyrosin-basierte Aktivierungsmotiv (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, ITAM) in die Zelle.<sup>22</sup> Der TCR-Komplex reifer T-Zellen enthält zusätzlich entweder den CD4- oder den CD8-Korezeptor, der entsprechend für die Bindung an MHC-II oder MHC-I entscheidend ist.<sup>23</sup> Die T-Helferzellen ( $CD4^+$ ) erkennen die von den APCs auf MHC-II präsentierten Peptide und unterstützen die Immunantwort durch Kostimulation und Ausschüttung von Zytokinen, wodurch sie wesentlich zur Regulation der Immunantwort beitragen. Sie können anhand der sezernierten Zytokine in Th1, Th2, Th9, Th17, Tfh und Treg Zellen unterteilt werden.<sup>24</sup> Zytotoxische T-Zellen ( $CD8^+$ ) erkennen und bekämpfen Zellen die körperfremde oder maligne Antigene auf MHC-I präsentieren.<sup>25</sup> In den Zielzellen induzieren sie Apoptose entweder durch die Freisetzung zytotoxischer Granula, die unter anderem aus Perforin und Granzymen bestehen, oder durch die Stimulation von Todesrezeptoren wie Fas oder TRAIL-Rezeptoren.<sup>26</sup> Zusätzlich sezernieren aktivierte  $CD8^+$  T-Zellen Zytokine wie IFN $\gamma$ , IL-2 oder TNF.

Für die Aktivierung von T-Zellen sind insgesamt drei Signale notwendig. Das erste Signal erfolgt durch die Bindung des TCR an den MHC:Peptid-Komplex. Die vollständige Aktivierung naiver T-Zellen erfordert zusätzlich ein zweites kostimulatorisches Signal, sowie ein drittes Signal in Form von Zytokinen. Ohne diese Signale wird die T-Zelle anerg, d.h. unempfindlich gegenüber einer erneuten Stimulation, wodurch eine Selbsttoleranz gewährleistet wird.<sup>27</sup>

Einer der wichtigsten Rezeptoren für die Kostimulation ist CD28, der auf fast allen T-Zellen exprimiert wird. CD28 bindet an Liganden der B7-Superfamilie, zu der unter anderem CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) zählen. Sie gehören zu den aktivierenden Liganden, die für die Interaktion mit APCs, insbesondere mit DCs, entscheidend sind.<sup>28</sup> Die Stimulation über CD28 resultiert in einer verstärkten Expression von Zytokinen, wie IL-2, das auch autokrin stimulierend wirkt.<sup>29</sup> Weitere kostimulatorische Rezeptoren der TNF-Superfamilie wie

OX40, CD30 und 4-1BB werden nach dem primären Signal verstärkt exprimiert und modulieren bei entsprechender Interaktion mit ihrem Liganden die T-Zellaktivierung.<sup>30</sup>

Das dritte Signal, das durch Zytokine vermittelt wird, erhalten die T-Zellen durch die angeborene Immunantwort. Dazu gehören z.B. IFN $\gamma$  von NK-Zellen oder TNF von Makrophagen, welche die Migration und Aktivierung von T-Zellen fördern.<sup>31</sup> Daraufhin sezernieren T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen IL-2, das die Bildung von IFN $\gamma$  und TNF, aber auch die Effektorfunktion der zytotoxischen T-Zellen durch vermehrte Bildung von Perforin und Granzymen verstärkt.<sup>32, 33</sup>

Die vollständige Aktivierung naiver T-Zellen führt zur klonalen Proliferation und zur Bildung einer großen Anzahl kurzlebiger Effektorzellen.<sup>34</sup> Ein kleiner Teil der T-Zellen differenziert dann zu zentralen Gedächtniszellen, die in der Regel für längere Zeit im lymphatischen Gewebe persistieren.<sup>35, 36</sup> Im Vergleich zu naiven T-Zellen reagieren Gedächtniszellen sensibler auf eine erneute TCR-Stimulation und sind weniger abhängig von kostimulatorischen Signalen.<sup>37</sup> Nach Aktivierung der Effektor-Gedächtniszellen wandern diese in das periphere Gewebe, wo sie wieder zu Effektorzellen reifen.<sup>36</sup>

Neben den aktivierenden Signalen, sind in den letzten Jahrzehnten immer mehr Details über inhibierende Signale, sogenannte Immun-Checkpoints, bekannt und klinisch relevant geworden. Zu den wichtigsten Checkpoints zählen das *Programmed Cell Death Protein 1* (PD-1) und das *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4* (CTLA-4).<sup>38</sup> Die Aktivierung von T-Zellen führt unter anderem zur Expression von PD-1.<sup>39</sup> Zytokine wie IFN $\gamma$  induzieren die Expression des zugehörigen Liganden PD-L1 auf benachbarten Zellen.<sup>40</sup> In der Folge wird die Immunantwort gedämpft, um die Schädigung der benachbarter Zellen zu minimieren und Autoimmunität zu verhindern.

### 2.1.2.2 B-Zellen

B-Zellen produzieren die Antikörper der humoralen adaptiven Immunantwort. Jede B-Zelle exprimiert einen einzigartigen BCR mit einer spezifischen Antigenaffinität. Mit Hilfe des BCR, bestehend aus membrangebundenen Immunglobulinen (Antikörper, Ig), werden spezifische Antigene erkannt und das Aktivierungssignal über Signaltransduktionsproteine (CD79A/B) in die Zelle geleitet.<sup>3</sup> An B-Zellen gebundene Antigene werden zunächst aufgenommen, anschließend prozessiert und schließlich über MHC-II den T-Helferzellen präsentiert. Im Gegenzug vermittelt die T-Helferzelle kostimulatorische Signale, aktiviert die B-Zelle zur klonalen Expansion und zur Differenzierung in Plasmazellen und in reaktivierbare Gedächtniszellen.<sup>18</sup> Die Plasmazellen sezernieren daraufhin erhebliche Mengen an löslicher antigenspezifischer Antikörper.<sup>2</sup> Nach der Antigenbindung der B-Zelle findet in den sekundären lymphatischen Organen eine Affinitätsreifung statt. Dabei werden

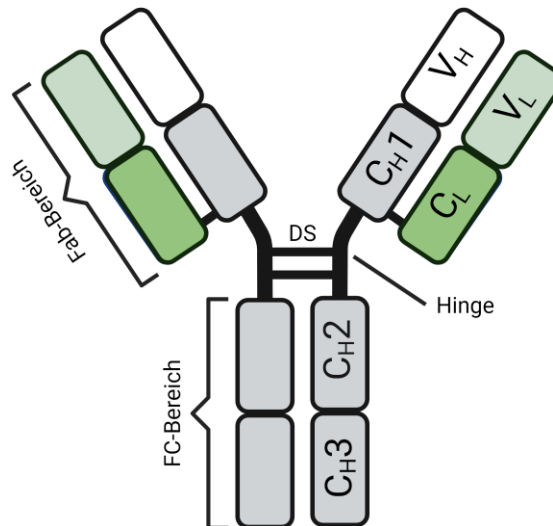
die für die Antigenbindung wichtigen variablen Regionen somatisch hypermutiert. B-Zellen mit höher affinen Antikörpern werden dabei selektiert und expandieren. Dieser Prozess wiederholt sich mehrmals, wodurch die Antikörperantwort im Laufe der Zeit effektiver und effizienter wird.<sup>3</sup>

### 2.1.2.3 Antikörper

Antikörper, bestehend aus leichten und schweren Proteinketten mit konstanten und variablen Bereichen, erkennen mit der Antigenbindungsstelle (Paratop) eine spezifische Struktur des Antigens (Epitop), welches wie ein Schlüssel in ein Schloss passt.<sup>3</sup> Das Paratop wird aus den variablen Bereichen der schweren ( $V_H$ ) und leichten ( $V_L$ ) Proteinketten gebildet. Die schweren Proteinketten definieren die fünf Antikörperklassen IgA, IgD, IgE, IgG und IgM und unterscheiden sich in Struktur, Funktion und Verteilung im Gewebe.<sup>41</sup> Nach der Bindung des Antikörpers an das Epitop üben sie verschiedene Funktionen des Immunsystems aus, wie die Neutralisierung, Komplementaktivierung, Opsonierung und die Aktivierung von Immunzellen. Die Neutralisierung von Krankheitserregern wie Viren und Bakterien durch Bindung an Oberflächenstrukturen blockiert deren Fähigkeit, Zellen zu infizieren oder in Gewebe einzudringen. Des Weiteren können Antikörper Pathogene zu größeren Aggregaten agglutinieren, die von Immunzellen leichter attackiert werden können. Auch lösliche Bestandteile können durch die Antikörperbindung zu unlöslichen Proteinagglomeraten führen, die phagozytiert werden können. Sind zwei Antikörper in geringem Abstand zueinander an Zielmoleküle gebunden, kann die Komplementaktivierung über das C1q-Protein erfolgen und die Initiierung des Membranangriffskomplexes (MAC), die komplementabhängige Zytolyse (*complement dependent cytotoxicity*, CDC), auslösen.<sup>42</sup> Bei der Opsonierung werden die Erreger durch die Antigenbindung markiert, wodurch die Erkennung und Phagozytose (*antibody-dependent cellular phagocytosis*, ADCP) erleichtert wird. Zudem können antigengebundene Antikörper die ADCC von NK-Zellen induzieren.

Die natürlich im Blut vorkommenden IgG-Antikörper zeichnen sich durch eine geringe Größe, die Fähigkeit, aus den Blutgefäßen in Gewebe zu diffundieren, sowie eine vergleichsweise lange Serumhalbwertszeit aus.<sup>43</sup> Der IgG-Antikörper ist ein aus vier Peptidketten bestehendes Glykoprotein.<sup>44</sup> Die kovalente Bindung der beiden schweren Ketten (50 kDa) erfolgt über zwei Disulfidbrücken an der hochflexiblen Hinge-Region. Dies führt zur Ausbildung der typischen symmetrischen Y-förmigen Struktur (siehe Abbildung 1). Die leichte Kette (25 kDa) besteht aus einer konstanten ( $C_L$ ) und einer variablen ( $V_L$ ) Domäne und ist über eine Disulfidbrücke mit der schweren Kette verbunden. Zusammen mit den  $C_H1$ - und  $V_H$ -Domänen bilden sie den Antigenbindungsbereich, auch Fab-Region

(*fragment antigen binding*) genannt.<sup>41</sup> Die schwere Kette besteht aus drei konstanten ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ) und einer variablen ( $V_H$ ) Domäne. Die  $C_{H2}$ - und  $C_{H3}$ -Domänen bilden den Fc-Teil (*fragment crystallizable*) und sind für die Vermittlung der Effektorfunktionen essentiell.<sup>45</sup>



**Abbildung 1: Aufbau eines IgG1 Antikörpers**

Der Schematische Aufbau eines IgG1 Antikörpers, bestehend aus Fab (*fragment antigen binding*) und FC (*fragment crystallizable*) die über die Hinge-Region verbunden sind. Die schweren Ketten werden über die Disulfidbrücke (DS) verbunden. Die Peptidketten setzen sich aus verschiedenen Domänen zusammen:  $C_H$  (Konstante schwere Kette),  $V_H$  (variable schwere Kette),  $C_L$  (konstante leichte Kette) und  $V_L$  (variable leichte Kette). (Abbildung erstellt mit biorender.com)

Die IgG-Isotypen (IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4) unterscheiden sich in ihren Fc-Regionen und den dadurch induzierten Effektormechanismen. Die Fc-Regionen binden mit unterschiedlicher Affinität an die verschiedenen Fc $\gamma$ -Rezeptoren oder an Komponenten des Komplementsystems.<sup>41, 46</sup> Die Fc $\gamma$ -Rezeptorfamilie (Fc $\gamma$ R) umfasst Rezeptoren mit hoher und niedriger Affinität, darunter Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIC und Fc $\gamma$ RIIIA, die aktivierend wirken, sowie Fc $\gamma$ RIIB, der inhibierend wirkt.<sup>46</sup> Mit Ausnahme der  $\alpha\beta$ -T-Zellen exprimieren alle Immunzellen Fc-Rezeptoren. Die Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA und Fc $\gamma$ RIIC werden von Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen und DC exprimiert und induzieren die ADCP der opsonierten Zellen.<sup>47</sup> Der Fc $\gamma$ RIIIA-Rezeptor wird auf der Oberfläche von NK-Zellen, Monozyten und Neutrophilen exprimiert.<sup>46</sup> Nach Bindung an die Fc-Region aktiviert Fc $\gamma$ RIIIA die ADCC von NK-Zellen.<sup>48</sup> Der neonatale Fc-Rezeptor (FcRn) ist ubiquitär exprimiert und übernimmt eine wichtige Funktion beim Transport von Antikörpern über Membranbarrieren.<sup>49</sup> Im Rahmen der Pinozytose werden kontinuierlich Antikörper aus dem

Plasma aufgenommen und mit Hilfe des FcRn vor lysosomalem Abbau geschützt und zurück ins Plasma transportiert.<sup>50</sup> Antikörper, die nicht an den FcRn binden, weisen daher eine deutlich verkürzte Halbwertszeit auf.

## 2.2 Tumorimmunologie

Bereits im Jahr 1909 vermutete Paul Ehrlich, dass das menschliche Immunsystem über verschiedene Mechanismen verfügt, um die Entstehung von Tumoren zu verhindern.<sup>51</sup> Die Theorie der Immunüberwachung wurde Ende der 1960er Jahre von Lewis Thomas und Frank Macfarlane Burnett entwickelt. Sie besagt, dass das Immunsystem den Körper ständig auf abnorme Zellen überwacht und diese eliminiert, bevor sie zu Tumoren werden können.<sup>52, 53</sup> Allerdings treten Tumoren auch bei Menschen und Tieren mit funktionierendem Immunsystem auf, was das Modell immer wieder in die Kritik gebracht hat.<sup>54, 55</sup> Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Leukozyten durch die Sekretion von Zytokinen das Tumorwachstum fördern und dass Tumoren durch die Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen wie IL-10 eine gegenseitige Beeinflussung erfahren.<sup>56, 57</sup> Aufgrund der zunehmenden Erkenntnisse wurde 2004 von Robert Schreiber das Konzept der Immunoediting-Theorie vorgestellt.<sup>58, 59</sup>

Die Immunoediting-Theorie beschreibt den Einfluss des Immunsystems auf die Entstehung und Entwicklung von Tumoren. Sie besteht aus drei E-Phasen: Elimination, Equilibrium und Escape. In der Eliminations-Phase werden die entstandenen Tumoren durch das angeborene und das adaptive Immunsystem eliminiert.<sup>59</sup> In dieser Phase kommt den NK-Zellen und den T-Zellen eine besondere Bedeutung zu.<sup>60, 61</sup> Nur wenige resistente Zellen überleben diese Phase und erreichen die sogenannte Equilibrium-Phase. In dieser Phase sind Tumoren klinisch noch nicht nachweisbar und das Tumorwachstum bleibt durch das Immunsystem kontrolliert. Dieser Zustand kann über mehrere Jahre stabil bleiben. Durch den anhaltenden Selektionsdruck des Immunsystems kommt es in der Escape-Phase zur vermehrten Bildung von immuntoleranten oder resistenten Tumorzellen. Dies geschieht unter anderem durch eine verminderte Expression von Stressliganden oder von MHC-I-Molekülen, wodurch die Präsentation entarteter Peptide an überwachende T-Zellen reduziert wird.<sup>62, 63</sup> Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass inhibitorische Checkpoint-Moleküle wie PD-L1 oder CTLA-4 auf der Tumorzellen die T-Zellen hemmen.<sup>38, 39</sup> Außerdem können anti-apoptische Moleküle, wie BCL-2 überexprimiert werden und dadurch die Effektormechanismen der Immunzellen abschwächen.<sup>64</sup> Das immunsuppressive Tumormikromilieu (*tumor microenvironment*, TME), das unter anderem Fibroblasten und tumorassoziierte Makrophagen (TAM) enthält, fördert die Bildung

dysfunktionaler und erschöpfter T-Zellen.<sup>65, 66</sup> Dies führt zu einer unkontrollierten Proliferation des Tumors und begünstigt die Metastasierung.

### 2.3 Immuntherapie von Tumorerkrankungen

Mit Hilfe der Immuntherapie können verschiedene Immunzellen gezielt stimuliert oder inhibiert werden, um die Eliminierung des Tumors zu verbessern. William Coley, der Vater der Tumorimmuntherapie, veröffentlichte 1883 eine Studie, in der er über die Heilung von Sarkompatienten berichtete, die gleichzeitig an einer bakteriellen Infektion (Erysipel) litten.<sup>67</sup> Diese Erkenntnis inspirierte ihn zur Entwicklung von Coley's Toxins, der ersten Immuntherapie im 19. Jahrhundert.<sup>68</sup> Neben den unspezifischen Chemo- und Strahlentherapien, die neben dem Tumor auch viel gesundes Gewebe schädigen, wurden selektivere und zum Teil personalisierte Immuntherapien entwickelt.<sup>69, 70</sup>

Grundlage der selektiven Immuntherapie sind spezifische Antigene, die überwiegend auf Tumoren vorkommen und möglichst nicht auf gesundem Gewebe exprimiert werden.<sup>71</sup> Diese Tumorantigene können in tumorspezifischen Antigenen (TSA), auch Neoantigenen genannt, sowie tumorassoziierten Antigenen (TAA) unterteilt werden. Die TSA entstehen durch Mutationen in den Tumorzellen und werden von gesundem Gewebe nicht exprimiert.<sup>72</sup> TAA werden in der Regel von Tumoren im Vergleich zu gesundem Gewebe überexprimiert. Dennoch ist eine Expression im gesunden Gewebe nachweisbar. Die Folge ist eine zielgerichtete, tumorunabhängige Zytotoxizität (*on target off tumor*), die den Einsatz der Immuntherapie limitieren kann.

Immuntherapien, auch in Kombination mit klassischer Chemotherapie, Kinaseinhibitoren oder Strahlentherapie, haben sich als effektive Behandlungsmethode erwiesen und zu einer dramatischen Verbesserung der Tumorthherapie und des Überlebens der Patienten geführt. Immuntherapien lassen sich in fünf Therapieformen unterteilen: Tumorzellvakzinierung, onkolytische Viren, adoptive Zelltherapie, Checkpoint-Inhibitoren, und tumorspezifische Antikörper.

Die aktive Tumorzellvakzinierung zielt auf die Bildung und Rekrutierung tumorspezifischer T-Zellen ab. Dabei werden tumorassoziierte Peptide von DCs über MHC-I und MHC-II an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert, wodurch spezifische T-Zellen gebildet werden, die die Immunantwort verstärken.<sup>28, 73</sup> In der Anfangsphase wurden Tumorzelllysate in Patienten injiziert oder *ex vivo* mit synthetischen Peptiden beladene DCs refundiert. Inzwischen wurden ganze Warenhäuser tumorspezifischer Peptide identifiziert, die tumor- und patientenindividuell eingesetzt werden können.<sup>74, 75</sup> Die Vakzinierung kann in verschiedenen Formen erfolgen, beispielsweise als Peptid- oder Vektor-basierte Vakzine oder als DNA/mRNA-Vakzine.<sup>2, 3</sup> Insbesondere der Einsatz von mRNA-Vakzinen hat sich

in den letzten Jahren als sehr effektiv gegen Infektionen erwiesen. Das US-amerikanische Pharmaunternehmen Moderna plant, bis 2025 einen mRNA-Impfstoff gegen das Melanom auf den Markt zu bringen.<sup>76</sup>

Die Behandlung mit onkolytischen Viren führt zu einer selektiven Infektion der Tumorzellen, was zu einer direkten Tumorlyse und damit zur Freisetzung tumorspezifischer Peptide führt. Analog zur Vakzinierung werden die Peptide von den DCs prozessiert und über die MHC-Präsentation tumorspezifische T-Zellen rekrutiert. Talimogen-Laherparepvec (T-VEC) ist das erste von der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) und der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassene onkolytische Virus zur Behandlung des malignen Melanoms, das im Tumor die Produktion von GM-CSF induziert, wodurch eine verstärkte Immunantwort gegen den Tumor induziert wird.<sup>77, 78</sup>

Bei der adoptiven Zelltherapie werden NK- oder T-Zellen zunächst isoliert, dann *ex vivo* expandiert und schließlich reinfundiert, um eine Anti-Tumor-Antwort zu induzieren. Neben tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) und den TCR-modifizierten T-Zellen haben insbesondere chimäre Antigenrezeptor- (*chimeric antigen receptor*, CAR-) T- oder NK-Zellen die Aufmerksamkeit erregt.<sup>79-81</sup> Autologe T-Zellen werden durch genetische Modifikation so verändert, dass sie extrazellulär eine einzelkettige Antigenerkennungsdomäne eines Antikörpers, fusioniert an die ITAM-CD3ζ-Domäne, exprimieren.<sup>82</sup> Nach der Bindung an das entsprechende Antigen werden die CAR-Zellen aktiviert. Um die Effizienz dieser CAR-Zellen zu optimieren, werden intrazelluläre kostimulatorische Domänen, beispielsweise von CD28, OX40 und 4-1BB, hinzugefügt. CAR-T-Zellen werden bereits zur Therapie der CD19<sup>+</sup> akuten lymphatischen Leukämie eingesetzt.<sup>83</sup>

Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI) blockieren inhibitorische Tumor-T-Zell-Achsen und führen so zu einer Verstärkung oder Reaktivierung der T-Zell-Immunität. Die Blockade der Interaktion von PD-1 und PD-L1 durch Pembrolizumab oder Nivolumab bzw. CTLA-4 mit CD80 und CD86 durch Ipilimumab ermöglicht eine Reaktivierung der T-Zellen.<sup>38, 84</sup> Insbesondere Tumoren mit hoher mutagener Last und vielen Neoantigenen, wie beispielsweise das Melanom oder das Lungenkarzinom von Rauchern, sprechen effektiv auf die ICI-Therapie an.<sup>85, 86</sup>

Tumorspezifische Antikörper haben je nach Antigen und Format sehr unterschiedliche Effektorfunktionen, auf die in den folgenden Abschnitten näher eingegangen wird.

### 2.3.1 Immuntherapie mit monospezifischen Antikörpern

Antikörper, die in der Tumorthherapie eingesetzt werden, führen über verschiedene Mechanismen zur Tumorkontrolle bzw. Tumoreradikation. Zu den induzierten

Effektormechanismen gehören ADCC, CDC und ADCP sowie indirekte Mechanismen, die durch Signalblockade oder Signalinduktion vermittelt werden.

Der erste Antitumor-Antikörper Rituximab bindet an CD20 auf Pro-B und reifen B-Zellen und wird bei malignen B-Zell-Erkrankungen wie der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL), der CD20-positiven akuten lymphatischen Leukämie (ALL), oder dem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom eingesetzt.<sup>87</sup> Im Rahmen der Therapie werden alle CD20-positiven B-Zellen eliminiert. Nach Abschluss der Therapie können sich aus hämatopoetischen Stammzellen wieder gesunde B-Zellen bilden, so dass das immunologische Gedächtnis wieder aufgebaut werden kann.<sup>88, 89</sup> Rituximab kann direkt Apoptose induzieren, indem es an CD20 bindet und dadurch den intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegel erhöht.<sup>90</sup> Die wichtigsten Effektorfunktionen von Rituximab wie ADCC, CDC und ADCP werden jedoch über den Fc-Teil induziert.<sup>91</sup> Durch molekulare Optimierung im Fc-Teil können die therapeutischen Effekte weiter gesteigert werden. Die Veränderung der Glykosylierung (Glycoengineering) von Obinutuzumab (anti-CD20) erhöht so beispielweise die Affinität zu Fc $\gamma$ R und verstärkt die ADCC durch NK-Zellen.<sup>92</sup> Ähnlich führt die gezielte Mutation S239D/I332E im Fc-Teil von Tafasitamab (anti-CD19) zu einer erhöhten Affinität für den aktivierenden Fc $\gamma$ RIIIA bei gleichzeitiger Verringerung der Affinität für den inhibierenden Fc $\gamma$ RIIB, wodurch die ADCC- und ADCP-Effekte verstärkt werden.<sup>93, 94</sup>

Durch die Wahl des Epitops, sowie der Affinität des Antikörpers können die induzierten Effekte beeinflusst werden.<sup>2</sup> Dies ist insbesondere für die Blockade von Signalwegen von Bedeutung. Trastuzumab ist ein IgG1-Antikörper, der an das Onkogen *human epidermal growth factor receptor 2* (Her2) bindet und vor allem über indirekte Effekte die Apoptose von Her2<sup>+</sup> Brustkrebszellen induziert. Her2 vermittelt nach Dimerisierung mit Vertretern der *epidermal growth factor receptor*-Familie oder als Homodimer proliferationsfördernde und anti-apoptotische Signale in die Zelle.<sup>95</sup> Die Dimerisierung wird durch die Bindung von Trastuzumab verhindert und damit für das Tumorwachstum essentielle Signale blockiert. Außerdem verhindert Trastuzumab die Abspaltung extrazellulärer Her2-Domänen durch Metalloproteasen und verhindert so, dass eine unregulierte Her2-Domäne mit aktiver intrazellulärer Kinase in der Membran verbleibt und nachgeschaltete Signalwege übermäßig stimuliert.<sup>96</sup>

Auch lösliche Wachstumssignale, wie der *vascular endothelial growth factor 2* (VEGF2), können durch therapeutische Antikörper blockiert werden.<sup>97</sup> Bevacizumab hemmt durch die Bindung an VEGF2 die Interaktion mit dem VEGF-Rezeptor, wodurch die Neubildung tumorumgebender Blutgefäße gehemmt und das Tumorwachstum durch Nährstoffmangel eingeschränkt wird.<sup>98</sup>

Ein weiterer Ansatz sind Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI), die inhibitorische Tumor-T-Zell-Achsen blockieren. Die Blockade der Interaktion von PD-1 und PD-L1 durch Pembrolizumab oder Nivolumab bzw. von CTLA-4 mit CD80 und CD86 durch Ipilimumab ermöglicht eine Reaktivierung von T-Zellen.<sup>38, 84</sup> Insbesondere Tumoren mit hoher Mutationslast und vielen Neoantigenen, wie beispielsweise das Melanom oder das Lungenkarzinom von Rauchern, sprechen effektiv auf eine ICI-Therapie an.<sup>85, 86</sup> ICIs wie Pembrolizumab, die an T-Zellen binden, werden bevorzugt als IgG4-Antikörper oder Fc-modifiziert eingesetzt, um keine Effektormechanismen gegen die Effektorzelle zu induzieren.<sup>99</sup>

Zusammenfassend sind die Auswahl des Epitops sowie die gewählten Fc-Modifikationen entscheidend für die Wirkung des Antikörpers und müssen für die jeweilige Indikation und den gewünschten Wirkmechanismus optimiert werden.

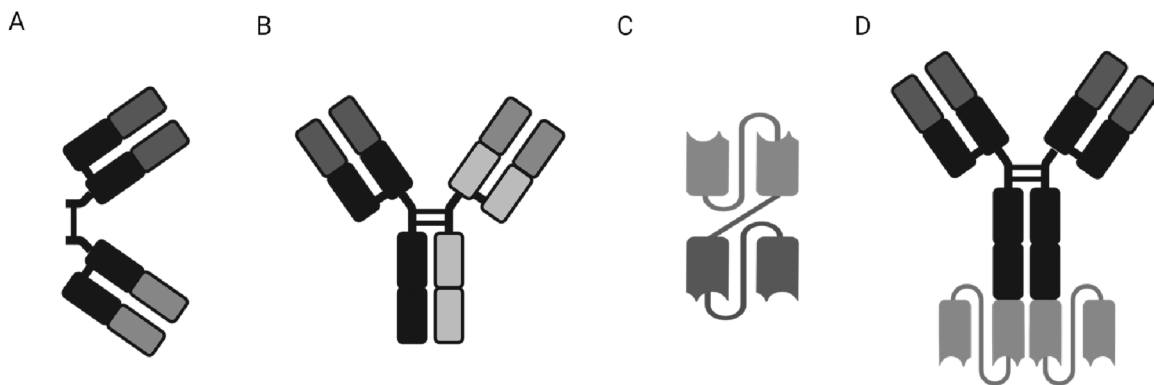
### 2.3.2 Immuntherapie mit bispezifischen Antikörpern

T-Zellen besitzen ein hohes zytotoxisches Potential, das durch klassische monospezifische Antikörper nicht induziert werden kann. Bereits 1985 wurden erste Versuche mit bispezifischen Antikörpern (bsAb) durchgeführt, die sowohl an ein Antigen binden als auch T-Zellen als Effektorzellen stimulieren.<sup>100</sup> Durch die induzierte immunologische Synapse werden unstimulierte T-Zellen aktiviert und zerstören die Zielzellen. Durch die Auswahl der Antigene können mit bsAb immunologische Synapsen nicht nur mit T-Zellen, sondern auch mit anderen Effektorzellen induzieren. Darüber hinaus, können bsAb auch zur Signalblockade eingesetzt werden, ohne Effektorzellen zu stimulieren.

Die späte Marktreife der bsAbs ist auf den aufwändigen Entwicklungsprozess zurückzuführen, bei dem die proteolytische Verdauung des IgG-Formats zu einzelnen Fab-Fragmenten führte, die anschließend wieder chemisch zu (Fab)<sub>2</sub> verknüpft wurden (Abbildung 2A). Dabei traten Probleme mit der Stabilität, Löslichkeit, Aggregation und bei anderen Aspekten auf. Die Entwicklung und Herstellung verschiedener bsAb-Formate wurde durch neue DNA-Klonierungstechnologien erheblich erleichtert. Der erste 2009 klinisch zugelassene bsAb Catumaxomab EpCAMxCD3 (*epithelial cell adhesion molecule*) wurde mit der Quadroma-Technologie hergestellt, die einen entscheidenden Fortschritt in der bsAb-Entwicklung darstellt.<sup>101</sup> Diese Technologie basiert auf der Verknüpfung zweier schwerer Ketten mit den entsprechenden leichten Ketten in Maus/Ratten-Hybridomzellen (Abbildung 2B).

Die Entwicklung des variablen Einzelkettenfragments (*single chain fragment variable*, scFv) steigert die Produktionseffizienz, da keine Zusammensetzung aus leichten und schweren Ketten erforderlich ist.<sup>102</sup> Blinatumomab (CD19xCD3) ist der erste für die Behandlung

maligner B-Zell-Erkrankungen zugelassene bsAb im BiTE-Format, der aus nur zwei scFv besteht (Abbildung 2C).<sup>103</sup> Aufgrund ihrer geringen Größe, zeigen scFv im Vergleich zu normalen IgG1-Antikörpern eine schnellere Extravasation und Anreicherung auf der Tumorseite.<sup>104</sup> Da Blinatumomab im BiTE-Format keine Fc-Bereiche aufweist, kann es nicht an den FcRn binden und muss aufgrund seiner sehr kurzen Halbwertszeit als kontinuierliche Infusion verabreicht werden.<sup>105</sup> Generell sind viele Kombinationen für das Design von bsAb möglich und klinisch anwendbar, beeinflussen jedoch die Halbwertszeit und die Zielzellrestriktion.<sup>106</sup>



**Abbildung 2: Bispezifische Antikörper und Fusionsproteine**

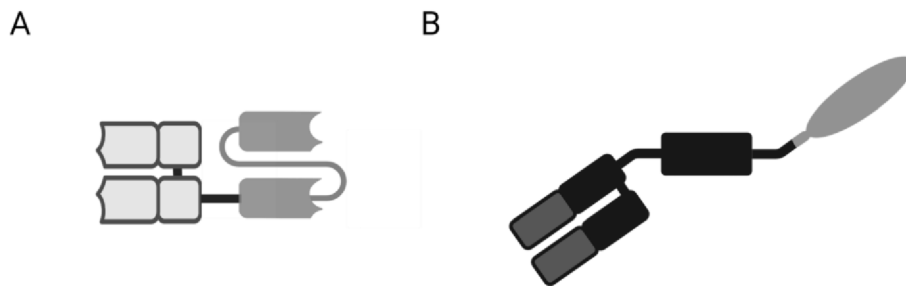
A: Chemisch verknüpfte (Fab)<sub>2</sub>-Fragmente, B: Quadroma produzierter bsAb, C: bsAb im BiTE-Format, D: bsAb im IgG-Format mit scFv an den konstanten Regionen  
(Abbildung erstellt mit biorender.com)

In unserer Arbeitsgruppe wurde mit CC-3 ein humanisierter IgG1 bsAb gegen das TAA B7-Homolog-3 (B7-H3) mit C-terminalen scFv-Domänen mit reduzierter CD3-Affinität und Fc-Optimierung entwickelt (Abbildung 2D).<sup>107, 108</sup> Dadurch zeichnet sich CC-3 durch eine erhöhte Affinität zu FcRn und damit eine verbesserte Halbwertszeit, eine verbesserte Proliferation und langfristige Aktivierbarkeit der stimulierten T-Zellen aus. B7-H3 als Transmembranprotein der B7-Proteinfamilie besitzt eine lange extrazelluläre und eine kurze intrazelluläre Domäne auf und liegt in der Membran als Homodimer vor.<sup>109</sup> Die Oberflächenexpression von B7-H3 wird in vielen gesunden Zellen durch miRNAs verhindert, so dass in gesundem Gewebe keine oder nur eine geringe Expression vorliegt.<sup>110, 111</sup> Bislang konnte kein Rezeptor für B7-H3 identifiziert werden und die genaue Funktion ist noch unklar. Es wird vermutet, dass B7-H3 eine inhibierende Funktion auf das Immunsystem ausübt.<sup>112, 113</sup> Durch die Blockade von B7-H3 konnte eine erhöhte Zytotoxizität von T-Zellen und NK-Zellen beobachtet werden.<sup>114</sup> B7-H3 wird in zahlreichen Tumoren, wie Bronchialkarzinom, Kolonkarzinom, Ovarialkarzinom und Sarkomen stark

exprimiert, wobei eine hohe Expression mit einem aggressiveren Verlauf assoziiert ist.<sup>115-118</sup> B7-H3 soll zudem die Proliferation, Differenzierung und Migration von Tumoren beeinflussen.<sup>119, 120</sup> Darüber hinaus wird B7-H3 auf der tumorumgebenden Neovaskulatur exprimiert, was einen zusätzlichen Angriffspunkt für die Tumorthherapie darstellt.<sup>121</sup>

### 2.3.3 Immuntherapie mit Fusionsproteinen

Fusionsproteine (FP) kombinieren funktionelle Domänen verschiedener Proteine mit Teilen eines Antikörpers, um synergistische Effekte zu erzielen.<sup>2</sup> Dabei können extrazelluläre Domänen von Rezeptoren, Liganden oder Zytokinen mit einem IgG oder scFv fusioniert werden.<sup>122</sup> Die Fc-Domänen verbessern die pharmakokinetischen Eigenschaften, beispielsweise hinsichtlich der Stabilität, der Serumhalbwertszeit und der Verteilung im Körper. Fusionsproteine sind in der Lage, Rezeptor-Ligand-Interaktionen zu unterbrechen. Die Fusion mit Fab oder scFv ermöglicht die gezielte Rekrutierung von Effektorzellen zu den Zielzellen.<sup>123</sup> Ein Beispiel hierfür ist Tebentafusp mit der Fusion eines hochaffinen TCR, der das auf MHC-I präsentierte Glykoprotein 100 (gp100) erkennt, mit einem gegen CD3 gerichteten scFv (Abbildung 3A). Tebentafusp induziert damit antigenspezifisch eine panklonale T-Zellaktivierung. Das erste von uns entwickelte Fusionsprotein besteht aus dem extrazellulären NKG2D-Rezeptor fusioniert an einen optimierten Fc-Teil eines IgG1-Antikörpers und konnte die ADCC von NK-Zellen gegen Her2-positiven Brustkrebs wirksam induzieren.<sup>124</sup> Das Konstrukt wurde zu einem bispezifischen Fusionsprotein (BFP) weiterentwickelt. Dazu wurde ein Fab-Fragment, das entweder an CD3 oder CD16 bindet, über ein C<sub>H</sub>1-Fragment mit dem C-terminalen verknüpften extrazellulären NKG2D-Rezeptor verbunden (Abbildung 3B). Die bispezifischen NKG2D-Fusionsproteine (BFP) binden an alle Mitglieder der NKG2DL-Familie und aktivieren die Effektorzellen über die Fab-Domäne. Die Bindung an CD16 verstärkt die NK-Zellaktivierung im Vergleich zu dem NKG2D-Fc FP, da BFPs nicht an inhibitorische Fc-Rezeptoren binden.<sup>125</sup> NKG2DLs eignen sich gut als TAA, da sie auf gesunden Zellen nicht exprimiert werden.<sup>126</sup> Zudem führen Chemotherapeutika wie Cisplatin, Cyclophosphamid oder Decitabin in der Regel zu einer erhöhten Transkription von NKG2DL.<sup>127-129</sup> Unter anderem werden durch DNA-Schäden Zellzyklus-Checkpointkinasen wie Chk1/2 aktiviert, die wiederum die Transkription der NKG2DL induzieren.<sup>130</sup>



**Abbildung 3: Fusionsproteine**

A: Tebentafusp-Fusionsprotein aus einem TCR verbunden mit scFv, B: Fab Domäne über ein C<sub>H</sub>1-Fragment verbunden mit dem extrazellulären NKG2D-Rezeptor  
(Abbildung erstellt mit biorender.com)

## 2.4 Therapie der akuten lymphatischen Leukämie

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist eine seltene hämatologische Erkrankung, die durch die Proliferation und Akkumulation entarteter und unreifer lymphatischer T- oder B-Zell-Blasten im Knochenmark, Blut und lymphatischem Gewebe gekennzeichnet ist.<sup>131</sup> Sie tritt häufig im Kindesalter, aber auch bei Erwachsenen auf und führt unbehandelt in der Regel relativ rasch zum Tod. Die ALL ist immunologisch und molekular eine sehr heterogene Erkrankung, wobei die häufigste Form die B-Linien-ALL ist. Das derzeitige Therapieschema der B-ALL bei Erwachsenen ist komplex und hängt vom Alter und von prognostischen Faktoren ab. Die Therapie umfasst Induktions-, Konsolidierungs- und Erhaltungstherapiephasen mit regelmäßiger Überwachung der minimalen Resterkrankung (*minimal residual disease*, MRD).<sup>132</sup>

In der Induktionsphase werden häufig Chemotherapeutika wie Doxorubicin und Asparaginasen oder Methotrexat und Cytarabin eingesetzt, um die hohe Leukämielast rasch zu reduzieren. Die Philadelphia-Chromosom-positive (Ph<sup>+</sup>) B-ALL ist eine besonders aggressive Form der B-ALL. Die Translokation der Tyrosinkinase ABL1 in die *breakpoint cluster region*, kurz BCR, auf Chromosom 22 (BCR::ABL1) führt zu einem konstitutiv-aktivem Signal von ABL1, das die Proliferation steigert und die Apoptose stört.<sup>133</sup> Selektive BCR::ABL1 Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) blockieren die dysregulierte Signalaktivität und werden für die Therapie eingesetzt. Darüber hinaus kann die Gabe von CD20 mAb (Rituximab, Obinutuzumab) vor den Chemotherapiezyklen bei der B-ALL, zu einer deutlichen Verbesserung der Therapieergebnisse führen.<sup>132</sup> In der Konsolidierungstherapie werden wechselnde Therapeutika eingesetzt, die der Eliminierung der verbliebenen Blasten sowie der Reduktion der Resistenzentwicklung dienen.<sup>134</sup> Eine langfristige Heilung kann in

vielen Fällen nur durch eine Stammzelltransplantation erreicht werden.<sup>135</sup> Falls kein geeigneter Spender gefunden wird, erfolgt die Erhaltungstherapie unter anderem mit Methotrexat und Mercaptopurin.<sup>132</sup> Einzelne resistente Blasten können die Therapie in Knochenmarksnischen überleben und zu einem späteren Zeitpunkt ein Rezidiv der ALL auslösen.<sup>136</sup> Für die rezidierte B-ALL steht zudem der bsAb Blinatumomab (CD19xCD3) zur Verfügung.<sup>132</sup> Erst kürzlich wurde mit KTE-X19 ein gegen CD19 gerichtetes CAR-T-Zellpräparat für die ALL-Therapie zugelassen, das eine hohe Ansprechrate, aber auch ausgeprägte Symptome eines Zytokin-Freisetzungssyndroms (cytokine release syndrome, CRS) zeigt.<sup>105</sup>

Trotz vieler neuer Therapien ist die Rezidiv Rate der Ph+ B-ALL mit 30-40% immer noch sehr hoch und optimierte Behandlungsprotokolle werden benötigt.

## 2.5 Therapie von *triple*-negativem Brustkrebs

*Triple*-negativer Brustkrebs (*triple-negative breast cancer*, TNBC) zeichnet sich durch die fehlende Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren sowie des *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2) aus.<sup>137</sup> TNBC tritt häufig bei jüngeren Frauen auf und stellt eine aggressive Form des Brustkrebses dar, die bereits in frühen Stadien Metastasen bildet.<sup>138</sup> Da eine gezielte, selektive Hormontherapie beim TNBC keine Therapieoption darstellt, ist die neoadjuvante Chemotherapie mit den Substanzen Paclitaxel oder Capecitabin sowie die Resektion des Tumors die Standardtherapie. Bei Vorliegen von BRCA1/2-Mutationen kann der Einsatz spezifischer PARP-Inhibitoren indiziert sein, die zur Induktion von Einzelstrangbrüchen der DNA und damit zur Apoptose führen.<sup>139, 140</sup> Als immuntherapeutische Optionen stehen bisher lediglich ein Antikörper-Drug-Konjugat (ADC) gegen den *tumor-associated calcium signal transducer 2* (Trop2) und die Blockade des VEGF2 mit dem mAb Bevacizumab zur Verfügung.<sup>141, 142</sup> Trop2 wird von 60% der TNBC exprimiert und wird nach der Bindung von Sacituzumab-Govitecan internalisiert und das Govitecan abgespalten. Govitecan induziert DNA-Schäden und induziert Apoptose.<sup>143</sup> Bevacizumab führt zu einer Hemmung der Neubildung tumorumgebender Blutgefäße und damit zu einer Einschränkung des Tumorwachstums durch Nährstoffmangel.<sup>97</sup> Darüber hinaus können ICIs, wie Pembrolizumab oder Nivolumab, bei PD-L1-positiven Tumoren einen zusätzlichen therapeutischen Effekt erzielen.<sup>144, 145</sup> Generell befinden sich viele neue immunologische Therapeutika in der klinischen Prüfung, wie neu entwickelte ADCs wie Datopotecan-Deruxtecan und gegen B7-H3 oder NKG2DL gerichtete CAR-T-Zellen (NCT05460273, NCT05341492, NCT04107142). Im Verlauf werden die Immuntherapien mit bestehenden Chemotherapien

wie Paclitaxel, Gemcitabin oder Carboplatin kombiniert und in klinischen Studien evaluiert (NCT05973864, NCT03742102, NCT02622074).

## 2.6 Therapie von Sarkomen

Sarkome sind eine seltene Gruppe von Tumoren, die sich aus allen mesenchymalen Geweben des Weichteil- und Skelettsystems entwickeln können. Sarkome können in mehr als 100 verschiedene Unterformen eingeteilt werden.<sup>146, 147</sup> Der Einfachheit halber wird jedoch meist nur zwischen Knochen- und Weichteilsarkomen unterschieden. Das 5-Jahres-Überleben liegt bei ca. 60-70%, wobei signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Untergruppen beobachtet werden.<sup>148-150</sup> Sind bereits Metastasen oder ein Rezidiv aufgetreten, ist die Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 20% dramatisch ungünstiger.<sup>150-152</sup>

Sarkome werden je nach Lokalisation partiell oder komplett reseziert, zusätzlich wird eine Chemo- oder Strahlentherapie durchgeführt, um die häufig vorkommenden okkulten Metastasen zu eliminieren.<sup>149</sup> Die Auswahl des geeigneten Zytostatikums variiert je nach Sarkomform. Ein nicht unerheblicher Anteil der Therapeutika wird im „*off-label use*“ (ohne Zulassung für die entsprechende Indikation) eingesetzt, da die Konzeption klinischer Studien aufgrund der Seltenheit und Diversität äußerst komplex ist.<sup>149</sup> Das erste Immuntherapeutikum, das zur Behandlung von Weichteilsarkomen eingesetzt wurde, war Coley's Toxin.<sup>67, 153</sup> Dieses wurde jedoch in den 1970er Jahren aufgrund fehlender Wirksamkeitsnachweise vom Markt genommen. Im Jahr 2014 wurde der gegen den PDGFR1-Rezeptor gerichtete mAb Olaratumomab für die Behandlung von Weichteilsarkomen zugelassen.<sup>154</sup> Die Zulassung basierte auf vielversprechenden Daten aus einer Phase-2-Studie, die sich jedoch in der Phase-3-Studie nicht bestätigten, was schließlich zur Rücknahme der Zulassung führte. Bei Sarkomen ist die Anzahl der Neoantigene meist sehr gering, so dass nur wenige tumorreaktive T-Zellen vorhanden sind.<sup>85</sup> Die ICIs Nivolumab, Pembrolizumab und Ipilimumab zeigten enttäuschende Ansprechraten von nur 16% bei Weichteilsarkomen und 5% bei Knochensarkomen.<sup>84, 155-158</sup> Dies unterstreicht die Komplexität und den hohen klinischen Bedarf der Sarkomtherapie, da bisher keine zielgerichtete Immuntherapie für Sarkome zugelassen ist.

### 3 Zielsetzung der Arbeit

Die Tumorthherapie hat in den letzten Jahrzehnten erhebliche Fortschritte erzielt, insbesondere durch die Einführung von Immuntherapien. Dennoch bleibt die Entwicklung effektiver und zielgerichteter Therapien eine Herausforderung. Die Kombination verschiedener konventioneller und immuntherapeutischer Behandlungskonzepte hat zu einer deutlichen Verbesserung der Überlebensraten bei zahlreichen Tumorerkrankungen geführt. Durch selektivere Therapien, wie beispielsweise TKIs und therapeutische Antikörper, konnten die Nebenwirkungen für die Patient\*innen reduziert werden.<sup>159</sup> Nach wie vor ist aber die Relapse-Rate bei vielen Tumoren hoch und die Heilungschancen sind für manche Patient\*innen nur gering. Daher sind optimierte Therapieprotokolle mit verbesserten Heilungschancen dringend erforderlich.

In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Kombination der BCR::ABL1 TKI mit Blinatumomab das zytotoxische Potential von T-Zellen reduzieren kann.<sup>160</sup> Im ersten Teil dieser Arbeit soll im Hinblick auf die Kombinationstherapie von BCR::ABL1 TKIs mit Rituximab bei der B-ALL untersucht werden, inwieweit TKIs die ADCC durch NK-Zellen beeinflussen.<sup>132</sup> Dementsprechend wurde ihr Einfluss auf die Aktivierbarkeit, Degranulationsfähigkeit, Zytokinsekretion und das zytotoxische Potential von NK-Zellen untersucht, um potenziell geeignete bzw. ungeeignete TKIs zu identifizieren.

Neben den NK-Zellen sind insbesondere zytotoxische T-Zellen in der Lage, hochgradig tumorlytische Effekte zu vermitteln. Daher wird im zweiten Teil Arbeit die Rekrutierung von zytotoxischen T- und NK-Zellen zur Bekämpfung von TNBC mit NKG2DxCD3 und NKG2DxCD16 BFPs evaluiert. Da die Therapie des TNBC in der Regel eine neoadjuvante Chemotherapie beinhaltet, soll zusätzlich evaluiert werden, ob periphere mononukleäre Zellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) von Patientinnen während der Chemotherapie *in vitro* eine ausreichende Zytotoxizität für eine potentielle Behandlung mit BFPs aufweisen.

Der heterogenen Gruppe der Sarkome mangelt es an wirksamen Immuntherapien. Die ausgeprägte B7-H3 Expression verschiedener Sarkome ermöglicht daher eine gezielte Immuntherapie mit Antikörpern. Daher soll in der dritten Arbeit das präklinische Potential des bsAb CC-3 (B7-H3xCD3) bei Sarkomen evaluiert werden.<sup>118, 125</sup>

Das Ziel dieser Arbeiten ist es, immuntherapeutische Behandlungskonzepte für neue Indikationsgebiete präklinisch zu charakterisieren sowie den Einfluss von TKI oder Chemotherapien auf die Effektorzellfunktion von NK- und T-Zellen zu untersuchen, um mögliche Synergien der Therapien zu identifizieren.

## 4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der drei Publikationen, auf denen diese Dissertation basiert, zusammengefasst. Die drei Forschungsartikel sind im Anhang beigelegt.<sup>161-163</sup>

### 4.1 Asciminib erhält die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität gegen leukämische Blasten

Da aus bereits publizierten Arbeiten bekannt ist, dass der Einsatz von TKIs in Kombination mit Blinatumomab die Zytotoxizität von T-Zellen hemmen kann,<sup>160</sup> wurde in dieser Arbeit der Einfluss von TKIs auf die Wirkung von Rituximab, insbesondere auf die Wirkung der Rituximab-vermittelten ADCC durch NK-Zellen, untersucht.

Dazu wurden bereits für die Behandlung der BCR::ABL1-positiven B-ALL zugelassene TKIs wie Bosutinib (Bosu), Dasatinib (DASA), Imatinib (IMA), Nilotinib (NILO) und Ponatinib (PONA), aber auch der neue Inhibitor Asciminib (ASCI), der sich derzeit im Zulassungsverfahren befindet, in IC50- und Plasma-Peak-Konzentrationen (Peak) untersucht. NK-Zellaktivierung, -degranulation, -proliferation und Tumorzelllyse wurden in verschiedenen *in vitro*-Analysen mit PBMCs gesunder Spender, in Kombination mit Rituximab, untersucht. Zudem wurden die beiden BCR::ABL1-negativen Zelllinien Nalm-6 und Nalm-16 sowie die beiden BCR::ABL1-positiven Zelllinien SD-1 und TOM-1 verwendet. Zur Beurteilung der NK-Zellaktivierung in Gegenwart von TKIs wurde die Expression von CD69 nach 24 h Kokultur durchflusszytometrisch bestimmt. Insbesondere DASA führte bei allen B-ALL-Zelllinien zu einer Reduktion der NK-Zellaktivierung bei allen Spendern. Bei keinem der anderen TKIs konnten signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden.

Um zu analysieren, ob die verschiedenen TKIs die Proliferation der NK-Zellen beeinflussen, wurde die Anzahl der NK-Zellen nach 24 h Kokultivierung der NK-Zellen mit B-ALL-Zellen in Gegenwart von Rituximab bestimmt. Da kein Unterschied in der Anzahl der NK-Zellen festgestellt werden konnte, gehen wir davon aus, dass die TKIs selbst keine toxische oder proliferationsfördernde Wirkung auf die NK-Zellen haben. Eine weitere wichtige Effektorfunktion der NK-Zellen ist die Sekretion immunstimulierender Zytokine, die mit Hilfe eines LEGENDplex-Assays nach 24 h Kokultivierung analysiert wurde. Die durchgeführten Experimente zeigten, dass NILO bei Peak-Konzentrationen die Sekretion der Zytokine IL-10 und IL-2- sowie die Produktion von TNF bei Peak-Konzentrationen hemmt. PONA zeigte eine Hemmung der sFASL-Sekretion sowohl bei IC50- als auch bei Peak-Konzentrationen. Die Zugabe von DASA bei Peak-Konzentrationen reduzierte die sFASL-Sekretion signifikant. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Kinaseinhibitoren die ABL1

und die SRC-Kinasen Familie blockieren eine hemmende Wirkung auf den sFASL-vermittelten Zelltod ausüben.

In weiteren Untersuchungen konnte nach Kokultivierung kein Einfluss der TKIs auf die über die CD107a-Expression bestimmte Degranulation der NK-Zellen festgestellt werden. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden LEGENDplex Zytokin-Arrays mit den Überständen aus den vorangegangenen Experimenten durchgeführt. In Übereinstimmung mit der ermittelten CD107a-Expression konnte keiner der TKIs die Sekretion der Effektormoleküle Granzym A und Perforin beeinflussen.

Die Lyse von B-ALL-Zellen durch NK-Zellen wurde mit Hilfe des Europium-Zytotoxizitätstest untersucht. Bei einer der vier untersuchten Zelllinien führte die Behandlung mit ASCI zu einer moderaten Hemmung der Tumorzellyse. Analog dazu wurde auch bei der Zelllinie SD-1 eine moderate Reduktion der Lyse durch IMA beobachtet. Zusätzlich wurde bei einer Zelllinie eine Reduktion der Tumorlyse bei Peak-Konzentrationen durch BOSU beobachtet. Eine Beeinträchtigung der Lyse von TOM-1 wurde durch die Behandlung mit NILO beobachtet, während die Anwendung von PONA zu einer konsistenten Blockierung der Lyse in allen untersuchten Zelllinien führte. DASA zeigte eine dosisabhängige Hemmung der Tumorlyse in drei der vier untersuchten Zelllinien, wobei die Hemmung bereits bei der IC50-Konzentration vollständig war.

Um die Langzeiteffekte der TKIs auf die Zytotoxizität zu untersuchen, wurden *Live-Cell-Imaging*-Assays mit Nalm-6 und SD-1 über einen Zeitraum von 120 Stunden durchgeführt. In Übereinstimmung mit den Kurzeitergebnissen konnte keine Hemmung der Langzeitlyse durch IMA und ASCI festgestellt werden. Bei Peak-Konzentrationen führten NILO und DASA zu einer Reduktion der Lyse von SD-1, BOSU zu einer Lysereduktion von NALM-6, während NILO die Lyse beider Zelllinien reduzierte. Darüber hinaus konnte eine Hemmung der Lyse von Nalm-6 durch DASA bei beiden Konzentrationen nachgewiesen werden.

Abschließend wurde untersucht, ob die Stimulation der NK-Zellen mit IL-15 die hemmenden Effekte der TKIs überwinden kann. Interessanterweise konnte die mit IL-15 beobachtete NK-Zellproliferation, in Gegenwart von DASA zusätzlich gesteigert werden. Ähnliche Effekte wurden mit anderen TKIs nicht beobachtet.

Zusammenfassend zeigten DASA und PONA die stärksten hemmenden Effekte auf die NK-Zellaktivierung, Degranulation und Tumorzellyse. Die anderen TKIs hatten wenig bis keine Wirkung auf die Rituximab-vermittelte ADCC. Insgesamt erweist sich Asciminib als der geeignetste Kandidat für Kombinationstherapien mit ADCC-induzierenden Antikörpern, die eine NK-Zell-vermittelte Tumorkontrolle zum Ziel haben.

## 4.2 NKG2DL als Zielantigene für die bispezifischen Fusionsproteine NKG2DxCD16 und NKG2DxCD3 bei triple-negativem Brustkrebs

Da bisher nur wenige immuntherapeutische Optionen zur Behandlung des aggressiven triple-negativen Brustkrebses (TNBC) zur Verfügung stehen, wurde im zweiten Teil der Arbeit die Wirkungsweise von bispezifischen NKG2DxCD16/CD3-Fusionsproteinen (BFPs) untersucht. Die BFPs sind, wie bereits unter 2.3.3. beschrieben, in der Lage, alle verschiedenen NKG2DL gleichermaßen zu binden und können je nach Konstrukt NK-Zellen oder T-Zellen rekrutieren und aktivieren.

Für die vorliegende Arbeit wurden die Konstrukte entsprechend produziert und aufgereinigt und ihre Wirkungsweise *in vitro* bei der Behandlung von TNBC-Zelllinien in Kombination mit PBMCs gesunder Spender untersucht. Dabei wurde die Expression der verschiedenen NKG2DL auf unterschiedlichen Tumorzelllinien untersucht und der Einfluss der BFPs auf die Rekrutierung, Aktivierung, Degranulation und Zytotoxizität der Effektorzellen analysiert. Im ersten Schritt wurde die mRNA-Expression der verschiedenen NKG2DL in acht TNBC-Zelllinien analysiert, wobei alle untersuchten Zelllinien mindestens zwei der Liganden exprimierten. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zeigten, dass MICA und ULBP2 die höchste Oberflächenexpression unter den getesteten Zelllinien aufwiesen, während ULBP4 nicht nachweisbar war. Basierend auf diesen Daten wurden BT-549 mit der niedrigsten, MDA-MB-468 mit einer mittleren und MDA-MB-231 mit einer hohen NKG2DL-Expression für die folgenden Experimente ausgewählt.

Durch die Verwendung von NKG2DxCD16 und NKG2DxCD3 konnte die Rekrutierung von NK-Zellen bzw. T-Zellen zu den TNBC-Zellen eindeutig nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigte sich, dass die BFPs die Effektorzellen in den Kokulturen aktivierten und zu einer Degranulation führten, was anhand von CD69 und CD107a nachgewiesen werden konnte. Weiterhin konnte eine signifikant erhöhte Freisetzung von IFN $\gamma$ , TNF, Granzym A, Perforin und Granulysin in den Kokulturüberständen nach Behandlung mit NKG2DxCD16 und NKG2DxCD3 festgestellt werden. Das NKG2DxCD16 Konstrukt induzierte innerhalb von 2 h eine signifikante NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität gegen Tumorzellen. Im Gegensatz dazu konnte im *Live-Cell-Imaging* über einen Zeitraum von 120 h eine stärkere und länger anhaltende Tumorkontrolle durch die von NKG2DxCD3 induzierte T-Zell-Antwort beobachtet werden.

Um zu untersuchen, ob TNBC-Patientinnen Veränderungen in den Effektorzellen aufweisen, die zu einem Verlust der Wirksamkeit von BFPs führen könnten, und ob BFPs auch mit konventioneller Chemotherapie kombiniert werden können, wurden PBMCs von gesunden Spendern und TNBC-Patientinnen unter zytotoxischer Chemotherapie verglichen. In der TNBC-Kohorte wurden normale Lymphozyten-, Leukozyten-,

Neutrophilen-, Monozyten- und Thrombozytenzahlen beobachtet. Es zeigte sich jedoch eine Abnahme der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, aber keine Veränderung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen und eine Zunahme der DCs, aber keine relevanten Unterschiede bei anderen mononukleären Zellen im Vergleich zu den gesunden Spendern. Die Behandlung mit BFPs führte zu einer signifikanten Aktivierung und Induktion von CD107a in NK-Zellen sowie CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen und zu einer signifikanten Freisetzung von IFN $\gamma$ , TNF, Granzym A, Perforin und Granulysin. Abschließend wurde die Zytotoxizität von NK-Zellen und T-Zellen von TNBC-Patienten gegen TNBC-Zelllinien mittels *Live-Cell-Imaging* über 120 h evaluiert. Es konnte eine starke tumorlytische Wirkung von NKG2DxCD3 bei TNBC-Patienten nachgewiesen werden, wohingegen NKG2DxCD16 nur bei MDA-MB-468 Zellen zu in einer signifikanten Tumorlyse führte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass NKG2DxCD16 und NKG2DxCD3 auch mit PBMCs von Patientinnen während einer aktiven Chemotherapie eine effektive Tumorlyse induzieren können. Die Fusionsproteine könnten daher eine sinnvolle Erweiterung der Therapieoptionen für TNBC-Patientinnen darstellen.

#### **4.3 Der bispezifische B7-H3xCD3 Antikörper CC-3 induziert T-Zell-Immunität gegen Knochen- und Weichteilsarkome**

Für die Behandlung von Sarkomen wurden in der Vergangenheit einige immuntherapeutische Ansätze in klinischen Studien evaluiert, jedoch konnten bisher keine signifikanten Fortschritte erzielt werden.<sup>147, 164</sup> Daher wurde in dieser Arbeit der bsAb B7-H3xCD3, auch CC-3 genannt, präklinisch für die Therapie von Knochen- und Weichteilsarkomen charakterisiert.

Die TCGA-Datenbankanalyse der B7-H3 Expression von Sarkompatienten zeigte ein signifikant verkürztes progressionsfreies Überleben bzw. Gesamtüberleben bei Patienten mit hoher B7-H3 Expression im Vergleich zu Patienten mit niedriger B7-H3 Expression. Für die weiteren Analysen wurden Zelllinien von Liposarkomen, Leiomyosarkomen, Synovialsarkomen, Rhabdomyosarkomen, Chondrosarkomen sowie Osteosarkomen ausgewählt, die ca. 44% aller diagnostizierten Sarkomsubtypen repräsentieren.<sup>165</sup>

Da Tumorzellen während einer Antikörpertherapie häufig die Expression des Zielantigens reduzieren, wurde die B7-H3 Expression nach 72-stündiger Inkubation mit CC-3 bestimmt und keine relevante Veränderung auf den Sarkomzellen festgestellt. Die zielzellrestringierte Aktivierung von T-Zellen durch CC-3, die anhand der Expression von CD69 und CD25 bestimmt wurde, konnte in Kokultur mit Sarkomzellen und PBMCs nachgewiesen werden. Die T-Zell-Aktivierung führte trotz ausgeprägter Spendervariabilität zu einem signifikanten Anstieg von sekretiertem IL-2, IL-4, IL-10 und IFN $\gamma$  sowie zu einer erhöhten Freisetzung

von sFasL, TNF, Granzym A, Granzym B, Perforin und Granulysin im Vergleich zur Kontrolle.

Die Induktion der Proliferation von T-Zellen ist essentiell für die effektive Bekämpfung hoher Tumorlasten. Nach 6-tägiger Kokultivierung von PBMCs und Sarkomzellen mit CC-3 konnte eine induzierte Proliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Neben der erhöhten Anzahl von Effektorzellen, spielt auch die Bildung von Gedächtnis-T-Zellen eine entscheidende Rolle für eine starke und langanhaltende T-Zell-Antwort. Daher wurde die Differenzierung naiver T-Zellen in Stammzell-Gedächtniszellen (SCM), zentrale Gedächtniszellen (CMC), Effektor-Gedächtniszellen (EMC) und Effektorzellen untersucht. Die Behandlung mit CC-3 führte zu einer spezifischen Proliferation und Bildung von CMC und EMC bei CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Abschließend konnte gezeigt werden, dass CC-3 die Degranulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, bestimmt durch der CD107a Expression, und die Tumorlyse in Kokultur mit allen untersuchten Sarkomsubtypen signifikant induzierte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CC-3 eine ausgeprägte T-Zell-Antwort induziert, die sowohl zur Bildung re-stimulierbarer Gedächtniszellen als auch zu einer ausgeprägten Tumor-Eradikation der untersuchten Sarkome führt. Daher wird CC-3 als zukünftig in einer klinischen Studie der KKE Translationale Immunologie zur Behandlung von Sarkomen evaluiert werden.

## 5 Diskussion

Die Immuntherapie hat in den letzten Jahrzehnten zu einer deutlichen Verbesserung der Prognose und des Überlebens vieler Patienten geführt. Die Entwicklung neuer Immuntherapien, basierend auf einem besseren Verständnis der immunologischen Grundlagen sowie klinischen Erfahrungen, hat zu einer kontinuierlichen Erweiterung der Indikationen und zur Markteinführung zahlreicher neuer Präparate geführt. Die meisten Immuntherapien befinden sich noch in der klinischen Erprobung. Durch die Kombination bereits zugelassener Therapeutika, wie z.B. spezifische BCR::ABL1-Inhibitoren, mit neuen Medikamenten ergeben sich zunehmend effektivere Kombinationsmöglichkeiten, die das Langzeitüberleben der Patienten weiter verbessern können. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzentwicklung bei einer Kombinationstherapie mit zwei oder mehr Therapeutika statistisch gesehen geringer ist als bei einer Monotherapie.<sup>166, 167</sup>

Die Therapie der CD20<sup>+</sup>-Leukämien konnte durch Rituximab oder andere Anti-CD20-Antikörper deutlich verbessert werden.<sup>168, 169</sup> Insbesondere in der Hochrisikogruppe der BCR::ABL1-positiven B-ALLs konnte durch die Kombination mit Anti-CD20-Antikörpern eine Dosisreduktion unselektiver Chemotherapien erreicht werden.<sup>170</sup> Darüber hinaus konnte eine erhöhte Ansprechrate durch die Kombination von TKIs mit therapeutischen Antikörpern wie Rituximab oder Blinatumomab beobachtet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener TKIs wie ASCI, BOSU, DASA, IMA, NILO und PONA auf die Aktivierung, Zytokinsekretion und die NK-Zell-vermittelte ADCC untersucht. DASA zeigte die stärkste Hemmung der Rituximab-vermittelten Effekte bei IC50- und Serum-Peak-Konzentrationen, während PONA nur eine leichte Hemmung der Zytotoxizität bei IC50-Konzentration zeigte. NILO und BOSU hemmten die Aktivierung und die zytotoxischen Effekte von Rituximab nur in den Peak-Konzentrationen. Imatinib und Asciminib zeigten keine oder nur sehr geringe Effekte auf die Rituximab-vermittelten Effekte. Es konnte gezeigt werden, dass TKIs *in vitro* eine ähnliche Hemmung auf die Zytotoxizität von T-Zellen haben. Dabei wurde beobachtet, dass insbesondere die Kombination von DASA oder PONA mit dem bsAb Blinatumomab die Aktivierung, die Proliferation und die zytotoxischen Effekte hemmt.<sup>160, 171</sup> Eine Reduktion der zytotoxischen Wirkung von Blinatumomab konnte dagegen bei IMA oder NILO nicht beobachtet werden. Bei der Applikation von CAR-T-Zellen zeigte sich, dass DASA sowohl die Aktivierung als auch die zytotoxischen Effekte von CD19-CAR-T bei B-ALL *in vitro* und *in vivo* hemmt.<sup>172</sup> Im Gegensatz zu den präklinischen Daten gibt es bereits klinische Studien, die den Einsatz von Blinatumomab in Kombination mit DASA und PONA untersuchten und über hervorragende Remissionsraten berichteten.<sup>173, 174</sup> Allerdings wurde in diesen Studien

DASA in der Induktionsphase und Blinatumomab in den nachfolgenden Therapiezyklen eingesetzt, so dass vermutlich kein direkter Einfluss der TKIs auf die Wirkung von Blinatumomab besteht.

In der Literatur wurde bisher kein Einfluss der ABL1 Kinase auf die Effektorfunktion humaner NK-Zellen beschrieben. In murinen NK-Zellen konnte dagegen gezeigt werden, dass die ABL1 Kinase für die Entwicklung von NK-Zellen nicht notwendig ist.<sup>175</sup> Die heterogenen Effekte der TKIs auf NK-Zellen lassen sich möglicherweise durch die spezifischen Eigenschaften der einzelnen TKIs erklären. Kinaseinhibitoren hemmen im Allgemeinen die Bindung von ATP an das aktive Zentrum, entweder durch sterische Blockade oder durch direkte Bindung an das aktive Zentrum der Kinase.<sup>2</sup> Der Inhibitor verhindert die Übertragung der terminalen Phosphatgruppe auf die Seitenkette des Tyrosins, was zu einer Unterbrechung der Signalkaskaden führt.<sup>176</sup> Das aktive Zentrum vieler Tyrosinkinase weist aufgrund der Verwendung des gleichen Substrats eine hohe strukturelle Ähnlichkeit auf. Dies führt bei vielen selektiven Kinaseinhibitoren zu einer Hemmung anderer Kinasen (*off-target*), wobei diese Wechselwirkungen in den meisten Fällen erst zu einem späteren Zeitpunkt erkannt werden.<sup>177</sup> Die TKIs IMA, NILO, DASA, BOSU und PONA weisen neben einer äußerst starken Affinität zur BCR::ABL1-Kinase auch unterschiedliche Affinitäten zu SRC, LCK, PI3K, STAT3 und zahlreichen anderen Kinasen auf.<sup>176-179</sup> PONA besitzt beispielsweise zusätzlich eine subnanomolare Affinität zur ABL1-Kinase, sowie eine nanomolare Affinität zu SRC und PDGFR $\alpha$ .<sup>180</sup> Imatinib kann dagegen nicht an SRC binden.<sup>181</sup> In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Hemmung von SRC, ERK, oder PI3K die zytotoxischen Effekte von NK-Zellen reduzieren kann.<sup>182-184</sup> Dies ist beispielsweise für den aktivierenden NKG2D- oder Fc-Rezeptor-Signalweg relevant. Der Fc $\gamma$ RIIIa (CD16) und der NKG2D-Rezeptor leiten nach der Bindung das Aktivierungssignal über ITAMs in die Zelle. Dort wird das Signal von SRC und weiteren Adaptorproteinen unter anderem über PI3K weitergeleitet und die Zytotoxizität ausgelöst.<sup>185</sup> Es ist auch bekannt, dass insbesondere DASA SRC blockiert und damit die für die Zytotoxizität wichtigen nachgeschalteten Signalproteine PI3K und ERK hemmt.<sup>186</sup>

Die Effekte auf *Off-Target*-Kinasen erklären die verminderte Zytotoxizität durch DASA und PONA sowie die deutlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Inhibitoren in unseren Experimenten. Asciminib, der erste *selective allosteric ABL myristoyl pocket* (STAMP) Inhibitor, bindet an die Myristoyltasche von ABL1 und blockiert durch Konformationsänderungen das aktive Zentrum.<sup>187</sup> Dies hat zwei Vorteile: Zum einen kann die Hemmung nicht durch eine erhöhte ATP-Konzentration aufgehoben werden, zum anderen ist Asciminib selektiver, da es nicht an die konservierten und strukturähnlichen

Bereiche um das aktive Zentrum bindet. Unspezifische Hemmungen durch Asciminib sind daher bisher nicht bekannt.<sup>187</sup>

Insgesamt zeigen unsere *in vitro* Daten einen ähnlichen Einfluss auf die NK-Zellen, wie er bereits von anderen Gruppen beschreiben wurde. Inwieweit die beobachteten Effekte auf NK-Zellen *in vivo* übertragbar sind, ist jedoch noch unklar, da auch pharmakokinetische Einflüsse der TKIs zu berücksichtigen sind. Aufgrund der komplexen Wechselwirkungen der TKIs auf immuntherapeutische Effekte muss ihr Einsatz sorgfältig abgewogen werden. Die Kombination von DASA oder PONA mit Immuntherapien, die NK-Zellen, T-Zellen oder CAR-T-Zellen als Effektorzellen benötigen, sollte vermieden werden oder zumindest zeitlich verzögert eingesetzt werden. Darüber hinaus könnten die hemmenden Eigenschaften von DASA bei überschießenden Immunreaktionen, wie dem Zytokin-Freisetzungssyndrom (*cytokine release syndrom*, CRS), einer häufigen Nebenwirkung von therapeutischen Antikörpern und CAR-T-Zellen, genutzt werden.

Die zielgerichtete Therapie von Tumorerkrankungen, z.B. mit Antikörpern, wird häufig durch das Fehlen eines guten tumorspezifischen Antigens (TSA) oder tumorassoziierten Antigens (TAA) limitiert. Ein gutes TAA ermöglicht die gezielte Rekrutierung und Aktivierung von NK- oder T-Zellen am Tumor durch Antikörper oder Fusionsproteine. Die Mitglieder der NKG2DL-Familie werden auf zahlreichen Tumoren wie Sarkomen, Leberkarzinomen und TNBC in unterschiedlicher Intensität exprimiert, jedoch nicht auf gesundem Gewebe, und eignen sich daher hervorragend als TAA.<sup>125, 126, 130, 188</sup> Aufgrund der strukturellen Unterschiede der einzelnen NKG2DLs ist eine Bindung mit einem Antikörper an alle verschiedenen Liganden nicht möglich. Die in dieser Arbeitsgruppe entwickelten Fusionsproteine enthalten die extrazelluläre Domäne des NKG2D-Rezeptors und ermöglichen so die Bindung an alle NKG2DL.<sup>124, 125, 189</sup> Ein wesentlicher Vorteil der BFPs ist, dass die Aktivierung der Effektorzellen unabhängig von der Expression des NKG2D-Rezeptors über CD3 und CD16 entsprechend erfolgt. Bei T-Zellen würde die physiologische Stimulation des NKG2D-Rezeptors zu einer verbesserten Aktivierbarkeit über den TCR führen.<sup>190</sup> Die Reaktivität der T-Zellen gegen den Tumor bliebe jedoch ohne zusätzlichen Antigenkontakt über den TCR aus. Durch die Bindung von NKG2DxCD3 an CD3 werden alle T-Zellen antigenunabhängig aktiviert.

In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass diese Fusionsproteine *in vitro* zur Bekämpfung von akuter myeloischer Leukämie und von Sarkomen eingesetzt werden können.<sup>125, 189</sup> In dieser Arbeit konnte präklinisch gezeigt werden, dass NKG2DxCD3 und NKG2DxCD16 BFPs auch bei der Behandlung von TNBC wirksam sein können.<sup>163</sup> Dies wurde durch die ausgeprägte Rekrutierung von NK- und T-Zellen durch die BFPs zum Tumor und die erhöhte Aktivierung bestimmt. Die geringere Menge an freigesetzten

Zytokinen durch NKG2DxCD16 im Vergleich zu NKG2DxCD3 deutet auf ein besseres Sicherheitsprofil im Hinblick auf das bei Immuntherapien besonders gefürchtete CRS hin, dass vor allem bei besonders vulnerablen Patienten ein Problem darstellt. Die deutlich schnellere Tumorlyse durch NKG2DxCD16, aber dafür stärkere Lyse durch NKG2DxCD3 nach längeren Inkubationszeiten, wird durch das unterschiedliche zytotoxische Potential von NK- und T-Zellen, ihre unterschiedliche Aktivierung und Zellzahl bestimmt. NK-Zellen werden direkt mit großen Mengen an vesikulär gespeichertem Perforin und Granzym ausgestattet und sind „*ready-to-kill*“, da sie keine Voraktivierung benötigen.<sup>191</sup> T-Zellen stellen nicht nur zahlenmäßig die größte Lymphozytenpopulation dar, sondern zeigen nach NKG2DxCD3-Behandlung auch eine deutlich höhere Proliferationsrate als NK-Zellen. Allerdings müssen T-Zellen erst ihre zytotoxischen Effektormoleküle synthetisieren, um Tumorzellen aktiv lysieren zu können.

Bei der Chemotherapie des TNBC werden häufig Taxane wie Paclitaxel oder Carboplatin in Kombination mit verschiedenen anderen Substanzen wie Pembrolizumab eingesetzt. Es wird vermutet, dass sowohl durch die Tumorerkrankung selbst, als auch durch die Chemotherapie mit Paclitaxel, ein erhöhter Anteil an erschöpften und geschädigten PBMCs vorliegt, wodurch weniger Effektor-Target-Kontakte stattfinden.<sup>192</sup> Außerdem sollten die Proliferationsfähigkeit der T-Zellen die verschiedenen Chemotherapeutika eingeschränkt sein. Die BFPs konnten bei PBMCs von Patientinnen unter Chemotherapie immer noch eine starke Aktivierung und Degranulation von NK- und T-Zellen induzieren, wobei hier vermutlich auch ausreichende Behandlungspausen zur Regeneration der Effektorzellen eine Rolle spielen. Erst kürzlich wurde berichtet, dass mit Taxanen vorbehandelte T-Zellen *in vivo* effektiver gegen Tumorzellen sind und die cytotoxische Degranulierung über einen TCR-unabhängigen Mechanismus auslösen.<sup>193</sup> Daraus schließen wir, dass eine Kombination von BFPs mit Chemotherapeutika wie Paclitaxel effektiv möglich ist. Insbesondere die durch die Chemotherapie induzierte verstärkte Expression von NKG2DL durch zellulären Stress könnte synergistisch mit BFPs kombiniert werden.<sup>127, 130</sup>

Obwohl NKG2DL formal gut als TAA geeignet sind, unterliegen auch sie verschiedenen Immunevasionsmechanismen. Es konnte gezeigt werden, dass NKG2DL wie MICA oder MICB u.a. durch Metalloproteasen wie ADAM10 von der Tumoroberfläche abgespalten werden können (*shedding*).<sup>63, 194-196</sup> Als lösliche Liganden können sie dennoch an den NKG2D-Rezeptor von NK- und T-Zellen binden. Dies führt zu einer verminderten Expression des NKG2D-Rezeptors und zu einer verminderten Reaktivität gegenüber malignen oder infizierten Zellen.<sup>197, 198</sup> Daher ist es therapeutisch vorteilhaft, die NKG2DL-Expression auf der Tumorzelloberfläche zu stabilisieren. Das *Shedding* von NKG2DL MICA und MICB kann unter anderem durch den Einsatz des mAb CLN-619 verhindert werden,

indem die Spaltstelle in der  $\alpha 3$ -Domäne sterisch blockiert wird.<sup>199</sup> Dies führt zu einer erhöhten Antitumorreaktion der NK-Zellen. In klinischen Studien wird der CLN-619 in Kombination mit Pembrolizumab bei soliden Tumoren untersucht (NCT05117476, NCT06381141).

Im Vergleich zu einem Antikörper hat der NKG2D-Rezeptor nur eine geringe Affinität zu seinen Liganden, was zu einer schnellen Dissoziation des BFP von den Liganden führt.<sup>200</sup> Dies führt zu einer verkürzten Retentionszeit und einer geringeren Akkumulation am Tumor. Die Rekrutierung von Effektorzellen wird somit eingeschränkt, da nur tumorgebundenes BFP eine aktivierende Wirkung entfaltet. In den durchgeführten *in vitro* Experimenten spielt dieser Aspekt jedoch aufgrund der hohen Konzentration an BFPs nur eine untergeordnete Rolle. Für *in vivo* Experimente ist dies jedoch ein wesentlicher Parameter, der die Pharmakokinetik und die Verteilung des Fusionsproteins beeinflusst. Ähnlich wie bei Blinatumomab verkürzt die fehlende Fc-Region die Serum-Halbwertszeit der BFPs. Dieses Problem könnte durch eine Änderung des Formats gelöst werden. Die CD3-Bindung würde in der Fab-Domäne verbleiben und die bisherige C<sub>H</sub>1-Domäne könnte um die aus C<sub>H</sub>2 und C<sub>H</sub>3 bestehende IgG1-Fc-Domäne ergänzt werden. Der NKG2D-Rezeptor bleibt C-terminal an die schwere Kette gebunden. Um die Rezeptoraffinität zu erhöhen, gibt es zwei Möglichkeiten: Eine Optimierung der Aminosäuren in den Interaktionsbereichen von NKG2D/NKG2DL sowie eine Destabilisierung der Konformation des ungebundenen Rezeptors sind vielversprechende Ansätze zur Erhöhung der Rezeptoraffinität.<sup>200-202</sup> Im Detail werden bei der letztgenannten Methode Aminosäuren gezielt ausgetauscht, um die Enthalpie der ungebundenen Konformation zu erhöhen und damit den gebundenen Zustand thermodynamisch stabiler zu machen. Dadurch konnte die Affinität des TCR-HLA-A2 Komplexes um das bis zu 1000-fache gesteigert werden.<sup>203, 204</sup> Wird der NKG2D-Rezeptor in CAR-Konstrukten verwendet, ist die höhere Affinität nicht notwendig.<sup>205-207</sup> Die NKG2D-CAR-T- oder CAR-NK-Zellen werden direkt durch die Bindung an die NKG2DL-Liganden aktiviert, ohne dass eine anhaltende Bindung erforderlich ist. In den ersten Studien konnte eine positive klinische Ansprechrate der NKG2D-Konstrukte beobachtet werden, wobei die Nebenwirkungen als beherrschbar eingestuft wurden.<sup>208, 209</sup> Die onkologische Relevanz der NKG2D-Konstrukte wird durch derzeit 40 klinische Studien unterstrichen (clinicaltrials.gov, Stand: 07/2024).

Die größte Herausforderung für den effektiven Einsatz therapeutischer Antikörper bei soliden Tumoren ist neben der klinischen Sicherheit das TME.<sup>210, 211</sup> Das TME setzt sich aus einer Vielzahl von Komponenten zusammen, darunter verschiedene Immunzellen, Stromazellen, extrazelluläre Matrix, Zytokine, Wachstumsfaktoren und Tumervaskulatur.<sup>66</sup>

Es konnte gezeigt werden, dass das TME ein ausgeprägtes immunsuppressives und tumorstimulierendes Milieu erzeugen kann. Der erhöhte Anteil an immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen, myeloiden Suppressorzellen sowie die Expression von PD-L1 und die Sekretion von IL-10 oder TGF- $\beta$  durch die Tumorzellen selbst reduzieren die zytotoxischen Funktionen von NK- und T-Zellen.<sup>212, 213</sup> Um den erhöhten Nährstoff- und Sauerstoffverbrauch zu kompensieren, bilden Tumoren zudem kontinuierlich neue Blutgefäße. Die chronische Vaskularisierung durch VEGF führt zu einer veränderten Struktur der Gefäßwände, wodurch die Extravasation von Lymphozyten oder CAR-T-/NK-Zellen behindert wird.<sup>214</sup> Solide Tumoren stellen aufgrund dieser eingeschränkten Zugänglichkeit für Immunzellen eine therapeutische Herausforderung dar, die mittlerweile mit verschiedenen Ansätzen klinisch adressiert wird. Eine Option ist das therapeutische Targeting von Tumorgefäßen, um einerseits die Versorgung des Tumors zu behindern und andererseits die Infiltration von Immunzellen zu erleichtern. Eine potenzielle Zielstruktur um dies klinisch zu adressieren, ist das Tumorantigen B7-H3.

B7-H3 wird sehr stark auf der Neovaskulatur von Tumoren, auf dem Tumorstroma und auf dem Tumor selbst exprimiert.<sup>215, 216</sup> Darüber hinaus wird B7-H3 in geringem Maße auf der Leber exprimiert, was bedeutet, dass *on-target off-tumor* Reaktionen klinisch gut überwacht werden müssen.<sup>217</sup> Wir gehen davon aus, dass unser bsAb B7-H3xCD3 (CC-3) in der Lage ist, eine Schädigung der Neovaskulatur zu induzieren, wodurch die Nährstoffversorgung reduziert wird und die Extravasation von T-Zellen verbessert wird, was zu einer verstärkten Tumorlyse führt. Die breite Expression auf verschiedenen soliden Tumoren, einschließlich Mammakarzinom, Kolonkarzinom, nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom und Sarkomen, qualifiziert B7-H3 als exzellentes TAA.<sup>116-118, 121</sup> Trotz der Heterogenität der verschiedenen Subtypen von Knochen- und Weichteilsarkomen, exprimieren alle Sarkome B7-H3 in ausreichender Menge, so dass B7-H3 als Zielstruktur für alle Sarkome verwendet werden kann.<sup>118</sup> Eine hohe B7-H3-Expression bei Sarkompatienten ist mit einem verkürzten progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben assoziiert, was eine gezielte B7-H3-Therapie noch interessanter macht.<sup>116, 117, 121</sup> Die präklinische Charakterisierung zeigte eine starke Bindung von CC-3 an alle Sarkomsubtypen und eine stabile Antigenexpression auch nach längerer Exposition mit hohen Antikörperkonzentrationen. B7-H3 ist daher ein sehr geeignetes stabiles Zielantigen, da es nicht zu einer Immunevasion durch Reduktion der Antigenexpression kommt, wie sie häufig bei der Therapie mit CD20-Antikörpern beobachtet wird.<sup>59, 166</sup> Die Behandlung mit CC-3 führt zu einer zielzellrestringierten Aktivierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen und zur Sekretion von Zytokinen und Effektorproteinen, was zu einer signifikanten Tumorlyse und einer ausgeprägten T-Zell-Proliferation, insbesondere von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, führt. Dies ist essentiell, um eine hohe

Tumorlast effektiv zu bekämpfen. Insbesondere konnte eine starke Expansion von zentralen Gedächtniszellen und Effektor-Gedächtniszellen nachgewiesen werden. Die gebildeten Gedächtniszellen sind in der Lage, bei erneuter Stimulation mit CC-3 schnell zu proliferieren und zytotoxische Effektorzellen zu bilden, was für eine effektive Tumorbekämpfung von Vorteil ist.<sup>36, 82</sup>

Derzeit wird unser bsAb CC-3 in einer Phase I „*first in human*“ Studie am Kolonkarzinom evaluiert (NCT05999396). Aufgrund vielversprechender präklinischer Daten ist geplant, die laufende Studie auf Sarkome und TNBC auszuweiten. Neben CC-3 werden auch andere B7-H3xCD3 bsAb wie der MGD009 der Firma MacroGenics für den Einsatz bei fortgeschrittenen soliden Tumoren evaluiert (NCT05585034). Im Vergleich zu unserem IgG-Format handelt es sich bei MGD009 um ein „*dual affinity re-targeting*“ (DART)-Format, das aus vier variablen Einzelstrangdomänen besteht. Es wurde beobachtet, dass bsAb, die aus mehreren Einzelsträngen bestehen, eine hohe Tendenz zur Aggregatbildung aufweisen und eine unspezifische T-Zell-Aktivierung auslösen können.<sup>218</sup> Dies erklärt warum die klinische Studie mit MGD009 aufgrund temporär erhöhter Leberwerte kurzzeitig unterbrochen wurde. Inzwischen ist die klinische Studie abgeschlossen, allerdings hat MacroGenics noch keine Ergebnisse veröffentlicht, so dass keine genaueren Informationen vorliegen. Auch die klinische Studie mit MGD009 und einem anti-PD-1 mAb wurde aus betrieblichen Gründen eingestellt, ohne dass Daten publiziert wurden (NCT03406949). In präklinischen Studien zeigten verschiedene anti-B7-H3 bsAbs als T-Zell-aktivierende Antikörperperformatore vielversprechende Ergebnisse.<sup>219, 220</sup> Darüber hinaus wurden kostimulatorische Varianten entwickelt, die mittels B7-H3 im Tumor und im TME angereichert werden und dort mit dem gegen 4-1BB oder CD28 gerichteten Paratop lokal die Expansion von tumorspezifischen T-Zellen stimulieren.<sup>221, 222</sup> Ergänzend wurde durch B7-H3 eine zielgerichtete Checkpointblockade lokal am Tumor vermittelt, indem das zweite Paratop an PD-L1 bindet und die Interaktion mit PD-1 auf T-Zellen unterbietet.<sup>223</sup> Keiner dieser bsAbs wird bisher in klinischen Studien evaluiert.

In klinischen Phase I/II Studien wurden bereits mehrere B7-H3 mAb bei verschiedenen fortgeschrittenen Tumoren evaluiert. Dabei erreichten verschiedene ADCC induzierende mAb bei etwas mehr als 40% der Patienten eine partielle Remission, wobei die Nebenwirkungen kontrollierbar blieben (NCT01391143, NCT03729596). Ebenfalls lieferte das gegen B7-H3 gerichteten Antikörper-Drug-Konjugat Duocarmycin (MGC018) in einer klinischen Studie bei verschiedenen soliden Tumoren positive Ergebnisse mit partieller Remission bei mehr als 50% der Patienten bei tolerierbaren Nebenwirkungen (NCT03729596).<sup>224</sup> Dies hebt B7-H3 als ausgezeichnetes TAA hervor. Allerdings handelt es sich bei den untersuchten Antikörpern um mAbs die keine T-Zell-Antworten induzieren,

daher ist das Sicherheitsprofil wenig bis gar nicht mit dem von bsAbs wie CC-3 oder MGD009 vergleichbar und muss in zukünftigen Studien sorgfältig geprüft werden.

B7-H3 wird derzeit auch in verschiedenen CAR-T-Therapiekonzepten als Zielantigen verwendet, wobei zwei klinische Studien auch Sarkompatienten einschließen (NCT04483778, NCT04897321)<sup>225</sup>. Die Studien zeigten ein gut kontrollierbares CRS, allerdings wurde ein transienter Anstieg der Leberwerte beobachtet. Die verwendeten CAR-T-Zellen erwiesen sich als hochwirksam, zeigten aber eine ähnliche Hemmung durch das TME wie physiologische T-Zellen. Die aufwändige, individuelle Herstellung der CAR-T-Zellen führt im Vergleich zur Antikörpertherapie zu hohen Therapiekosten. Um die steigende Zahl von Tumorthérapien auch in Zukunft für die Gesellschaft finanzierbar zu halten, sind kostengünstigere Therapien von entscheidender Bedeutung. Zudem ist zu berücksichtigen, dass die Generierung autologer CAR-T-Zellen nach der Diagnosestellung mehrere Wochen in Anspruch nimmt, so dass unter Umständen eine Chemotherapie zur Überbrückung notwendig ist. Antikörpertherapien können dagegen unmittelbar nach Diagnosestellung eingesetzt werden. Ein Nachteil der CD3-Stimulation mit bsAbs ist jedoch die fehlende Kostimulation der T-Zellen, was zu erschöpften und dysfunktionalen T-Zellen führt.<sup>226</sup>

Die Prävention der T-Zell-Erschöpfung kann durch kostimulatorische Signale wie CD28 erreicht werden.<sup>28</sup> CAR-T-Zellen begegnen diesem Problem durch kostimulatorische Signaldomänen im CAR-Rezeptor, die zu einer langanhaltenden Zytotoxizität der CAR-T-Zellen führen. Ein kostimulatorisches Signal kann z.B. auch durch CD28-Antikörper erreicht werden, wodurch die Proliferation und Zytotoxizität verstärkt werden kann.<sup>227</sup> Nachdem der erste CD28 mAb TGN1412 als Superagonist eine unkontrollierte T-Zell-Aktivierung mit einer massiver Ausschüttung von Zytokinen wie IL-2 auslöste, und zu einem lebensbedrohlichen CRS führte, wurde die CD28-Kostimulation in klinischen Studien vorerst eingestellt.<sup>228</sup> Mit dem verbessertem Verständnis von CD28 und erhöhten Sicherheitsstandards in der präklinischen und klinischen Evaluation wurden CD28 bsAb in den letzten Jahren erneut klinisch evaluiert. Die Verwendung von TAAxCD28-Formaten bei bsAb ermöglicht eine kontrollierte und zielzellrestringierte Kostimulation am Tumor. Derzeit werden verschiedene TAA, darunter B7-H3, EGFR, und PSMA mit CD28 in klinischen Studien evaluiert (NCT06085664, NCT05585034, NCT04626635). Vorläufige Ergebnisse deuten darauf hin, dass der EGFRxCD28 in Kombination mit dem PD-1 Antikörper eine gute Verträglichkeit und verbesserte Ansprechraten beim Kolonkarzinom aufweist.<sup>229</sup>

Vergleicht man die drei in dieser Arbeit diskutierten Therapiestrategien, so zeigen sich die wesentlichen Unterschiede vor allem in ihrer Eignung für spezifische Tumorarten. Bei

hämatologischen Erkrankungen zeigen Immuntherapien generell eine hohe Effizienz, während solide Tumoren damit deutlich schlechter zu behandeln sind. Die Infiltration hämatologischer Tumoren mit Effektorzellen ist wesentlich einfacher, als bei TNBC oder Sarkomen. Ein wesentliches Risiko bei der Anwendung von antikörperbasierten Immuntherapien ist die mögliche Reduktion oder sogar der vollständige Verlust der TAA-Expression. Dieses Phänomen wird als Immunoediting bezeichnet: Immuntherapien üben einen kontinuierlichen Selektionsdruck auf den Tumor aus, wodurch sich sein Antigenprofil im Verlauf der Behandlung verändert. Dadurch reichern sich Tumorzellen mit resistenzfördernden Mutationen an, die dem therapeutischen Druck standhalten können. Dies führt dazu, dass die verbleibenden Tumorzellen nicht mehr effektiv erkannt und eliminiert werden können.<sup>230, 231</sup> Daher ist die simultane Kombination von ADCC-induzierenden mAb wie Rituximab mit TKIs wie ASCI oder IMA bei der ALL, sowie NKG2DxCD3/CD16 BFPs mit Paclitaxel beim TNBC ein vielversprechender Therapieansatz gegenüber der Monotherapie von Sarkomen mit CC-3. Eine einzelne Mutation oder veränderte TAA-Expression reicht in der Kombinationstherapie nicht mehr aus, um den erhöhten Selektionsdruck zu umgehen.<sup>187</sup>

Die Kombination von BFPs mit Paclitaxel unterscheidet sich konzeptionell von den beiden anderen Therapieansätzen. Paclitaxel induziert die Apoptose des Tumors und erhöht die Expression der NKG2DL-Familie. Dadurch sinkt die Wahrscheinlichkeit einer Immunevasion durch eine verminderte NKG2D-Liganden-Expression. Darüber hinaus stimulieren die BFPs neben den NK-Zellen auch die T-Zellen als Effektorzellen, wodurch eine stärkere zytotoxische Wirkung erzielt wird, als dies mit mAbs allein möglich wäre. Die geringe Affinität und die zu erwartende kurze Serumhalbwertszeit der BFPs erschweren jedoch die klinische Anwendung, so dass weitere Optimierungen der Konstrukte notwendig sind, um sie therapeutisch einsetzen zu können.

Der bsAb CC-3 wurde in dieser Arbeit als Monotherapie gegen Sarkome evaluiert. Anstelle von Kombinationstherapeutika bietet dieser Therapieansatz die Möglichkeit, neben dem Tumor auch die den Tumor umgebende Neovaskulatur zu schädigen.<sup>216</sup> Durch den entstehenden Nährstoffmangel wird das Tumorwachstum eingeschränkt und die geschädigte Gefäßwand soll die Infiltration des Tumors mit proinflammatorischen Immunzellen erhöhen. Dies stellt insbesondere bei schwer infiltrierbaren soliden Tumoren wie den Sarkomen einen vielversprechenden immuntherapeutischen Ansatz dar. Darüber hinaus ist CC-3 mit seiner ausgeprägten Zytotoxizität von T-Zell-Zytotoxizität vermutlich potenter, als die durch Rituximab oder NKG2DxCD16 FP induzierte ADCC von NK-Zellen. Im Vergleich zu NKG2DxCD3 FP besitzt CC-3, neben einer höheren Affinität zum TAA, einen weniger affinen Anti-CD3-Klon. Dies führt zu einer vermehrten Bildung der

bevorzugten EMC und CMC T-Zellen, da diese re-stimulierbar sind und stark proliferieren können.<sup>107</sup>

Zusammenfassend lässt sich aus den drei durchgeführten Arbeiten sagen, dass der Einsatz von Asciminib und Rituximab in der ALL-Therapie klinisch noch abschließend evaluiert werden muss, aber eine sinnvolle Ergänzung für die Therapie der BCR::ABL1-positiven ALL zu sein scheint. Die NKG2D BFP bedürfen weiterer Optimierung, bevor sie in *in vivo* Modellen getestet werden können, stellen aber eine interessante und auch breit anwendbare Option für viele Tumorarten dar. Die präklinischen Daten des bsAb CC-3 gegen Sarkome sind dagegen sehr vielversprechend, und aufgrund der bereits vorhandenen Expertise werden weitere Optionen derzeit in eigenen klinischen Studien evaluiert.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Schmiedel BJ. Expression, Funktion und therapeutische Modulation von RANKL in der Immunüberwachung von malignen hämatopoetischen Neoplasien durch Natürliche Killerzellen. Dissertation Universität Tübingen 2011.
2. Vollmar Z, Dingermann. Immunologie - Grundlagen und Wirkstoffe. 2. Auflage ed: WVG - Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 2013.
3. Murphy K. Janeway's Immunobiology. 8 ed; 2012.
4. Mantovani A, Garlanda C. Humoral Innate Immunity and Acute-Phase Proteins. *N Engl J Med* 2023; 388:439-52.
5. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 2010; 327:656-61.
6. Amarante-Mendes GP, Adjemian S, Branco LM, Zanetti LC, Weinlich R, Bortoluci KR. Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. *Front Immunol* 2018; 9:2379.
7. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007; 81:1-5.
8. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; 22:633-40.
9. Zingoni A, Molfetta R, Fionda C, Soriani A, Paolini R, Cippitelli M, et al. NKG2D and Its Ligands: "One for All, All for One". *Frontiers in Immunology* 2018; 9.
10. Molfetta R, Quatrini L, Santoni A, Paolini R. Regulation of NKG2D-Dependent NK Cell Functions: The Yin and the Yang of Receptor Endocytosis. *Int J Mol Sci* 2017; 18.
11. Shifrin N, Raulet DH, Ardolino M. NK cell self tolerance, responsiveness and missing self recognition. *Semin Immunol* 2014; 26:138-44.
12. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008; 9:495-502.
13. Basilio-Queiros D, Mischak-Weissinger E. Natural killer cells- from innate cells to the discovery of adaptability. *Front Immunol* 2023; 14:1172437.
14. Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci* 2002; 27:19-26.
15. Smyth MJ, Cretney E, Takeda K, Wiltrot RH, Sedger LM, Kayagaki N, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J Exp Med* 2001; 193:661-70.
16. Wang W, Erbe AK, Hank JA, Morris ZS, Sondel PM. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 2015; 6:368.
17. Kroemer G, Martinez C. Mechanisms of self tolerance. *Immunol Today* 1992; 13:401-4.
18. Suan D, Sundling C, Brink R. Plasma cell and memory B cell differentiation from the germinal center. *Curr Opin Immunol* 2017; 45:97-102.
19. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125:S33-40.
20. Zuniga-Pflucker JC. T-cell development made simple. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:67-72.
21. Alcover A, Alarcon B, Di Bartolo V. Cell Biology of T Cell Receptor Expression and Regulation. *Annu Rev Immunol* 2018; 36:103-25.
22. Dong D, Zheng L, Lin J, Zhang B, Zhu Y, Li N, et al. Structural basis of assembly of the human T cell receptor-CD3 complex. *Nature* 2019; 573:546-52.
23. Ellmeier W, Haust L, Tschismarov R. Transcriptional control of CD4 and CD8 coreceptor expression during T cell development. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70:4537-53.

24. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* 2015; 74:5-17.
25. Sun L, Su Y, Jiao A, Wang X, Zhang B. T cells in health and disease. *Signal Transduct Target Ther* 2023; 8:235.
26. Barber DL, Wherry EJ, Ahmed R. Cutting edge: rapid in vivo killing by memory CD8 T cells. *J Immunol* 2003; 171:27-31.
27. Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990; 248:1349-56.
28. Lenschow DJ, Sperling AI, Cooke MP, Freeman G, Rhee L, Decker DC, et al. Differential up-regulation of the B7-1 and B7-2 costimulatory molecules after Ig receptor engagement by antigen. *J Immunol* 1994; 153:1990-7.
29. Lindstein T, June CH, Ledbetter JA, Stella G, Thompson CB. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science* 1989; 244:339-43.
30. Watts TH. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:23-68.
31. Sonar SA, Shaikh S, Joshi N, Atre AN, Lal G. IFN-gamma promotes transendothelial migration of CD4(+) T cells across the blood-brain barrier. *Immunol Cell Biol* 2017; 95:843-53.
32. Codarri Deak L, Nicolini V, Hashimoto M, Karagianni M, Schwalie PC, Lauener L, et al. PD-1-cis IL-2R agonism yields better effectors from stem-like CD8(+) T cells. *Nature* 2022; 610:161-72.
33. Hashimoto M, Araki K, Cardenas MA, Li P, Jadhav RR, Kissick HT, et al. PD-1 combination therapy with IL-2 modifies CD8(+) T cell exhaustion program. *Nature* 2022; 610:173-81.
34. Mori T, Kumagai K, Nasu K, Yoshizawa T, Kuwano K, Hamada Y, et al. Clonal Expansion of Tumor-Infiltrating T Cells and Analysis of the Tumor Microenvironment within Esophageal Squamous Cell Carcinoma Relapsed after Definitive Chemoradiation Therapy. *Int J Mol Sci* 2021; 22.
35. Campbell JJ, Murphy KE, Kunkel EJ, Brightling CE, Soler D, Shen Z, et al. CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J Immunol* 2001; 166:877-84.
36. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999; 401:708-12.
37. Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood* 2003; 101:4260-6.
38. Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 2005; 25:9543-53.
39. Liu R, Li HF, Li S. PD-1-mediated inhibition of T cell activation: Mechanisms and strategies for cancer combination immunotherapy. *Cell Insight* 2024; 3:100146.
40. Abiko K, Matsumura N, Hamanishi J, Horikawa N, Murakami R, Yamaguchi K, et al. IFN-gamma from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. *Br J Cancer* 2015; 112:1501-9.
41. Bradley J. Immunoglobulins. *J Med Genet* 1974; 11:80-90.
42. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol* 2010; 11:785-97.
43. Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat. Biotechnol* 2005; 23:1147-57.
44. Schroeder HW, Jr., Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125:S41-52.

45. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc gamma receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology* 2008; 8:34-47.
46. Dairon M. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:203-34.
47. Gul N, van Egmond M. Antibody-Dependent Phagocytosis of Tumor Cells by Macrophages: A Potent Effector Mechanism of Monoclonal Antibody Therapy of Cancer. *Cancer Res* 2015; 75:5008-13.
48. Capuano C, Pighi C, Battella S, De Federicis D, Galandrini R, Palmieri G. Harnessing CD16-Mediated NK Cell Functions to Enhance Therapeutic Efficacy of Tumor-Targeting mAbs. *Cancers (Basel)* 2021; 13.
49. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:715-25.
50. Ober RJ, Martinez C, Vaccaro C, Zhou J, Ward ES. Visualizing the site and dynamics of IgG salvage by the MHC class I-related receptor, FcRn. *J Immunol* 2004; 172:2021-9.
51. Ehrlich P. Über den jetzigen Stand der karzinomforschung. 1909.
52. Thomas L, Lawrence He. Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. *Hoeber-Harper* 1959:529-32.
53. Burnet M. Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br Med J* 1957; 1:841-7.
54. Stutman O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* 1974; 183:534-6.
55. Ochsenbein AF, Klenerman P, Karrer U, Ludwig B, Pericin M, Hengartner H, et al. Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:2233-8.
56. Mantovani A, Ming WJ, Balotta C, Abdeljalil B, Bottazzi B. Origin and regulation of tumor-associated macrophages: the role of tumor-derived chemotactic factor. *Biochim Biophys Acta* 1986; 865:59-67.
57. Pisa P, Halapi E, Pisa EK, Gerdin E, Hising C, Bucht A, et al. Selective expression of interleukin 10, interferon gamma, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in ovarian cancer biopsies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:7708-12.
58. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat. Rev. Immunol* 2006; 6:836-48.
59. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21:137-48.
60. Lopez-Soto A, Gonzalez S, Smyth MJ, Galluzzi L. Control of Metastasis by NK Cells. *Cancer Cell* 2017; 32:135-54.
61. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011; 331:1565-70.
62. Angell TE, Lechner MG, Jang JK, LoPresti JS, Epstein AL. MHC class I loss is a frequent mechanism of immune escape in papillary thyroid cancer that is reversed by interferon and selumetinib treatment in vitro. *Clin Cancer Res* 2014; 20:6034-44.
63. Zingoni A, Vulpis E, Loconte L, Santoni A. NKG2D Ligand Shedding in Response to Stress: Role of ADAM10. *Front Immunol* 2020; 11:447.
64. Rao PH, Houldsworth J, Dyomina K, Parsa NZ, Cigudosa JC, Louie DC, et al. Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998; 92:234-40.
65. McSheehy PMJ, Forster-Gross N, El Shemerly M, Bachmann F, Roceri M, Hermann N, et al. The fibroblast growth factor receptor inhibitor, derazantinib, has strong efficacy in human gastric tumor models and synergizes with paclitaxel in vivo. *Anticancer Drugs* 2023; 34:532-43.

66. Arima Y, Matsueda S, Saya H. Significance of Cancer-Associated Fibroblasts in the Interactions of Cancer Cells with the Tumor Microenvironment of Heterogeneous Tumor Tissue. *Cancers (Basel)* 2023; 15.
67. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res* 1991;3-11.
68. Nauts HC, Fowler GA, Bogatko FH. A review of the influence of bacterial infection and of bacterial products (Coley's toxins) on malignant tumors in man; a critical analysis of 30 inoperable cases treated by Coley's mixed toxins, in which diagnosis was confirmed by microscopic examination selected for special study. *Acta Med Scand Suppl* 1953; 276:1-103.
69. Perkins DW, Steiner I, Haider S, Robertson D, Buus R, O'Leary L, et al. Therapy-induced normal tissue damage promotes breast cancer metastasis. *iScience* 2024; 27:108503.
70. Wei J, Wang B, Wang H, Meng L, Zhao Q, Li X, et al. Radiation-Induced Normal Tissue Damage: Oxidative Stress and Epigenetic Mechanisms. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 2019:3010342.
71. Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, Finn OJ, Hastings BM, Hecht TT, et al. The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res* 2009; 15:5323-37.
72. Sensi M, Anichini A. Unique tumor antigens: evidence for immune control of genome integrity and immunogenic targets for T cell-mediated patient-specific immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2006; 12:5023-32.
73. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:515-48.
74. Bauer J, Kohler N, Maringer Y, Bucher P, Bilich T, Zwick M, et al. The oncogenic fusion protein DNAJB1-PRKACA can be specifically targeted by peptide-based immunotherapy in fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Nat Commun* 2022; 13:6401.
75. Nelde A, Maringer Y, Bilich T, Salih HR, Roerden M, Heitmann JS, et al. Immunopeptidomics-Guided Warehouse Design for Peptide-Based Immunotherapy in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Front Immunol* 2021; 12:705974.
76. Carvalho T. Personalized anti-cancer vaccine combining mRNA and immunotherapy tested in melanoma trial. *Nat Med* 2023; 29:2379-80.
77. Fukuhara H, Ino Y, Todo T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci* 2016; 107:1373-9.
78. Andtbacka RH, Kaufman HL, Collichio F, Amatruda T, Senzer N, Chesney J, et al. Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol* 2015; 33:2780-8.
79. Ten Ham RMT, Rohaan MW, Jedema I, Kessels R, Stegeman W, Scheepmaker W, et al. Cost-effectiveness of treating advanced melanoma with tumor-infiltrating lymphocytes based on an international randomized phase 3 clinical trial. *J Immunother Cancer* 2024; 12.
80. Stadtmauer EA, Fraietta JA, Davis MM, Cohen AD, Weber KL, Lancaster E, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science* 2020; 367.
81. Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J* 2021; 11:69.
82. Golubovskaya V, Wu L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel)* 2016; 8.
83. Mullard A. FDA approves first CAR T therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2017; 16:669.
84. D'Angelo SP, Mahoney MR, Van Tine BA, Atkins J, Milhem MM, Jahagirdar BN, et al. Nivolumab with or without ipilimumab treatment for metastatic sarcoma

- (Alliance A091401): two open-label, non-comparative, randomised, phase 2 trials. *Lancet Oncol* 2018; 19:416-26.
85. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 2015; 348:124-8.
  86. Drake CG, Lipson EJ, Brahmer JR. Breathing new life into immunotherapy: review of melanoma, lung and kidney cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2014; 11:24-37.
  87. Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol Today* 1994; 15:450-4.
  88. Tam CS, O'Brien S, Wierda W, Kantarjian H, Wen S, Do KA, et al. Long-term results of the fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab regimen as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; 112:975-80.
  89. Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, Washel WS, Bhuiya NS, Cutler CS, et al. Recovery of B-cell homeostasis after rituximab in chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2011; 117:2275-83.
  90. Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood* 1998; 91:1644-52.
  91. Weiner GJ. Rituximab: mechanism of action. *Semin Hematol* 2010; 47:115-23.
  92. Golay J, Da Roit F, Bologna L, Ferrara C, Leusen JH, Rambaldi A, et al. Glycoengineered CD20 antibody obinutuzumab activates neutrophils and mediates phagocytosis through CD16B more efficiently than rituximab. *Blood* 2013; 122:3482-91.
  93. Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, et al. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:4005-10.
  94. Liu R, Oldham RJ, Teal E, Beers SA, Cragg MS. Fc-Engineering for Modulated Effector Functions-Improving Antibodies for Cancer Treatment. *Antibodies (Basel)* 2020; 9.
  95. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* 2007; 26:6469-87.
  96. Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61:4744-9.
  97. Melincovici CS, Bosca AB, Susman S, Marginean M, Mihu C, Istrate M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol* 2018; 59:455-67.
  98. Sikov WM, Berry DA, Perou CM, Singh B, Cirrincione CT, Tolaney SM, et al. Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603 (Alliance). *J Clin Oncol* 2015; 33:13-21.
  99. Goulet DR, Atkins WM. Considerations for the Design of Antibody-Based Therapeutics. *J Pharm Sci* 2020; 109:74-103.
  100. Staerz UD, Kanagawa O, Bevan MJ. Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells. *Nature* 1985; 314:628-31.
  101. Lindhofer H, Mocikat R, Steipe B, Thierfelder S. Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step purification of bispecific antibodies. *J Immunol* 1995; 155:219-25.
  102. Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, Margolies MN, et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:5879-83.

103. Nagorsen D, Kufer P, Baeuerle PA, Bargou R. Blinatumomab: a historical perspective. *Pharmacol Ther* 2012; 136:334-42.
104. Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, Schlom J. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res* 1992; 52:3402-8.
105. Kantarjian HM, Logan AC, Zaman F, Gokbuget N, Bargou RC, Zeng Y, et al. Survival outcomes in patients with relapsed/refractory or MRD-positive B-cell acute lymphoblastic leukemia treated with blinatumomab. *Ther Adv Hematol* 2023; 14:20406207231201454.
106. Jin S, Sun Y, Liang X, Gu X, Ning J, Xu Y, et al. Emerging new therapeutic antibody derivatives for cancer treatment. *Signal Transduct Target Ther* 2022; 7:39.
107. Zekri L, Lutz M, Prakash N, Manz T, Klimovich B, Mueller S, et al. An optimized IgG-based B7-H3xCD3 bispecific antibody for treatment of gastrointestinal cancers. *Mol Ther* 2023; 31:1033-45.
108. Lutz M. Bispezifische Antikörper zur Behandlung solider Tumore und der Einfluss von Thrombozyten auf ihre Wirksamkeit. Dissertation Eberhard Karls University Tübingen 2023.
109. Steinberger P, Majdic O, Derdak SV, Pfistershammer K, Kirchberger S, Klauser C, et al. Molecular characterization of human 4Ig-B7-H3, a member of the B7 family with four Ig-like domains. *J Immunol* 2004; 172:2352-9.
110. Bolandi N, Derakhshani A, Hemmat N, Baghbanzadeh A, Asadzadeh Z, Afrashteh Nour M, et al. The Positive and Negative Immunoregulatory Role of B7 Family: Promising Novel Targets in Gastric Cancer Treatment. *Int J Mol Sci* 2021; 22.
111. Xu H, Cheung IY, Guo HF, Cheung NK. MicroRNA miR-29 modulates expression of immunoinhibitory molecule B7-H3: potential implications for immune based therapy of human solid tumors. *Cancer Res* 2009; 69:6275-81.
112. Vigdorovich V, Ramagopal UA, Lazar-Molnar E, Sylvestre E, Lee JS, Hofmeyer KA, et al. Structure and T cell inhibition properties of B7 family member, B7-H3. *Structure* 2013; 21:707-17.
113. Prasad DV, Nguyen T, Li Z, Yang Y, Duong J, Wang Y, et al. Murine B7-H3 is a negative regulator of T cells. *J Immunol* 2004; 173:2500-6.
114. Chen H, Duan X, Deng X, Huang Y, Zhou X, Zhang S, et al. EBV-Upregulated B7-H3 Inhibits NK cell-Mediated Antitumor Function and Contributes to Nasopharyngeal Carcinoma Progression. *Cancer Immunol Res* 2023; 11:830-46.
115. Ingebrigtsen VA, Boye K, Tekle C, Nesland JM, Flatmark K, Fodstad O. B7-H3 expression in colorectal cancer: nuclear localization strongly predicts poor outcome in colon cancer. *Int J Cancer* 2012; 131:2528-36.
116. Bin Z, Guangbo Z, Yan G, Huan Z, Desheng L, Xueguang Z. Overexpression of B7-H3 in CD133+ colorectal cancer cells is associated with cancer progression and survival in human patients. *J Surg Res* 2014; 188:396-403.
117. Zhang X, Fang C, Zhang G, Jiang F, Wang L, Hou J. Prognostic value of B7-H3 expression in patients with solid tumors: a meta-analysis. *Oncotarget* 2017; 8:93156-67.
118. Hagelstein I, Engel M, Hinterleitner C, Manz T, Marklin M, Jung G, et al. B7-H3-targeting Fc-optimized antibody for induction of NK cell reactivity against sarcoma. *Front Immunol* 2022; 13:1002898.
119. Li Y, Yang X, Wu Y, Zhao K, Ye Z, Zhu J, et al. B7-H3 promotes gastric cancer cell migration and invasion. *Oncotarget* 2017; 8:71725-35.
120. Jiang B, Zhang T, Liu F, Sun Z, Shi H, Hua D, et al. The co-stimulatory molecule B7-H3 promotes the epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Oncotarget* 2016; 7:31755-71.

121. Crispen PL, Sheinin Y, Roth TJ, Lohse CM, Kuntz SM, Frigola X, et al. Tumor cell and tumor vasculature expression of B7-H3 predict survival in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14:5150-7.
122. Kontermann RE. Antibody-cytokine fusion proteins. *Arch Biochem Biophys* 2012; 526:194-205.
123. Liu L. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *Protein Cell* 2018; 9:15-32.
124. Raab S, Steinbacher J, Schmiedel BJ, Kousis PC, Steinle A, Jung G, et al. Fc-optimized NKG2D-Fc constructs induce NK cell antibody-dependent cellular cytotoxicity against breast cancer cells independently of HER2/neu expression status. *J Immunol* 2014; 193:4261-72.
125. Hagelstein I, Lutz MS, Schmidt M, Heitmann JS, Malenke E, Zhou Y, et al. Bispecific NKG2D-CD3 and NKG2D-CD16 Fusion Proteins as Novel Treatment Option in Advanced Soft Tissue Sarcomas. *Front Immunol* 2021; 12:653081.
126. Stern-Ginossar N, Mandelboim O. An integrated view of the regulation of NKG2D ligands. *Immunology* 2009; 128:1-6.
127. Wang Z, Wang Z, Li S, Li B, Sun L, Li H, et al. Decitabine Enhances Vgamma9Vdelta2 T Cell-Mediated Cytotoxic Effects on Osteosarcoma Cells via the NKG2DL-NKG2D Axis. *Front Immunol* 2018; 9:1239.
128. Weiss T, Schneider H, Silginer M, Steinle A, Pruschy M, Polic B, et al. NKG2D-Dependent Antitumor Effects of Chemotherapy and Radiotherapy against Glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2018; 24:882-95.
129. Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Miyagi T, Ishida H, Ohkawa K, et al. Anticancer chemotherapy inhibits MHC class I-related chain a ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2009; 69:8050-7.
130. Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol* 2013; 31:413-41.
131. Cripe LD. Adult acute leukemia. *Curr Probl Cancer* 1997; 21:1-64.
132. Wörmann B. Akute Lymphatische Leukämie, S3-Leitlinie. *Okopedia Leitlinien* 2022.
133. Leak S, Horne GA, Copland M. Targeting BCR-ABL1-positive leukaemias: a review article. *Camb Prism Precis Med* 2023; 1:e21.
134. Kato M, Manabe A. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Int* 2018; 60:4-12.
135. Khimani F, Dutta M, Faramand R, Nishihori T, Perez AP, Dean E, et al. Impact of Total Body Irradiation-Based Myeloablative Conditioning Regimens in Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Systematic Review and Meta-Analysis. *Transplant Cell Ther* 2021; 27:620 e1- e9.
136. Jedraszek K, Malczewska M, Parysek-Wojcik K, Lejman M. Resistance Mechanisms in Pediatric B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci* 2022; 23.
137. Ismail-Khan R, Bui MM. A review of triple-negative breast cancer. *Cancer Control* 2010; 17:173-6.
138. Li X, Yang J, Peng L, Sahin AA, Huo L, Ward KC, et al. Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2017; 161:279-87.
139. Arteaga CL, Sliwkowski MX, Osborne CK, Perez EA, Puglisi F, Gianni L. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 9:16-32.
140. Miglietta F, Cinquini M, Dieci MV, Cortesi L, Criscitiello C, Montemurro F, et al. PARP-inhibitors for BRCA1/2-related advanced HER2-negative breast cancer: A

- meta-analysis and GRADE recommendations by the Italian Association of Medical Oncology. *Breast* 2022; 66:293-304.
141. Izci H, Punie K, Waumans L, Laenen A, Wildiers H, Verdoodt F, et al. Correlation of TROP-2 expression with clinical-pathological characteristics and outcome in triple-negative breast cancer. *Sci Rep* 2022; 12:22498.
  142. Ma X, Wang X, Huang J, Chen Y, Zhang J, Zhang B, et al. Bevacizumab Addition in Neoadjuvant Treatment Increases the Pathological Complete Response Rates in Patients with HER-2 Negative Breast Cancer Especially Triple Negative Breast Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS One* 2016; 11:e0160148.
  143. Bardia A, Tolaney SM, Punie K, Loirat D, Oliveira M, Kalinsky K, et al. Biomarker analyses in the phase III ASCENT study of sacituzumab govitecan versus chemotherapy in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Ann Oncol* 2021; 32:1148-56.
  144. Loibl S, Untch M, Burchardi N, Huober J, Sinn BV, Blohmer JU, et al. A randomised phase II study investigating durvalumab in addition to an anthracycline taxane-based neoadjuvant therapy in early triple-negative breast cancer: clinical results and biomarker analysis of GeparNuevo study. *Ann Oncol* 2019; 30:1279-88.
  145. Voorwerk L, Slagter M, Horlings HM, Sikorska K, van de Vijver KK, de Maaker M, et al. Immune induction strategies in metastatic triple-negative breast cancer to enhance the sensitivity to PD-1 blockade: the TONIC trial. *Nat Med* 2019; 25:920-8.
  146. Burningham Z, Hashibe M, Spector L, Schiffman JD. The epidemiology of sarcoma. *Clin Sarcoma Res* 2012; 2:14.
  147. Grunewald TG, Alonso M, Avnet S, Banito A, Burdach S, Cidre-Aranaz F, et al. Sarcoma treatment in the era of molecular medicine. *EMBO Mol Med* 2020; 12:e11131.
  148. Gage MM, Nagarajan N, Ruck JM, Canner JK, Khan S, Giuliano K, et al. Sarcomas in the United States: Recent trends and a call for improved staging. *Oncotarget* 2019; 10:2462-74.
  149. S3-Leitlinie Adulte Weichgewebesarkome. 1.1 ed; 2022.
  150. Duchman KR, Gao Y, Miller BJ. Prognostic factors for survival in patients with high-grade osteosarcoma using the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program database. *Cancer Epidemiol* 2015; 39:593-9.
  151. Palmerini E, Staals EL, Alberghini M, Zanella L, Ferrari C, Benassi MS, et al. Synovial sarcoma: retrospective analysis of 250 patients treated at a single institution. *Cancer* 2009; 115:2988-98.
  152. Billingsley KG, Burt ME, Jara E, Ginsberg RJ, Woodruff JM, Leung DH, et al. Pulmonary metastases from soft tissue sarcoma: analysis of patterns of diseases and postmetastasis survival. *Ann Surg* 1999; 229:602-10; discussion 10-2.
  153. McCarthy EF. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J* 2006; 26:154-8.
  154. Tap WD, Wagner AJ, Schoffski P, Martin-Broto J, Krarup-Hansen A, Ganjoo KN, et al. Effect of Doxorubicin Plus Olaratumab vs Doxorubicin Plus Placebo on Survival in Patients With Advanced Soft Tissue Sarcomas: The ANNOUNCE Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2020; 323:1266-76.
  155. Tawbi HA, Burgess M, Bolejack V, Van Tine BA, Schuetze SM, Hu J, et al. Pembrolizumab in advanced soft-tissue sarcoma and bone sarcoma (SARC028): a multicentre, two-cohort, single-arm, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2017; 18:1493-501.
  156. Tamura K, Hasegawa K, Katsumata N, Matsumoto K, Mukai H, Takahashi S, et al. Efficacy and safety of nivolumab in Japanese patients with uterine cervical cancer, uterine corpus cancer, or soft tissue sarcoma: Multicenter, open-label phase 2 trial. *Cancer Sci* 2019; 110:2894-904.

157. Ben-Ami E, Barysaukas CM, Solomon S, Tahlil K, Malley R, Hohos M, et al. Immunotherapy with single agent nivolumab for advanced leiomyosarcoma of the uterus: Results of a phase 2 study. *Cancer* 2017; 123:3285-90.
158. Davis KL, Fox E, Merchant MS, Reid JM, Kudgus RA, Liu X, et al. Nivolumab in children and young adults with relapsed or refractory solid tumours or lymphoma (ADVL1412): a multicentre, open-label, single-arm, phase 1-2 trial. *Lancet Oncol* 2020; 21:541-50.
159. Lang F, Pfeifer H, Bruggemann M, Hermann E, Serve H, Goekbuget N. A Multicentre, Randomized Trial in Adults with de novo Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukaemia to Assess the Efficacy of Ponatinib versus Imatinib in Combination with Low-Intensity Chemotherapy, to Compare End of Therapy with Indication for Stem Cell Transplantation versus Tyrosine Kinase Inhibitor, Blinatumomab, and Chemotherapy in Optimal Responders, and to Evaluate Blinatumomab in Suboptimal Responders (GMALL-EVOLVE). *Oncol Res Treat* 2024:1-4.
160. Kauer J, Marklin M, Pflugler M, Horner S, Hinterleitner C, Tandler C, et al. BCR::ABL1 tyrosine kinase inhibitors hamper the therapeutic efficacy of blinatumomab in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol* 2022; 148:2759-71.
161. Holzmayer SJ, Kauer J, Mauermann J, Roider T, Marklin M. Asciminib Maintains Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity against Leukemic Blasts. *Cancers (Basel)* 2024; 16.
162. Holzmayer SJ, Liebel K, Hagelstein I, Salih HR, Marklin M. The bispecific B7H3xCD3 antibody CC-3 induces T cell immunity against bone and soft tissue sarcomas. *Front Immunol* 2024; 15:1391954.
163. Kaidun P, Holzmayer SJ, Greiner SM, Seller A, Tegeler CM, Hagelstein I, et al. Targeting NKG2DL with Bispecific NKG2D-CD16 and NKG2D-CD3 Fusion Proteins on Triple-Negative Breast Cancer. *Int J Mol Sci* 2023; 24.
164. Ray-Coquard I, Serre D, Reichardt P, Martin-Broto J, Bauer S. Options for treating different soft tissue sarcoma subtypes. *Future Oncol* 2018; 14:25-49.
165. Ressing M, Wardelmann E, Hohenberger P, Jakob J, Kasper B, Emrich K, et al. Strengthening health data on a rare and heterogeneous disease: sarcoma incidence and histological subtypes in Germany. *BMC Public Health* 2018; 18:235.
166. Hiraga J, Tomita A, Sugimoto T, Shimada K, Ito M, Nakamura S, et al. Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: its prevalence and clinical significance. *Blood* 2009; 113:4885-93.
167. Bayat Mokhtari R, Homayouni TS, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, et al. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget* 2017; 8:38022-43.
168. Maury S, Chevret S, Thomas X, Heim D, Leguay T, Huguet F, et al. Rituximab in B-Lineage Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 2016; 375:1044-53.
169. Ponvilawan B, Vittayawacharin P, Tunsing P, Owattanapanich W. Efficacy of Targeted Immunotherapy as Induction or Salvage Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Technol Cancer Res Treat* 2021; 20:15330338211037434.
170. Komorowski L, Fidyk K, Patkowska E, Firczuk M. Philadelphia Chromosome-Positive Leukemia in the Lymphoid Lineage-Similarities and Differences with the Myeloid Lineage and Specific Vulnerabilities. *Int J Mol Sci* 2020; 21.
171. Leonard JT, Kosaka Y, Malla P, LaTocha D, Lambie A, Hayes-Lattin B, et al. Concomitant use of a dual Src/ABL kinase inhibitor eliminates the in vitro efficacy of blinatumomab against Ph+ ALL. *Blood* 2021; 137:939-44.
172. Mestermann K, Giavridis T, Weber J, Ryzdek J, Frenz S, Nerreter T, et al. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib acts as a pharmacologic on/off switch for CAR T cells. *Sci Transl Med* 2019; 11.

173. Foa R, Bassan R, Vitale A, Elia L, Piciocchi A, Puzzolo MC, et al. Dasatinib-Blinatumomab for Ph-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. *N Engl J Med* 2020; 383:1613-23.
174. Chen LY, Gong WJ, Li MH, Zhou HX, Xu MZ, Qian CS, et al. Anti-CD19 CAR T-cell consolidation therapy combined with CD19+ feeding T cells and TKI for Ph+ acute lymphoblastic leukemia. *Blood Adv* 2023; 7:4913-25.
175. Ganesan S, Luu TT, Chambers BJ, Meinke S, Brodin P, Vivier E, et al. The Abl-1 Kinase is Dispensable for NK Cell Inhibitory Signalling and is not Involved in Murine NK Cell Education. *Scand J Immunol* 2017; 86:135-42.
176. Iqbal N, Iqbal N. Imatinib: a breakthrough of targeted therapy in cancer. *Chemother Res Pract* 2014; 2014:357027.
177. Rix U, Hantschel O, Durnberger G, Remsing Rix LL, Planyavsky M, Fernbach NV, et al. Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets. *Blood* 2007; 110:4055-63.
178. Bieerkehazhi S, Chen Z, Zhao Y, Yu Y, Zhang H, Vasudevan SA, et al. Novel Src/Abl tyrosine kinase inhibitor bosutinib suppresses neuroblastoma growth via inhibiting Src/Abl signaling. *Oncotarget* 2017; 8:1469-80.
179. Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ, Wait CL, Ott KA, Zigler AJ. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* 2000; 96:925-32.
180. O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, Eide CA, Rivera VM, Wang F, et al. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T3151 mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell* 2009; 16:401-12.
181. Dar AC, Lopez MS, Shokat KM. Small molecule recognition of c-Src via the Imatinib-binding conformation. *Chem Biol* 2008; 15:1015-22.
182. Tan S, Xu Y, Wang Z, Wang T, Du X, Song X, et al. Tim-3 Hampers Tumor Surveillance of Liver-Resident and Conventional NK Cells by Disrupting PI3K Signaling. *Cancer Res* 2020; 80:1130-42.
183. Dai K, Chen Z, She S, Shi J, Zhu J, Huang Y. Leucine rich repeats and calponin homology domain containing 1 inhibits NK-92 cell cytotoxicity through attenuating Src signaling. *Immunobiology* 2020; 225:151934.
184. Romeo V, Gierke S, Edgar KA, Liu SD. Effects of PI3K Inhibition on Afucosylated Antibody-Driven Fcγ3 Events and Phospho-S6 Activity in NK Cells. *J Immunol* 2019; 203:137-47.
185. Colucci F, Di Santo JP, Leibson PJ. Natural killer cell activation in mice and men: different triggers for similar weapons? *Nat Immunol* 2002; 3:807-13.
186. Salih J, Hilpert J, Placke T, Grunebach F, Steinle A, Salih HR, et al. The BCR/ABL-inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib differentially affect NK cell reactivity. *Int J Cancer* 2010; 127:2119-28.
187. Wylie AA, Schoepfer J, Jahnke W, Cowan-Jacob SW, Loo A, Furet P, et al. The allosteric inhibitor ABL001 enables dual targeting of BCR-ABL1. *Nature* 2017; 543:733-7.
188. Armeanu S, Bitzer M, Lauer UM, Venturelli S, Pathil A, Krusch M, et al. Natural killer cell-mediated lysis of hepatoma cells via specific induction of NKG2D ligands by the histone deacetylase inhibitor sodium valproate. *Cancer Res* 2005; 65:6321-9.
189. Marklin M, Hagelstein I, Koerner SP, Rothfelder K, Pfluegler MS, Schumacher A, et al. Bispecific NKG2D-CD3 and NKG2D-CD16 fusion proteins for induction of NK and T cell reactivity against acute myeloid leukemia. *J Immunother Cancer* 2019; 7:143.
190. Prajapati K, Perez C, Rojas LBP, Burke B, Guevara-Patino JA. Functions of NKG2D in CD8(+) T cells: an opportunity for immunotherapy. *Cell Mol Immunol* 2018; 15:470-9.

191. Prager I, Watzl C. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *J Leukoc Biol* 2019; 105:1319-29.
192. Das RK, O'Connor RS, Grupp SA, Barrett DM. Lingering effects of chemotherapy on mature T cells impair proliferation. *Blood Adv* 2020; 4:4653-64.
193. Vennin C, Cattaneo CM, Bosch L, Vegna S, Ma X, Damstra HGJ, et al. Taxanes trigger cancer cell killing in vivo by inducing non-canonical T cell cytotoxicity. *Cancer Cell* 2023; 41:1170-85 e12.
194. Raffaghello L, Prigione I, Airoidi I, Camoriano M, Levreri I, Gambini C, et al. Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. *Neoplasia* 2004; 6:558-68.
195. Maurer S, Kropp KN, Klein G, Steinle A, Haen SP, Walz JS, et al. Platelet-mediated shedding of NKG2D ligands impairs NK cell immune-surveillance of tumor cells. *Oncoimmunology* 2018; 7:e1364827.
196. Salih HR, Rammensee HG, Steinle A. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* 2002; 169:4098-102.
197. Luo Q, Luo W, Zhu Q, Huang H, Peng H, Liu R, et al. Tumor-Derived Soluble MICA Obstructs the NKG2D Pathway to Restrain NK Cytotoxicity. *Aging Dis* 2020; 11:118-28.
198. Seller A, Tegeler CM, Mauermann J, Schreiber T, Hagelstein I, Liebel K, et al. Soluble NKG2DLs Are Elevated in Breast Cancer Patients and Associate with Disease Outcome. *Int J Mol Sci* 2024; 25.
199. Ferrari de Andrade L, Tay RE, Pan D, Luoma AM, Ito Y, Badrinath S, et al. Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity. *Science* 2018; 359:1537-42.
200. Fan J, Shi J, Zhang Y, Liu J, An C, Zhu H, et al. NKG2D discriminates diverse ligands through selectively mechano-regulated ligand conformational changes. *EMBO J* 2022; 41:e107739.
201. Lengyel CS, Willis LJ, Mann P, Baker D, Kortemme T, Strong RK, et al. Mutations designed to destabilize the receptor-bound conformation increase MICA-NKG2D association rate and affinity. *J Biol Chem* 2007; 282:30658-66.
202. Henager SH, Hale MA, Maurice NJ, Dunnington EC, Swanson CJ, Peterson MJ, et al. Combining different design strategies for rational affinity maturation of the MICA-NKG2D interface. *Protein Sci* 2012; 21:1396-402.
203. Fleishman SJ, Whitehead TA, Ekiert DC, Dreyfus C, Corn JE, Strauch EM, et al. Computational design of proteins targeting the conserved stem region of influenza hemagglutinin. *Science* 2011; 332:816-21.
204. Pierce BG, Haidar JN, Yu Y, Weng Z. Combinations of affinity-enhancing mutations in a T cell receptor reveal highly nonadditive effects within and between complementarity determining regions and chains. *Biochemistry* 2010; 49:7050-9.
205. Leivas A, Valeri A, Cordoba L, Garcia-Ortiz A, Ortiz A, Sanchez-Vega L, et al. NKG2D-CAR-transduced natural killer cells efficiently target multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2021; 11:146.
206. Sentman CL, Meehan KR. NKG2D CARs as Cell Therapy for Cancer. *Cancer Journal* 2014; 20:156-9.
207. Han Y, Xie W, Song DG, Powell DJ, Jr. Control of triple-negative breast cancer using ex vivo self-enriched, costimulated NKG2D CAR T cells. *J Hematol Oncol* 2018; 11:92.
208. Baumeister SH, Murad J, Werner L, Daley H, Trebeden-Negre H, Gicobi JK, et al. Phase I Trial of Autologous CAR T Cells Targeting NKG2D Ligands in Patients with AML/MDS and Multiple Myeloma. *Cancer Immunol Res* 2019; 7:100-12.
209. Sallman DA, Kerre T, Havelange V, Poire X, Lewalle P, Wang ES, et al. 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. *Lancet Haematol* 2023; 10:e191-e202.
210. Johnson A, Townsend M, O'Neill K. Tumor Microenvironment Immunosuppression: A Roadblock to CAR T-Cell Advancement in Solid Tumors. *Cells* 2022; 11.
211. Safarzadeh Kozani P, Safarzadeh Kozani P, Rahbarizadeh F. Addressing the obstacles of CAR T cell migration in solid tumors: wishing a heavy traffic. *Crit Rev Biotechnol* 2022; 42:1079-98.
212. Ugel S, Delpozzi F, Desantis G, Papalini F, Simonato F, Sonda N, et al. Therapeutic targeting of myeloid-derived suppressor cells. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9:470-81.
213. Jandus C, Bioley G, Speiser DE, Romero P. Selective accumulation of differentiated FOXP3(+) CD4 (+) T cells in metastatic tumor lesions from melanoma patients compared to peripheral blood. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57:1795-805.
214. Buckanovich RJ, Facciabene A, Kim S, Benencia F, Sasaroli D, Balint K, et al. Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy. *Nat Med* 2008; 14:28-36.
215. MacGregor HL, Sayad A, Elia A, Wang BX, Katz SR, Shaw PA, et al. High expression of B7-H3 on stromal cells defines tumor and stromal compartments in epithelial ovarian cancer and is associated with limited immune activation. *J Immunother Cancer* 2019; 7:357.
216. Seaman S, Zhu Z, Saha S, Zhang XM, Yang MY, Hilton MB, et al. Eradication of Tumors through Simultaneous Ablation of CD276/B7-H3-Positive Tumor Cells and Tumor Vasculature. *Cancer Cell* 2017; 31:501-15 e8.
217. Seaman S, Stevens J, Yang MY, Logsdon D, Graff-Cherry C, St Croix B. Genes that distinguish physiological and pathological angiogenesis. *Cancer Cell* 2007; 11:539-54.
218. Worn A, Pluckthun A. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J Mol Biol* 2001; 305:989-1010.
219. Liu X, Zhelev D, Adams C, Chen C, Mellors JW, Dimitrov DS. Effective killing of cells expressing CD276 (B7-H3) by a bispecific T cell engager based on a new fully human antibody. *Transl Oncol* 2021; 14:101232.
220. Ma J, Shang T, Ma P, Sun X, Zhao J, Sun X, et al. Bispecific anti-CD3 x anti-B7-H3 antibody mediates T cell cytotoxic ability to human melanoma in vitro and in vivo. *Invest New Drugs* 2019; 37:1036-43.
221. You G, Lee Y, Kang YW, Park HW, Park K, Kim H, et al. B7-H3x4-1BB bispecific antibody augments antitumor immunity by enhancing terminally differentiated CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes. *Sci Adv* 2021; 7.
222. Moore GL, Zeng VG, Diaz JE, Bonzon C, Avery KN, Rashid R, et al. A B7-H3-targeted CD28 bispecific antibody enhances the activity of anti-PD1 and CD3 T-cell engager immunotherapies. *Mol Cancer Ther* 2024.
223. Li HY, Chen YL, Deng XN, Li HH, Tan J, Liu GJ, et al. Bispecific antibody targeting both B7-H3 and PD-L1 exhibits superior antitumor activities. *Acta Pharmacol Sin* 2023; 44:2322-30.
224. Jang S, Powderly JD, Spira AI, Bakkacha O, Loo D, Bohac GC, et al. Phase 1 dose escalation study of MGC018, an anti-B7-H3 antibody-drug conjugate (ADC), in patients with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology* 2021; 39:2631-.
225. Pinto NR, Albert CM, Taylor M, Wilson A, Rawlings-Rhea S, Huang W, et al. STRIVE-02: A first-in-human phase 1 trial of systemic B7H3 CAR T cells for children and young adults with relapsed/refractory solid tumors. *Journal of Clinical Oncology* 2022; 40:10011-.

226. Philipp N, Kazerani M, Nicholls A, Vick B, Wulf J, Straub T, et al. T-cell exhaustion induced by continuous bispecific molecule exposure is ameliorated by treatment-free intervals. *Blood* 2022; 140:1104-18.
227. Skokos D, Waite JC, Haber L, Crawford A, Hermann A, Ullman E, et al. A class of costimulatory CD28-bispecific antibodies that enhance the antitumor activity of CD3-bispecific antibodies. *Sci Transl Med* 2020; 12.
228. Horvath CJ, Milton MN. The TeGenero incident and the Duff Report conclusions: a series of unfortunate events or an avoidable event? *Toxicol Pathol* 2009; 37:372-83.
229. Neil Howard Segal MP, Eugenia Girda, Lawrence Fong, Anthony J. Olszanski, Hyunsil Han, Kerry A. Casey, Siyu Li, Erik Welf, Chieh-I Chen, Dimitris Skokos, Frank A. Seebach, Israel Lowy, Matthew G. Fury, Melissa Divya Mathias, and Nehal J. Lakhani. A phase 1/2 study of REGN7075 (EGFRxCD28 costimulatory bispecific antibody) in combination with cemiplimab (anti-PD-1) in patients with advanced solid tumors: Trial-in-progress update. *Journal of Clinical Oncology* 2023; 41.
230. Maddipati R, Norgard RJ, Baslan T, Rathi KS, Zhang A, Saeid A, et al. MYC Levels Regulate Metastatic Heterogeneity in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Discov* 2022; 12:542-61.
231. Baslan T, Morris JPt, Zhao Z, Reyes J, Ho YJ, Tsanov KM, et al. Ordered and deterministic cancer genome evolution after p53 loss. *Nature* 2022; 608:795-802.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

ADC	Antikörper Drug Konjugat
ADCC	Antibody dependent cellular cytotoxicity
ADCP	Antibody dependent cellular phagocytosis
ALL	Akute lymphatische Leukämie
APC	Antigen presenting cells
Asci	Asciminib
B7-H3	B7-Homolog-3
BCR	B cell receptor
BCR::ABL1	Philadelphia Chromosomen Translokation
BFP	Bispezifisches NKG2D Fusionsprotein
Bosu	Bosutinib
bsAb	Bispecific Antibody
C <sub>H</sub>	konstante schwere Kette
C <sub>L</sub>	Konstante leichte Kette
CAR	Chimeric antigen receptor
CD4 <sup>+</sup>	T-Helferzellen
CD8 <sup>+</sup>	Zytotoxische T-Zelle
CDC	Complement dependent cytotoxicity
CMC	Zentralen Gedächtniszellen
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
CRS	Cytokine Release Syndrome
DART	Dual affinity re-targeting
Dasa	Dasatinib
DC	Dendritische Zellen
EMA	Europäische Arzneimittelbehörde
EMC	Effektor Gedächtniszellen
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment crystallizable
FcγR	Fcγ-Rezeptor
FcγRIIIa	Fcγ-Rezeptor IIIa
FcRn	Fc-Rezeptor neonatal
FDA	Food and Drug Administration
FP	Fusionsprotein
gp100	Glykoprotein 100

---

Her2	Human epidermal growth factor receptor 2
ICI	Immune-Checkpoint-Inhibitoren
IFN $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobuline
IMA	Imatinib
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
KIR	Killer cell immunoglobulin-like receptors
MAC	Membranangriffskomplex
MHC-I	Major histocompatibility complex class I
MICA/MICB	MHC class I chain-related A and B
MRD	Minimal residual disease
Nilo	Nilotinib
NKG2D	Natural killer group 2, member D
NKG2DL	NKG2D-Liganden
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PAMP	Pattern associated membrane proteins
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PD-1	Programmed cell death protein 1
Peak	Plasma-Peak-Konzentration
Pona	Ponatinib
PRR	Pattern recognition receptors
scFv	single chain fragment variable
SCM	Stammzell-Gedächtniszellen
STAMP	Selective allosteric ABL myristoyl pocket
TAM	Tumorassoziierte Makrophagen
TCR	T cell receptor
TIL	Tumor infiltrating lymphocytes
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TLR	Toll-like receptors
TME	Tumor microenvironment
TNBC	Triple negative breast cancer
TNF	Tumor necrosis factor
Trop2	Tumor-associated calcium signal transducer 2
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TAA	Tumor assoziiertes Antigen
TSA	Tumor spezifisches Antigen
ULBP	UL-16 binding protein

V <sub>H</sub>	Variable schwere Kette
V <sub>L</sub>	Variable leichte Kette
VEGF2	Vascular endothelial growth factor 2

## **8      Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Aufbau eines IgG1 Antikörpers .....	12
Abbildung 2: Bispezifische Antikörper und Fusionsproteine.....	18
Abbildung 3: Fusionsproteine .....	20

## 9 Eigene Publikationen

Kaban K, Greiner SM, **Holzmayr S**, Tandler C, Meyer S, Hinterleitner C, Salih HR, Märklin M, Heitmann JS. Immunoprofiling of 4-1BB Expression Predicts Outcome in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Diagnostics (Basel)*. 2021 Nov 4;11(11):2041. doi: 10.3390/diagnostics11112041. PMID: 34829391; PMCID: PMC8622208.

Greiner SM, Märklin M, **Holzmayr S**, Kaban K, Meyer S, Hinterleitner C, Tandler C, Hagelstein I, Jung G, Salih HR, Heitmann JS, Kauer J. Identification of CD105 (endoglin) as novel risk marker in CLL. *Ann Hematol*. 2022 Apr;101(4):773-780. doi: 10.1007/s00277-022-04756-4. Epub 2022 Jan 19. PMID: 35044512; PMCID: PMC8913466.

Ho JNHG, Schmidt D, Lowinus T, Ryoo J, Dopfer EP, Gonzalo Núñez N, Costa-Pereira S, Toffalori C, Punta M, Fetsch V, Wertheimer T, Rittmann MC, Braun LM, Follo M, Briere C, Vinnakota JM, Langenbach M, Koppers F, Shoumariyeh K, Engel H, Rückert T, Märklin M, **Holzmayr S**, Illert AL, Magon F, Andrieux G, Duquesne S, Pfeifer D, Staniek J, Rizzi M, Miething C, Köhler N, Duyster J, Menssen HD, Boerries M, Buescher JM, Cabezas-Wallscheid N, Blazar BR, Apostolova P, Vago L, Pearce EL, Becher B, Zeiser R. Targeting MDM2 enhances antileukemia immunity after allogeneic transplantation via MHC-II and TRAIL-R1/2 upregulation. *Blood*. 2022 Sep 8;140(10):1167-1181. doi: 10.1182/blood.2022016082. PMID: 35853161; PMCID: PMC9461473.

Jonas S. Heitmann, Claudia Tandler, Maddalena Marconato, Annika Nelde, Timorshah Habibzada, Susanne M. Rittig, Christian M. Tegeler, Yacine Maringer, Simon U. Jaeger, Monika Denk, Marion Richter, Melek T. Oezbek, Jens Bauer, Jonas Rieth, Marcel Wacker, Sarah M. Schroeder, Naomi Hoenisch Gravel, Jonas Scheid, Melanie Märklin, Annika Henrich, Boris Klimovich, Kim L. Clar, Martina Lutz, **Samuel Holzmayr**, Sebastian Hörber, Andreas Peter, Christoph Meisner, Imma Fischer, Markus W. Löffler, Caroline Anna Peuker, Stefan Habringer, Thorsten O. Goetze, Elke Jäger, Hans-Georg Rammensee, Helmut R. Salih & Juliane S. Walz Phase I/II trial of a peptide-based COVID-19 T-cell activator in patients with B-cell deficiency. *Nat Commun* **14**, 5032 (2023).

Kaidun P \*, **Holzmayr SJ** \*, Greiner SM, Seller A, Tegeler CM, Hagelstein I, Mauermann J, Engler T, Koch A, Hartkopf AD, Salih HR, Märklin M. Targeting NKG2DL with Bispecific NKG2DXCD16 and NKG2DXCD3 Fusion Proteins on Triple-Negative Breast Cancer. *Int J*

Mol Sci. 2023 Aug 24;24(17):13156. doi: 10.3390/ijms241713156. PMID: 37685962; PMCID: PMC10487695. \* gleicher Anteil

**Holzmayr SJ** \*, Kauer J \*, Mauermann J, Roider T, Märklin M. Asciminib Maintains Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity against Leukemic Blasts. *Cancers (Basel)*. 2024 Mar 26;16(7):1288. doi: 10.3390/cancers16071288. PMID: 38610966; PMCID: PMC11010908. \* gleicher Anteil

Stefańczyk SA, Hagelstein I, Lutz MS, Müller S, **Holzmayr SJ**, Jarjour G, Zekri L, Heitmann JS, Salih HR, Märklin M. Induction of NK cell reactivity against acute myeloid leukemia by Fc-optimized CD276 (B7-H3) antibody. *Blood Cancer J*. 2024 Apr 18;14(1):67. doi: 10.1038/s41408-024-01050-6. PMID: 38637557; PMCID: PMC11026476.

**Holzmayr SJ**, Liebel K, Hagelstein I, Salih HR, Märklin M. The bispecific B7H3xCD3 antibody CC-3 induces T cell immunity against bone and soft tissue sarcomas. *Front Immunol*. 2024 May 3;15:1391954. doi: 10.3389/fimmu.2024.1391954. PMID: 38765008; PMCID: PMC11099233.

## 10 Eigenanteil

Die Arbeiten, die zu den drei Publikationen in dieser Doktorarbeit geführt haben, wurden nicht bzw. nicht ausschließlich von mir selbst durchgeführt. Die Beiträge von mir und den anderen Autoren sind im Folgenden gemäß den CRediT-Beitragstaxonomierichtlinien aufgeführt.

Kaidun P \*, **Holzmayr SJ** \*, Greiner SM, Seller A, Tegeler CM, Hagelstein I, Mauermann J, Engler T, Koch A, Hartkopf AD, Salih HR, Märklin M. Targeting NKG2DL with Bispecific NKG2DXCD16 and NKG2DXCD3 Fusion Proteins on Triple-Negative Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2023 Aug 24;24(17):13156. doi: 10.3390/ijms241713156. PMID: 37685962; PMCID: PMC10487695. \* gleicher Anteil

Konzeptualisierung: Melanie Märklin, Helmut R Salih

Projektleitung: Melanie Märklin

Supervision: Melanie Märklin, Helmut R Salih

Methodologie: Samuel J Holzmayr, Polina Kaidun

Durchführung der Forschungs- und Untersuchungsprozesse: Samuel J Holzmayr, Polina Kaidun

Formelle Analyse: Samuel J Holzmayr, Polina Kaidun

Datenkuratierung: Samuel J Holzmayr, Polina Kaidun

Visualisierung: Samuel J Holzmayr, Polina Kaidun

Schreiben – Erstellung des Originalentwurfs: Polina Kaidun, Samuel Holzmayr, Melanie Märklin, Helmut R Salih

Schreiben – Revision und Editieren: Samuel J Holzmayr, Polina Kaidun

Melanie Märklin, Helmut R Salih

Ressourcen: Ilona Hagelstein, Jonas Mauermann, Sarah M Greiner, Anna Sellar, Christain M Tegeler, Tobias Engler, André Koch, Andreas D Hartkopf

Akquisition von Fördermitteln: Melanie Märklin, Helmut R Salih

**Holzmayr SJ** \*, Kauer J \*, Mauermann J, Roider T, Märklin M. Asciminib Maintains Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity against Leukemic Blasts. *Cancers (Basel).* 2024 Mar 26;16(7):1288. doi: 10.3390/cancers16071288. PMID: 38610966; PMCID: PMC11010908. \* gleicher Anteil

Konzeptualisierung: Samuel J Holzmayr, Joseph Kauer, Melanie Märklin

Projektleitung: Melanie Märklin

Supervision: Melanie Märklin

Methodologie: Samuel J Holzmayr, Joseph Kauer

Durchführung der Forschungs- und Untersuchungsprozesse: Samuel Holzmayr, Jonas Mauermann, Melanie Märklin, Joseph Kauer

Formelle Analyse: Samuel J Holzmayr, Joseph Kauer, Jonas Mauermann, Tobias Roider

Datenkuratierung: Samuel J Holzmayr, Melanie Märklin

Visualisierung: Samuel J Holzmayr, Tobias Roider, Joseph Kauer

Schreiben – Erstellung des Originalentwurfs: Joseph Kauer

Schreiben – Revision und Editieren: Melanie Märklin, Joseph Kauer, Samuel J Holzmayr, Tobias Roider

Ressourcen: Melanie Märklin

Akquisition von Fördermitteln: Melanie Märklin

**Holzmayr SJ**, Liebel K, Hagelstein I, Salih HR, Märklin M. The bispecific B7H3xCD3 antibody CC-3 induces T cell immunity against bone and soft tissue sarcomas. *Front Immunol.* 2024 May 3;15:1391954. doi: 10.3389/fimmu.2024.1391954. PMID: 38765008; PMCID: PMC11099233.

Konzeptualisierung: Samuel J Holzmayr, Melanie Märklin, Helmut R Salih

Projektleitung: Melanie Märklin

Supervision: Melanie Märklin, Helmut R Salih

Methodologie: Ilona Hagelstein

Software: Samuel J Holzmayr

Durchführung der Forschungs- und Untersuchungsprozesse: Samuel J Holzmayr, Kai Liebel

Formelle Analyse: Samuel J Holzmayr

Datenkuratierung: Samuel J Holzmayr, Kai Liebel

Visualisierung: Samuel J Holzmayr, Kai Liebel

Schreiben – Erstellung des Originalentwurfs: Samuel Holzmayr, Melanie Märklin

Schreiben – Revision und Editieren: Samuel Holzmayr, Melanie Märklin, Helmut R Salih

Ressourcen: Ilona Hagelstein, Melanie Märklin

Akquisition von Fördermitteln: Melanie Märklin, Helmut R Salih

## 11 Anhang

Die drei Forschungsartikel auf denen diese Doktorarbeit basiert, sind im Anhang beigelegt.

**Publikation 1** (13 Seiten Hauptartikel und 5 Seiten Zusätzliches Material)

**Holzmayr SJ** \*, Kauer J \*, Mauermann J, Roider T, Märklin M. Asciminib Maintains Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity against Leukemic Blasts. *Cancers (Basel)*. 2024 Mar 26;16(7):1288. doi: 10.3390/cancers16071288. PMID: 38610966; PMCID: PMC11010908. \* gleicher Anteil

**Publikation 2** (15 Seiten Hauptartikel und 5 Seiten Zusätzliches Material)





Kaidun P \*, **Holzmayr SJ** \*, Greiner SM, Seller A, Tegeler CM, Hagelstein I, Mauermann J, Engler T, Koch A, Hartkopf AD, Salih HR, Märklin M. Targeting NKG2DL with Bispecific NKG2DXCD16 and NKG2DXCD3 Fusion Proteins on Triple-Negative Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2023 Aug 24;24(17):13156. doi: 10.3390/ijms241713156. PMID: 37685962; PMCID: PMC10487695. \* gleicher Anteil

**Publikation 3** (10 Seiten Hauptartikel und 4 Seiten Zusätzliches Material)

**Holzmayr SJ**, Liebel K, Hagelstein I, Salih HR, Märklin M. The bispecific B7H3xCD3 antibody CC-3 induces T cell immunity against bone and soft tissue sarcomas. *Front Immunol*. 2024 May 3;15:1391954. doi: 10.3389/fimmu.2024.1391954. PMID: 38765008; PMCID: PMC11099233.

## Article

# Asciminib Maintains Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity against Leukemic Blasts

Samuel J. Holzmayer<sup>1,2,†</sup>, Joseph Kauer<sup>1,3,4,5,†</sup>, Jonas Mauermann<sup>1,2</sup>, Tobias Roider<sup>4,5</sup>  
and Melanie Märklin<sup>1,2,\*</sup>

- <sup>1</sup> Clinical Collaboration Unit Translational Immunology, German Cancer Consortium (DKTK), Department of Internal Medicine, University Hospital Tübingen, 72076 Tübingen, Germany; samuel.holzmayer@med.uni-tuebingen.de (S.J.H.)
  - <sup>2</sup> Cluster of Excellence iFIT (EXC 2180), Image-Guided and Functionally Instructed Tumor Therapies, Eberhard Karls University, 72076 Tübingen, Germany
  - <sup>3</sup> Interfaculty Institute for Cell Biology, Department of Immunology, University of Tübingen, German Cancer Consortium (DKTK) and German Cancer Research Center (DKFZ), Partner Site Tübingen, 72076 Tübingen, Germany
  - <sup>4</sup> Department of Hematology, Oncology and Rheumatology, University Hospital Heidelberg, 69117 Heidelberg, Germany; tobias.roider@med.uni-heidelberg.de
  - <sup>5</sup> European Molecular Biology Laboratory (EMBL), 69116 Heidelberg, Germany
- \* Correspondence: melanie.maerklin@med.uni-tuebingen.de; Tel.: +49-7071290  
† These authors contributed equally to this work.

**Simple Summary:** Acute lymphoblastic leukemia is a malignant disease which is commonly treated with various chemotherapeutic drugs. Novel therapeutic options are gaining interest, most of them involving therapeutic antibodies. In a high-risk genetic subset called BCR-ABL1 positive acute lymphoblastic leukemia, tyrosine kinase inhibitors are successfully used. Tyrosine kinase inhibitors combine well with chemotherapy but might interfere with antibody therapy. The effects of tyrosine kinase inhibitors on antibody dependent cellular cytotoxicity are not fully understood. We therefore tested a novel inhibitor called asciminib that is tested in acute lymphoblastic leukemia and assessed its influence on immune cell activation by antibodies. We found that asciminib, in contrast to other agents such as dasatinib, does not interfere with antibody therapy and should therefore be tested in clinical trials for patients with acute lymphoblastic leukemia.

**Abstract:** B cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) is characterized by an accumulation of malignant precursor cells. Treatment consists of multiagent chemotherapy followed by allogeneic stem cell transplantation in high-risk patients. In addition, patients bearing the BCR-ABL1 fusion gene receive concomitant tyrosine kinase inhibitor (TKI) therapy. On the other hand, monoclonal antibody therapy is increasingly used in both clinical trials and real-world settings. The introduction of rituximab has improved the outcomes in CD20 positive cases. Other monoclonal antibodies, such as tafasitamab (anti-CD19), obinutuzumab (anti-CD20) and epratuzumab (anti-CD22) have been tested in trials (NCT05366218, NCT04920968, NCT00098839). The efficacy of monoclonal antibodies is based, at least in part, on their ability to induce antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). Combination treatments, e.g., chemotherapy and TKI, should therefore be screened for potential interference with ADCC. Here, we report on in vitro data using BCR-ABL1 positive and negative B-ALL cell lines treated with rituximab and TKI. NK cell activation, proliferation, degranulation, cytokine release and tumor cell lysis were analyzed. In contrast to ATP site inhibitors such as dasatinib and ponatinib, the novel first-in-class selective allosteric ABL myristoyl pocket (STAMP) inhibitor asciminib did not significantly impact ADCC in our settings. Our results suggest that asciminib should be considered in clinical trials.

**Keywords:** acute lymphoblastic leukemia; bcr-abl; asciminib; monoclonal antibodies; TKI



**Citation:** Holzmayer, S.J.; Kauer, J.; Mauermann, J.; Roider, T.; Märklin, M. Asciminib Maintains Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity against Leukemic Blasts. *Cancers* **2024**, *16*, 1288. <https://doi.org/10.3390/cancers16071288>

Academic Editors: Harinder Gill, Naveen Pemmaraju, Hsin-An Hou and Melissa Gaik Ming Ooi

Received: 19 February 2024  
Revised: 19 March 2024  
Accepted: 23 March 2024  
Published: 26 March 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

B cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) is a malignancy characterized by the proliferation of transformed precursor B cells. A genetic subgroup indicating high-risk disease is defined by BCR-ABL1-fusion-gene-positive patients [1,2]. Such patients are treated with multi-agent chemotherapy combined with tyrosine kinase inhibitors (TKI) and consolidated with allogeneic stem cell transplantation [3–6]. The introduction of TKI has improved 5-year overall survival to 70–80% [4,6], compared to 30–40% in the pre-TKI era [7]. However, novel protocols reduce chemotherapy burden by utilizing bispecific or monospecific antibodies thus aiming at an immunotherapeutic effect [8–11]. One such strategy is the use of monospecific antibodies that elicit antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) via their Fc region. Rituximab improves outcomes in CD20-positive cases [12,13]. Different antibodies, such as tafasitamab (anti-CD19) [14], isatuximab (anti-CD38) [15], epratuzumab (anti-CD22) [16] and obinutuzumab (anti-CD20), have been tested in clinical trials (NCT05366218, NCT04920968, NCT00098839). If proven effective in B-ALL, they might also be used in combination with TKI in BCR-ABL1-positive cases. However, TKI used concomitantly may interfere with ADCC [17,18]. Therefore, a combinatorial regimen should be tested for potential interference with the desired immunotherapeutic effects. Here, we focused on currently available TKI for BCR-ABL1-positive ALL, including bosutinib, imatinib, dasatinib, nilotinib, ponatinib and the novel first-in-class selective allosteric ABL myristoyl pocket (STAMP) inhibitor asciminib, which is currently being tested for BCR-ABL1-positive ALL, but not yet approved [19]. We characterize the effect of each TKI on NK cell activity by measuring activation, degranulation, proliferation, cytokine release and tumor cell killing. Our results support the inclusion of asciminib in clinical trials for BCR-ABL1-positive ALL patients due to its non-interference with immunotherapy.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Peripheral Blood Mononuclear Cells and Cell Lines

All experiments were performed according to the Helsinki protocol and approved by the Ethics Committee of the University of Tübingen (vote: 13/2007V). Informed consent was obtained from all enrolled participants. Peripheral blood samples were collected from healthy donors, and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated using density gradient centrifugation with Biocoll Cell Separation Solution (Biochrom, Berlin, Germany). The B-ALL cell lines Nalm-6, Nalm-16, SD-1 and TOM-1 were obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany) and routinely screened for mycoplasma contamination. PBMCs and cell lines were cultured in RPMI 1640 medium, GlutaMAX Supplement (Life Technologies, Darmstadt, Germany) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (PAN-biotech, Aidenbach, Germany), 100 U/mL penicillin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 100 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich), at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.2. Tyrosine Kinase Inhibitors (TKI)

Asciminib, (ASCI), bosutinib (BOSU), dasatinib (DASA), imatinib (IMA), nilotinib (NILO) and ponatinib (PONA) were obtained from Selleckchem (Cologne, Germany). The TKI were dissolved in DMSO and stored at –80 °C. Stock concentrations were 5 mM for ASCI, BOSU, DASA and PONA, and 10 mM for IMA and NILO. Peak and IC<sub>50</sub> concentrations were chosen based on clinical studies which reported serum levels in patient samples. Peak levels as well as steady-state concentrations (from here on: IC<sub>50</sub>) were based on these data [20–27]. The concentrations were chosen as follows: ASCI 806 nM (peak) and 28 nM (IC<sub>50</sub>); BOSU 600 nM (peak) and 2.4 nM (IC<sub>50</sub>); DASA 150 nM (peak) and 10 nM (IC<sub>50</sub>); IMA 3000 nM (peak) and 600 nM (IC<sub>50</sub>); NILO 3000 nM (peak) and 30 nM (IC<sub>50</sub>); PONA 145 nM (peak) and 70 nM (IC<sub>50</sub>). DMSO was included as a control in all experiments at a maximum concentration of 0.1% *v/v* in NILO peak samples.

### 2.3. Flow Cytometry

Antibodies including CD3-FITC (clone OKT3; 1:150, BioLegend, San Diego, CA, USA), CD56 PE/Cy7 (clone NCAM1; 1:50, BioLegend), CD69-PE (clone FN50; 1:60, BD Biosciences, Heidelberg, Germany), CD107a-PE (clone H4A3; 1:25, BD Biosciences) and the corresponding isotype controls were obtained from BioLegend. 7-AAD (BioLegend) staining (1:200) or LIVE/DEAD™ Fixable Violet (1:1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were used to identify non-viable cells within flow cytometric samples. For flow cytometric assays, 30,000 target cells were incubated in 96-well plates with 65,000 PBMCs, Rituximab at 2.5 µg/mL and various tyrosine kinase inhibitors at the indicated concentrations. After 4 and 24 h, flow cytometric analyses were performed to determine CD107a and CD69 expression, respectively. NK cells were identified as CD56+ CD3+, activated subsets as CD69+. CD107a expression indicated degranulation. Detailed gating strategies are provided in Supplementary Figure S1. All samples were analyzed using the BD FACS Canto II or BD FACS Fortessa II (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Data analysis was performed using FlowJo V10 software (BD Bioscience).

### 2.4. Cytotoxicity Assays

Lysis of cell lines by allogeneic PBMC was analyzed using a 2 h BATDA Europium assay as previously described. Long-term cytotoxicity analyses were performed using the IncuCyte® S3 Live Cell Analysis System (Essenbioscience, Sartorius, Göttingen, Germany). B-ALL cells were labeled with Incucyte® Nuclight Rapid Red Dye (Sartorius, Germany, Göttingen) seeded in 96-well plates and cocultured with PBMC from healthy donors (E:T ratio 20:1) with or without the indicated mAbs (2.5 µg/mL each). To determine the amount of red labeled B-ALL cells, images were taken at 10× magnification every 4 h for 120 h. Quantification of viable cells was performed through normalization to the corresponding measurement at seed. The number of cells at seed was set to 100%.

### 2.5. Legendplex Cytokine Arrays

Legendplex cytokine arrays (BioLegend) for the measurement of granzyme A, perforin, sFasL, TNF, IL 2, IFNγ, IL 6 and IL 10 using Legendplex assays were performed with supernatants from 24 h co-culture experiments of B-ALL cells with PBMC from healthy donors (E:T ratio 5:1) according to the manufacturer's protocol.

### 2.6. Statistical Analysis

Data are presented as bar graphs with means superimposed by dot plots or box plots with min/max whiskers and dot plots for individual values. ANOVA tests with Bonferroni correction were used for group comparisons. Statistical analyses were performed using Prism 8.1.0 (GraphPad Software, Boston, MA, USA), R 4.3.1 and SPSS 29 (IBM, Armonk, NY, USA) software. *p*-values < 0.05 were considered statistically significant.

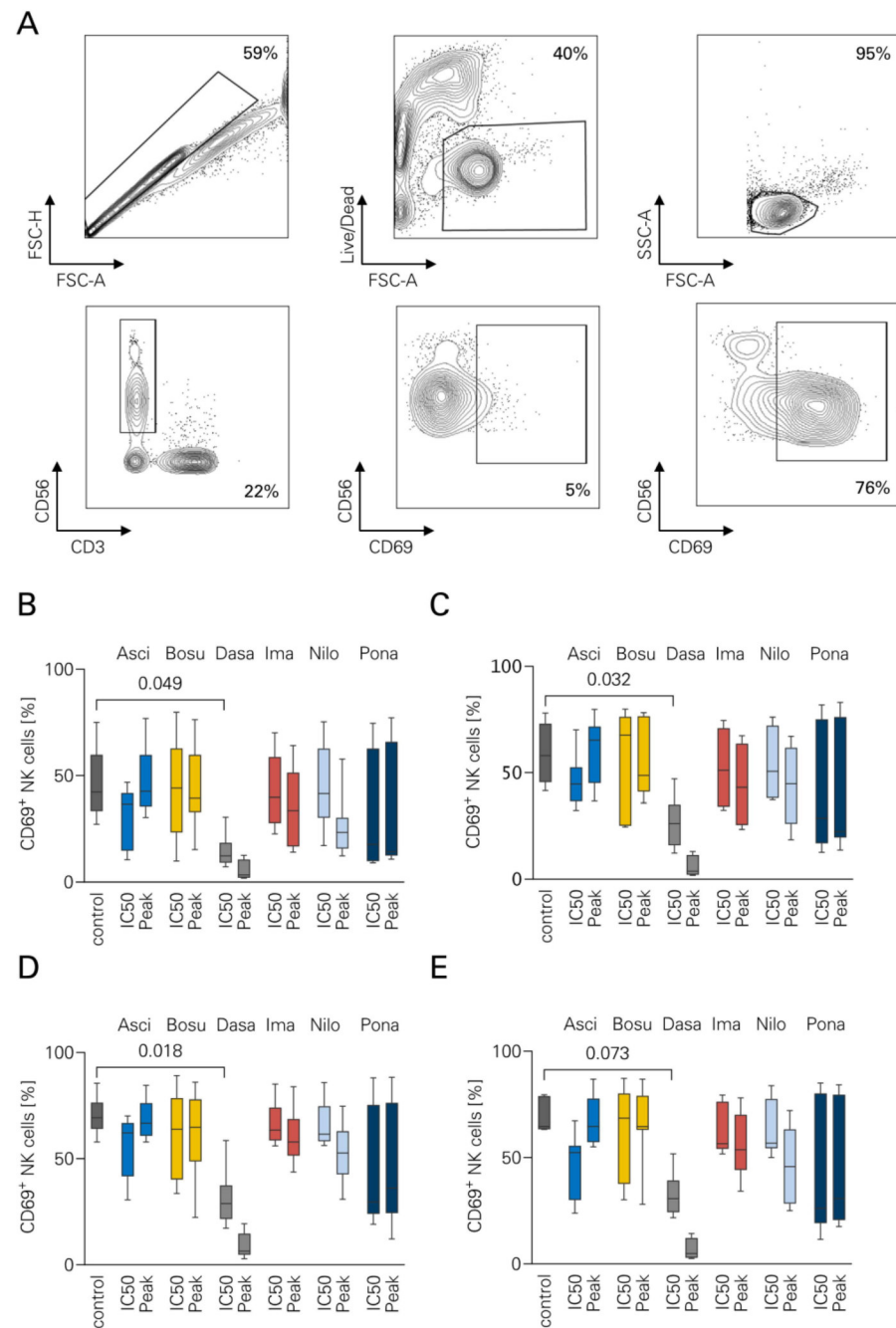
## 3. Results

Various *in vitro* assays were performed to elucidate the effect of different TKI on NK cell activation, degranulation, proliferation and NK-mediated tumor cell lysis.

### 3.1. NK Cell Activation in the Presence of TKI

To evaluate NK cell activation in the presence of TKI, flow cytometry-based assays were performed with PBMC from healthy donors (*n* = 7) (Figure 1). All experiments were performed using two bcr-abl negative cell lines (Nalm-6, Nalm-16) and two bcr-abl positive cell lines (SD-1, TOM-1). In Nalm-6, DASA resulted in a significantly lower CD69 expression (10.3% vs. 45.7%, *p* = 0.045) (Figure 1B). Similarly, DASA reduced CD69 in Nalm-16 to 16.1% compared to the control (58.4%, *p* = 0.032) (Figure 1C). In SD-1 cells, the effects of DASA were comparable, showing 20.2% activated NK cells vs. 70.3% in control wells (*p* = 0.018) (Figure 1D). A similar trend was observed in TOM-1 cells (19.2% vs. 68.5%),

which did not reach significance ( $p = 0.073$ ) (Figure 1E). None of the other TKI induced significant differences compared to the control group.

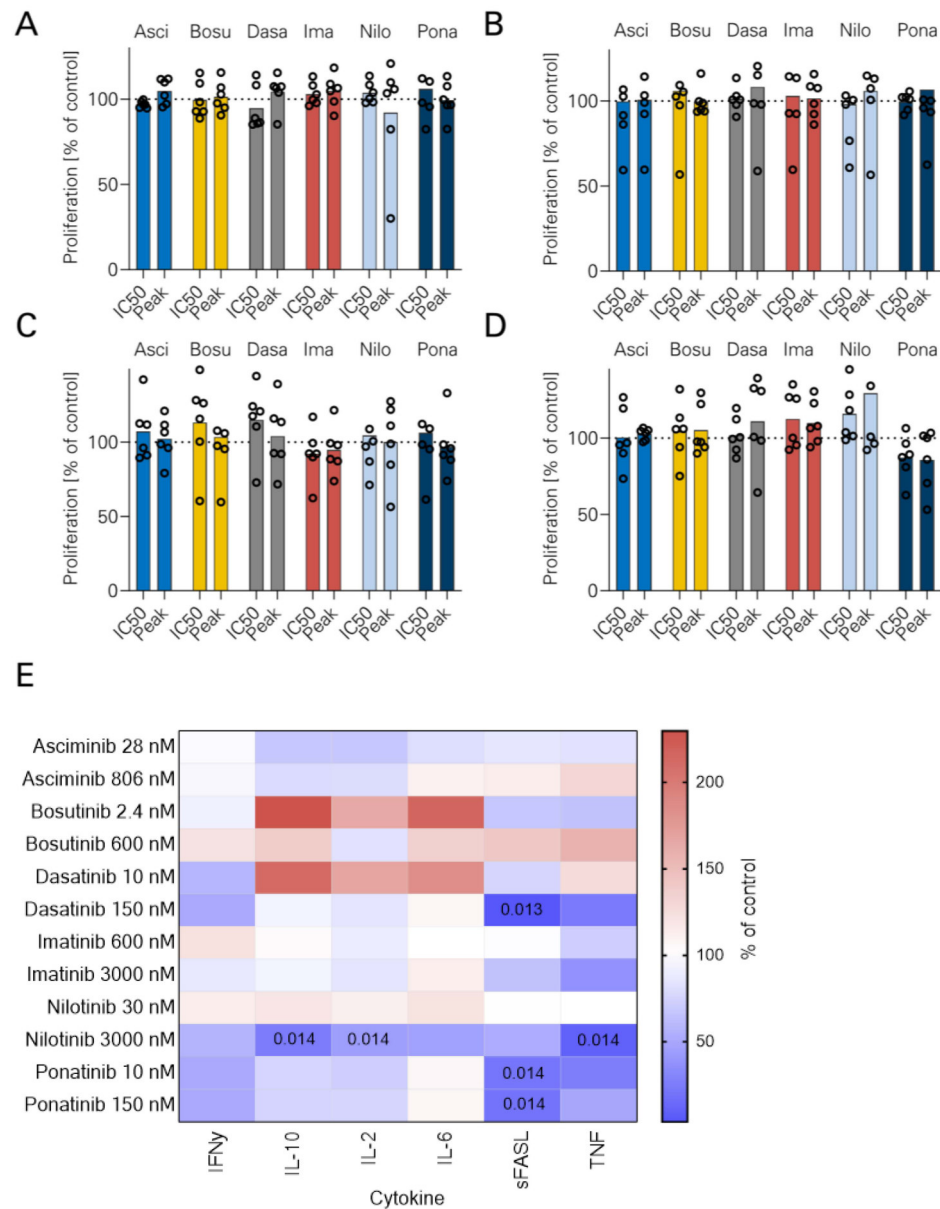


**Figure 1.** NK cell activation in the presence of TKI. ALL cell lines were cultured for 24 h together with PBMCs ( $n = 7$ ) and Rituximab +/- different TKI (Asciminib, Bosutinib, Dasatinib, Imatinib, Nilotinib, Ponatinib). CD69 expression as activation marker was measured using flow cytometry. (A) Exemplary gating strategy: Singlets–live cells–lymphocytes–CD56+CD3– NK cells–CD56+CD69+ activated subsets. The following cell lines were used: (B) BCR-ABL1-negative Nalm-6. (C) BCR-ABL1 negative Nalm-16. (D) BCR-ABL1 positive SD-1. (E) BCR-ABL1-positive TOM-1. Boxplots with Tukey whiskers. ANOVA with Bonferroni correction.

### 3.2. NK Cell Proliferation and TKI

Next, NK cell proliferation was measured using flow cytometry after 24 h stimulation with B-ALL cells with rituximab with or without TKI. No significant reduction of absolute NK cell numbers was observed with either TKI (Figure 2A–D). Additionally, cytokine

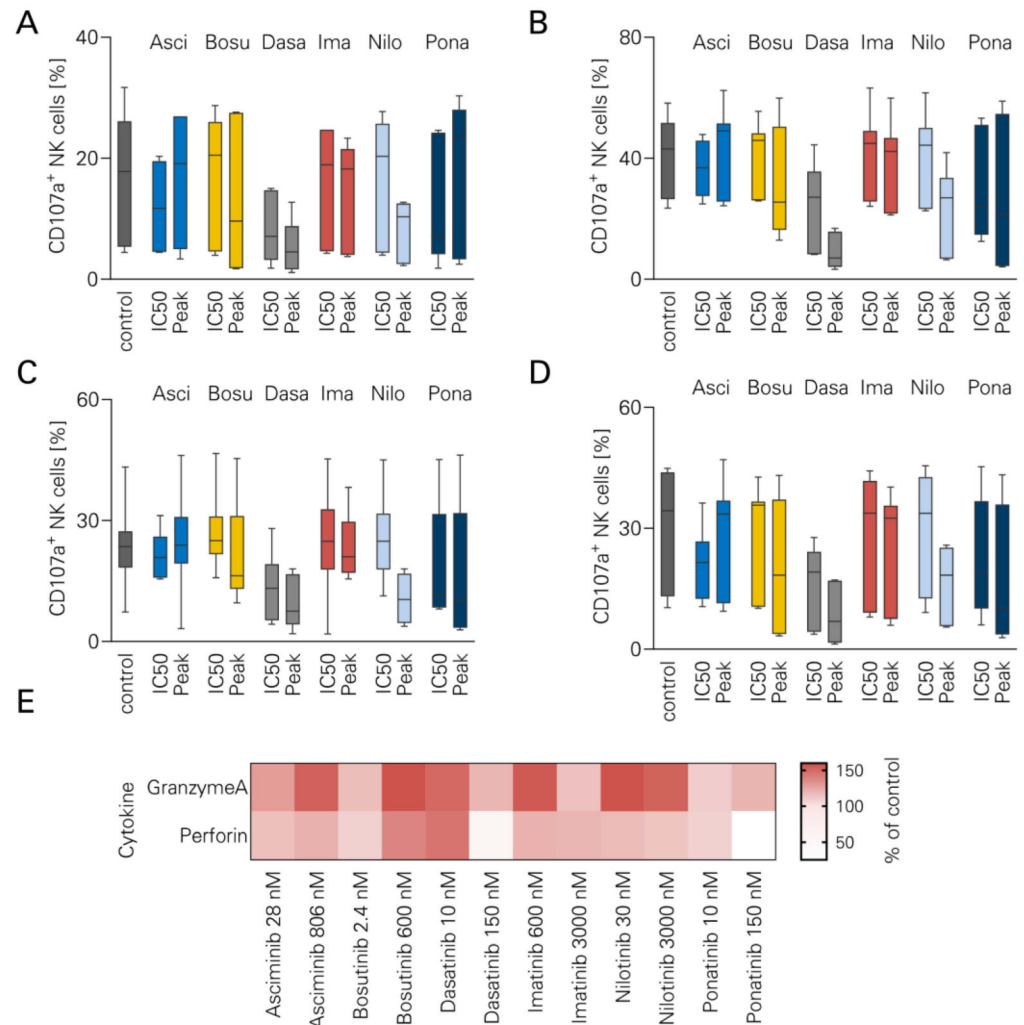
secretion by NK cells was measured using LEGENDplex assays after 24 h stimulation with rituximab (Figure 2E). Nilotinib at peak levels reduced IL-10 (2.0 versus 16.5 pg/mL,  $p = 0.014$ ) and IL-2 secretion (2.0 vs. 16.5 pg/mL,  $p = 0.014$ ) as well as TNF production (10.0 vs. 145.0 pg/mL,  $p = 0.014$ ). Ponatinib inhibited sFASL secretion at both IC50 and peak levels (3.77 and 3.48 vs. 17.5 pg/mL, respectively;  $p = 0.014$ ). Addition of Dasatinib at peak levels significantly decreased sFASL secretion (0.73 vs. 17.5 pg/mL,  $p = 0.013$ ). The latter findings suggest an inhibitory effect of SRC-ABL TKI on sFASL-mediated cell death.



**Figure 2.** NK cell proliferation and cytokine release in the presence of TKI. ALL cell lines were cultured for 24 h together with PBMCs ( $n = 6$ ) and Rituximab +/- different TKI (Asciminib, Bosutinib, Dasatinib, Imatinib, Nilotinib, Ponatinib). Absolute NK cell counts were measured using flow cytometry. The following cell lines were used: (A) BCR-ABL1-negative Nalm-6. (B) BCR-ABL1 negative Nalm-16. (C) BCR-ABL1 positive SD-1. (D) BCR-ABL1-positive TOM-1. Bar graphs (mean) with individual values. (E) After 24 h, supernatants from the abovementioned experiments ( $n = 4$  PBMC donors) were analyzed using a LEGENDplex assay. IFN $\gamma$ , IL-2, IL-6, IL10, sFASL and TNF levels were measured. Results obtained with the TOM-1 cell line are shown. ANOVA with Bonferroni correction.

### 3.3. NK Cell Degranulation and TKI

To evaluate the influence of TKI on NK cell degranulation and effector molecule secretion, CD107a levels were measured using flow cytometry after 24 h stimulation with rituximab. The gating strategy is shown in Supplementary Figure S1. No significant reduction in CD107a expression was observed with either TKI (Figure 3A–D). To validate these findings, LEGENDplex cytokine arrays were performed using supernatants from the abovementioned assays. Consistent with the preserved CD107a expression, secretion of granzyme A and perforin was not affected by either TKI (Figure 3E).

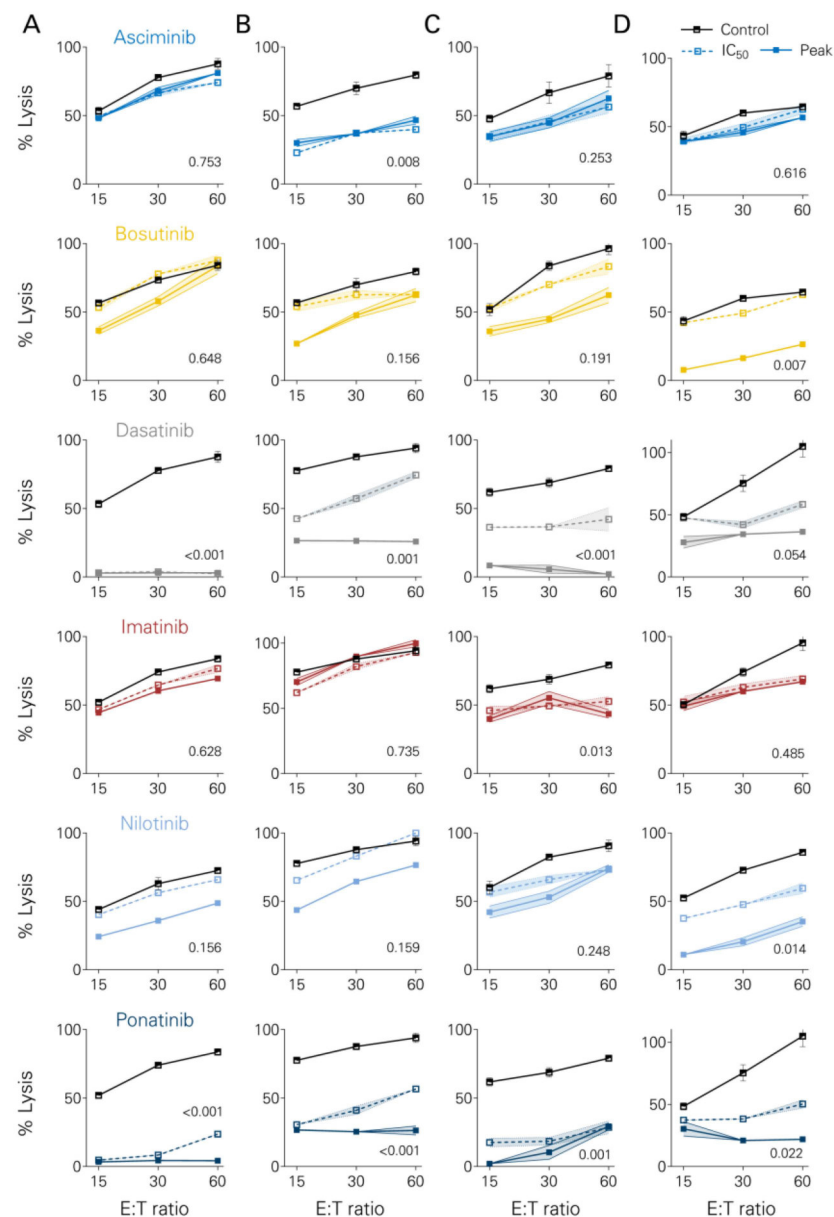


**Figure 3.** NK cell degranulation in the presence of TKI. ALL cell lines were cultured for 24 h together with PBMCs ( $n = 7$ ) and Rituximab +/- different TKI (Asciminib, Bosutinib, Dasatinib, Imatinib, Nilotinib, Ponatinib). CD107a expression as degranulation marker was measured using flow cytometry. The following cell lines were used: (A) BCR-ABL1-negative Nalm-6. (B) BCR-ABL1-negative Nalm-16. (C) BCR-ABL1 positive SD-1. (D) BCR-ABL1-positive TOM-1. Boxplots with Tukey whiskers. (E) After 24 h, supernatants from the abovementioned experiments ( $n = 4$  PBMC donors) were analyzed using a LEGENDplex assay. Granzyme A and perforin levels were measured.

### 3.4. Short-Term Lysis of Tumor Cells

Short-term lysis of B-ALL cells by NK cells was assessed using europium kill assays (Figure 4). ASCI moderately inhibited tumor cell lysis in one out of four cell lines (Nalm-16,  $p = 0.008$ ). Similarly, BOSU decreased tumor cell killing at peak levels in one cell line (TOM-1,  $p = 0.007$ ). DASA dose-dependently inhibited tumor cell killing in three out of four cell lines (Nalm-6,  $p < 0.001$ ; Nalm-16  $p < 0.001$ ; SD-1  $p < 0.001$ ). A moderate decrease in tumor cell lysis was observed with IMA only in SD-1 ( $p = 0.013$ ). NILO impaired killing

in TOM-1 ( $p = 0.014$ ), whereas PONA consistently blocked tumor cell lysis in all cell lines ( $p = 0.022$  in TOM-1,  $p < 0.001$  in other cell lines).

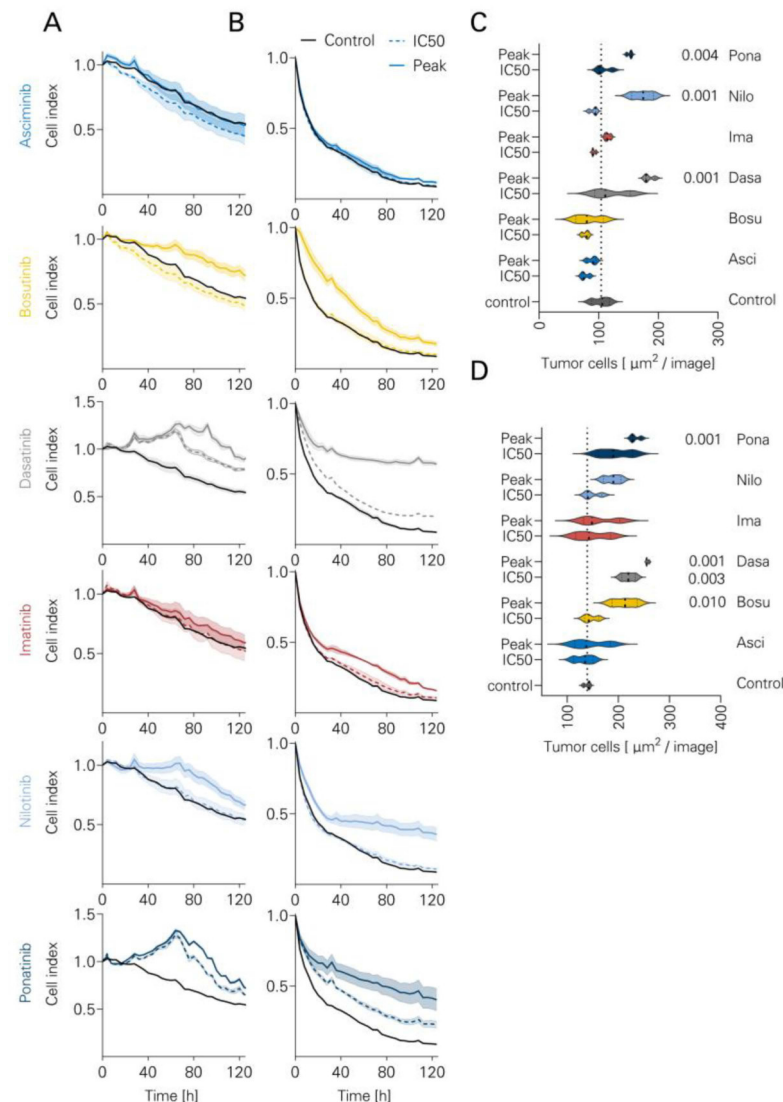


**Figure 4.** Short-term lysis of ALL cells by NK cells in the presence of TKI. Europium-loaded ALL cell lines were cultured for 4 h together with PBMCs ( $n = 3$ ) and Rituximab +/- different TKI (Asciminib, Bosutinib, Dasatinib, Imatinib, Nilotinib, Ponatinib) at effector:target (E:T) ratios of 15, 30 and 60. Europium release was measured as a marker for tumor cell lysis. Solid lines indicate TKI at peak values and dotted lines indicate conditions with IC50 levels. The following cell lines were used: (A) BCR-ABL1-negative Nalm-6. (B) BCR-ABL1-negative Nalm-16. (C) BCR-ABL1-positive SD-1. (D) BCR-ABL1-positive TOM-1. Boxplots with Tukey whiskers. ANOVA.

### 3.5. Long-Term Lysis in the Presence of TKI

To further investigate the long-term inhibitory effects of TKI, Incucyte live cell imaging assays were performed for 120 h using Nalm-6 (Figure 5A) and SD-1 (Figure 5B). Exemplary sample snapshots are shown in Supplementary Figure S2. Consistent with the short-term results, IMA and ASCI did not inhibit long-term lysis. NILO inhibited SD-1 killing at peak levels ( $p = 0.001$ ). PONA inhibited lysis of both Nalm-6 and SD-1 at peak levels ( $p = 0.001$  and  $0.004$ , respectively). BOSU inhibited killing of Nalm-6 only at peak levels

( $p = 0.010$ ). DASA inhibited killing of Nalm-6 at both concentration levels (IC50  $p = 0.003$ , peak  $p = 0.001$ ). In addition, DASA inhibited lysis of SD-1 at peak levels ( $p = 0.001$ ). Results for Nalm-16 cells and TOM-1 are shown in Supplementary Figure S3.



**Figure 5.** Long-term lysis of ALL cells by NK cells in the presence of TKI. ALL cell lines were cultured in an Incucyte real-time assay system for 120 h together with PBMCs ( $n = 3$ ) and Rituximab +/- different TKI (Asciminib, Bosutinib, Dasatinib, Imatinib, Nilotinib, Ponatinib). Cell indices indicate the presence of viable tumor cells. Solid lines indicate TKI at peak values and dotted lines indicate conditions with IC50 levels. The following cell lines were used: (A) BCR-ABL1-negative Nalm-6. (B) BCR-ABL1-positive SD-1. (C,D) Absolute numbers of viable tumor cells after 120 h coculture with NK cells, rituximab +/- TKI are shown ( $n = 3$ ). Violin plots. The following cell lines are shown: (C) Nalm-6, (D) SD-1. ANOVA with Bonferroni correction.

Finally, we investigated whether NK cell stimulation with IL-15 could help to overcome the inhibitory effects of TKI. Interestingly, NK cell proliferation observed with IL-15 could be additionally boosted in the presence of DASA (Supplementary Figure S4). Similar effects were not observed with other TKI.

In summary, DASA and PONA exhibited the most profound inhibitory effects on NK cell activation, degranulation and tumor cell killing. The other TKI had little or no effect on rituximab-mediated ADCC.

#### 4. Discussion

Patients carrying the BCR-ABL1 fusion gene represent a high-risk population within the B-ALL patient cohort. Recently, chemotherapy-sparing regimens combining TKI and immunotherapeutic agents have shown promising efficacy in these patients. However, the interplay between immunotherapy and TKI therapy remains incompletely understood. We report on the interference of the classical ATP site TKI and the STAMP inhibitor ASCI with rituximab-induced ADCC.

Asciminib is currently approved in Europe for the treatment of patients with chronic myeloid leukemia who have been treated with at least two different TKIs. Its mechanism of action is based on binding to an allosteric site, in contrast to the ATP site TKIs. Common side effects include bone marrow toxicity, elevated liver enzymes, diarrhea, rash, QTc prolongation and nausea [28]. Its use may be limited in certain patients due to its weak inhibition of CYP3A and CYP2C9 [29]. Emerging evidence suggests clinical activity of ASCI in B-ALL. In one case report, ASCI was successfully used in combination with PONA in a patient with relapsed BCR-ABL1-positive B-ALL [9]. A phase 1 study in 14 patients evaluated ASCI in combination with dasatinib and prednisone for the same indication [19]. Molecular responses were observed in 78.6% of patients after three cycles. In vitro data show that the efficacy of ASCI in NUP214-ABL1 mutated cases appears to depend on the presence of an intact ABL1 SH3 domain [30]. In vitro data from refractory cases suggest that combination treatment of ASCI with an ATP site TKI can restore efficacy in ATP site mutated cases resistant to PONA [21].

Monoclonal antibody therapy with rituximab is an important component of B-ALL therapy. CD20 expression itself is a negative prognostic marker in adult B-ALL [31] and CD20 positivity is generally defined as CD20 expression in >20% of blasts. A recent study suggests increased CD20 expression in BCR-ABL1 positive cases [5]. The addition of 16–18 doses of rituximab to multi-agent chemotherapy in a clinical trial by the GRAALL group comprising 209 patients with CD20 positive B-ALL resulted in significantly prolonged event-free survival [12]. Rituximab plus Hyper-CVAD (fractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, dexamethasone) resulted in a complete remission rate of 95% [13]. More recent data suggest that baseline CD20 expression may not be an optimal selection factor for the use of rituximab, as CD20 is upregulated upon application of steroids [32]. The same clinical trial of 586 patients applied four doses of rituximab regardless of CD20 expression and found no survival benefit. The authors suggest that a higher number of doses should be applied [32]. The Fc-optimized anti-CD19 antibody tafasitamab was tested in a phase 2a clinical trial in 22 B-ALL patients. The overall response rate was 9%, with one CR and one MRD-negative Cri [14]. These data suggest clinical activity, but also the lack of efficacy as a single-agent therapy. Therefore, combinatorial regimen should be evaluated.

Data on ASCI in combination with NK cell-based immunotherapy are scarce. Domka et al. showed similar results in B-ALL cell lines and in xenografts with NSG mice and primary patient B-ALL cells [5]. Consistent with our data, DASA and PONA inhibited NK cell function, whereas ASCI did not. BOSU, DASA, IMA, NILO and PONA target the ATP site of BCR-ABL and affect multiple off-target kinases with varying affinity. BOSU affects the phosphorylation of SRC, ERK, S6 and STAT3 [33]. DASA inhibits the phosphorylation of ERK and PI3K [17]. IMA has been reported to inhibit c-kit and PDGFR signaling [34,35]. NILO has been shown to inhibit NK cell function in part through direct toxicity [17]. PONA has been shown to inhibit PDGFR $\alpha$ , VEGFR2, FGFR1 and SRC [36,37]. For example, studies have shown that blocking SRC, ERK or PI3K can reduce the cytotoxic activity of natural killer cells [38–40]. In contrast, ASCI is reported to be a highly selective allosteric inhibitor of BCR-ABL by blocking the myristoyl pocket. It has not shown any known off-target effects on other kinases at relevant concentrations [41,42]. Variations in the effects of the tested TKIs on the cytotoxic function of NK cells in the short- and long-term may be due to differences in their targeting of off-target kinases, which may alter multiple signaling pathways.

There are some similarities between the TKI-related inhibition of bispecific antibody-mediated T cell activation by blinatumomab and inhibition of ADCC. T cell proliferation and activation is largely affected by DASA and PONA and to a lesser extent by NILO [43,44]. However, the *in vitro* data showing T cell inhibition stand in contrast to the high efficacy of the regimen consisting of DASA/PONA and the bispecific CD19×CD3 antibody blinatumomab [10,45]. The differences between *in vitro* data and clinical efficacy may be due to the short half-life of TKI and the resulting differences between *in vitro* dosing and *in vivo* pharmacokinetics [43]. As this manuscript reports *in vitro* data, NK cell inhibition may not be seen in patients to the same extent, which is a limitation of our data. Recent *in vitro* data suggest that T cell activation and metabolic fitness are not affected by ASCI [46]. In contrast to the *in vitro* data on T cells, the NK cell activation we observed seems to be more robust even in the presence of an inhibitory TKI. Furthermore, certain effector molecules were not affected by TKI, whereas T cell-derived cytokines are strongly affected by co-treatment with TKI [43,44]. While blinatumomab has revolutionized the treatment of B-ALL, the timing of bispecific antibody therapy and chemotherapy remains unclear. In contrast, monospecific antibodies are easily combined with a variety of chemotherapeutic agents, but lack efficacy as monotherapies [14].

Given the results presented here and their relevance, there is ample room for further research. An evaluation of the relevant effects of the TKIs described here in an *in vivo* model would strengthen the conclusions drawn. This would also help to clarify the effects of other mechanisms of action induced by rituximab. For example, antigen-dependent cellular phagocytosis by macrophages, complement-dependent cytotoxicity and effector functions of neutrophils are not reflected in our setting, but may help to further validate and strengthen our findings.

The interplay between TKI and immunotherapy is complex. We report that IL-15 can overcome the inhibitory effects of DASA on NK cells and that the combination may induce further NK cell proliferation. Monoclonal antibody therapy may therefore be combined with additional cytokine treatments. Further animal studies and clinical trials incorporating pharmacokinetics are needed to fully evaluate the potential of combining TKI and monoclonal antibody therapy in BCR-ABL1-positive B-ALL patients. Given the non-interference of ASCI with ADCC, a head-to-head trial evaluating different TKI in BCR-ABL1-positive B-ALL should be performed.

## 5. Conclusions

To the best of our knowledge, we here provide the first full-length report on the effects of ASCI on NK cell-mediated ADCC in B-ALL. Our data support further preclinical and clinical analysis of ASCI in B-ALL.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers16071288/s1>, Figure S1: Flow cytometric gating strategy for degranulation assays; Figure S2: Exemplary data from Incucyte long-term lysis assays; Figure S3: Long-term lysis of ALL cells by NK cells in the presence of TKI; Figure S4: NK cell proliferation induced by IL-15 in the presence of TKI.

**Author Contributions:** Conceptualization: S.J.H., M.M. and J.K.; Data curation: S.J.H. and M.M.; Formal analysis: J.K., J.M., S.J.H. and T.R.; Funding acquisition: M.M.; Investigation: S.J.H., J.M., M.M. and J.K.; Methodology: S.J.H. and J.K.; Resources: M.M.; Supervision: M.M.; Visualization: S.J.H., T.R. and J.K.; Writing—original draft, J.K.; Writing—review & editing, M.M., S.J.H. and T.R. and J.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by grants from Deutsche Forschungsgemeinschaft (MA 9302/2–1 to M.M.) and Deutsche Krebshilfe (70113496 to M.M.). We acknowledge support from the Open Access Publishing Fund of the University of Tübingen.

**Institutional Review Board Statement:** All experiments were performed according to the Helsinki protocol and approved by the Ethics Committee of the University of Tübingen (vote: 13/2007V).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all enrolled healthy blood donors.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** The authors thank Tatjana Schreiber for expert technical assistance. The graphical abstract was created with BioRender.com.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

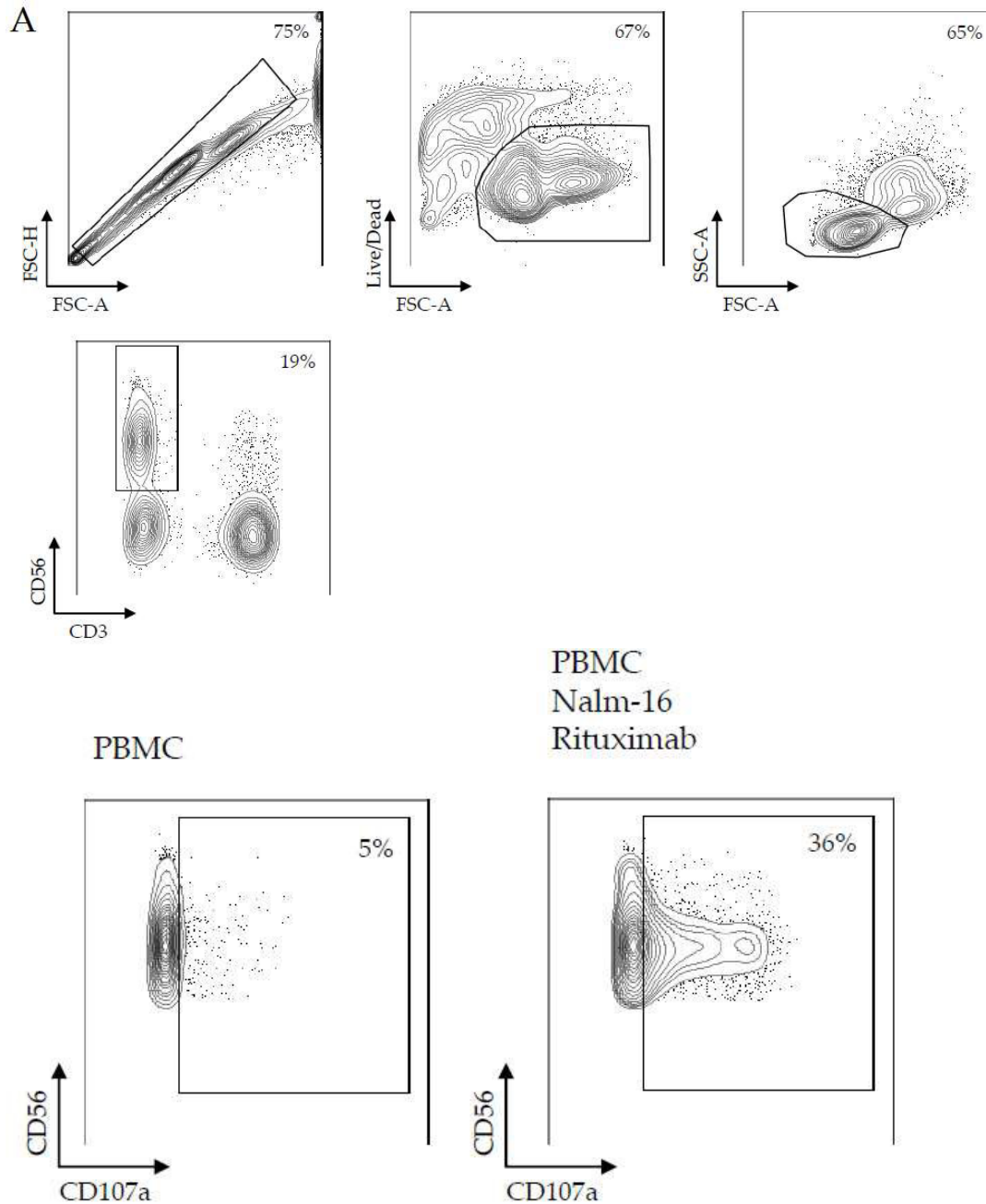
## References

1. Hunger, S.P.; Mullighan, C.G. Redefining ALL classification: Toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine. *Blood J. Am. Soc. Hematol.* **2015**, *125*, 3977–3987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Komorowski, L.; Fidy, K.; Patkowska, E.; Firczuk, M. Philadelphia Chromosome-Positive Leukemia in the Lymphoid Lineage—Similarities and Differences with the Myeloid Lineage and Specific Vulnerabilities. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Druker, B.J.; Guilhot, F.; O'Brien, S.G.; Gathmann, I.; Kantarjian, H.; Gattermann, N.; Deininger, M.W.; Silver, R.T.; Goldman, J.M.; Stone, R.M. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 2408–2417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Chang, J.; Douer, D.; Aldoss, I.; Vahdani, G.; Jeong, A.R.; Ghaznavi, Z.; Zhang, S.; Yaghmour, G.; Lee, K.J.; Weissman, A. Combination chemotherapy plus dasatinib leads to comparable overall survival and relapse-free survival rates as allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Med.* **2019**, *8*, 2832–2839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Domka, K.; Poprzeczko, M.; Urbanska, Z.; Komorowski, L.; Pastorczak, A.; Fidy, K.; Dabkowska, A.; Lachota, M.; Winiarska, M.; Siudakowska, K. Optimizing the therapeutic potential of tyrosine kinase inhibitors in chemo-immunotherapy of B-cell acute lymphoblastic leukemia involving rituximab. *Cancer Res.* **2022**, *82*, 3324. [[CrossRef](#)]
6. Fielding, A.K.; Rowe, J.M.; Buck, G.; Feroni, L.; Gerrard, G.; Litzow, M.R.; Lazarus, H.; Luger, S.M.; Marks, D.I.; McMillan, A.K. UKALLXII/ECOG2993: Addition of imatinib to a standard treatment regimen enhances long-term outcomes in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **2014**, *123*, 843–850. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Kantarjian, H.M.; O'Brien, S.; Smith, T.L.; Cortes, J.; Giles, F.J.; Beran, M.; Pierce, S.; Huh, Y.; Andreeff, M.; Koller, C. Results of treatment with hyper-CVAD, a dose-intensive regimen, in adult acute lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* **2000**, *18*, 547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. King, A.C.; Pappacena, J.J.; Tallman, M.S.; Park, J.H.; Geyer, M.B. Blinatumomab administered concurrently with oral tyrosine kinase inhibitor therapy is a well-tolerated consolidation strategy and eradicates measurable residual disease in adults with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.* **2019**, *79*, 27–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Zerbit, J.; Tamburini, J.; Goldwirt, L.; Decroocq, J.; Cayuela, J.M.; Chapuis, N.; Contejean, A.; Batista, R.; Bouscary, D.; Willems, L. Asciminib and ponatinib combination in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Lymphoma* **2021**, *62*, 3558–3560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Foà, R.; Bassan, R.; Vitale, A.; Elia, L.; Piciocchi, A.; Puzzolo, M.-C.; Canichella, M.; Viero, P.; Ferrara, F.; Lunghi, M. Dasatinib–blinatumomab for Ph-positive acute lymphoblastic leukemia in adults. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 1613–1623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Advani, A.S.; Moseley, A.; O'Dwyer, K.M.; Wood, B.L.; Park, J.; Wieduwilt, M.; Jeyakumar, D.; Yaghmour, G.; Atallah, E.L.; Gerds, A.T. Dasatinib/prednisone induction followed by blinatumomab/dasatinib in Ph+ acute lymphoblastic leukemia. *Blood Adv.* **2023**, *7*, 1279–1285. [[CrossRef](#)]
12. Maury, S.; Chevret, S.; Thomas, X.; Heim, D.; Leguay, T.; Huguet, F.; Chevallier, P.; Hunault, M.; Boissel, N.; Escoffre-Barbe, M. Rituximab in B-lineage adult acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 1044–1053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Thomas, D.A.; O'Brien, S.; Faderl, S.; Garcia-Manero, G.; Ferrajoli, A.; Wierda, W.; Ravandi, F.; Verstovsek, S.; Jorgensen, J.L.; Bueso-Ramos, C. Chemoimmunotherapy with a modified hyper-CVAD and rituximab regimen improves outcome in de novo Philadelphia chromosome–negative precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 3880. [[CrossRef](#)]
14. Klisovic, R.B.; Leung, W.H.; Brugger, W.; Dimberger-Hertweck, M.; Winderlich, M.; Ambarkhane, S.V.; Jabbour, E.J. A phase 2a, single-arm, open-label study of tafasitamab, a humanized, Fc-modified, anti-CD19 antibody, in patients with relapsed/refractory B-precursor cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* **2021**, *127*, 4190–4197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Wang, A.; Song, Z.; Zheng, G.; Nicolazzi, C.; Fromm, J.R.; Shehu, E.; Srinivasan, S.; Chen, X.; Zhu, C.; Blondel, M.C. Evaluation of preclinical activity of isatuximab in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Mol. Cancer Ther.* **2021**, *20*, 1916–1925. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Raetz, E.A.; Cairo, M.S.; Borowitz, M.J.; Lu, X.; Devidas, M.; Reid, J.M.; Goldenberg, D.M.; Wegener, W.A.; Zeng, H.; Whitlock, J.A. Re-induction chemoimmunotherapy with epratuzumab in relapsed acute lymphoblastic leukemia (ALL): Phase II results from Children's Oncology Group (COG) study ADVL04P2. *Pediatr. Blood Cancer* **2015**, *62*, 1171–1175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Salih, J.; Hilpert, J.; Placke, T.; Grünebach, F.; Steinle, A.; Salih, H.R.; Krusch, M. The BCR/ABL-inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib differentially affect NK cell reactivity. *Int. J. Cancer* **2010**, *127*, 2119–2128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

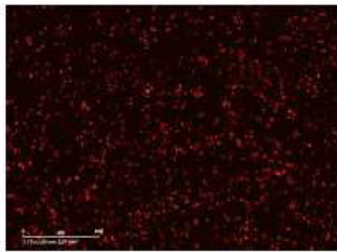
18. Zitvogel, L.; Rusakiewicz, S.; Routy, B.; Ayyoub, M.; Kroemer, G. Immunological off-target effects of imatinib. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2016**, *13*, 431–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Lusk, M.; Murakami, M.A.; Stevenson, K.E.; Wadleigh, M.; McMasters, M.; Winter, P.; Weinstock, D.M.; Stone, R.; DeAngelo, D.J. A phase I study of asciminib (ABL001) in combination with dasatinib and prednisone for untreated BCR-ABL1-positive ALL in older adults. *Blood* **2019**, *134*, 3879. [[CrossRef](#)]
20. Kantarjian, H.; Giles, F.; Wunderle, L.; Bhalla, K.; O'Brien, S.; Wassmann, B.; Tanaka, C.; Manley, P.; Rae, P.; Mietlowski, W. Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *354*, 2542–2551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Eide, C.A.; Zabriskie, M.S.; Stevens, S.L.S.; Antelope, O.; Vellore, N.A.; Than, H.; Schultz, A.R.; Clair, P.; Bowler, A.D.; Pomicter, A.D. Combining the allosteric inhibitor asciminib with ponatinib suppresses emergence of and restores efficacy against highly resistant BCR-ABL1 mutants. *Cancer Cell* **2019**, *36*, 431–443.e435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Abbas, R.; Hsyu, P.-H. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of bosutinib. *Clin. Pharmacokinet.* **2016**, *55*, 1191–1204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Golas, J.M.; Arndt, K.; Etienne, C.; Lucas, J.; Nardin, D.; Gibbons, J.; Frost, P.; Ye, F.; Boschelli, D.H.; Boschelli, F. SKI-606, a 4-anilino-3-quinolinecarbonitrile dual inhibitor of Src and Abl kinases, is a potent antiproliferative agent against chronic myelogenous leukemia cells in culture and causes regression of K562 xenografts in nude mice. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 375–381. [[PubMed](#)]
24. Hughes, T.P.; Mauro, M.J.; Cortes, J.E.; Minami, H.; Rea, D.; DeAngelo, D.J.; Breccia, M.; Goh, Y.-T.; Talpaz, M.; Hochhaus, A. Asciminib in chronic myeloid leukemia after ABL kinase inhibitor failure. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 2315–2326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Rix, U.; Hantschel, O.; Dürnberger, G.; Remsing Rix, L.L.; Planyavsky, M.; Fernbach, N.V.; Kaupe, I.; Bennett, K.L.; Valent, P.; Colinge, J. Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets. *Blood J. Am. Soc. Hematol.* **2007**, *110*, 4055–4063. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Menna, P.; De Grazia, U.; Marchesi, F.; Minotti, G.; Salvatorelli, E. Further analytical, pharmacokinetic, and clinical observations on low-dose ponatinib in patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Chemotherapy* **2020**, *65*, 35–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Peng, B.; Hayes, M.; Resta, D.; Racine-Poon, A.; Druker, B.J.; Talpaz, M.; Sawyers, C.L.; Rosamilia, M.; Ford, J.; Lloyd, P. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients. *J. Clin. Oncol.* **2004**, *22*, 935–942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Hochhaus, A.; Réa, D.; Boquimpani, C.; Minami, Y.; Cortes, J.E.; Hughes, T.P.; Apperley, J.F.; Lomaia, E.; Voloshin, S.; Turkina, A. Asciminib vs bosutinib in chronic-phase chronic myeloid leukemia previously treated with at least two tyrosine kinase inhibitors: Longer-term follow-up of ASCSEMBL. *Leukemia* **2023**, *37*, 617–626. [[CrossRef](#)]
29. Hoch, M.; Sengupta, T.; Hourcade-Potelleret, F. Pharmacokinetic drug interactions of asciminib with the sensitive cytochrome P450 probe substrates midazolam, warfarin, and repaglinide in healthy participants. *Clin. Transl. Sci.* **2022**, *15*, 1406–1416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Eadie, L.N.; Schutz, C.E.; Page, E.C.; Conlin, T.S.; Heatley, S.L.; Lagonik, E.; Rehn, J.A.; Yeung, D.T.; Hughes, T.P.; White, D.L. Asciminib Is Effective Against ABL1 Gene Fusions in Acute Lymphoblastic Leukemia but Only When the ABL1 SH3 Domain Is Present. *Blood* **2023**, *142*, 1602. [[CrossRef](#)]
31. Maury, S.; Huguot, F.; Leguay, T.; Lacombe, F.; Maynadié, M.; Girard, S.; de Labarthe, A.; Kuhlein, E.; Raffoux, E.; Thomas, X. Adverse prognostic significance of CD20 expression in adults with Philadelphia chromosome-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **2010**, *95*, 324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Marks, D.I.; Kirkwood, A.A.; Rowntree, C.J.; Aguiar, M.; Bailey, K.E.; Beaton, B.; Cahalin, P.; Castleton, A.Z.; Clifton-Hadley, L.; Copland, M. Addition of four doses of rituximab to standard induction chemotherapy in adult patients with precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia (UKALL14): A phase 3, multicentre, randomised controlled trial. *Lancet Haematol.* **2022**, *9*, e262–e275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Bieerkehazhi, S.; Chen, Z.; Zhao, Y.; Yu, Y.; Zhang, H.; Vasudevan, S.A.; Woodfield, S.E.; Tao, L.; Yi, J.S.; Muscal, J.A.; et al. Novel Src/Abl tyrosine kinase inhibitor bosutinib suppresses neuroblastoma growth via inhibiting Src/Abl signaling. *Oncotarget* **2017**, *8*, 1469–1480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Heinrich, M.C.; Griffith, D.J.; Druker, B.J.; Wait, C.L.; Ott, K.A.; Zigler, A.J. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* **2000**, *96*, 925–932. [[CrossRef](#)]
35. Ballinger, M.L.; Osman, N.; Hashimura, K.; de Haan, J.B.; Jandeleit-Dahm, K.; Allen, T.; Tannock, L.R.; Rutledge, J.C.; Little, P.J. Imatinib inhibits vascular smooth muscle proteoglycan synthesis and reduces LDL binding in vitro and aortic lipid deposition in vivo. *J. Cell Mol. Med.* **2010**, *14*, 1408–1418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. O'Hare, T.; Pollock, R.; Stoffregen, E.P.; Keats, J.A.; Abdullah, O.M.; Moseson, E.M.; Rivera, V.M.; Tang, H.; Metcalf, C.A., 3rd; Bohacek, R.S.; et al. Inhibition of wild-type and mutant Bcr-Abl by AP23464, a potent ATP-based oncogenic protein kinase inhibitor: Implications for CML. *Blood* **2004**, *104*, 2532–2539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Gozgit, J.M.; Wong, M.J.; Wardwell, S.; Tyner, J.W.; Loriaux, M.M.; Mohemmad, Q.K.; Narasimhan, N.I.; Shakespeare, W.C.; Wang, F.; Druker, B.J.; et al. Potent activity of ponatinib (AP24534) in models of FLT3-driven acute myeloid leukemia and other hematologic malignancies. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 1028–1035. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

38. Oykman, P.; Timm-McCann, M.; Xiang, R.F.; Islam, A.; Li, S.S.; Stack, D.; Huston, S.M.; Ma, L.L.; Mody, C.H. Requirement and redundancy of the Src family kinases Fyn and Lyn in perforin-dependent killing of *Cryptococcus neoformans* by NK cells. *Infect. Immun.* **2013**, *81*, 3912–3922. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Tan, S.; Xu, Y.; Wang, Z.; Wang, T.; Du, X.; Song, X.; Guo, X.; Peng, J.; Zhang, J.; Liang, Y.; et al. Tim-3 Hampers Tumor Surveillance of Liver-Resident and Conventional NK Cells by Disrupting PI3K Signaling. *Cancer Res.* **2020**, *80*, 1130–1142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Romeo, V.; Gierke, S.; Edgar, K.A.; Liu, S.D. Effects of PI3K Inhibition on Afucosylated Antibody-Driven FcγRIIIa Events and Phospho-S6 Activity in NK Cells. *J. Immunol.* **2019**, *203*, 137–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Wylie, A.A.; Schoepfer, J.; Jahnke, W.; Cowan-Jacob, S.W.; Loo, A.; Furet, P.; Marzinzik, A.L.; Pelle, X.; Donovan, J.; Zhu, W.; et al. The allosteric inhibitor ABL001 enables dual targeting of BCR-ABL1. *Nature* **2017**, *543*, 733–737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Manley, P.W.; Barys, L.; Cowan-Jacob, S.W. The specificity of asciminib, a potential treatment for chronic myeloid leukemia, as a myristate-pocket binding ABL inhibitor and analysis of its interactions with mutant forms of BCR-ABL1 kinase. *Leuk. Res.* **2020**, *98*, 106458. [[CrossRef](#)]
43. Leonard, J.T.; Kosaka, Y.; Malla, P.; LaTocha, D.; Lambie, A.; Hayes-Lattin, B.; Byrd, K.; Druker, B.J.; Tyner, J.W.; Chang, B.H. Concomitant use of a dual Src/ABL kinase inhibitor eliminates the in vitro efficacy of blinatumomab against Ph+ ALL. *Blood J. Am. Soc. Hematol.* **2021**, *137*, 939–944. [[CrossRef](#)]
44. Kauer, J.; Märklin, M.; Pflügler, M.; Hörner, S.; Hinterleitner, C.; Tandler, C.; Jung, G.; Salih, H.R.; Heitmann, J.S. BCR:: ABL1 tyrosine kinase inhibitors hamper the therapeutic efficacy of blinatumomab in vitro. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2022**, *148*, 2759–2771. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Assi, R.; Kantarjian, H.; Short, N.J.; Daver, N.; Takahashi, K.; Garcia-Manero, G.; DiNardo, C.; Burger, J.; Cortes, J.; Jain, N. Safety and efficacy of blinatumomab in combination with a tyrosine kinase inhibitor for the treatment of relapsed Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **2017**, *17*, 897–901. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Häselbarth, L.; Karow, A.; Mentz, K.; Böttcher, M.; Roche-Lancaster, O.; Krumbholz, M.; Jitschin, R.; Mougiakakos, D.; Metzler, M. Effects of the STAMP-inhibitor asciminib on T cell activation and metabolic fitness compared to tyrosine kinase inhibition by imatinib, dasatinib, and nilotinib. *Cancer Immunol. Immunother.* **2023**, *72*, 1661–1672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

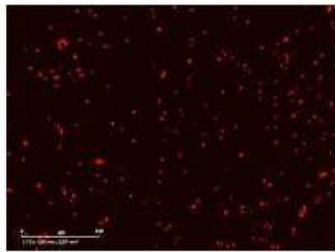
**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



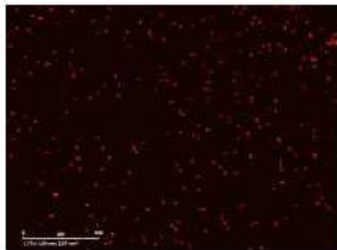
**SUPPLEMENTARY FIGURE S1 Flow cytometric gating strategy for degranulation assays.** Co-cultures of PBMC and tumor cells (exemplified by Nalm-16) were gated as follows: singlets, live cells, lymphocytes, CD56+CD3-NK cells, CD107a as surrogate marker for degranulation.



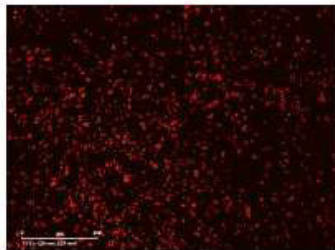
Nalm-16  
PBMC



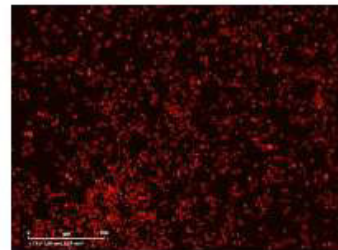
Nalm-16  
PBMC  
Rituximab



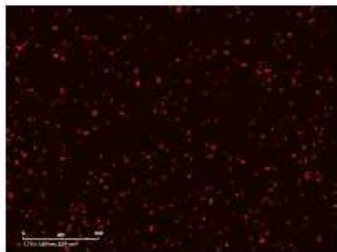
Nalm-16  
PBMC  
Rituximab  
Asciminib Peak



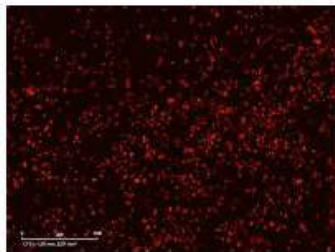
Nalm-16  
PBMC  
Rituximab  
Bosutinib Peak



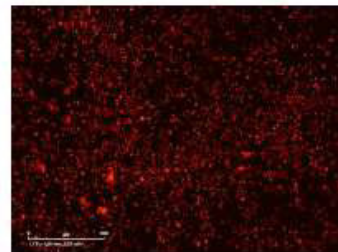
Nalm-16  
PBMC  
Rituximab  
Dasatinib Peak



Nalm-16  
PBMC  
Rituximab  
Imatinib Peak

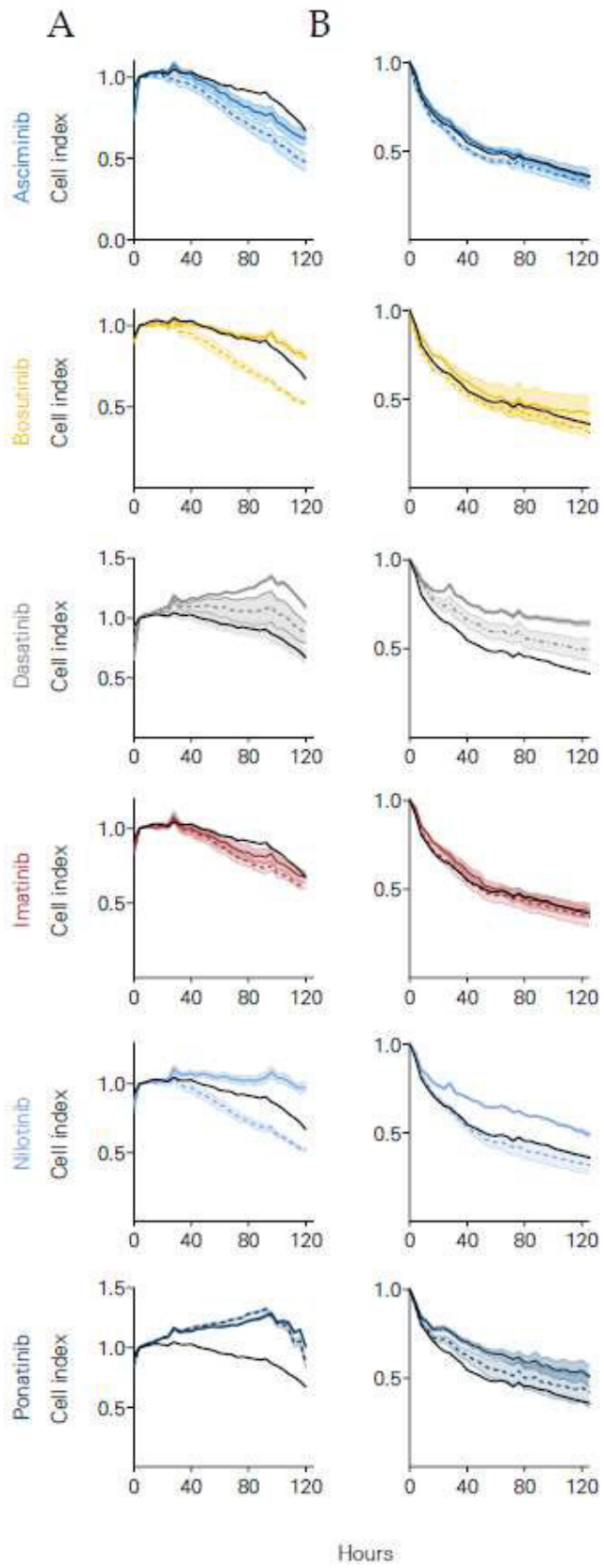


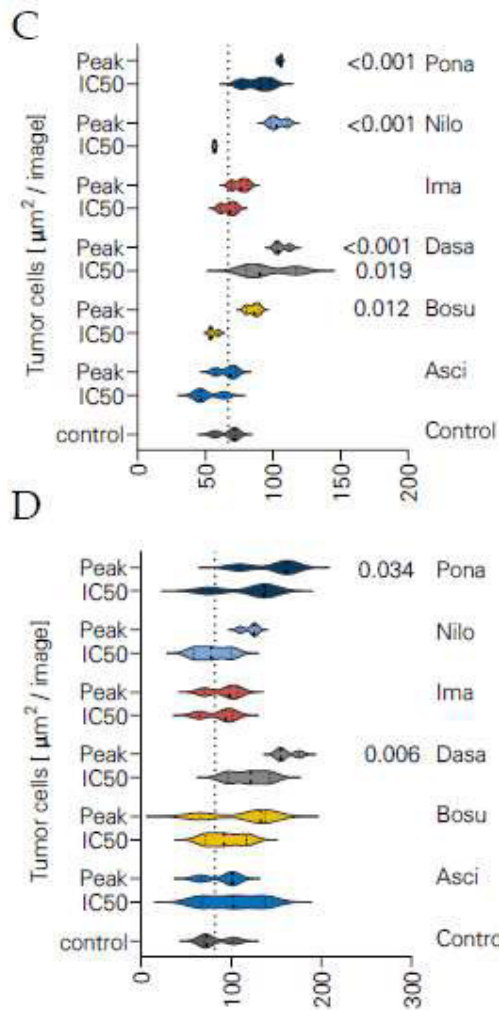
Nalm-16  
PBMC  
Rituximab  
Nilotinib Peak



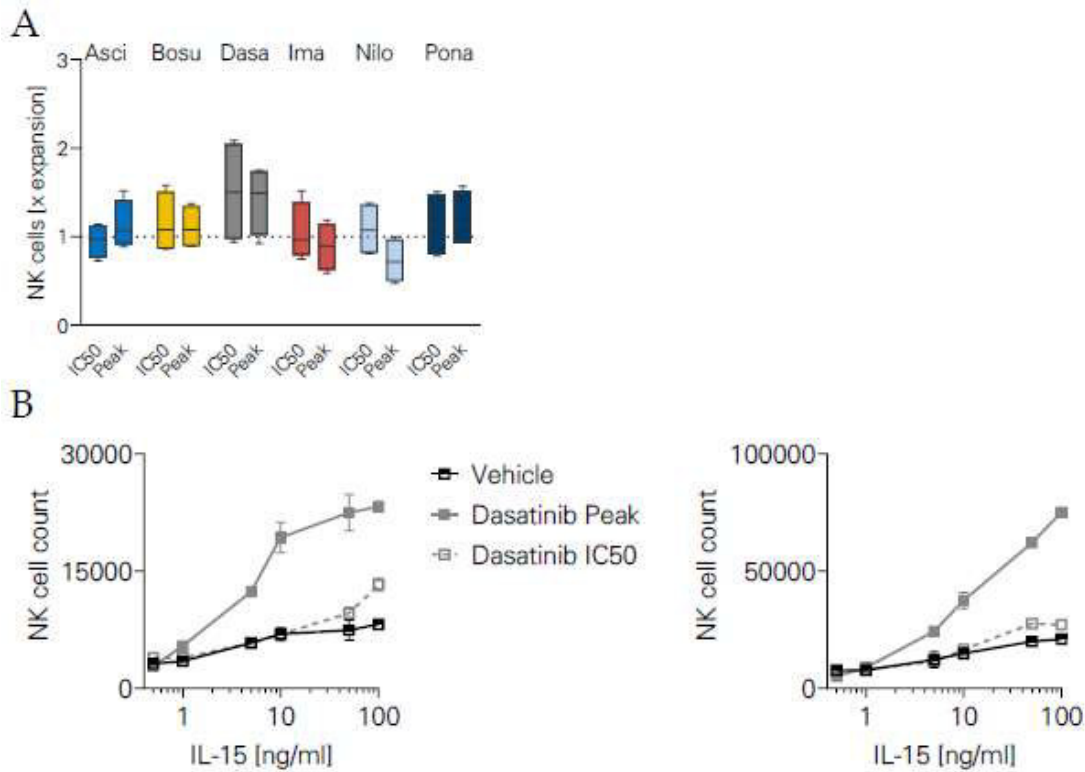
Nalm-16  
PBMC  
Rituximab  
Ponatinib Peak

**SUPPLEMENTARY FIGURE S2 Exemplary data from Incucyte long-term lysis assays.**  
A Snapshots showing the abundance of viable tumor cells (red fluorescent) after 80 hours under different conditions.





**SUPPLEMENTARY FIGURE S3 Long-term lysis of ALL cells by NK cells in the presence of TKI.** ALL cell lines were cultured in an Incucyte real-time assay system for 120 hours together with PBMC (n=3) and Rituximab +/- different TKI (Asciminib, Bosutinib, Dasatinib, Imatinib, Nilotiib, Ponatinib). Cell indices indicate the presence of viable tumor cells. The following cell lines were used: **A** BCR::ABL1-negative Nalm-16. **B** BCR::ABL1-positive TOM-1. **C-D** Absolute numbers of viable tumor cells after 120 h co-culture with NK cells, rituximab +/- TKI are shown. The following cell lines are shown: **C** Nalm-16, **D** TOM-1. ANOVA with Bonferroni correction.



**SUPPLEMENTARY FIGURE S4 NK cell proliferation induced by IL-15 in the presence of TKI.** PBMC (n=4) were cultured for 7 days with IL-15 at 10ng/ml +/- different TKI (Asciminib, Bosutinib, Dasatinib, Imatinib, Nilotiib, Ponatinib). **A** Relative NK cell expansion with PBMC + IL-15 + TKI versus PBMC + IL-15 (control, set to 1.0). **B** Exemplary dose curves indicating NK cell proliferation in the presence of varying IL-15 doses +/- dasatinib.



Article

# Targeting NKG2DL with Bispecific NKG2D–CD16 and NKG2D–CD3 Fusion Proteins on Triple–Negative Breast Cancer

Polina Kaidun <sup>1,2,†</sup>, Samuel J. Holzmayer <sup>1,2,†</sup>, Sarah M. Greiner <sup>1,2,3</sup>, Anna Seller <sup>1,2,3</sup>, Christian M. Tegeler <sup>3</sup>, Ilona Hagelstein <sup>1,2</sup>, Jonas Mauermann <sup>1,2</sup>, Tobias Engler <sup>3</sup>, André Koch <sup>3</sup>, Andreas D. Hartkopf <sup>3</sup>, Helmut R. Salih <sup>1,2</sup> and Melanie Märklin <sup>1,2,\*</sup>

- <sup>1</sup> Clinical Collaboration Unit Translational Immunology, German Cancer Consortium (DKTK), Department of Internal Medicine, University Hospital Tuebingen, 72076 Tuebingen, Germany; polina.kaidun@med.uni-tuebingen.de (P.K.); samuel.holzmayer@med.uni-tuebingen.de (S.J.H.); sarah.maria.greiner@med.uni-tuebingen.de (S.M.G.); anna.seller@med.uni-tuebingen.de (A.S.); ilona.hagelstein@med.uni-tuebingen.de (I.H.); jonas.mauermann@med.uni-tuebingen.de (J.M.); helmut.salih@med.uni-tuebingen.de (H.R.S.)
- <sup>2</sup> Cluster of Excellence iFIT (EXC 2180) ‘Image–Guided and Functionally Instructed Tumor Therapies’, Eberhard Karls University Tuebingen, 72074 Tuebingen, Germany
- <sup>3</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital Tuebingen, 72076 Tuebingen, Germany; christian.tegeler@med.uni-tuebingen.de (C.M.T.); tobias.engler@med.uni-tuebingen.de (T.E.); andre.koch@med.uni-tuebingen.de (A.K.); andreas.hartkopf@med.uni-tuebingen.de (A.D.H.)
- \* Correspondence: melanie.maerklin@med.uni-tuebingen.de
- † These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** Triple–negative breast cancer (TNBC) is a particularly aggressive subtype of breast cancer with a poor response rate to conventional systemic treatment and high relapse rates. Members of the natural killer group 2D ligand (NKG2DL) family are expressed on cancer cells but are typically absent from healthy tissues; thus, they are promising tumor antigens for novel immunotherapeutic approaches. We developed bispecific fusion proteins (BFPs) consisting of the NKG2D receptor domain targeting multiple NKG2DLs, fused to either anti–CD3 (NKG2D–CD3) or anti–CD16 (NKG2D–CD16) Fab fragments. First, we characterized the expression of the NKG2DLs (MICA, MICB, ULBP1–4) on TNBC cell lines and observed the highest surface expression for MICA and ULBP2. Targeting TNBC cells with NKG2D–CD3/CD16 efficiently activated both NK and T cells, leading to their degranulation and cytokine release and lysis of TNBC cells. Furthermore, PBMCs from TNBC patients currently undergoing chemotherapy showed significantly higher NK and T cell activation and tumor cell lysis when stimulated with NKG2D–CD3/CD16. In conclusions, BFPs activate and direct the NK and T cells of healthy and TNBC patients against TNBC cells, leading to efficient eradication of tumor cells. Therefore, NKG2D–based NK and T cell engagers could be a valuable addition to the treatment options for TNBC patients.

**Keywords:** NKG2D; bispecific; fusion protein; TNBC; breast cancer; NK cell; T cell; immunotherapy



**Citation:** Kaidun, P.; Holzmayer, S.J.; Greiner, S.M.; Seller, A.; Tegeler, C.M.; Hagelstein, I.; Mauermann, J.; Engler, T.; Koch, A.; Hartkopf, A.D.; et al. Targeting NKG2DL with Bispecific NKG2D–CD16 and NKG2D–CD3 Fusion Proteins on Triple–Negative Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 13156. <https://doi.org/10.3390/ijms241713156>

Academic Editor: Anna Kawiak

Received: 28 July 2023

Revised: 18 August 2023

Accepted: 22 August 2023

Published: 24 August 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Invasive breast cancer (IBC) is the most common malignancy in women worldwide [1]. The absence of estrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth receptor 2 (HER2) is classified as triple–negative breast cancer (TNBC). TNBC accounts for up to 20% of all breast cancers, and remains one of the most difficult to cure. It also exhibits a particularly aggressive phenotype compared to other subtypes of IBC [2,3]. TNBC patients typically receive conventional chemotherapy [4,5], but the recent introduction of PD1/PDL1 checkpoint inhibitors such as Pembrolizumab and Atezolizumab enhance T–cell–mediated anti–tumor effects and improve outcomes in TNBC. However, recurrence rates remain high, and the management of metastatic disease remains challenging [6].

The natural killer group 2D ligand (NKG2DL) family consists of the MHC class I-related chain (MIC) MICA and MICB and the UL16-binding proteins (ULBP) ULBP1–6. NKG2DLs are generally absent on healthy tissues, but are induced upon cellular stress such as malignant transformation or infection [7]. NKG2DLs are potent inducers of antitumor immunity by activating natural killer (NK) cells and T cells after binding to the NKG2D receptor. This leads to the release of effector granules such as perforin and granzyme, thereby inducing apoptosis of the tumor cells [8]. NKG2DL expression can be further enhanced by treatment with various DNA-damaging chemotherapeutic agents such as doxorubicin [9]. It has been reported that all TNBCs express NKG2DL [10]. Therefore, NKG2DLs are promising tumor antigens, and there are many therapeutic approaches targeting the NKG2DL/NKG2D axis are currently under clinical investigation. These include chimeric antigen receptor T cells (CAR-T) or chimeric antigen receptor NK cells (CAR-NK), or an anti-MICA/MICB monoclonal antibody, which have induced partial responses in leukemia and multiple myeloma patients (NCT04550663, NCT05117476, NCT05117476) [11,12]. We have previously targeted NKG2DLs with NKG2D fusion proteins, in which the extracellular domain of the NKG2D receptor was fused to an antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)-optimized Fc-IgG1 moiety. With this construct, we were able to successfully induce NK cell reactivity and induce lysis of IBC cells [13]. In general, monoclonal antibodies (mAbs) and IgG fusion proteins face two problems. First, they can only activate NK cells as effector cells, and second, their Fc parts can also bind to inhibitory Fcγ receptors, which reduces their cytotoxic effect [14]. To overcome these hurdles, we improved the anti-tumor activity by creating bispecific fusion proteins (BFPs) with the NKG2D receptor domain linked to anti-CD16 or anti-CD3 Fab fragments to direct the NK cells or cytotoxic T lymphocytes against tumor cells. The main advantage of these two constructs is, on the one hand, that binding to inhibitory Fcγ receptors is prevented by the anti-CD16 part and, on the other hand, that T cells with higher cytotoxic potential, can be recruited by the anti-CD3 part. These BFPs have already been shown to have potent anti-tumor effects against soft tissue sarcomas and acute myeloid leukemia [15,16].

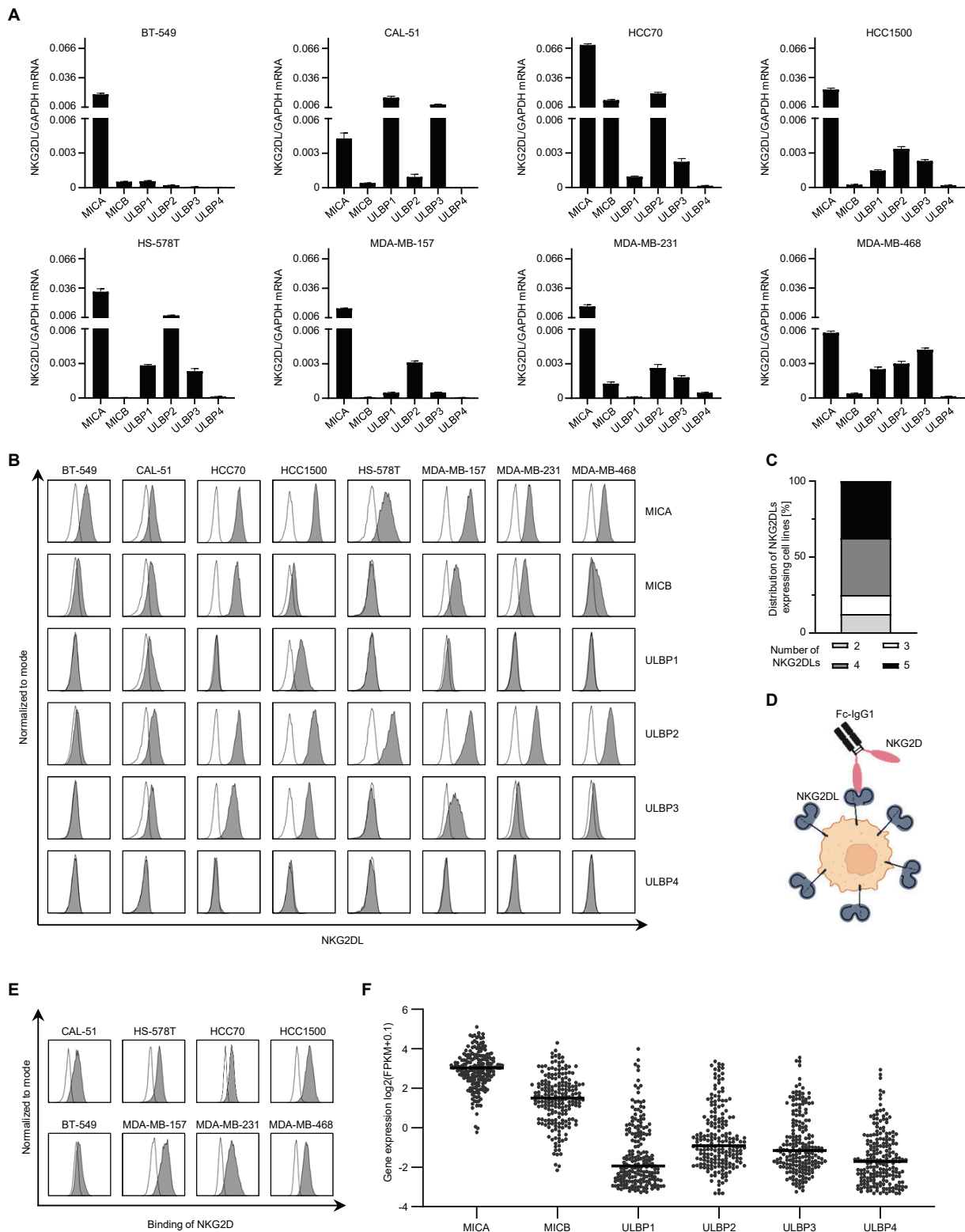
In this study, we evaluate the efficacy of NKG2D-CD16 and NKG2D-CD3 bispecific fusion proteins (BFPs) in the treatment of TNBC. We show that the BFPs effectively direct NK cells and T cells to the tumor cells and eliminate the TNBC cells. Furthermore, we report that NK cells and T cells from TNBC patients currently undergoing chemotherapy are able to efficiently eliminate TNBC tumor cells.

## 2. Results

### 2.1. Characterization of NKG2DL Expression in Triple-Negative Breast Cancer Cells

We examined the mRNA expression of NKG2DL in eight TNBC cell lines and found that all of them expressed at least two different ligands at varying levels (Figure 1A). *MICA* showed the highest expression, while the expression of *MICB* and *ULBP1–3* varied between different cell lines. *ULBP4* was mostly absent in all cell lines tested.

Next, we determined the surface protein expression using specific mAbs against *MICA*, *MICB*, and *ULBP1–4* (Figure 1B). *MICA* and *ULBP2* showed the highest surface expression among cell lines tested, whereas *ULBP4* could not be detected (Figure 1B). Six TNBC cell lines expressed four or five different NKG2DLs (37.5% each), except HS-578T, which expressed only two, and BT-549, which expressed three types of NKG2DLs (12.5% each) (Figures 1C and S1A). We examined the binding of all NKG2DLs on the surface with the extracellular NKG2D receptor domain fused to the Fc-IgG1 (Figure 1D). Based on our results, we selected BT-549, with the lowest, MDA-MB-468, with intermediate, and MDA-MB-231, with high NKG2DL expression for further experiments (Figures 1E and S1B). To evaluate the expression of NKG2DL in primary breast cancer material (n = 200), we used the TCGA database analysis and observed predominant expression of *MICA*, *MICB* and *ULBP2* (Figure 1F).



**Figure 1. Expression of NKG2DL in triple-negative breast cancer.** (A) Expression of various NKG2DL mRNAs in TNBC cell lines was measured by qRT-PCR. (B) Surface expression of the indicated NKG2DL was stained with specific mAbs (10 µg/mL) and assessed by flow cytometry. Open histograms show isotype control staining, and filled histograms show the staining of the indicated NKG2DL. (C) The relative proportion of cell lines expressing the indicated amount of different NKG2DL on the surface is shown. (D) Schematic representation of NKG2DL staining with

the NKG2D–Fc in which the disulfide–linked homodimer of the extracellular NKG2D domain is fused to the Fc portion of an IgG1 antibody (created with [BioRender.com](https://www.biorender.com)). (E) Binding of NKG2D to the surface of the TNBC cell lines was assessed by staining with an Fc fusion protein (10 µg/mL). Open histograms show isotype control staining, and filled histograms show the staining of the indicated NKG2DL. (F) Relative expression of MICA, MICB and ULBP1–4 RNA in breast cancer patients (n = 200), assessed using TCGA datasets (FPKM: fragments per kilobase of transcripts per million mapped fragments).

### 2.2. Effector Cell Recruitment by NKG2D BFPs against TNBC Cells

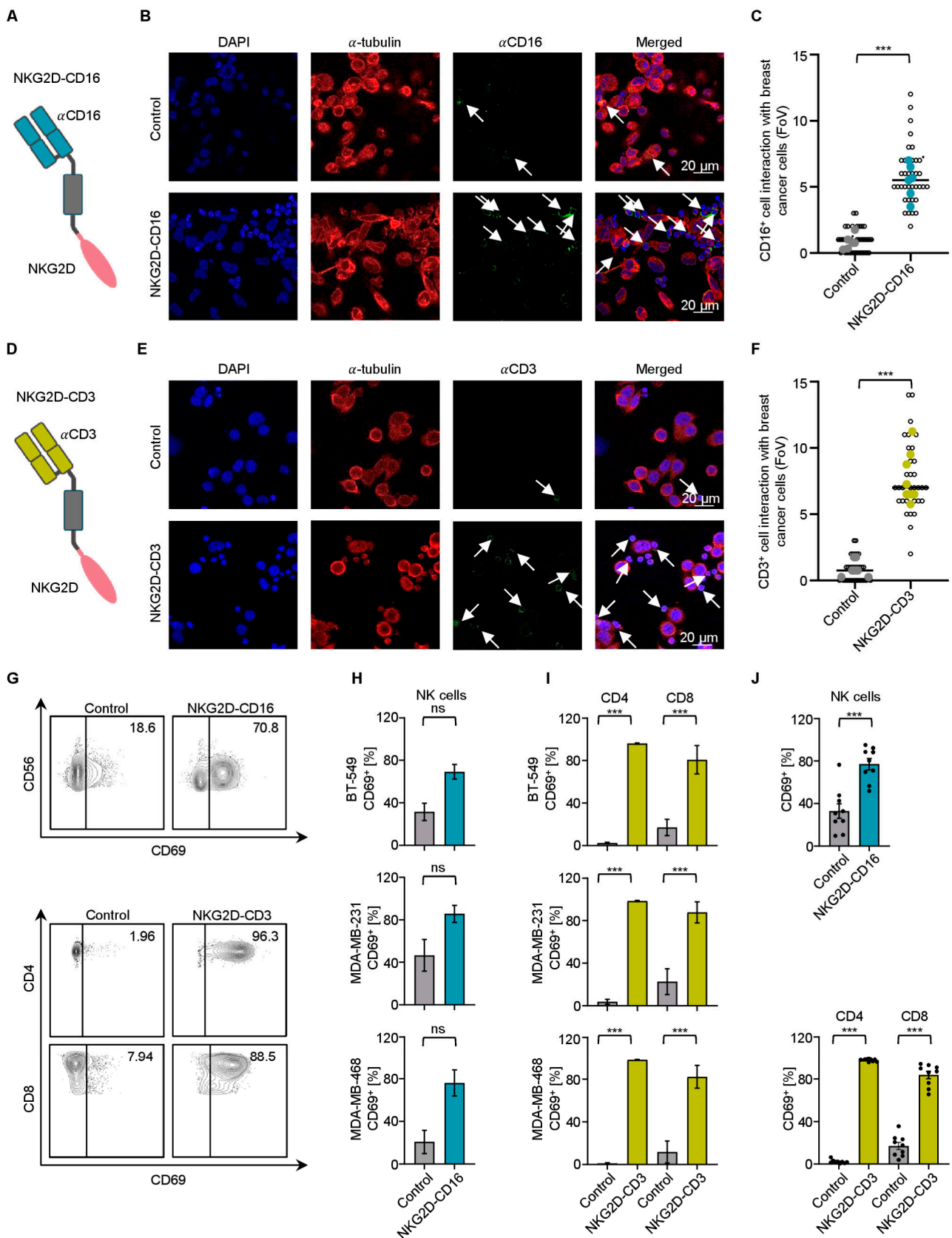
We analyzed the ability of NKG2D–CD16 and NKG2D–CD3 to recruit NK cells and T cells, respectively, to the TNBC cells. MDA–MB–231 and MDA–MB–468 cells were incubated with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors in the presence or absence of NKG2D–CD16. Immune cell recruitment to TNBC was quantified visually by determining the number of colocalized effector and target cells per field of view (FoV), a representative example of which is shown for MDA–MB–231 (Figure 2A,B). We observed a significant increase in CD16<sup>+</sup> cells interacting with TNBC cells when treated with NKG2D–CD16 (Figures 2C and S2A). A similar effect was observed for CD3<sup>+</sup> cells when MDA–MB–231 or MDA–MB–468 cells were co–incubated with PBMCs from healthy donors in the presence of NKG2D–CD3 (Figures 2D–F and S2B), confirming the effective recruitment of NK cells and T cells induced by the respective BFPs.

### 2.3. Modulation of NK Cell and T Cell Reactivity against TNBC Cells with PBMCs from Healthy Donors

To analyze whether our constructs were able to induce effector cell reactivity against TNBC cells, we cocultured the PBMCs from healthy donors with BT–549, MDA–MB–231 and MDA–MB–468 cells in the presence or absence of BFPs. Application of NKG2D–CD16 or NKG2D–CD3 resulted in a significant induction of the activation marker CD69 on NK cells and T cells (Figure 2G–J). Similarly, the increased surface expression of CD107a confirmed that NKG2D–CD16/CD3 strongly induced the degranulation of NK cells and T cells, respectively (Figure 3A–D). Analysis of the supernatants by Legendplex assays showed a significant increase in IFN $\gamma$ , TNF, granzyme A, perforin and granulysin secretion after treatment with NKG2D–CD16 (Figure 3E) or NKG2D–CD3 (Figure 3F).

### 2.4. Induction of Target Cell Lysis by Bispecific NKG2D Fusion Proteins

We then analyzed whether activation of effector cells resulted in cytotoxicity against tumor cells. Naturally, NK cells and T cells have different kinetics of activation and tumor cell killing [17]. To investigate the intrinsic function of both types of effector cells, we performed cell lysis assays with different incubation times. Europium–based short–term cytotoxicity assays revealed the potency of both BFPs to lyse target cells after 2 h, but the more pronounced effect was observed with NKG2D–CD16 (Figures 3G,H and S3C). At 72 h, flow cytometry–based lysis assays showed much stronger lysis with NKG2D–CD3 (Figures 3I,J and S3D). The finding that the lysis ability of NKG2D–CD3 emerged after prolonged incubation time and then surpassed the effects of NKG2D–CD16 was also confirmed by live cell imaging over an incubation period of 120 h (Figures 3K,L and S3E).

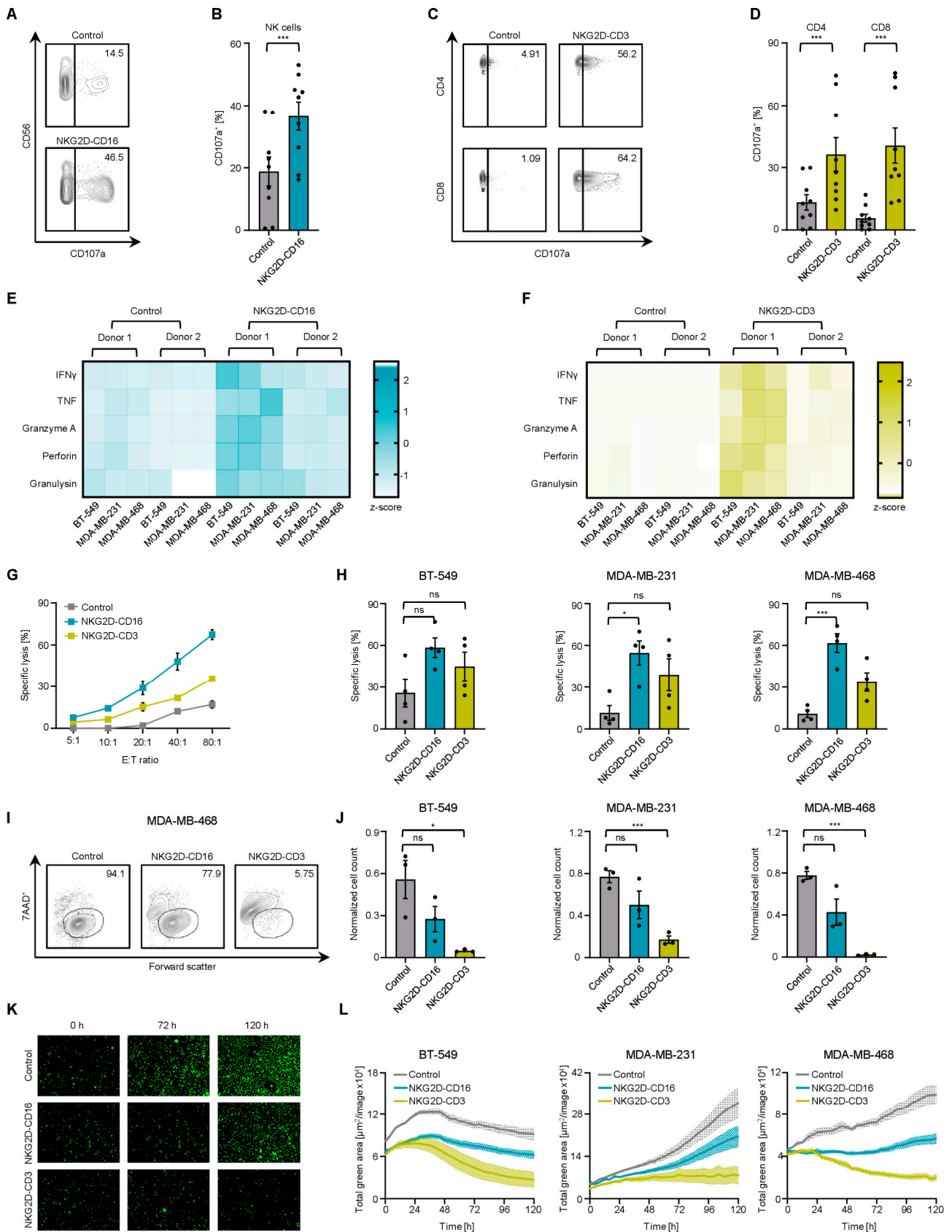


**Figure 2.** Recruitment of effector cells to the TNBC cell lines and activation of NK cells and T cells by BFPs. (A,D) Schematic illustration of BFPs with the  $\alpha$ CD16 (blue) (A) or  $\alpha$ CD3 (green) (D) sFab linked with a CH2 domain of IgG1 to the extracellular receptor domain of NKG2D (created with BioRender.com). (B,C,E,F) TNBC tumor cells were incubated with PBMCs from a healthy donor

(E:T ratio of 5:1) and control or NKG2D–CD16/CD3 (2.5 µg/mL) for 30 min. (B,E) Representative images for (B) MDA–MB–231 cells treated with control or NKG2D–CD16 with CD16<sup>+</sup> cells in green and (E) MDA–MB–468 cells treated with control or NKG2D–CD3 with CD3<sup>+</sup> cells in green.  $\alpha$ -Tubulin is shown in red and DAPI (300 nM) in blue was used to counterstain the nucleus. White arrows indicate the NK cells (B) and T cells (E) engaged with targets. (C,F) Pooled data of PBMCs from healthy donors (n = 4) with n = 4 fields of view (FoVs) per donor (small dots for each FoV, large dots indicate the mean per donor) incubated with NKG2D–CD16 (blue) and NKG2D–CD3 (green) are shown. (G–J) Activation of NK cells (CD56<sup>+</sup>) and T cells (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>) was determined by the expression level of CD69 after 24 h of PBMCs from healthy donors in coculture with TNBC cells at an E:T ratio of 2.5:1 in the presence or absence of NKG2D–CD16 (blue) or NKG2D–CD3 (green) (both 2.5 µg/mL). (G) Exemplary flow cytometry results for CD69 obtained with BT–549 cells are shown. (H) NK cell or (I) CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell activation with PBMCs from healthy donors (n = 3) with the indicated TNBC cell lines are shown. (J) Combined data of the TNBC cell lines BT–549, MDA–MB–231 and MDA–MB–468 cocultured with PBMCs from healthy donors (n = 3). All statistical tests were considered significant if the *p*-value was below 0.05 (\*\*\*) *p* < 0.001). *p*-values above 0.05 are marked as not significant (ns).

### 2.5. Reactivity of NK Cells and T Cells from TNBC Patients against TNBC Cells

To understand whether there are disease- and treatment-related changes in the immune cell subsets of TNBC patients that could affect the treatment efficacy of our BFPs, we compared the PBMCs from healthy donors and TNBC patients. At the time of PBMC collection, all tested TNBC patients studied were receiving cytotoxic chemotherapy with or without added immunotherapy. The specific details of the clinical characterization and treatment regimens of all TNBC patients are shown in Table 1. In our TNBC cohort, we observed normal counts of lymphocytes, leukocytes, neutrophils, monocytes and platelets (Figures 4A and S4A). We evaluated the distribution of the PBMC subsets, including T cells (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), monocytes (CD14<sup>+</sup>), dendritic cells (DCs, CD3<sup>−</sup>CD56<sup>−</sup>CD14<sup>−</sup>CD19<sup>−</sup>HLA-DR<sup>+</sup>), B cells (CD19<sup>+</sup>), NKT (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) and NK cells (CD3<sup>−</sup>CD56<sup>+</sup>), by performing flow cytometric analysis. TNBC samples showed fewer CD4<sup>+</sup> T cells but the same amount of CD8<sup>+</sup> T cells and an increase in DCs. No relevant difference was observed for other mononuclear cells compared to healthy donors (Figure 4B). To determine whether lymphocytes from TNBC patients could be stimulated by NKG2D–CD16 and NKG2D–CD3 in a similar manner compared to healthy donors, we used cocultures with TNBC cells. Treatment with both NKG2D–CD16 and NKG2D–CD3 significantly increased the activation of NK cells and CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, as determined by flow cytometry, for CD69 surface expression at 24 h (Figures 4C and S4B,C). In line, the detection of CD107a upregulation confirmed the effective degranulation of NK cells and T cells after treatment with BFPs (Figures 4D and S4D,E). Analysis of the coculture supernatants revealed a significant increase in the release of IFN $\gamma$ , TNF, granzyme A, perforin and granulysin after treatment with both NKG2D–CD16 (Figure 4E) and NKG2D–CD3 (Figure 4F).



**Figure 3.** Reactivity of healthy donor T and NK cells against TNBC cell lines in response to NKG2D–CD16/CD3 treatment. PBMCs from healthy donors were cultured with TNBC cells at an E:T ratio of 2.5:1 (unless otherwise noted) with controls (gray) or NKG2D–CD16 (blue) NKG2D–CD3

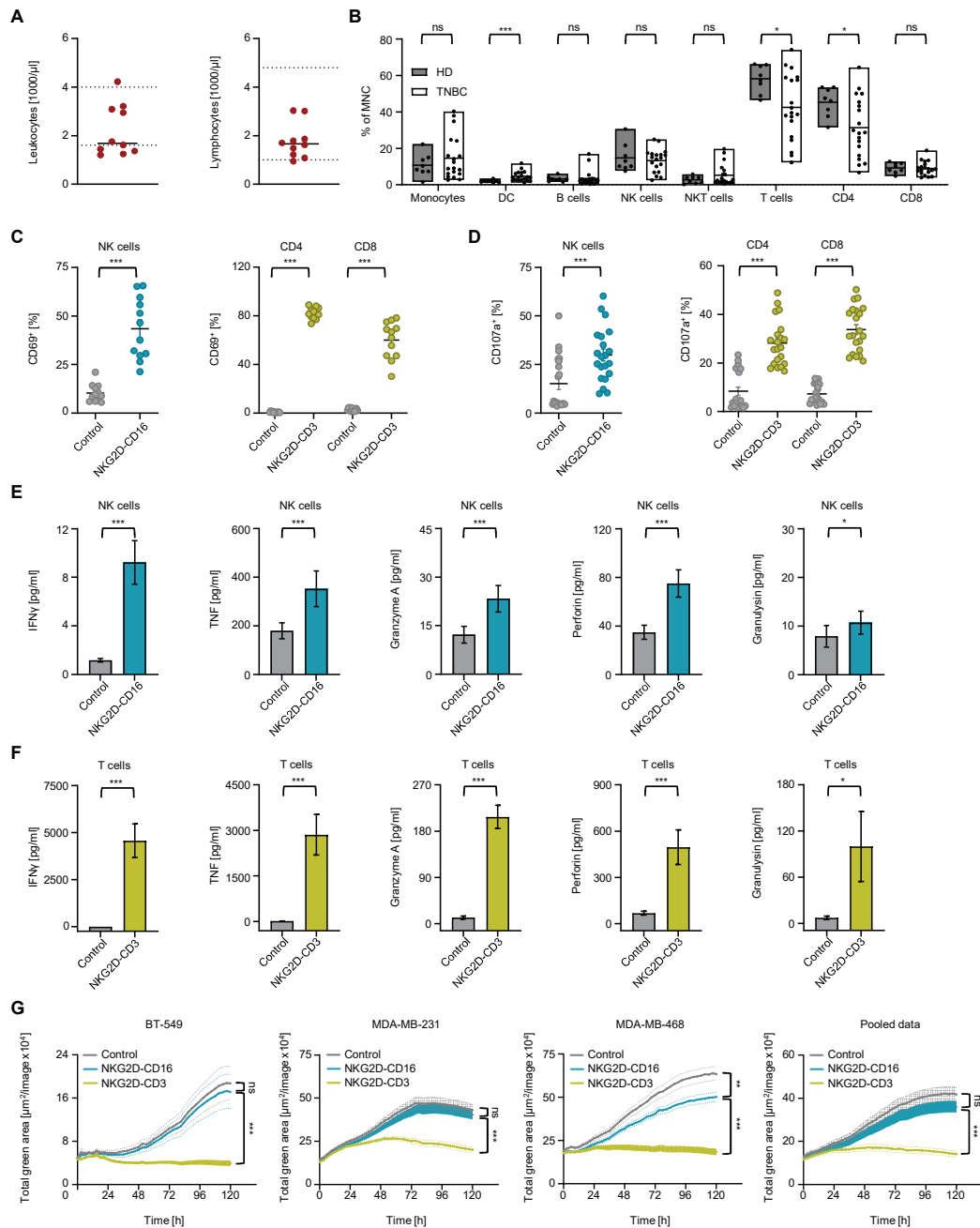
(green) (both 2.5 µg/mL). (A–D) Degranulation of NK cells after the treatment with NKG2D–CD16 and T cells after the treatment with NKG2D–CD3 was determined by the expression level of CD107a after 4 h. (A,C) Exemplary flow cytometry results for (A) NK cells and (C) T cells CD107a<sup>+</sup> obtained with MDA–MB–468 cells are shown. (B,D) Combined data with the TNBC cell lines BT–549, MDA–MB–231 and MDA–MB–468 and with PBMCs from healthy donors (n = 3) are shown. (E,F) Cytokines and effector molecules released into the supernatant after treatment with (E) NKG2D–CD16 after 4 h and (F) NKG2D–CD3 after 24 h coculture of TNBC cell lines (n = 3) with PBMCs from healthy donors (n = 2) measured by Legendplex assay. (G–L) Cytotoxicity of NKG2D–CD16/CD3 against TNBC cell lines was evaluated. (G,H) Cell lysis determined by 2 h Europium killing assay is shown. (G) Exemplary lysis of MDA–MB–468 with a healthy PBMCs donor at the indicated E:T ratios and (H) cytotoxicity against the indicated TNBC cell lines by PBMCs from healthy donors (n = 3) at an E:T ratio of 80:1 are shown. (I) Exemplary FACS data of MDA–MB–468 with a healthy donor PBMC and (J) lysis of the indicated TNBC cell lines determined by flow cytometry–based lysis assay (E:T ratio of 5:1) are shown. (K,L) Cell death of TNBC cells as determined by a live cell imaging system. Green fluorescent target cells were incubated with BFPs and PBMCs from healthy donors (n = 3) at an E:T ratio of 5:1 for 120 h. (K) Representative images at 0 h, 72 h and 120 h at 10x magnification and (L) data for separate TNBC cell lines and PBMCs from healthy donors (n = 3) are shown. All statistical tests were considered significant if the *p*-value was less than 0.05 (\* *p* < 0.05, \*\*\* *p* < 0.001). *p*-values greater than 0.05 are indicated as not significant (ns).

**Table 1.** Clinical characteristics of TNBC patients and therapy line at the time of blood sampling.

Clinical Characteristics	Total (n = 19)	
	n (%)	Mean (Stdv.)
Gender		
Female	19 (100)	
Age, Mean Years		59.4 (±10.4)
<b>TNM classification</b>		
T1c N0 MX	2 (11)	
T1c N0 M0	2 (11)	
T1c N1 MX	1 (5)	
T1c N1 M0	1 (5)	
T2 N0 MX	2 (11)	
T2 N0 M0	4 (21)	
T2 N1 MX	1 (5)	
T2 N1 M0	1 (5)	
T2 N1 M1	1 (5)	
T3 N0 MX	1 (5)	
T3 N1 M0	1 (5)	
T3 N2a M0	1 (5)	
T4d N1 MX	1 (5)	
<b>Histological subtype</b>		
<i>ER/PR status</i>		
negative	15 (79)	
<10%	3 (16)	
10–50%	1 (5)	
<i>Her2 neu status</i>		
negative	12 (63)	
+	3 (16)	
++	2 (11)	
<b>Histological grading</b>		
G2	8 (42)	
G3	11 (58)	
<b>Therapy line at the time of blood sampling</b>		
Atezolizumab	1 (5)	
Carboplatin, Paclitaxel	3 (16)	
Carboplatin, Paclitaxel, Atezolizumab	1 (5)	
Carboplatin, Paclitaxel, Pembrolizumab	7 (37)	
Cyclophosphamide, Epirubicin	2 (11)	
Denosumab	1 (5)	
Denosumab, Paclitaxel, Pembrolizumab	1 (5)	
Sacituzumab	1 (5)	
<b>Days since last treatment dose</b>		
d7	12 (63)	
d8	2 (11)	
d14	1 (5)	
d21	2 (11)	
d34	1 (5)	

Table 1. Cont.

Clinical Characteristics	Total (n = 19)	
	n (%)	Mean (Stdv.)
<b>Peripheral blood count</b>		
Leukocytes (1000/ $\mu$ L)		5.2 ( $\pm$ 2.4)
Lymphocytes (1000/ $\mu$ L)		1.8 ( $\pm$ 0.6)
Monocytes (1000/ $\mu$ L)		0.5 ( $\pm$ 0.15)
Neutrophils (1000/ $\mu$ L)		3.1 ( $\pm$ 1.9)
Platelet count (1000/ $\mu$ L)		275 ( $\pm$ 143)
Hb (g/dL)		11.1 ( $\pm$ 0.9)



**Figure 4. Characterization of PBMCs from TNBC patients receiving chemotherapy or combined chemo-immunotherapy. (A)** Leukocyte and lymphocyte counts from TNBC patients (n = 10) at the time of sample collection are shown. Dotted lines indicate the normal range for healthy individuals. **(B)** Peripheral mononuclear cells (MNCs) from TNBC patients (n = 19) and healthy donors (n = 7) were

identified by counterstaining for T cells (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), monocytes (CD14<sup>+</sup>), dendritic cells (DCs, CD3<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>), B cells (CD19<sup>+</sup>), NKT (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) and NK cells (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>), and then analyzed by flow cytometry and presented as percentage of MNCs. (C–F) BT-549, MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells were cocultured with PBMCs from TNBC donors (n = 4) and controls (gray) or NKG2D-CD16 (blue) or NKG2D-CD3 (green) (both 2.5 µg/mL) at an E:T ratio of 2.5:1. (C) Activation of NK and CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells as determined by expression levels of CD69 after 24 h and (D) degranulation of NK and CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells as determined by expression levels of CD107a after 4 h were measured by flow cytometry. (E,F) Legendplex assays of supernatants were performed to analyze IFN $\gamma$ , TNF, granzyme A, perforin and granulysin release at 24 h. (G) TNBC cell lysis by PBMCs from TNBC patients (n = 8) at an E:T ratio of 5:1 after control (gray) or NKG2D-CD16 (blue) and NKG2D-CD3 (green) treatment was measured using a live cell imaging system for 120 h. Data for indicated cell lines and combined results for 3 TNBC cell lines are shown. All statistical tests were considered significant if the *p*-value was less than 0.05 (\* *p* < 0.05, \*\* *p* < 0.01, \*\*\* *p* < 0.001). *p*-values greater than 0.05 are indicated as not significant (ns).

Finally, we evaluated the killing capacity of NK cells and T cells from TNBC patients against TNBC cell lines by live cell imaging (Figure 4G). While the strong lysis effect of NKG2D-CD3 was still present in TNBC patients, NKG2D-CD16 was only sufficient for the MDA-MB-468 target cell line (Figure 4G).

### 3. Discussion

The landscape of cancer treatment options has evolved rapidly in recent years. With the success of checkpoint inhibitors in TNBC, immunotherapy has become a standard of care, highlighting the strength of T-cell-based strategies for anti-tumor therapy. Despite these promising developments, survival rates are still lower than in other breast cancer subtypes, and the risk of recurrence remains a challenge [2]. NKG2D-based NK cell and T cell engagers could be potential options for the treatment of TNBC.

In our present study, we observed effective lysis of TNBC cells by PBMCs from both healthy donors and TNBC patients after treatment with NKG2D-CD16 and NKG2D-CD3 BFPs. Increased surface expression of CD69 and CD107a on NK cells and CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells indicated enhanced activation and degranulation accompanied by cytokine release upon NKG2D-CD3/CD16 BFP treatment. This effect was reflected in significant cytotoxicity against TNBC cells.

Recently, maturation of NK cells has been shown to be exclusively important in predicting their potential effect against TNBC tumors [18]. In humans, terminally differentiated peripheral blood NK cells, exhibiting the CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> phenotype, are cytotoxic. In contrast, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> NK cells, found in secondary lymphoid tissues, are considered to be immature and have reduced cytotoxic potential [19]. Thacker et al. demonstrated an increased number of immature NK cells in various TNBC models and provided evidence for the pro-tumorigenic nature of NK cells within the tumor microenvironment (TME) of TNBC [18]. Using the NKG2D-CD16 construct, we recruited cytotoxic CD16<sup>+</sup> NK cells, potentially altering the balance between immature and cytotoxic NK cell populations. Another advantage of NKG2D-CD16 is that NK cell activation is not dependent on the NKG2D receptor, which is beneficial given that NKG2D expression on NK cells can be downregulated under certain circumstances [20]. It is noteworthy that NKG2D-CD16 demonstrated superior cytotoxicity in the short-term assays, whereas NKG2D-CD3 required a longer period to achieve maximal anti-tumor activity. Although both NKG2D-CD16 and NKG2D-CD3 were effective, the killing ability of T cells stimulated by NKG2D-CD3 was more pronounced. This difference could be attributed to the fact that NKG2D-CD3 can induce T cell proliferation, whereas no proliferation was observed in NK cells activated by NKG2D-CD16 [21].

In terms of clinical implications, it is plausible to assume that the lower cytokine release upon treatment with NKG2D-CD16 compared to NKG2D-CD3 may lead to fewer side effects. This aspect qualifies NKG2D-CD16 as a promising therapy for elderly TNBC

patients who may not tolerate immediate massive immune activation. In addition, our study showed that PBMCs from TNBC patients undergoing chemotherapy showed notable activation of NK cells and T cells upon BFP stimulation, suggesting the feasibility of combined immunotherapy. However, additional data are needed to fully understand the bioavailability of NKG2D BFPs in the TNBC TME in the clinical setting.

In conclusion, these results highlight the encouraging antitumor efficacy of NKG2D–CD3 and NKG2D–CD16 BFPs. PBMCs from TNBC patients showed a robust potential to targeting cancer cells, even during ongoing chemotherapy, suggesting that our novel approach could serve as stand-alone therapy or as an adjunct to chemotherapy.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Cell Lines

The human cell lines CAL-51, HS-578T, HCC70, HCC1500, BT-549, MDA-MB-157, MDA-MB-231, and MDA-MB-468 were obtained from DSMZ or ATCC. Green fluorescent protein (GFP)-expressing breast cancer cell lines (BT-549, MDA-MB-231 and MDA-MB-468) were established by infection with Incucyte nuclight green lentivirus reagent (EF1 $\alpha$ , puro) (Sartorius Group, Göttingen, Germany) and sorted by flow cytometry. All cell lines were routinely tested for mycoplasma contamination.

##### 4.2. qRT-PCR

RNA from 1 million TNBC cells was isolated using the High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Basel, Switzerland) and tested for quality and quantity using the NanoDrop™ One/OneC (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA). cDNA synthesis was performed using a FastGeneScriptase II reverse-transcription PCR kit (Nippon Genetics Europe, Dueren, Germany), and 10 ng of cDNA was used for quantitative PCR. Previously described primers for *MICA* (FWD: 5'-ggcgctaaagtctgagaga-3', REV: 5'-aacctgactgcacagatcc-3'), *MICB* (FWD: 5'-ctgagaaggtggcgacgta-3', REV: 5'-cgaagactgtggggctca-3'), *ULBP1* (FWD: 5'-actgggaacaatgctggat-3', REV: 5'-gagaaggctccaggactg-3'), *ULBP2* (FWD: 5'-ccgtaccaa gatcctctg-3', REV: 5'-gggatgacggtgatgcatag-3'), *ULBP3* (FWD: 5'-tcctgcatctgagaagag-3', REV: 5'-cagaaagcacagtggtagt-3'), *ULBP4* (FWD: 5'-agcactggggagaattgac-3', REV: 5'-cttgacagtggaaggatcac-3') and *GAPDH* (FWD: 5'-agccacatgctcagacac-3', REV: 5'-gcccaata cgaccaaacc-3') were used for quantitative PCR and were performed using Perfecta SYBR Green FastMix (Quanta Biosciences Beverly, MA, USA) measured on a LightCycler480 (Roche, Basel, Switzerland) [13,21].

##### 4.3. Flow Cytometry

Single NKG2DL-specific mAbs (*MICA*, clone: AMO1; *MICB*, clone: BMO1; *ULBP1* clone: AUMO3; *ULBP2*, clone: BUMO1; *ULBP3*, clone CUMO3; *ULBP4*, clone: DUMO) or corresponding isotype controls (10  $\mu$ g/mL) followed by goat anti-mouse PE conjugate (Dako, Glostrup, Denmark) were used for staining, as described previously [13]. To study the binding of NKG2Ds, we used biotinylated NKG2D-Fc proteins and an isotype control (10  $\mu$ g/mL) (both R&D systems, Minneapolis, MN, USA), stained with streptavidin-PE conjugate (LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA), as previously described [21].

PBMC subsets from TNBC patients and healthy donors were identified by counterstaining with CD3-APC/Fire750 (clone: SK7), CD4-Pacific Blue (clone: RPA-T4), CD8-BV605 (clone: RPA-T8), CD14-BV785 (clone: M5E2), CD16-APC (clone: 3G8), CD19-FITC (clone: HIB19), CD56-PeCy7 (clone: HCD56) and HLA-DR-BV650 (clone: L243) (all BioLegend, San Diego, CA, USA) and 7-AAD (Biolegend, San Diego, CA, USA)).

NK cell and T cell activation and degranulation were assessed by flow cytometry. Briefly, 100,000 TNBC cells were cultured with allogeneic PBMCs from healthy donors or TNBC donors at an effector to target (E:T) ratio of 2.5:1 for 4 h and 24 h, followed by mAb staining. For flow cytometric evaluation of specific target cell lysis, TNBC cells were stained with 2.5  $\mu$ M CellTrace™ Violet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and cocultured with PBMCs (E:T ratio of 5:1) in the presence of the BFPs (2.5  $\mu$ g/mL) or control

for 72 h. Latex beads (Sigma–Aldrich, Darmstadt, Germany) were used to ensure that equal volumes of cell suspension were analyzed. 7–AAD was used to exclude dead cells from the analysis. PBMC subsets from healthy donors and TNBC patients were identified by counterstaining.

All measurements were performed using a FACS Canto II, FACS Fortessa or FACS Aria III (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) and data were analyzed using FlowJo–V10 software (BD Biosciences, Heidelberg, Germany).

#### 4.4. Production and Purification of Bispecific NKG2D Fusion Proteins

To generate NKG2D–CD3 and NKG2D–CD16 BFPs, the extracellular domain of NKG2D (F78–V216) was fused C–terminally to the heavy chain of a Fab fragment specific for either CD3 (clone UCHT1) or CD16 (clone 3G8) using a CH2 linker [22,23]. The CH2 domain of IgG1 was modified to attenuate FcγR and glycan receptor binding, complement fixation and reduce immunogenicity. The following amino acids in the CH2 domain of IgG1 have been swapped or deleted: E233→P; L234→V; L235→A; G236→deleted; D265→G; N297→Q; A327→Q; A330→S [24,25]. The N297→Q modification prevents the addition of a glycan structure and C226 and C229 were replaced with serine to prevent dimerization [25,26]. Final proteins were produced after transfection of SP2/0–Ag14 cells (American Type Culture Collection, Manassas). Subcloned transfectants were cultured in IMDM (GIBCO, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% of fetal bovine serum (PAN–biotech, Aidenbach, Germany), 1% non–essential amino acid solution (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1% L–glutamine (PAN–biotech, Aidenbach, Germany), 1% sodium pyruvate solution (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1% penicillin–streptomycin (PAN–biotech, Aidenbach, Germany), 1 mg/mL G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). BFPs were purified from culture supernatants by HiTrap KappaSelect™ affinity chromatography (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) followed by preparative size exclusion chromatography on Superdex HiLoad 16/60 column (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Purity was determined by 4–12% non–reducing gradient SDS–PAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Endotoxin (EU) levels were tested using Endonext™ (Biomerieux, Nuertingen, Germany) and were ≤1 EU/mg for all proteins (Figure S5A,B).

#### 4.5. Immunofluorescence

For immunofluorescence staining, MDA–MB–231 and MDA–MB–468 cells were incubated with PBMCs from healthy donors at an E:T ratio of 2.5:1. After 30 min of incubation, the media was removed and the cells were fixed with 4% paraformaldehyde. Cells were washed with PBS and blocked with 5% bovine serum albumin blocking solution containing 0.1% Tween20 and 0.2% Triton X–100 for 60 min. Staining was performed with murine mAb αCD3 (clone OKT3, 1:25 Biolegend, San Diego, CA, USA), αCD16 (clone #1001049, 1:25, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and rabbit mAb α–tubulin (clone 11H10 1:500, Cell Signaling, Danvers, MA, USA). Primary antibodies were detected with Alexa–Fluor488–conjugated anti–mouse (1:500) and Alexa–Fluor594–conjugated anti–rabbit (1:500) antibodies (both Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). DAPI was used for nuclear staining. Images were captured with an LSM800 microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) and analyzed with ImageJ 1.53a software.

#### 4.6. Analysis of Cytokine Secretion

To evaluate the cytokine release, supernatants from the coculture assays were analyzed at 4 h and 24 h using the Legendplex Human CD8/NK Panel (BioLegend, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer’s protocol.

#### 4.7. Cytotoxicity Assay

Lysis of TNBC cells by PBMCs from healthy donors in the presence or absence of the BFP (2.5 µg/mL) was assessed by a 2 h Europium–based cytotoxicity assay, as previously described [15]. Briefly, TNBC cells were labeled with DELFIA® BATDA (Perkin Elmer,

Waltham, MA, USA) for 30 min. After labeling, the cells were incubated with PBMCs at the indicated E:T ratios. After 2 h of incubation, 20  $\mu$ L of supernatant from each sample was mixed with 200  $\mu$ L DELFIA<sup>®</sup> Europium solution (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Subsequent samples were measured using a Spectra Max ID5 system (Molecular Devices, Silicon Valley, CA, USA). Specific lysis was calculated as follows:

$$100 \times (\text{experimental release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximum release} - \text{spontaneous release})$$

Long-term cytotoxicity analyses were performed using the IncuCyte<sup>®</sup> S3 Live-Cell Analysis System (Essenbioscience, Sartorius, Göttingen, Germany). GFP-expressing TNBC cells were cultured with PBMCs from healthy donors (E:T ratio of 5:1) with or without the indicated treatments (2.5  $\mu$ g/mL each). Live cell images were taken every 3–4 h at 10x magnification. To quantify live cells, the total green area of each variant was normalized to the corresponding measurement at T = 0 h.

#### 4.8. Primary Material

PBMCs from healthy donors and TNBC patients were isolated by density gradient centrifugation. Blood samples from 19 consecutive TNBC patients treated at the Department of Gynecology at the University Hospital of Tübingen were included in our study. All samples were collected in January/February 2023.

#### 4.9. Statistics

Unless otherwise noted, values are mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). For continuous variables, in the case of normal distribution, Student's *t*-test was used for normal distribution and Mann-Whitney U test for non-normal distribution. GraphPad Prism 9.4.1 was used for statistical analysis. All statistical tests were considered significant if the *p*-value was less than 0.05 (\* *p* < 0.05, \*\* *p* < 0.01, \*\*\* *p* < 0.001).

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms241713156/s1>.

**Author Contributions:** P.K. and S.J.H. designed, performed and interpreted the experiments. I.H. and J.M. prepared, validated and purified the BFPs. S.M.G., A.S., C.M.T., T.E., A.K. and A.D.H. collected PBMCs from BC patients or performed analysis and interpretation of clinical data. M.M. and H.R.S. designed the study and were involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by grants from DFG (MA 9302/2–1) and Deutsche Krebshilfe (70113496). We acknowledge support from the Deutsche Forschungsgemeinschaft and the Open Access Publishing Fund of University of Tübingen.

**Institutional Review Board Statement:** The study was approved by the ethics committee at the Medical Faculty of the Eberhard Karls University and the University Hospital Tuebingen (reference number 13/2007V). Human material was collected after obtaining informed consent in accordance with the Helsinki protocol.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article.

**Acknowledgments:** The authors thank Tatjana Schreiber for excellent technical assistance and the Flow Cytometry Core Facility Berg of the University Hospital Tuebingen for their excellent technical support.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Abbreviations

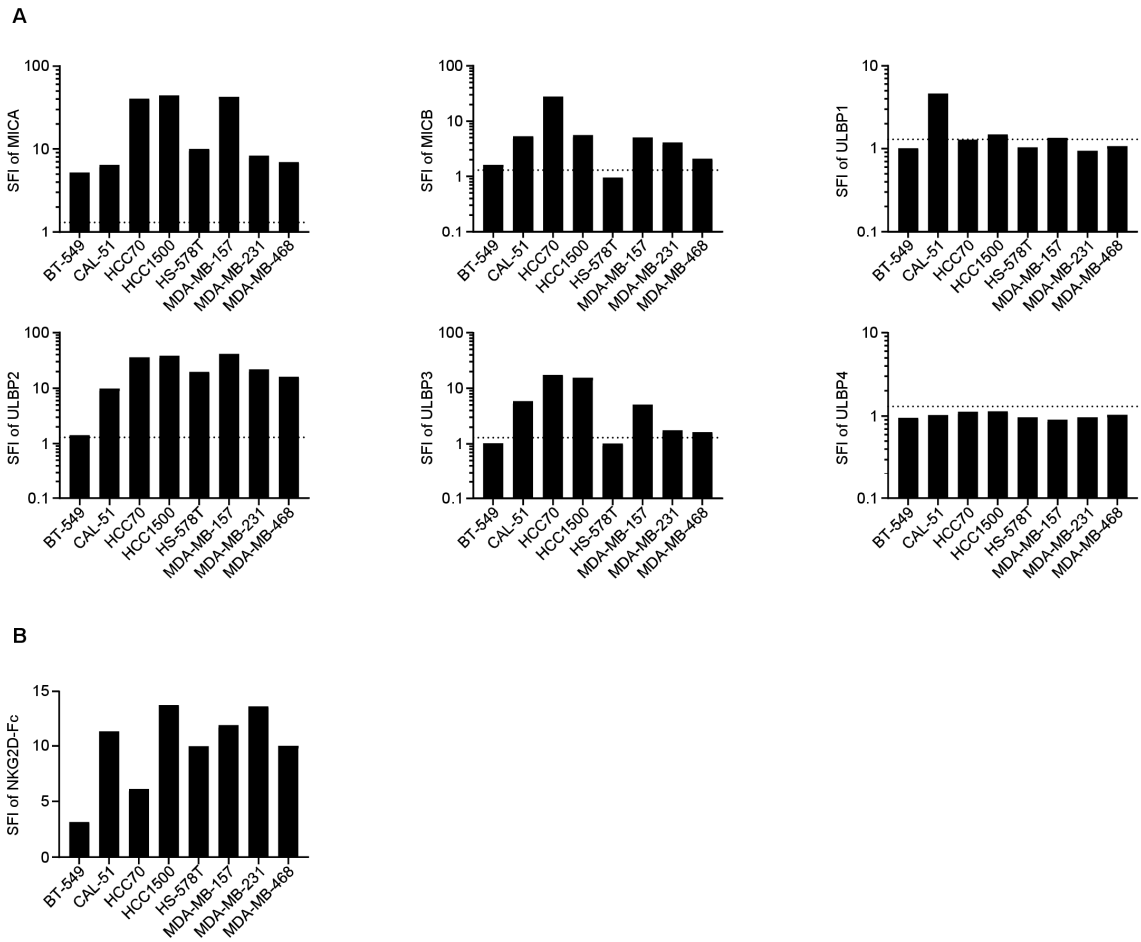
7–AAD: 7–aminoactinomycin D; ADCC: antibody dependent cellular cytotoxicity; IBC: invasive breast cancer; BFP: bispecific fusion protein; CAR: chimeric antigen receptor; DC: dendritic cells; E:T effector to target; FACS: Fluorescence–activated cell sorting; FcγR: Fc–gamma–receptor; FoV: field of view; FPKM: fragments per kilobase of transcripts per million mapped fragments; HER2: human epidermal growth factor receptor 2; IFNγ: Interferon–γ; mAb: monoclonal antibody; MFI: mean fluorescence intensity; MIC: MHC class I chain–related; NKG2D: natural killer group 2D; NKG2DL: NKG2D ligand; PARP: poly ADP–ribose polymerase; PBMC: peripheral blood mononuclear cell; PE: phycoerythrin; SEM: standard error of the mean; SFI: specific fluorescence intensity; TME: tumor micro environment; TNBC: triple–negative breast cancer; ULBP: UL16 binding protein; TCGA: the cancer genome atlas.

## References

- Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Giaquinto, A.N.; Sung, H.; Miller, K.D.; Kramer, J.L.; Newman, L.A.; Minihan, A.; Jemal, A.; Siegel, R.L. Breast Cancer Statistics, 2022. *CA Cancer J. Clin.* **2022**, *72*, 524–541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Li, X.X.; Yang, J.; Peng, L.M.; Sahin, A.A.; Huo, L.; Ward, K.C.; O’Regan, R.; Torres, M.A.; Meisel, J.L. Triple Negative Breast Cancer Has Worse Overall Survival and Cause–Specific Survival Than Non–Triple Negative Breast Cancer. *Mod. Pathol.* **2017**, *30*, 54a. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Anurag, M.; Jaehnig, E.J.; Krug, K.; Lei, J.T.; Bergstrom, E.J.; Kim, B.J.; Vashist, T.D.; Huynh, A.M.T.; Dou, Y.; Gou, X.; et al. Proteogenomic Markers of Chemotherapy Resistance and Response in Triple–Negative Breast Cancer. *Cancer Discov.* **2022**, *12*, 2586–2605. [[CrossRef](#)]
- Yao, H.; He, G.; Yan, S.; Chen, C.; Song, L.; Rosol, T.J.; Deng, X. Triple–negative breast cancer: Is there a treatment on the horizon? *Oncotarget* **2017**, *8*, 1913–1924. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bagegni, N.A.; Davis, A.A.; Clifton, K.K.; Ademuyiwa, F.O. Targeted Treatment for High–Risk Early–Stage Triple–Negative Breast Cancer: Spotlight on Pembrolizumab. *Breast Cancer* **2022**, *14*, 113–123. [[CrossRef](#)]
- Raulet, D.H.; Gasser, S.; Gowen, B.G.; Deng, W.; Jung, H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **2013**, *31*, 413–441. [[CrossRef](#)]
- Orr, M.T.; Lanier, L.L. Natural killer cell education and tolerance. *Cell* **2010**, *142*, 847–856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zingoni, A.; Fionda, C.; Borrelli, C.; Cippitelli, M.; Santoni, A.; Soriani, A. Natural Killer Cell Response to Chemotherapy–Stressed Cancer Cells: Role in Tumor Immunosurveillance. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1194. [[CrossRef](#)]
- Han, Y.; Xie, W.; Song, D.G.; Powell, D.J., Jr. Control of triple–negative breast cancer using ex vivo self–enriched, costimulated NKG2D CAR T cells. *J. Hematol. Oncol.* **2018**, *11*, 92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sallman, D.A.; Brayer, J.; Sagatys, E.M.; Loney, C.; Breman, E.; Agaoglu, S.; Verma, B.; Gilham, D.E.; Lehmann, F.F.; Davila, M.L. NKG2D–based chimeric antigen receptor therapy induced remission in a relapsed/refractory acute myeloid leukemia patient. *Haematologica* **2018**, *103*, e424–e426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sallman, D.A.; Kerre, T.; Havelange, V.; Poire, X.; Lewalle, P.; Wang, E.S.; Brayer, J.B.; Davila, M.L.; Moors, I.; Machiels, J.P.; et al. 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. *Lancet Haematol.* **2023**, *10*, e191–e202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Raab, S.; Steinbacher, J.; Schmiedel, B.J.; Kousis, P.C.; Steinle, A.; Jung, G.; Grosse–Hovest, L.; Salih, H.R. Fc–optimized NKG2D–Fc constructs induce NK cell antibody–dependent cellular cytotoxicity against breast cancer cells independently of HER2/neu expression status. *J. Immunol.* **2014**, *193*, 4261–4272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Aguilar, O.A.; Gonzalez–Hinojosa, M.D.R.; Arakawa–Hoyt, J.S.; Millan, A.J.; Gotthardt, D.; Nabekura, T.; Lanier, L.L. The CD16 and CD32b Fc–gamma receptors regulate antibody–mediated responses in mouse natural killer cells. *J. Leukoc. Biol.* **2023**, *113*, 27–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hagelstein, I.; Lutz, M.S.; Schmidt, M.; Heitmann, J.S.; Malenke, E.; Zhou, Y.; Clar, K.L.; Kopp, H.G.; Jung, G.; Salih, H.R.; et al. Bispecific NKG2D–CD3 and NKG2D–CD16 Fusion Proteins as Novel Treatment Option in Advanced Soft Tissue Sarcomas. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 653081. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Marklin, M.; Hagelstein, I.; Koerner, S.P.; Rothfelder, K.; Pfluegler, M.S.; Schumacher, A.; Grosse–Hovest, L.; Jung, G.; Salih, H.R. Bispecific NKG2D–CD3 and NKG2D–CD16 fusion proteins for induction of NK and T cell reactivity against acute myeloid leukemia. *J. Immunother. Cancer* **2019**, *7*, 143. [[CrossRef](#)]
- Rosenberg, J.; Huang, J. CD8<sup>+</sup> T Cells and NK Cells: Parallel and Complementary Soldiers of Immunotherapy. *Curr. Opin. Chem. Eng.* **2018**, *19*, 9–20. [[CrossRef](#)]

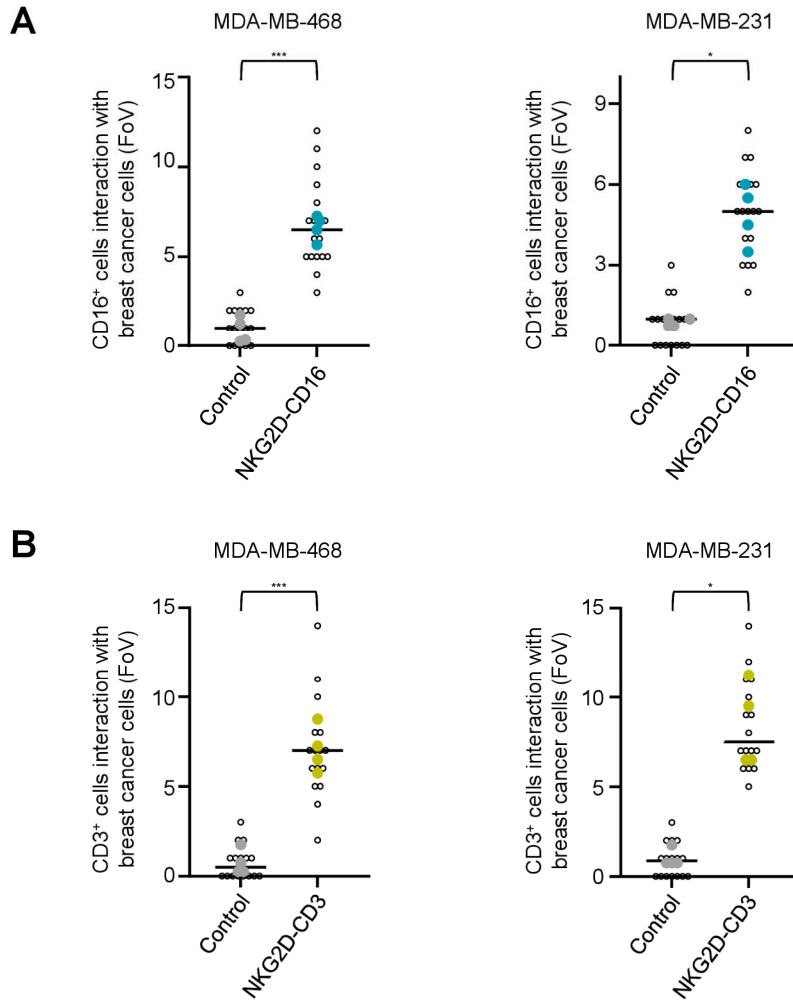
18. Thacker, G.; Henry, S.; Nandi, A.; Debnath, R.; Singh, S.; Nayak, A.; Susnik, B.; Boone, M.M.; Zhang, Q.; Kesmodel, S.B.; et al. Immature natural killer cells promote progression of triple-negative breast cancer. *Sci. Transl. Med.* **2023**, *15*, eabl4414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Moretta, L. Dissecting CD56dim human NK cells. *Blood* **2010**, *116*, 3689–3691. [[CrossRef](#)]
20. Sheppard, S.; Ferry, A.; Guedes, J.; Guerra, N. The Paradoxical Role of NKG2D in Cancer Immunity. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1808. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Paczulla, A.M.; Rothfelder, K.; Raffel, S.; Konantz, M.; Steinbacher, J.; Wang, H.; Tandler, C.; Mbarga, M.; Schaefer, T.; Falcone, M.; et al. Absence of NKG2D ligands defines leukaemia stem cells and mediates their immune evasion. *Nature* **2019**, *572*, 254–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Beverley, P.C.; Callard, R.E. Distinctive functional characteristics of human “T” lymphocytes defined by E rosetting or a monoclonal anti-T cell antibody. *Eur. J. Immunol.* **1981**, *11*, 329–334. [[CrossRef](#)]
23. Fleit, H.B.; Wright, S.D.; Unkeless, J.C. Human neutrophil Fc gamma receptor distribution and structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 3275–3279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Shields, R.L.; Namenuk, A.K.; Hong, K.; Meng, Y.G.; Rae, J.; Briggs, J.; Xie, D.; Lai, J.; Stadlen, A.; Li, B.; et al. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 6591–6604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Liu, R.; Oldham, R.J.; Teal, E.; Beers, S.A.; Cragg, M.S. Fc-Engineering for Modulated Effector Functions—Improving Antibodies for Cancer Treatment. *Antibodies* **2020**, *9*, 64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Herbener, P.; Schonfeld, K.; Konig, M.; Germer, M.; Przyborski, J.M.; Bernoster, K.; Schuttrumpf, J. Functional relevance of in vivo half antibody exchange of an IgG4 therapeutic antibody–drug conjugate. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e195823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



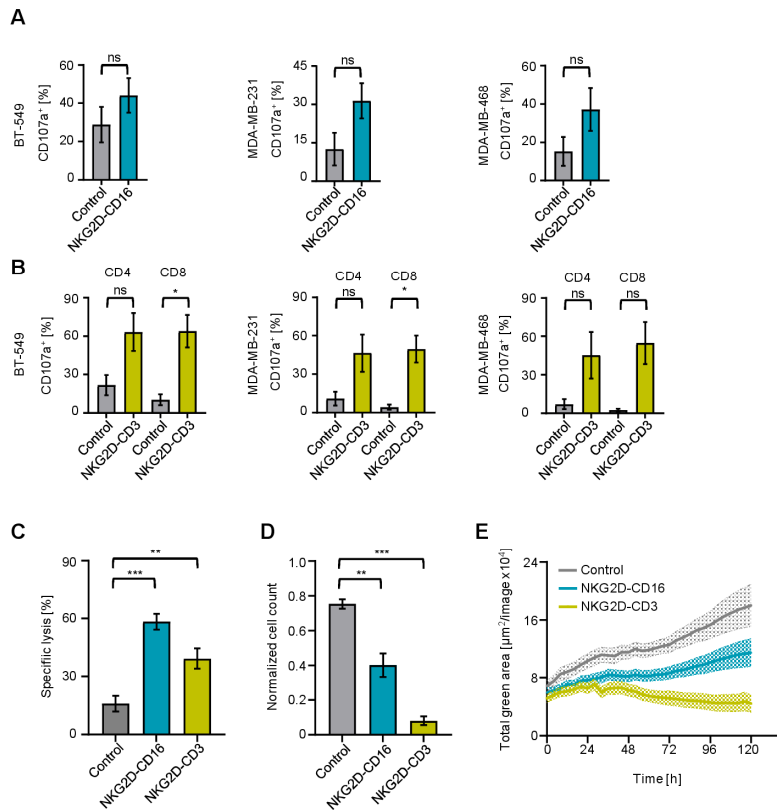
Supplemental Figure S1: Specific fluorescence intensity of NKG2DL

(A) TNBC cell lines were analyzed by flow cytometry for the specific fluorescence intensity (SFI) of the indicated NKG2DL. SFI levels above the dashed line show a SFI value >1.3 and are considered as NKG2DL positive. (B) The SFI of TNBC cell lines stained with the NKG2D-Fc was assessed by flow cytometry.



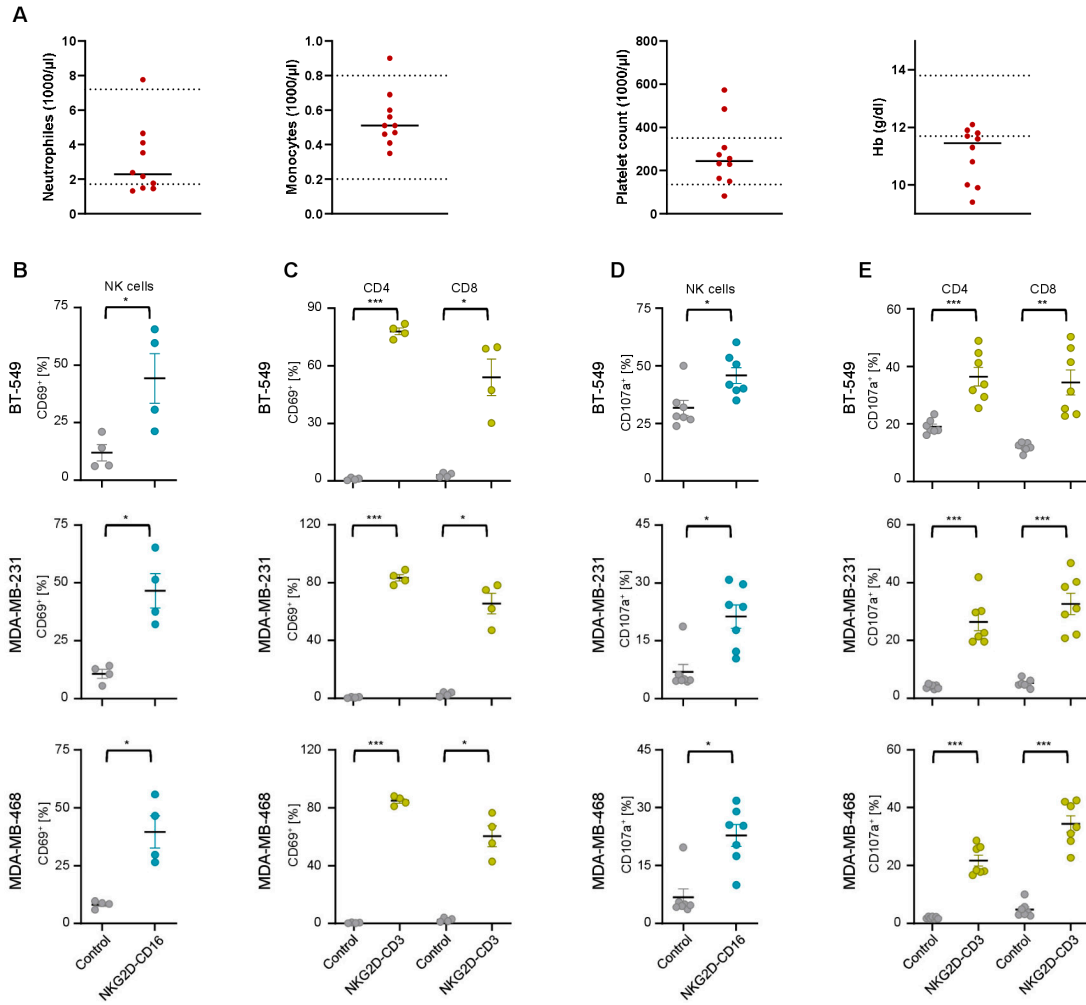
Supplemental Figure S2: Effector cell recruitment with the BFPs to TNBC cell lines

MDA-MB-468 cell line (left panel) and MDA-MB-231 cell line (right panel) were cultured with PBMC from healthy donors (n=4) at an E:T ratio of 5:1 in the presence of control or NKG2D-CD16 (blue) **(A)** or NKG2D-CD3 (green) **(B)** respectively. For each donor 4 field of views (FoV) were evaluated (small dots indicate FoV, large dots indicate the mean per donor).



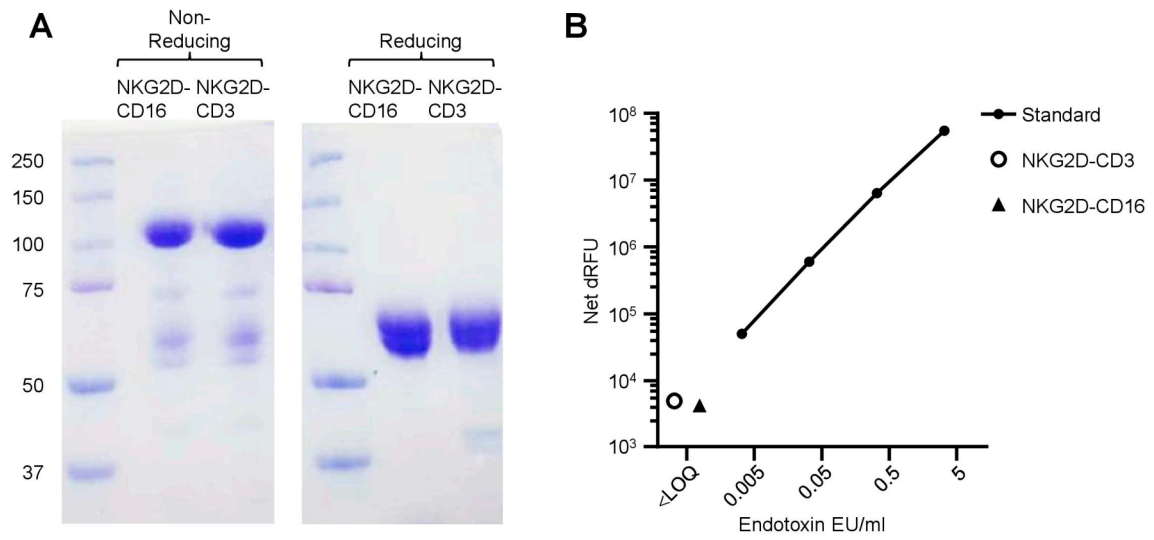
Supplemental Figure S3: Reactivity of T and NK cells from healthy donors against TNBC cell lines after NKG2D-CD16/CD3 treatment

TNBC tumor cells were incubated with PBMC from healthy donors (n=3) in the presence or absence of NKG2D-CD16/CD3 (2.5  $\mu$ g/ml). **(A–B)** Degranulation of **(A)** NK cells and **(B)** T cells after coculture with indicated cell lines at an E:T ratio of 2.5:1 was determined by expression of CD107a after 4 h. **(C–E)** Cell lysis of 3 TNBC cell lines (BT-549, MDA-MB-231 and MDA-MB-468) by PBMC from healthy donors after the treatment with NKG2D-CD16 (blue) or NKG2D-CD3 (green) determined by **(C)** 2 h Europium assays with E:T ratio of 80:1, **(D)** flow cytometry-based lysis assay (E:T= 5:1) and **(E)** by a live cell imaging system with E:T= 5:1 is shown.



Supplemental Figure S4: Reactivity of T and NK cells of TNBC patients against TNBC cell lines

**(A)** Immune cell counts of neutrophils, monocytes, platelets and hemoglobin (Hb) concentration in TNBC samples at time point of PBMC collection. **(B–E)** Reactivity of NK and T cells against BT-549, MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells in response to NKG2D-CD16 (blue) and NKG2D-CD3 (green) treatment. PBMC of TNBC donors were cultured with TNBC cell lines at an E:T ratio of 2.5:1 in the presence or absence of NKG2D-CD16/CD3 (2.5  $\mu$ g/ml). **(B, C)** Activation of NK cells **(B)** and CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>T cells **(C)** of TNBC patients (n=4) was determined by expression level of CD69 after 24 h. **(D, E)** Degranulation of NK cells **(D)** and CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>T cells **(E)** of TNBC patients (n=7) was determined by analysis of expression level of CD107a after 4 h.



Supplemental Figure S5: Quality test for NKG2D-CD16/CD3 BFPs

**(A)** SDS page in non-reducing and reducing conditions and **(B)** endotoxin test results for both NKG2D-CD16/CD3 BFPs are shown.



## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Sébastien Wälchli,  
Oslo University Hospital, Norway

## REVIEWED BY

Stefania C. Carrara,  
AbCellera, Canada  
Eden Kleiman,  
JSR Life Sciences, United States

## \*CORRESPONDENCE

Melanie Märklin  
✉ melanie.maerklin@med.uni-tuebingen.de

RECEIVED 26 February 2024

ACCEPTED 22 April 2024

PUBLISHED 03 May 2024

## CITATION

Holzmayr SJ, Liebel K, Hagelstein I,  
Salih HR and Märklin M (2024) The  
bispecific B7H3xCD3 antibody CC-3  
induces T cell immunity against bone  
and soft tissue sarcomas.  
*Front. Immunol.* 15:1391954.  
doi: 10.3389/fimmu.2024.1391954

## COPYRIGHT

© 2024 Holzmayr, Liebel, Hagelstein, Salih  
and Märklin. This is an open-access article  
distributed under the terms of the [Creative  
Commons Attribution License \(CC BY\)](#). The  
use, distribution or reproduction in other  
forums is permitted, provided the original  
author(s) and the copyright owner(s) are  
credited and that the original publication in  
this journal is cited, in accordance with  
accepted academic practice. No use,  
distribution or reproduction is permitted  
which does not comply with these terms.

# The bispecific B7H3xCD3 antibody CC-3 induces T cell immunity against bone and soft tissue sarcomas

Samuel J. Holzmayr<sup>1,2</sup>, Kai Liebel<sup>1,2</sup>, Ilona Hagelstein<sup>1,2</sup>,  
Helmut R. Salih<sup>1,2</sup> and Melanie Märklin<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Clinical Collaboration Unit Translational Immunology, German Cancer Consortium (DKTK);  
Department of Internal Medicine, University Hospital Tübingen, Tübingen, Germany,

<sup>2</sup>Cluster of Excellence iFIT (EXC 2180) 'Image-Guided and Functionally Instructed Tumor  
Therapies', Eberhard Karls University Tübingen, Tübingen, Germany

Sarcomas are rare and heterogeneous malignancies that are difficult to treat. Approximately 50% of patients diagnosed with sarcoma develop metastatic disease with so far very limited treatment options. The transmembrane protein B7-H3 reportedly is expressed in various malignancies, including different sarcoma subtypes. In several cancer entities B7-H3 expression is associated with poor prognosis. In turn, B7-H3 is considered a promising target for immunotherapeutic approaches. We here report on the preclinical characterization of a B7-H3xCD3 bispecific antibody in an IgG-based format, termed CC-3, for treatment of different sarcoma subtypes. We found B7-H3 to be expressed on all sarcoma cells tested and expression on sarcoma patients correlated with decreased progression-free and overall survival. CC-3 was found to elicit robust T cell responses against multiple sarcoma subtypes, resulting in significant activation, release of cytokines and effector molecules. In addition, CC-3 promoted T cell proliferation and differentiation, resulting in the generation of memory T cell subsets. Finally, CC-3 induced potent target cell lysis in a target cell restricted manner. Based on these results, a clinical trial evaluating CC-3 in soft tissue sarcoma is currently in preparation.

## KEYWORDS

bispecific antibody, B7-H3, CD276, sarcoma, T cell engager

**Abbreviations:** 7-AAD, 7-aminoactinomycin D; APC, Allophycocyanin; bsAB, bispecific Antibody; BV, brilliant violet; CAR, chimeric antigen receptor; 95% CI, 95% confidence interval; E, T effector to target; FACS, Fluorescence-activated cell sorting; FITC, Fluorescein isothiocyanate; GMP, Good manufacturing practice; HR, Hazard ratio; mAb, monoclonal antibody; MFI, median fluorescence intensity; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; PE, phycoerythrin; SEM, standard error of the mean; SFI, specific fluorescence intensity; TCGA, The cancer genome Atlas Program.

## 1 Introduction

Sarcomas account for more than 20% of solid malignancies in children, but less than 1% of solid malignancies in adults (1). They constitute a rare and diverse group of tumors that can arise from bone (BS) or soft tissue (STS) and are classified into more than 100 different subgroups, presenting a unique challenge for diagnosis and treatment (2, 3). The main therapeutic option for BS and STS is surgical removal of the primary tumor, often accompanied by neoadjuvant or adjuvant chemotherapy and/or radiotherapy (4). Radiation therapy particularly plays a role in cases with positive margins after surgery and in high-grade STS to achieve local tumor control (3, 5). Approximately 50% of sarcoma patients develop metastases during the course of disease (6). The 5-year overall survival rate for both bone sarcoma (BS) and soft tissue sarcoma (STS) ranges from 62% to 75%, despite the introduction of new treatment options (7, 8). In particular, the survival rate for patients with high-risk disease or metastasis at the time of diagnosis is only 30%, and new treatment approaches are needed (9).

In recent decades, treatment options for malignant diseases have greatly improved by the introduction of anti-tumor monoclonal antibodies such as rituximab (10). The further improvement of monoclonal antibodies by Fc optimization and the introduction of bispecific antibodies (bsAbs), such as blinatumomab and more recently glofitamab and epcoritamab, is steadily improving survival of patients with hematopoietic malignancies (11–13). When it comes to solid tumors, the introduction of immune checkpoint inhibitors (ICI), such as the anti-PD-1 antibody pembrolizumab, has improved the management of many cancers, particularly advanced melanoma and non-small cell lung cancer, by inducing potent T cell anti-tumor immunity. ICI therapy is currently also being evaluated in several clinical trials for the treatment of STS and is presently approved for certain sarcoma subtypes as part of combination therapies (14, 15). Nevertheless, ICI treatment of sarcomas has a low response rate, highlighting the urgent need for effective immunotherapies (16, 17).

B7-H3 is a transmembrane protein that belongs to the B7 superfamily of immunoregulatory proteins (18). It was shown to affect tumor cell differentiation, invasion, and migration (18, 19). In addition, the B7-H3 complex may enable tumor cells to evade cytotoxic T cell surveillance by acting as a co-inhibitory molecule (20). High expression of B7-H3 was reported to be associated with poor prognosis in patients with different solid tumors such as osteosarcoma or colorectal cancer (21–23). The identification of B7-H3/CD276 expressed by many sarcoma subtypes despite their heterogeneity, fueled interest in this molecule as a target for sarcoma treatment (24–26). In addition, B7-H3 is also expressed on the neovasculature of tumors (25, 27). To target B7-H3 for cancer treatment, we recently developed an optimized bsAb termed CC-3 (28, 29). CC-3 is based on our established IgGsc format, and contains an affinity reduced anti-CD3 binder (30). In preclinical studies, CC-3 demonstrated a favorable safety profile and pronounced efficacy in analyses with multiple gastrointestinal and colorectal cancer cell lines (28, 29). Currently, CC-3 is being evaluated in a phase I clinical trial for the treatment of metastatic colorectal cancer (NCT05999396). Here we studied the efficacy of CC-3 for the treatment of multiple sarcoma subtypes.

## 2 Methods

### 2.1 Cell lines

Human cell lines RH30 (rhabdomyosarcoma), SaOs2 (osteosarcoma), SK-LMS-1 (leiomyosarcoma), SW872 (liposarcoma), SW982 (synovial sarcoma) and SW1353 (chondrosarcoma) were obtained from DSMZ or ATCC. All cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (PAN-biotech, Aidenbach, Germany), 100 U/ml penicillin (Merck, Darmstadt, Germany), 100 µg/ml streptomycin (Merck), at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. All cell lines were routinely tested for mycoplasma contamination.

### 2.2 Isolation of blood cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors were isolated by density gradient centrifugation using Pancoll Cell Separation Solution (PAN-biotech, Aidenbach, Germany). Monocytes were depleted using human CD14 MicroBeads UltraPure Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

### 2.3 Antibody production

GMP-material of CC-3 used in our clinical trial (NCT05999396) was used for all experiments. The corresponding isotype control (MOPC) was produced as previously described (28, 29). In brief, MOPC was produced in ExpiCHO cells (Gibco, Carlsbad, CA, USA) and subsequently purified from culture supernatant by affinity chromatography on Mabselect affinity columns (GE Healthcare, Munich, Germany). Analytical and preparative size exclusion chromatography was performed using Superdex S200 Increase 10/300GL and HiLoad 16/60 columns (GE Healthcare). Endotoxin levels were measured with EndoZyme II (BioMerieux, Marcy-l'Étoile, France) according to the manufacturer's instructions and were always < 0.5 EU/ml.

### 2.4 Flow cytometry

Measurements were performed using either a FACS Canto II or FACS Fortessa (BD Biosciences, Heidelberg, Germany), and the data were analyzed using FlowJo-V10 software (BD Biosciences).

#### 2.4.1 B7-H3 expression and antigen shift assay

Sarcoma cells were incubated with CC-3 at the indicated concentrations for 24 h or 72 h. To measure B7-H3 expression, cells were washed and stained with 10 µg/ml anti-B7-H3 antibody (clone 7C4) or corresponding MOPC control, followed by 5 µg/ml donkey anti-human PE conjugate (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) and analyzed by flow cytometry. The specific fluorescence intensities (SFIs) were calculated by dividing median

fluorescence intensity (MFI) obtained with anti-B7-H3 by median fluorescence intensity obtained with the isotype control.

#### 2.4.2 T cell activation and degranulation assays

Monocyte-depleted PBMCs were cocultured with sarcoma cells at an effector to target (E:T) ratio of 5:1 with or without CC-3 or MOPC at the indicated concentrations. For analysis of T cell activation, CD69 and CD25 expression were determined after 24 and 72 h, respectively. Cells were stained with CD4-APC (clone L200), CD8a-FITC (clone HIT8a), CD69-PE (clone FN50) and CD25-PE (clone BC96) and the corresponding isotype control in PE (clone MOPC21). To analyze T cell degranulation, cells were cultured for 4 h in the presence of CD107a-PE (clone H4A3). All antibodies were purchased from BD Biosciences (Heidelberg, Germany). Dead cells were excluded by 7-AAD (Biolegend, San Diego, CA, USA).

#### 2.4.3 T cell proliferation and differentiation assays

Monocyte-depleted PBMCs were incubated with sarcoma cells (E:T ratio 10:1) and CC-3 or MOPC (1 nM each). On day 3, cells were restimulated using the same fresh target cell counts and bsAbs as in the initial coculture. On day 6, cells were stained with CD4-FITC (clone OKT4) CD8a-APC-Cy7 (clone SK1), CD45RA-APC (clone HI100), CD45RO-PE-Cy7 (clone UCHL1), CD62L-BV605 (clone DREG 56) and CD197-PE (clone G043H7, all Biolegend, San Diego, CA, USA). Latex beads (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) were used to ensure that equal volumes of cell suspension were analyzed. To exclude dead cells from the analysis, fixable violet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used. To generate t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE) plots, equal amounts of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells for each condition and sarcoma cell line were combined and analyzed for the different treatments.

### 2.5 Cytokine secretion

Monocyte-depleted PBMCs were cultured with sarcoma cells (E:T ratio 5:1) with or without CC-3 or MOPC (1 nM each). After 24 h supernatants were collected and analyzed using the Legendplex Human CD8/NK Panel (BioLegend, San Diego, CA, USA) according to manufacturer's protocol.

### 2.6 Cytotoxicity assays

Monocyte-depleted PBMCs were cocultured with sarcoma cells (E:T ratio 5:1) in the presence or absence of CC-3 or MOPC (1 nM each) and measured after 72 h by flow cytometry. Tumor cells were labeled with 2.5  $\mu$ M CellTrace™ Violet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Latex beads were used to ensure equal volumes in each measurement. The xCELLigence RTCA system (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) was used to conduct a long-term analysis over 120 hours.

## 2.7 Statistics

Unless otherwise noted, values presented are means  $\pm$  standard deviation (SD). Continuous variables were analyzed by one-way ANOVA and by Friedman's test. In cases of normally distributed values where ANOVA revealed significant differences, group comparisons were performed using Tukey's multiple comparison test. When Friedman's test showed significant differences for non-normally distributed values, Dunn's multiple comparison test was used. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism (v.9.4.1). All statistical tests were considered significant when the p-value was less than 0.05 (\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, \*\*\*\* p<0.0001).

## 3 Results

### 3.1 Clinical relevance of B7-H3 expression in sarcomas

It has been reported that B7-H3 overexpression is associated with cancer progression and poor patient survival (26). We here correlated B7-H3 expression levels with clinical outcomes in sarcoma patients (n=259) using the TCGA database. We observed a significant difference in median progression-free survival between the B7-H3 high quartile (22 months) and the B7-H3 low quartile (61 months) (Figure 1A). In addition, the median overall survival for the B7-H3 high quartile was 64 months, while the B7-H3 low quartile did not reach the median survival within the six-year period of data collection. The histological distribution of relevant sarcoma subtypes diagnosed in Germany in 2013 (n=2438), as reported by Reesing et al. in 2018, is simplified in Figure 1B (31). While the majority of sarcomas were not histologically defined (27%), described subtypes were liposarcoma (23%), leiomyosarcoma (15%), fibrosarcoma (9%), angiosarcoma (6%), synovial sarcoma (4%), rhabdomyosarcoma (2%), chondrosarcoma (0.6%), osteosarcoma (0.2%) and other subtypes (14%). In our study, we selected sarcoma cell lines representing a total of 44% of the sarcomas analyzed. Binding of CC-3 to tumor cells was observed in all sarcoma cell lines tested, with RH30 showing the highest and SK-LMS-1 the lowest expression levels (Figures 1C, D, E). By binding to the target antigen, antibodies can alter its expression on the target cells, which may impact therapeutic efficacy (32). To study whether and how CC-3 binding affected B7-H3 expression on sarcoma cells, all cell lines were incubated with increasing concentrations of CC-3 for 24 and 72 h and then compared to unexposed controls with regards to CC 3 binding. After 24 hours, CC-3 treatment reduced B7-H3 expression by 10% in SK-LMS-1 and by 23% in SW872, which showed the highest reduction at concentrations above 1 nM, (Figure 1F, left panel). After 72 h, B7-H3 levels decreased by an average of 11%, with a maximum decrease of 17% in SaOs2, while no changes were observed in SK-LMS-1 (Figure 1F, right panel). Additionally, no turnover of target cells without effector cells was observed (Supplementary Figure 1).

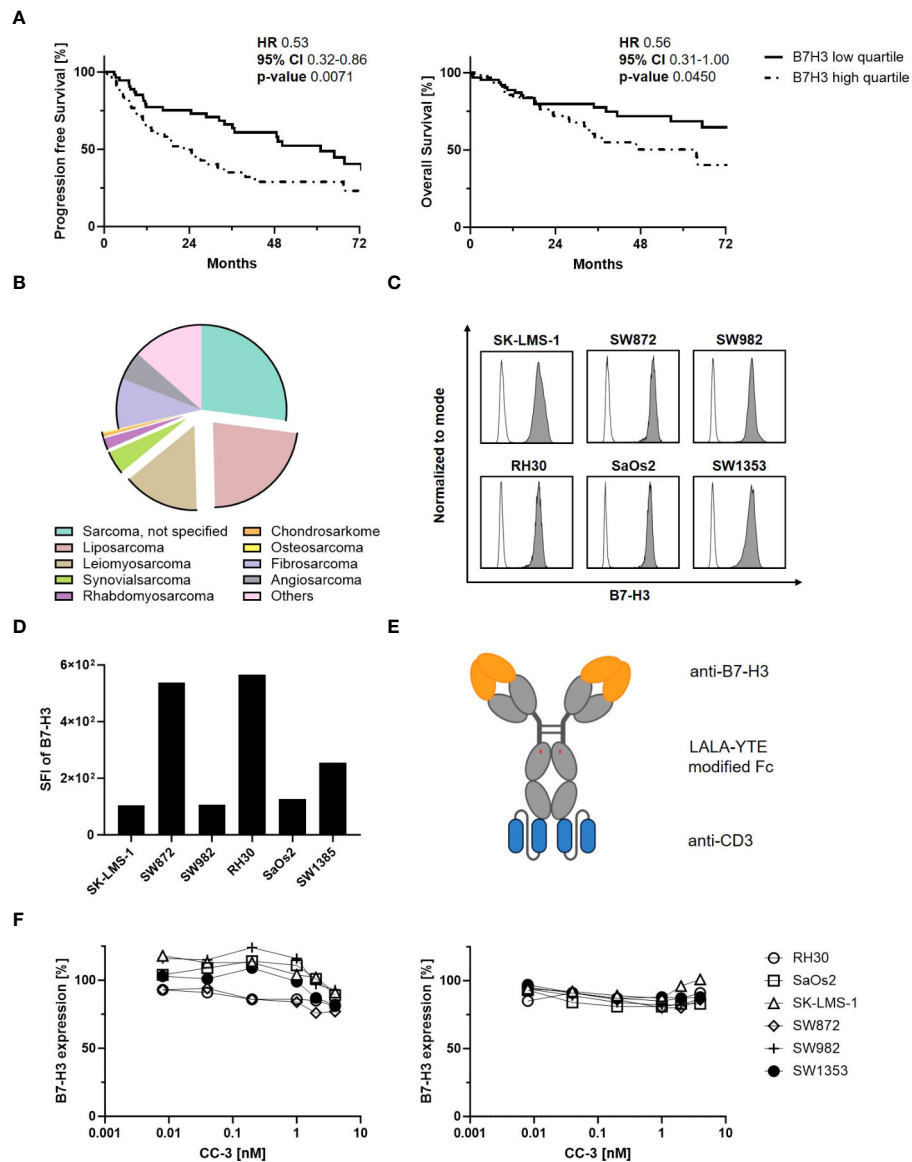


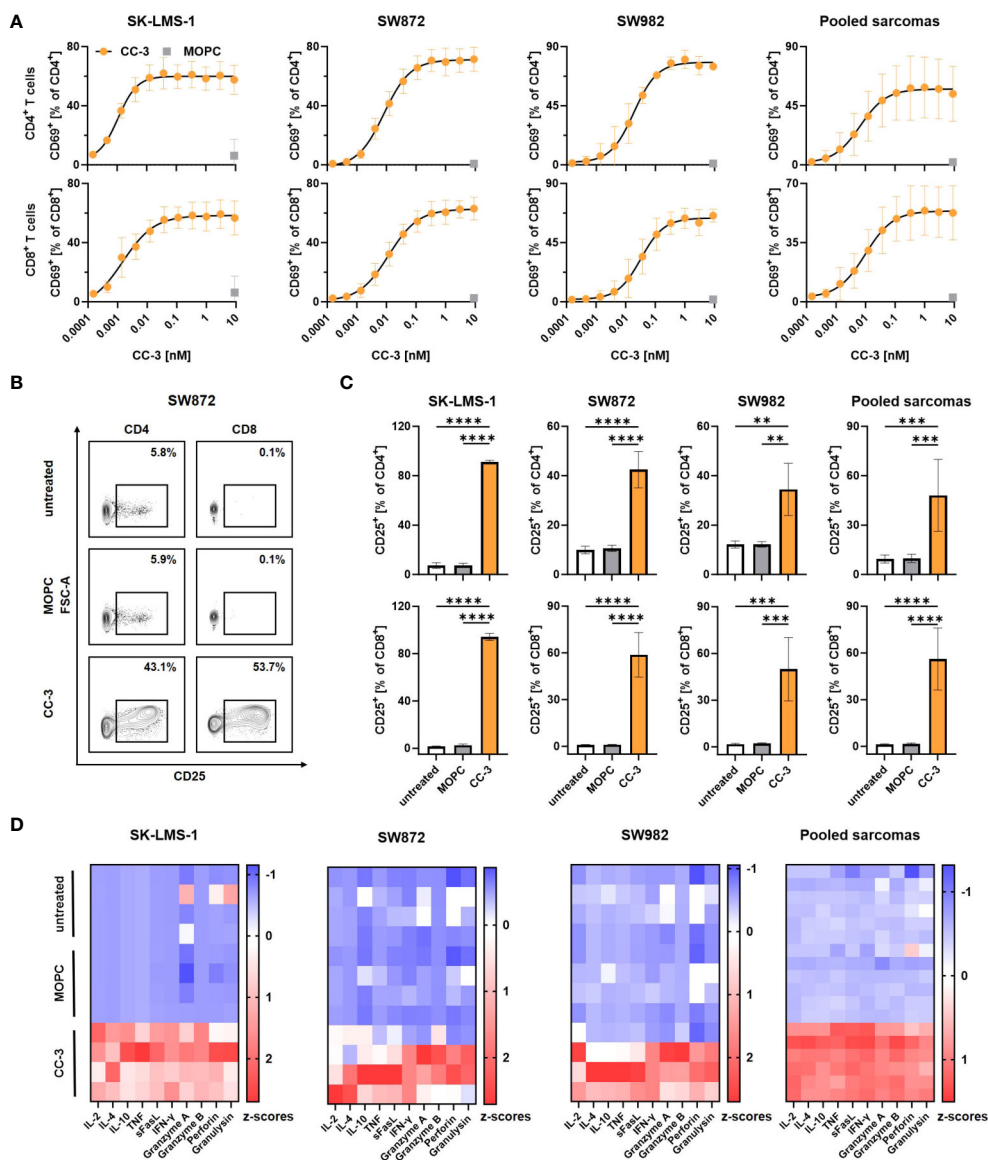
FIGURE 1

Characterization of B7-H3 expression in sarcomas. (A) Sarcoma patients were divided into B7-H3 low and high quartiles according to RNA expression based on data obtained from the The Cancer Genome Atlas (TCGA) program. Clinical data for progression-free survival (PFS, n=231) (left panel) and overall survival (OS, n=259) (right panel) of sarcoma patients were correlated with B7-H3 expression for 72 consecutive months. (B) Distribution of sarcoma subtypes diagnosed in Germany in 2013 (n=2438) based on data from Reesing et al, 2018 (31) (CC-BY 4.0 licence). (C, D) The indicated sarcoma cells were stained (n=1) with a monoclonal B7-H3 antibody (clone 7C4) followed by an anti-human PE conjugate and analyzed by flow cytometry. (C) B7-H3 expression (filled histograms) is shown for the indicated cell lines with corresponding isotype control staining (open histograms). (D) SFIs for B7-H3 (n=1), calculated by dividing the MFI of B7-H3 by the MFI obtained with the isotype control, are shown for the different sarcoma cell lines. (E) Schematic illustration of the bsAb CC-3 with the anti-B7-H3 (orange) and the anti-CD3 (blue) targeting regions. (F) Sarcoma cells were incubated with the indicated concentration of CC-3 for 24 h (left panel) or 72 h (right panel). Cells were then washed and directly reincubated with anti-B7-H3 (clone 7C4) followed by an anti-human PE antibody and measured by flow cytometry. Relative surface expression of B7-H3 was calculated by defining the MFI of cells preincubated without CC-3 as 100% (n=1, performed in duplicate). HR: hazard ratio, 95% CI: 95% confidence interval.

### 3.2 T cell activation with CC-3

To determine the CC-3 dose required to fully activate T cells in cocultures with sarcoma cells, we titrated CC-3 and determined expression of the activation marker CD69 on T cells by flow cytometry after 24 h. CC-3 induced a dose- and target-cell dependent activation of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, whereas the MOPC control showed no effect, even at the highest concentration of 9 nM (Figure 2A, Supplementary Figures 2A, B).

Maximum T cell activation was observed at 1 nM, which was selected as dose for subsequent experiments. Effective cancer treatment, particularly in patients with a high tumor burden, requires a persistent and long-lasting T cell response. To confirm ongoing T cell activation, we evaluated expression of the mid-term activation marker CD25 on T cells after CC-3 treatment by flow cytometry after 72 h of coculture with sarcoma cells. CC-3 treatment resulted in significant and sustained activation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells with all sarcoma subtypes tested. The MOPC



**FIGURE 2** Induction of T cell activation and cytokine release with sarcoma cell lines by CC-3. PBMCs (n=4) were incubated with the indicated sarcoma cells (E: T 5:1) in the presence or absence of CC-3 or MOPC. Unless otherwise noted, all constructs were used at 1 nM. T cell activation by CD69 and CD25 was assessed for CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells by flow cytometry after 24 h and 72 h, respectively, and secretion of cytokines and effector molecules was determined using Legendplex assays after 24 h. (A) Activation of CD4<sup>+</sup> (top panels) and CD8<sup>+</sup> T cells (bottom panels) was determined by CD69 expression. Combined data from all tested cell lines are shown (right panel). (B, C) Activation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells was determined by CD25 expression. (B) Exemplary results obtained with SW872 cells are shown. (C) CD4<sup>+</sup> (top panel) and CD8<sup>+</sup> (bottom panel) T cells were analyzed for CD25. Combined data of all cell lines tested are shown (right panels). (D) Cytokine and effector molecule release for the indicated cell lines with or without CC-3 or MOPC control after 24 h was determined using Legendplex assays. Combined data from all tested cell lines are shown (right panel). The values presented are means  $\pm$  SD (\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, \*\*\*\* p<0.0001).

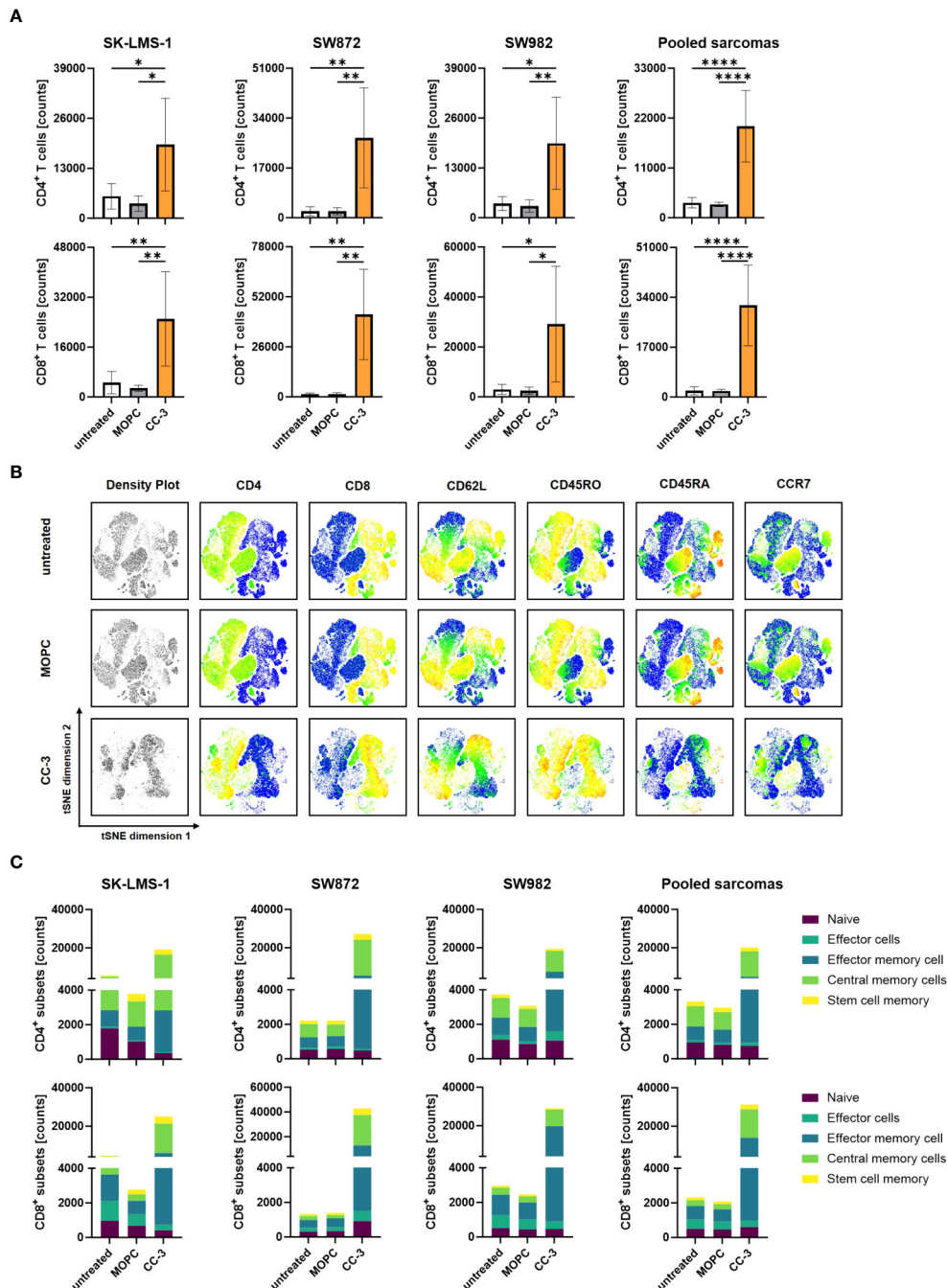
control showed no difference compared to PBMCs without antibody treatment (Figures 2B, C, Supplementary Figure 2C). Activation of T cells results in the release of activating cytokines and effector molecules into the culture supernatant. This was analyzed by Legendplex assays after 24 h. Despite a substantial donor variability, treatment with CC-3 resulted in significant increases in IL-2, IL-4, IL-10, and IFN $\gamma$  as well as enhanced release of sFasL, TNF, granzyme A, granzyme B, perforin and granulysin compared to MOPC control in all experiments (Figure 2D, Supplementary Figure 2D).

### 3.3 Induction of T cell proliferation and differentiation

To effectively combat high tumor burden, it is essential to induce T cell proliferation, resulting in a greater number of effector cells available to fight the tumor. We investigated whether and to what extent CC-3 induced T cell proliferation by coculturing PBMCs with and without CC-3 or MOPC control in cocultures with sarcoma cells. On day 3, fresh sarcoma cells as well as CC-3 or MOPC control were added. On day 6, the number of CD4<sup>+</sup> and

CD8<sup>+</sup> T cells was determined by flow cytometry (Figure 3A, Supplementary Figure 3A). On average, treatment with CC-3 resulted in a 6-fold increase in CD4<sup>+</sup> T cell counts and a 15-fold increase in CD8<sup>+</sup> T cell counts. In contrast, the MOPC control did

not alter the number of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells, confirming that CC-3 mediated its effect on T cells in a target cell-restricted manner. Memory T cells play a critical role for a strong and long-lasting T cell response, as they are able to proliferate rapidly upon

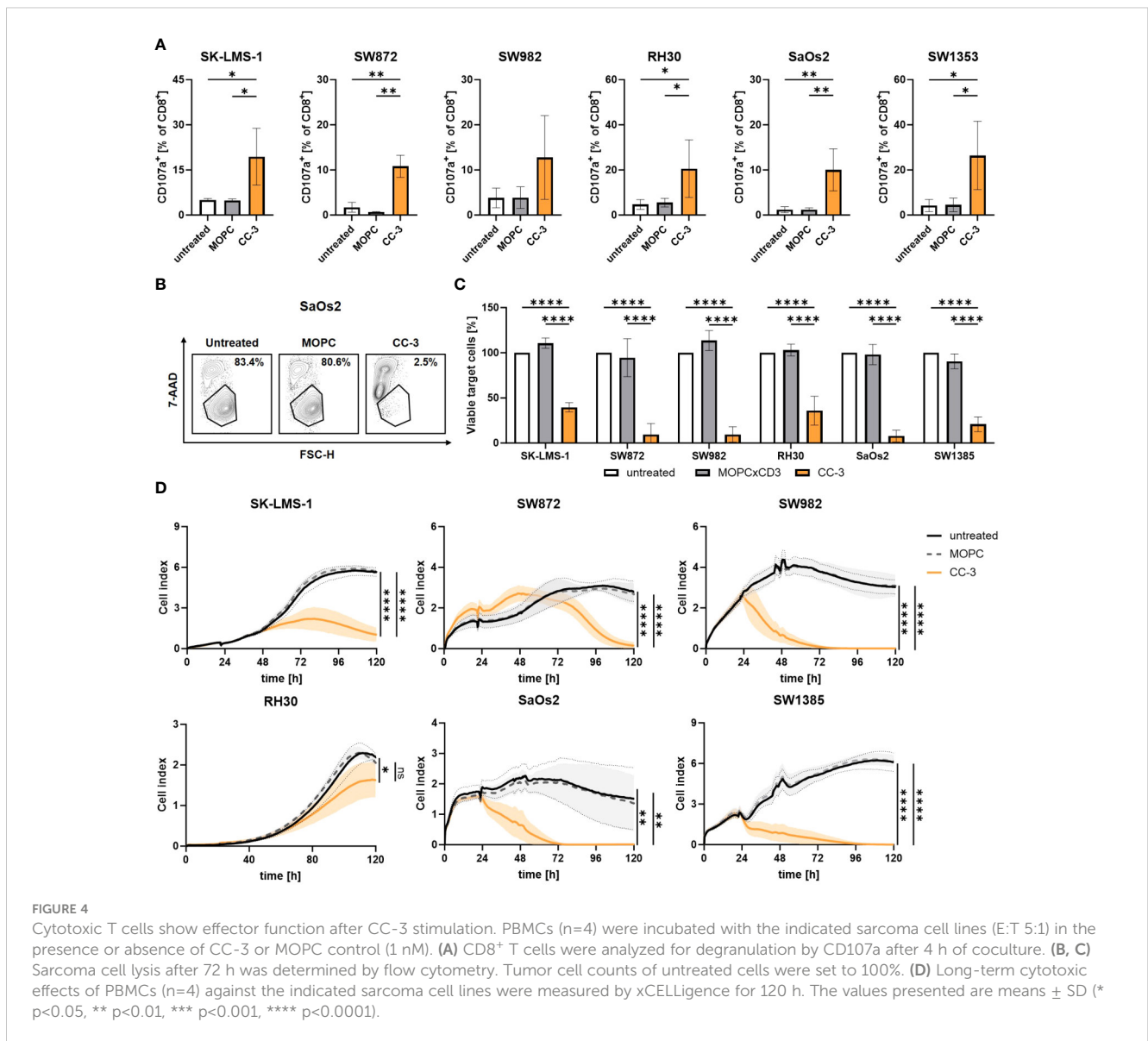


**FIGURE 3** Proliferation and differentiation of T cell subsets after treatment with CC-3. PBMCs (n=4) were incubated with the indicated sarcoma cells (E:T 10:1) in the presence or absence of CC-3 or MOPC control (1 nM each) for 6 days. On day 3, PBMC were re-exposed to fresh target cells and the respective treatment for additional 3 days. On day 6, proliferation and T cell subsets were analyzed by flow cytometry for CD62L, CD45RO, CD45RA and CCR7. **(A)** CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell counts for the indicated cell lines are shown. **(B)** Representative t-distributed stochastic neighbor embedding (tSNE) plots are shown with equal amounts of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from each PBMC donor after coculture with all sarcoma cell lines tested. The tSNE visualizes the density of all analyzed T cells, and the expression of each individual marker is displayed in pseudocolor. **(C)** Quantification of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell subpopulations after coculture with the indicated cell lines or the combined data for all cell lines tested. The values presented are means ± SD (\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, \*\*\*\* p<0.0001).

reactivation. We investigated the differentiation of T cells induced by CC-3 into subsets of naive cells (CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>), stem cell memory (SCM) (CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) central memory cells (CMC) (CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>), effector memory cells (EMC) (CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) and effector cells (CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>) (33). The tSNE visualization technique was used to display the multidimensional flow cytometry data (Figure 3B). The population composition obtained with the MOPC control was found to be similar to that of untreated T cells in coculture with sarcoma cells. In contrast, CC-3 specifically stimulated the formation of CMC and EMC in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (Figure 3C, Supplementary Figures 3B, C). Thus, CC-3 shifts the proportions towards CMC in CD4<sup>+</sup> T cells and higher proportions of both CMC and EMC in CD8<sup>+</sup> T cells (Supplementary Figure 3C).

### 3.4 CC-3 potently induces sarcoma cell lysis by T cells

When bsAbs bind to tumor cells and stimulate T cells via CD3, cytotoxic T cells release effector molecules such as perforin and granzymes from their secretory granules as a major killing mechanism (34). Degranulation of T cells was analyzed by CD107a expression after 4 h of coculture of - PBMCs and sarcoma cells, with and without CC-3 or MOPC control, by flow cytometry. We found that CC-3 potently stimulated the degranulation of CD8<sup>+</sup> T cells in cocultures with all sarcoma cells used (Figure 4A). Since efficient cell lysis is essential for effective tumor control, sarcoma cell lysis in coculture with PBMCs was determined by flow cytometry after 72 h, with and without CC-3 or MOPC control. CC-3 induced pronounced tumor cell lysis with all



sarcoma subtypes, whereas the MOPC control had no effect compared to untreated samples (Figures 4B, C). Continuous analysis of the cytotoxic effect over a period of 120 h using xCELLigence confirmed a sustained long-term cytotoxic effect of CC-3 with all sarcoma cells, resulting in significantly reduced tumor burden (Figure 4D).

## 4 Discussion

For many years, effective treatment options for sarcomas were lacking, and few improvements were introduced in routine care. Clinical trials including sarcoma patients are complicated by the substantial heterogeneity and rarity of the disease. This also holds true for the various immunotherapies that have revolutionized treatment in other cancer entities in recent years. For example, pembrolizumab and nivolumab are currently being investigated for use in sarcoma patients, but efficacy appears rather limited, in particular when compared to e.g. melanoma or lung cancer (14, 35). One reason may be the very low mutation rate in sarcomas, resulting in low level expression of tumor-specific neoantigens (36). Therefore, there is a high need to develop new therapies for sarcomas that stimulate targeted anti-tumor immunity.

B7-H3 has been shown to influence tumor cell differentiation, invasion, migration, and is discussed to play a role in cancer stemness (19, 37). B7-H3 overexpression was found to associate with tumor progression and aggressiveness in clear cell renal cell carcinoma and osteosarcoma (38, 39). In line, our findings obtained upon analysis of the TCGA database showed that sarcoma patients with high B7-H3 expression experience shorter progression-free and overall survival. B7-H3 was found to be highly expressed in several bone and soft tissue sarcomas, making it a promising target for therapy (26). Sarcomas are generally considered to be quite resistant to immunotherapy, in part due to low immune cell infiltration (16, 17, 40). B7-H3 is not only expressed on cancer cells themselves, but also on tumor vessels. Targeting the latter can be expected to generate a local inflammatory milieu that enhances immune infiltration into the tumor. In addition, damage to tumor vasculature per se would inhibit tumor growth (41). Our study indicates that even after prolonged exposure to high levels of anti-B7-H3 antibodies, a stable antigen expression is prevalent, and this was observed across different sarcoma subtypes. Our data further clearly show that targeting B7-H3 with our bsAb CC-3 induces potent and target-restricted activation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells that results in pronounced tumor cell killing, but also T cell proliferation that is particularly important to combat high tumor burden. In addition, CC-3 induced the development of memory T cell subsets such as EMC and CMC, which are essential for effective tumor control (42, 43).

In previous studies, we and others have already shown that monospecific B7-H3 mAbs which recruit NK cells as effector cells are effective in targeting solid tumor cells such as sarcoma, breast and ovarian cancers *in vitro* (26, 44, 45). BsAbs such as CC-3 may mediate enhanced efficacy by recruiting T cells, which exhibit profoundly higher effector potential than NK cells. Additionally, CC-3 contains an optimized antigen epitope with respect to membrane proximity

improving tumor lysis and a low-affinity CD3 binder to reduce side effects (28). Several bsAbs targeting B7-H3 are currently under clinical evaluation, such as XmAb808, a B7H3xCD28 bsAb that has been evaluated in advanced solid tumors (NCT05585034). MGD009, a B7H3xCD3 bsAb in a dual affinity re-targeting (DART) format, has been evaluated in various solid tumors including sarcomas. Notably, the clinical evaluation of the MGD009 bsAb was temporarily paused due to a transient elevation of liver enzymes in treated patients. However, the study was resumed following a safety evaluation. It is important to note that bsAbs carrying many single chains tend to aggregate, resulting in off-target T cell activation and cytokine release, but further comprehensive information on MGD009 is not currently available and therefore a direct comparison with CC-3 is not possible.

Our bsAb CC-3 generated in the IgGsc format, which is currently tested in a clinical trial in colorectal cancer patients (NCT05999396), has shown reduced side effects and toxicity in preclinical studies (28–30). In addition to bsAbs, chimeric antigen receptor (CAR) T cells targeting B7-H3 in sarcomas are currently in development (NCT04483778, NCT04897321) (46, 47). However, CAR-T cells require a complex and individualized manufacturing process for each patient, increasing the cost of therapy tremendously. Notably, the actual CAR-T therapy starts a few weeks after the diagnosis, and valuable time is spent on less effective bridging therapies. In contrast, antibody therapy is readily available off the shelf.

In summary, our bsAb CC-3 shows promise as an immunotherapeutic agent for multiple sarcoma subtypes and will be evaluated in an upcoming clinical trial in patients with soft tissue sarcoma. If successful, CC-3 would provide a new and effective treatment option for patients who so far do not have access to advanced and effective immunotherapeutic treatment options for cancer.

## Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## Ethics statement

The studies involving humans were approved by ethics committee at the Medical Faculty of the Eberhard Karls University and the University Hospital Tübingen (reference number 13/2007V). The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. The participants provided their written informed consent to participate in this study.

## Author contributions

SH: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. KL: Data curation, Formal analysis, Investigation,

Visualization, Writing – original draft. IH: Methodology, Resources, Writing – review & editing. HS: Conceptualization, Funding acquisition, Resources, Supervision, Writing – review & editing. MM: Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing.

## Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This work was supported by grants from DFG (MA 9302/2-1), Deutsche Krebshilfe (70113496 and 70115833 to MM, 70113999 to HRS) and the Wilhelm Sander-Stiftung (2017.100.3 to HRS) and Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) under Germany's Excellence Strategy - EXC 2180 - 39090067 (SA 1360/9-3).

## Acknowledgments

The authors thank Tatjana Schreiber for excellent technical assistance and the Flow Cytometry Core Facility Berg of the University Hospital Tübingen for their excellent technical support. We acknowledge support from the Open Access Publishing Fund of the University of Tübingen.

## References

- Burningham Z, Hashibe M, Spector L, Schiffman JD. The epidemiology of sarcoma. *Clin Sarcoma Res.* (2012) 2:14. doi: 10.1186/2045-3329-2-14
- Lahat G, Lazar A, Lev D. Sarcoma epidemiology and etiology: potential environmental and genetic factors. *Surg Clin North Am.* (2008) 88:451–81. doi: 10.1016/j.suc.2008.03.006
- Grunewald TG, Alonso M, Avnet S, Banito A, Burdach S, Cidre-Aranaz F, et al. Sarcoma treatment in the era of molecular medicine. *EMBO Mol Med.* (2020) 12:e11131. doi: 10.15252/emmm.201911131
- Ray-Coquard I, Serre D, Reichardt P, Martin-Broto J, Bauer S. Options for treating different soft tissue sarcoma subtypes. *Future Oncol.* (2018) 14:25–49. doi: 10.2217/fon-2018-0076
- Savina M, Le Cesne A, Blay JY, Ray-Coquard I, Mir O, Toulmonde M, et al. Patterns of care and outcomes of patients with METastatic soft tissue SARcoma in a real-life setting: the METASARC observational study. *BMC Med.* (2017) 15:78. doi: 10.1186/s12916-017-0831-7
- Billingsley KG, Burt ME, Jara E, Ginsberg RJ, Woodruff JM, Leung DH, et al. Pulmonary metastases from soft tissue sarcoma: analysis of patterns of diseases and postmetastasis survival. *Ann Surg.* (1999) 229:602–10. doi: 10.1097/0000658-199905000-00002
- Smeland S, Bielack SS, Whelan J, Bernstein M, Hogendoorn P, Kraillo MD, et al. Survival and prognosis with osteosarcoma: outcomes in more than 2000 patients in the EURAMOS-1 (European and American Osteosarcoma Study) cohort. *Eur J Cancer.* (2019) 109:36–50. doi: 10.1016/j.ejca.2018.11.027
- Duchman KR, Gao Y, Miller BJ. Prognostic factors for survival in patients with high-grade osteosarcoma using the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program database. *Cancer Epidemiol.* (2015) 39:593–9. doi: 10.1016/j.canep.2015.05.001
- Lochner J, Menge F, Vassos N, Hohenberger P, Kasper B. Prognosis of patients with metastatic soft tissue sarcoma: advances in recent years. *Oncol Res Treat.* (2020) 43:613–9. doi: 10.1159/000509519

## Conflict of interest

HS is listed as inventor on the patent application “Antibodies targeting, and other modulators of, the CD276 antigen, and uses thereof,” EP3822288A1, applicant is German Cancer Research Center, Heidelberg, and Medical Faculty University of Tübingen, Germany.

The remaining authors declares that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

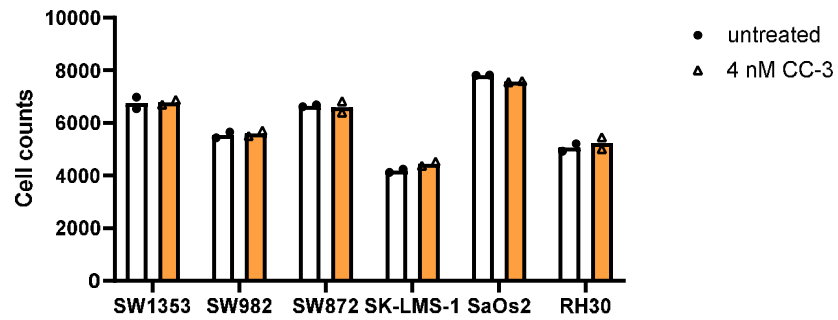
## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2024.1391954/full#supplementary-material>

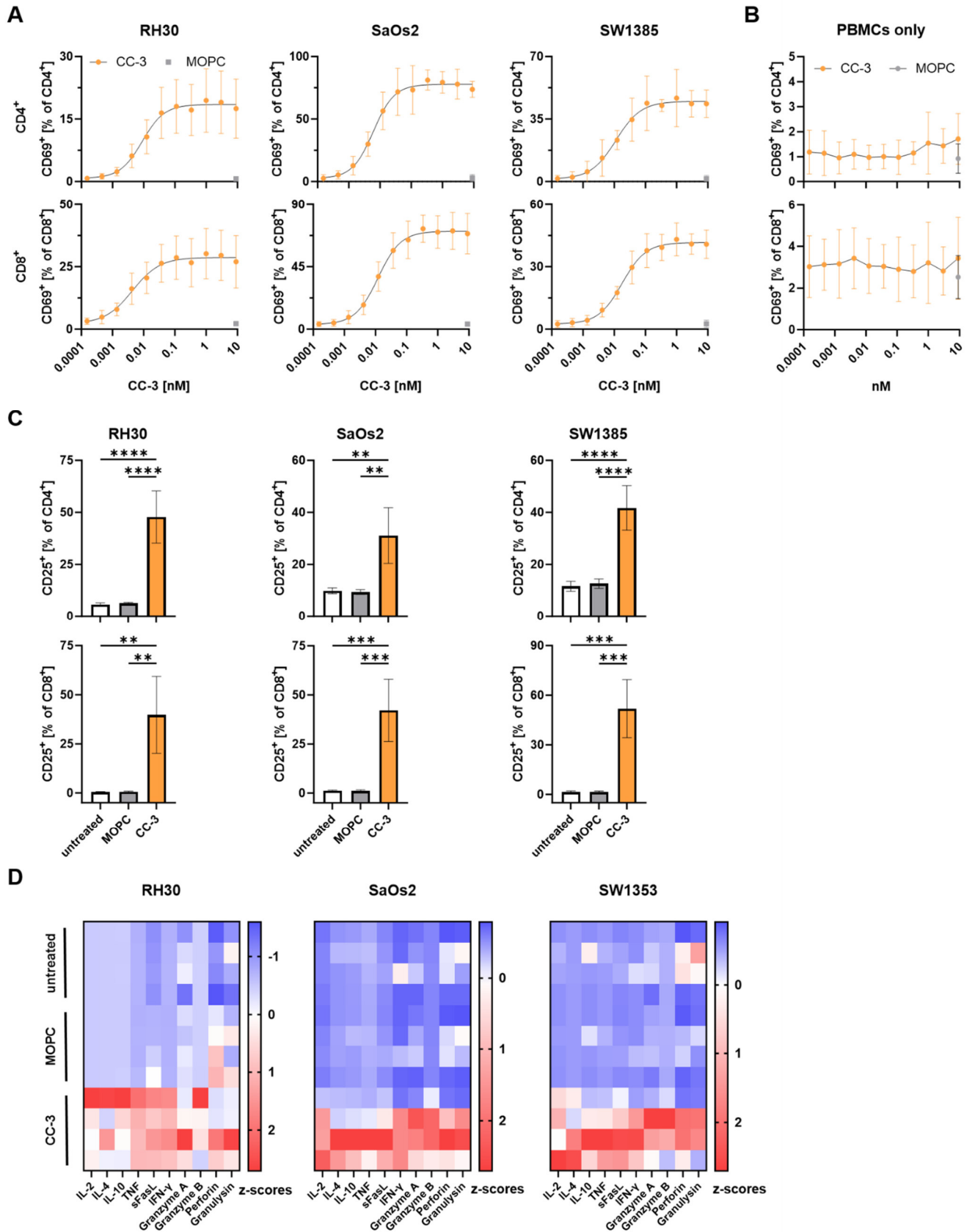
- Kajuter H, Wellmann I, Khil L, Jockel KH, Zhang C, Fink AM, et al. Survival of patients with chronic lymphocytic leukemia before and after the introduction of chemoimmunotherapy in Germany. *Blood Cancer J.* (2021) 11:174. doi: 10.1038/s41408-021-00556-7
- Dickinson MJ, Carlo-Stella C, Morschhauser F, Bachy E, Corradini P, Iacoboni G, et al. Glofitamab for relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* (2022) 387:2220–31. doi: 10.1056/NEJMoa2206913
- Kantarjian HM, Logan AC, Zaman F, Gokbuget N, Bargou RC, Zeng Y, et al. Survival outcomes in patients with relapsed/refractory or MRD-positive B-cell acute lymphoblastic leukemia treated with blinatumomab. *Ther Adv Hematol.* (2023) 14:20406207231201454. doi: 10.1177/20406207231201454
- Thieblemont C, Phillips T, Ghesquieres H, Cheah CY, Clausen MR, Cunningham D, et al. Eporitamab, a novel, subcutaneous CD3xCD20 bispecific T-cell-engaging antibody, in relapsed or refractory large B-cell lymphoma: dose expansion in a phase I/II trial. *J Clin Oncol.* (2023) 41:2238–47. doi: 10.1200/JCO.22.01725
- Blay JY, Chevret S, Le Cesne A, Brahmi M, Penel N, Cousin S, et al. Pembrolizumab in patients with rare and ultra-rare sarcomas (AcSe Pembrolizumab): analysis of a subgroup from a non-randomised, open-label, phase 2, basket trial. *Lancet Oncol.* (2023) 24:892–902. doi: 10.1016/S1470-2045(23)00282-6
- Anastasiou M, Kyriazoglou A, Kotsantis I, Economopoulou P, Kyrkasiadou M, Giannopoulou A, et al. Immune checkpoint inhibitors in sarcomas: a systematic review. *Immunooncol Technol.* (2023) 20:100407. doi: 10.1016/j.iotech.2023.100407
- Eulo V, Van Tine BA. Immune checkpoint inhibitor resistance in soft tissue sarcoma. *Cancer Drug Resist.* (2022) 5:328–38. doi: 10.20517/cdr
- Siozopoulou V, Domen A, Zwaenepoel K, Van Beek A, Smits E, Pauwels P, et al. Immune checkpoint inhibitory therapy in sarcomas: is there light at the end of the tunnel? *Cancers (Basel).* (2021) 13. doi: 10.3390/cancers13020360
- Yang S, Wei W, Zhao Q. B7-H3, a checkpoint molecule, as a target for cancer immunotherapy. *Int J Biol Sci.* (2020) 16:1767–73. doi: 10.7150/ijbs.41105

19. Liu S, Liang J, Liu Z, Zhang C, Wang Y, Watson AH, et al. The role of CD276 in cancers. *Front Oncol.* (2021) 11:654684. doi: 10.3389/fonc.2021.654684
20. Zhou WT, Jin WL. B7-H3/CD276: an emerging cancer immunotherapy. *Front Immunol.* (2021) 12:701006. doi: 10.3389/fimmu.2021.701006
21. Zhang X, Fang C, Zhang G, Jiang F, Wang L, Hou J. Prognostic value of B7-H3 expression in patients with solid tumors: a meta-analysis. *Oncotarget.* (2017) 8:93156–67. doi: 10.18632/oncotarget.v8i54
22. Mao Y, Sun J, Wang WP, Zhang XG, Hua D. Clinical significance of costimulatory molecule B7-H3 expression on CD3(+) T cells in colorectal carcinoma. *Chin Med J (Engl).* (2013) 126:3035–8. doi: 10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20122512
23. Wang L, Zhang Q, Chen W, Shan B, Ding Y, Zhang G, et al. B7-H3 is overexpressed in patients suffering osteosarcoma and associated with tumor aggressiveness and metastasis. *PLoS One.* (2013) 8:e70689. doi: 10.1371/journal.pone.0070689
24. Birdi HK, Jirovec A, Cortes-Kaplan S, Werier J, Nessim C, Diallo JS, et al. Immunotherapy for sarcomas: new frontiers and unveiled opportunities. *J Immunother Cancer.* (2021) 9. doi: 10.1136/jitc-2020-001580
25. Dai L, Guo X, Xing Z, Tao Y, Liang W, Shi Z, et al. Multi-omics analyses of CD276 in pan-cancer reveals its clinical prognostic value in glioblastoma and other major cancer types. *BMC Cancer.* (2023) 23:102. doi: 10.1186/s12885-023-10575-1
26. Hagelstein I, Engel M, Hinterleitner C, Manz T, Marklin M, Jung G, et al. B7-H3-targeting Fc-optimized antibody for induction of NK cell reactivity against sarcoma. *Front Immunol.* (2022) 13:1002898. doi: 10.3389/fimmu.2022.1002898
27. Crispin PL, Sheinin Y, Roth TJ, Lohse CM, Kuntz SM, Frigola X, et al. Tumor cell and tumor vasculature expression of B7-H3 predict survival in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* (2008) 14:5150–7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0536
28. Zekri L, Lutz M, Prakash N, Manz T, Klimovich B, Mueller S, et al. An optimized IgG-based B7-H3xCD3 bispecific antibody for treatment of gastrointestinal cancers. *Mol Ther.* (2023) 31:1033–45. doi: 10.1016/j.ythm.2023.02.010
29. Lutz MS, Zekri L, Wessling L, Berchtold S, Heitmann JS, Lauer UM, et al. IgG-based B7-H3xCD3 bispecific antibody for treatment of pancreatic, hepatic and gastric cancer. *Front Immunol.* (2023) 14:1163136. doi: 10.3389/fimmu.2023.1163136
30. Zekri L, Vogt F, Osburg L, Muller S, Kauer J, Manz T, et al. An IgG-based bispecific antibody for improved dual targeting in PSMA-positive cancer. *EMBO Mol Med.* (2021) 13:e11902. doi: 10.15252/emmm.201911902
31. Rensing M, Wardelmann E, Hohenberger P, Jakob J, Kasper B, Emrich K, et al. Strengthening health data on a rare and heterogeneous disease: sarcoma incidence and histological subtypes in Germany. *BMC Public Health.* (2018) 18:235. doi: 10.1186/s12889-018-5131-4
32. Knutson KL, Almand B, Dang Y, Disis ML. Neu antigen-negative variants can be generated after neu-specific antibody therapy in neu transgenic mice. *Cancer Res.* (2004) 64:1146–51. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-0173
33. Golubovskaya V, Wu L. Different subsets of T cells, memory, effector functions, and CAR-T immunotherapy. *Cancers (Basel).* (2016) 8. doi: 10.3390/cancers8030036
34. Stinchcombe JC, Majorovits E, Bossi G, Griffiths GM. Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature.* (2006) 443:462–5. doi: 10.1038/nature05071
35. D'Angelo SP, Mahoney MR, Van Tine BA, Atkins J, Milhem MM, Jahagirdar BN, et al. Nivolumab with or without ipilimumab treatment for metastatic sarcoma (Alliance A091401): two open-label, non-comparative, randomised, phase 2 trials. *Lancet Oncol.* (2018) 19:416–26. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30006-8
36. Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, Gay L, Ali SM, Ennis R, et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med.* (2017) 9:34. doi: 10.1186/s13073-017-0424-2
37. Bin Z, Guangbo Z, Yan G, Huan Z, Desheng L, Xueguang Z. Overexpression of B7-H3 in CD133+ colorectal cancer cells is associated with cancer progression and survival in human patients. *J Surg Res.* (2014) 188:396–403. doi: 10.1016/j.jss.2014.01.014
38. Yin SJ, Wang WJ, Zhang JY. Expression of B7-H3 in cancer tissue during osteosarcoma progression in nude mice. *Genet Mol Res.* (2015) 14:14253–61. doi: 10.4238/2015.November.13.9
39. Lee JH, Kim YJ, Ryu HW, Shin SW, Kim EJ, Shin SH, et al. B7-H3 expression is associated with high PD-L1 expression in clear cell renal cell carcinoma and predicts poor prognosis. *Diagn Pathol.* (2023) 18:36. doi: 10.1186/s13000-023-01356-2
40. Nystrom H, Jonsson M, Nilbert M, Carneiro A. Immune-cell infiltration in high-grade soft tissue sarcomas; prognostic implications of tumor-associated macrophages and B-cells. *Acta Oncol.* (2023) 62:33–9. doi: 10.1080/0284186X.2023.2172688
41. Seaman S, Zhu Z, Saha S, Zhang XM, Yang MY, Hilton MB, et al. Eradication of tumors through simultaneous ablation of CD276/B7-H3-positive tumor cells and tumor vasculature. *Cancer Cell.* (2017) 31:501–15.e8. doi: 10.1016/j.ccell.2017.03.005
42. Ando M, Ito M, Srirat T, Kondo T, Yoshimura A. Memory T cell, exhaustion, and tumor immunity. *Immunol Med.* (2020) 43:1–9. doi: 10.1080/25785826.2019.1698261
43. Klebanoff CA, Gattinoni L, Restifo NP. CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunol Rev.* (2006) 211:214–24. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00391.x
44. Fauci JM, Sabbatino F, Wang Y, Londono-Joshi AI, Straughn JM Jr., Landen CN, et al. Monoclonal antibody-based immunotherapy of ovarian cancer: targeting ovarian cancer cells with the B7-H3-specific mAb 376. *Gynecol Oncol.* (2014) 132:203–10. doi: 10.1016/j.ygyno.2013.10.038
45. Nagase-Zembutsu A, Hirotani K, Yamato M, Yamaguchi J, Takata T, Yoshida M, et al. Development of DS-5573a: A novel afucosylated mAb directed at B7-H3 with potent antitumor activity. *Cancer Sci.* (2016) 107:674–81. doi: 10.1111/cas.12915
46. Zhang Q, Zhang Z, Liu G, Li D, Gu Z, Zhang L, et al. B7-H3 targeted CAR-T cells show highly efficient anti-tumor function against osteosarcoma both in vitro and in vivo. *BMC Cancer.* (2022) 22:1124. doi: 10.1186/s12885-022-10229-8
47. Zhang S, Black RG, Kohli K, Hayes BJ, Miller C, Koehne A, et al. B7-H3 specific CAR T cells for the naturally occurring, spontaneous canine sarcoma model. *Mol Cancer Ther.* (2022) 21:999–1009. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-21-0726

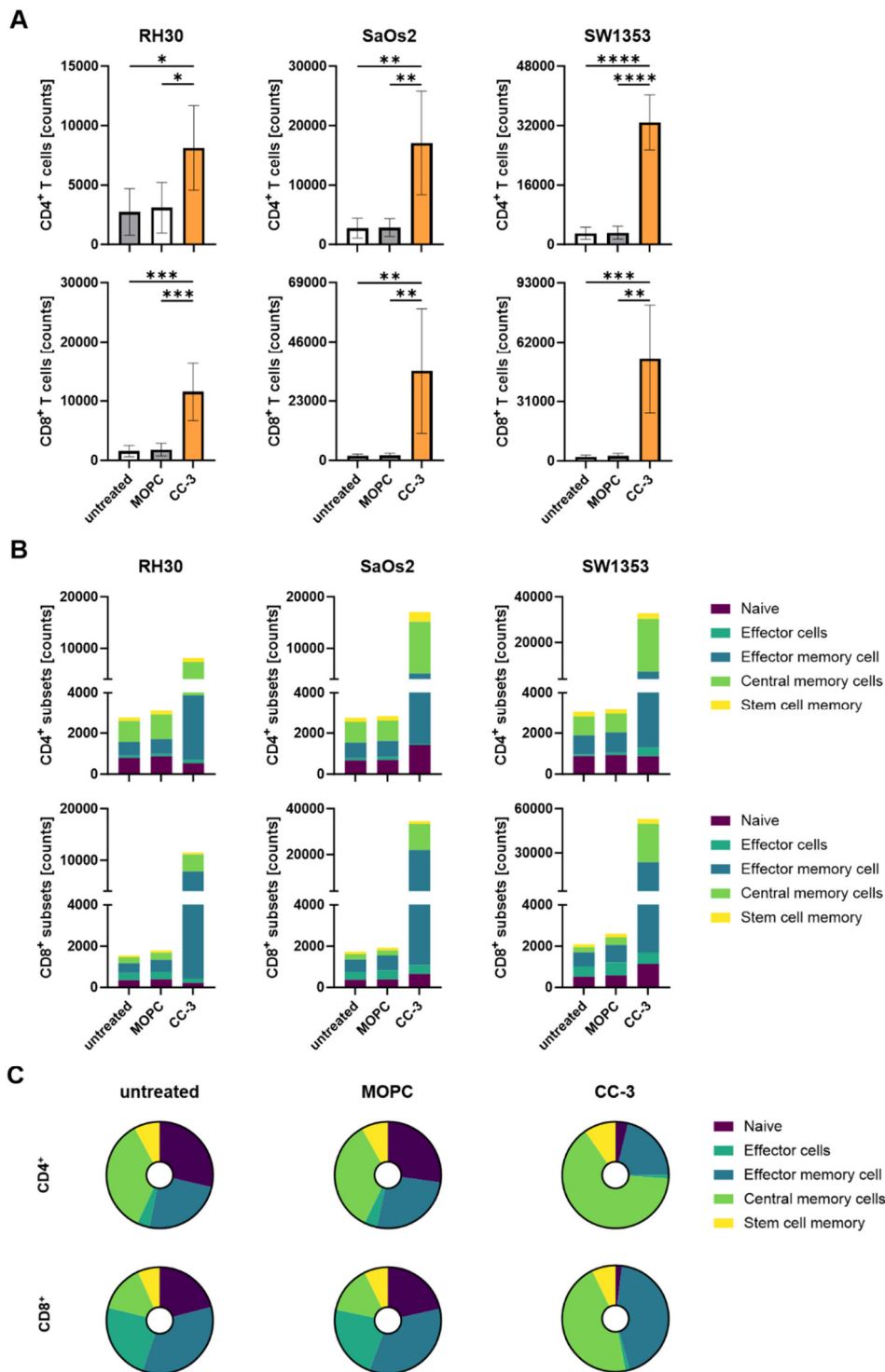
### *Supplementary Figures*



**Supplementary Figure 1 CC-3 in culture with sarcoma cells.** Sarcoma cell lines were cultured with or without CC-3 (4 nM) (n=1 in duplicates). The number of viable cells was determined by flow cytometry after 72 hours.



**Supplementary Figure 2 CC-3-induced T cell activation and cytokine release.** PBMCs (n=4) were incubated with the indicated sarcoma cell lines (E:T 5:1) in the presence or absence of CC-3 or MOPC. Unless otherwise noted, all constructs were used at 1 nM. T cell activation by CD69 and CD25 was assessed for CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells by flow cytometry after 24 h and 72 h, respectively, and secretion of cytokines and effector molecules was determined using Legendplex assays after 24 h. (A) Activation of CD4<sup>+</sup> (top panels) and CD8<sup>+</sup> T cells (bottom panels) was determined by CD69 expression. (B) CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell activation without target cells at the indicated concentration of MOPC or CC-3 was assessed by the CD69 expression using flow cytometry. (C) CD4<sup>+</sup> (top panel) and CD8<sup>+</sup> (bottom panel) T cells were analyzed for CD25. (D) Cytokine and effector molecules release for the indicated cell lines with or without CC-3 or MOPC control after 24 h was determined using Legendplex assay. The values presented are means  $\pm$  SD (\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, \*\*\*\* p<0.0001).



**Supplementary Figure 3 CC-3-induced T cell activation and cytokine release.** PBMCs (n=4) were incubated with the indicated sarcoma cells (E:T 10:1) in the presence or absence of CC-3 or MOPC control (1 nM each) for 6 days. On day 3, PBMC were re-exposed to fresh target cells and the respective treatment for additional 3 days. On day 6, proliferation and T cell subsets were analyzed by flow cytometry for CD62L, CD45RO, CD45RA and CCR7. **(A)** CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell counts for the indicated cell lines are shown. **(B)** Quantification of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell subpopulations after coculture with the indicated cell lines. **(C)** The distribution of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells after the indicated treatment for all sarcoma cell lines is shown. The values presented are means ± SD (\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, \*\*\*\* p<0.0001).