

# **Anti-Tumor Antikörper mit verbesserter Rekrutierung von NK und T Zellen zur Behandlung von Weichteil- und Knochensarkomen**

**Dissertation**

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

vorgelegt von  
Ilona Hagelstein, geb. Muschalek  
aus Tübingen

Tübingen  
2023

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

Tag der mündlichen Qualifikation:	15.05.2023
Dekan:	Prof. Dr. Thilo Stehle
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Helmut R. Salih
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

## Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	5
2 Einleitung .....	7
2.1 Das Immunsystem .....	7
2.1.1 Angeborene Immunität .....	7
2.1.2 Natürliche Killerzellen .....	8
2.1.3 Adaptive Immunität .....	10
2.1.4 T Zellen .....	11
2.2 Das Immunsystem und maligne Tumore.....	13
2.2.1 Sarkome der Weichteile und des Skelettsystems .....	13
2.2.2 Tumorimmunologie .....	14
2.3 Immuntherapie bei Sarkomen .....	16
2.3.1 Struktur und Eigenschaften von Antikörpern .....	17
2.3.2 Wirkungsweise von IgG Antikörpern.....	19
2.3.3 Fc-optimierte Anti-Tumor Antikörper.....	20
2.3.4 Bispezifische Antikörper und Fusionsproteine .....	21
2.4 Tumorassoziierte Antigene (TAA) .....	23
2.4.1 NKG2D Liganden (NKG2DL).....	23
2.4.2 B7-H3.....	25
3 Zielsetzung der Arbeit .....	26
4 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	28
4.1 Bispezifische NKG2D-CD3 und NKG2D-CD16 Fusionsproteine als neue Behandlungsoption für fortgeschrittene Sarkome.....	28
4.2 Fc-optimierte Antikörper gegen B7-H3 zur Induktion von NK Zell-Reaktivität gegen Sarkome .....	31
5 Diskussion.....	36
6 Literaturverzeichnis .....	44
7 Abkürzungsverzeichnis .....	66
8 Eigene Publikationen.....	69
9 Eigenanteil .....	72
10 Danksagung .....	74
11 Anhang.....	75



## 1 Zusammenfassung

Weichteil- und Knochensarkome stellen eine heterogene Gruppe seltener maligner Erkrankungen dar. Wirksame Behandlungsmöglichkeiten sind für die meisten Subtypen der Sarkome nach wie vor limitiert, infolgedessen ist die Prognose, vor allem bei fortgeschrittener oder metastasierter Krankheit, weiterhin ungünstig. Die Einführung der Immuntherapie, insbesondere der anti-Tumor Antikörper, hat die Behandlung von Tumorerkrankungen revolutioniert und die therapeutischen Möglichkeiten bei vielen bösartigen Tumoren erheblich verbessert. Inzwischen sind vor allem monoklonale Antikörper (mAb), aber auch bispezifische Antikörper (bsAb), welche gegen Tumorassoziierte Antigene (TAA) gerichtet sind, ein fester Bestandteil von klinisch angewandten Behandlungskonzepten. Etablierte Beispiele für mAb sind Rituximab oder Trastuzumab, die für die Therapie verschiedener B Zell Neoplasien bzw. von HER2-positivem Mammakarzinom eingesetzt werden. Ein Beispiel für einen bsAb ist der gegen CD19 und CD3 gerichtete *bispecific T cell engager* (BiTE) Blinatumomab zur Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie.

Trotz ihres unbestreitbaren Erfolgs lässt die therapeutische Wirksamkeit dieser und anderer anti-Tumor Antikörper noch viel Raum für Verbesserungen, und für viele Tumorentitäten sind geeignete Antikörper-basierte Therapeutika (noch) nicht klinisch verfügbar. Auch für die Behandlung von Sarkomen gibt es bislang nur wenige immuntherapeutische Optionen, deren Anwendung auf eine Minderheit von Patienten beschränkt sind. Aktuell werden unterschiedliche Strategien verfolgt, anti-Tumor Antikörper in ihrer Wirksamkeit zu verbessern und für mehr Tumorentitäten verfügbar zu machen. Dazu gehört zum einen die Identifizierung weiterer Zielantigene, zum anderen die Verbesserung ihrer therapeutischen Effizienz. Anti-Tumor mAb vermitteln ihre therapeutische Wirkung zu einem großen Teil über natürliche Killer (NK) Zellen. NK Zellen tragen wesentlich zur antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) bei, einer der zentralen Wirkmechanismen von mAb. Daher zielen zahlreiche Bemühungen darauf ab, diese wichtige Effektorfunktion zu verbessern, indem mAb mit Fc Teilen entwickelt werden, die eine erhöhte Affinität zum ADCC-vermittelnden Fc Rezeptor FcγRIIIa auf NK Zellen aufweisen. Dies kann durch Modulation der Aminosäuresequenz des Fc Teils erreicht werden, wie z. B. durch die Substitutionen S239D/I332E (SDIE), die in vielen mAb enthalten sind, die derzeit präklinisch und klinisch untersucht werden. Im Gegensatz zu NK Zellen verfügen T Zellen über ein größeres zytotoxisches Potential, können durch die höhere Freisetzung von Zytokinen aber auch erhebliche Nebenwirkungen verursachen. Ihre Aktivierung kann nicht durch mAb erfolgen, da T Zellen keine Fc Rezeptoren exprimieren, sondern erfordert bsAb, welche an zwei Antigene jeweils auf Tumorzellen und T Zellen binden und so die T Zellen gezielt an den

Tumor heranführen und aktivieren. Zu den bsAb können im weiteren Sinne auch bispezifische Fusionsproteine (BFP) gezählt werden, welche aus einem Antikörperteil und einem Protein bestehen, wie beispielsweise einem Rezeptor, der seinen Liganden bindet und aktiviert.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden anti-Tumor Antikörper gegen NKG2D Liganden (NKG2DL) und B7-H3 entwickelt und charakterisiert, um neue therapeutische Optionen für Weichteil- und Knochensarkome zu entwickeln. NKG2D ist ein aktivierender Immunrezeptor, dessen Liganden auf vielen Tumorarten und auch Weichteil- und Knochensarkomen häufig exprimiert werden, aber auf gesundem Gewebe im Allgemeinen nicht vorhanden sind. B7-H3 (CD276), ein Mitglied der B7 Proteinfamilie, dessen Rezeptor bislang unbekannt ist, erfährt in letzter Zeit großes Interesse als neues, vielversprechendes Zielantigen für die Immuntherapie. B7-H3 wird in vielen Tumorarten, darunter auch Sarkome, stark exprimiert, während die Expression in gesundem Gewebe eher gering ist. Die charakterisierten BFP bestehen aus der extrazellulären Domäne des NKG2D Rezeptors und sind mit einem Fab Fragment fusioniert, welches entweder gegen CD3 (NKG2D-CD3) oder CD16 (NKG2D-CD16) gerichtet ist. Im zweiten Teil der Arbeit wurden gegen B7-H3 gerichtete mAb getestet, die entweder einen unveränderten Fc Teil (8H8\_WT) oder eine Variante des Fc Teils mit Aminosäuresubstitutionen (S239D/I332E) zur Erhöhung der Affinität für CD16 exprimierende NK Zellen (8H8\_SDIE) enthalten.

Es konnte gezeigt werden, dass alle verwendeten Weichteil- und Knochensarkome unabhängig vom Subtyp NKG2DL und B7-H3 auf der Oberfläche exprimieren. Die BFP NKG2D-CD16 und NKG2D-CD3 induzierten eine potente NK bzw. T Zell-Reaktivität gegen die Tumorzellen, wie in Analysen von Aktivierung, Degranulation und Sekretion von IFN $\gamma$  sowie von immunmodulatorischen Proteinen gezeigt werden konnte. Auch mit dem Fc-optimierten 8H8\_SDIE konnte im Vergleich zu dem 8H8\_WT eine deutliche NK Zell-Reaktivität gegen die Sarkomzellen ausgelöst werden. Mit allen Konstrukten resultierte die Immunzellaktivierung in einer effizienten Lyse der Tumorzellen. Darüber hinaus wurde die Aktivierbarkeit von T und NK Zellen bei stark vorbehandelten Sarkompatienten analysiert und als vergleichbar mit gesunden Spendern befunden. Diese Ergebnisse unterstreichen das Potenzial der BFP NKG2D-CD3 und NKG2D-CD16 sowie des Fc-optimierten B7-H3 mAb 8H8\_SDIE als vielversprechende neue Therapeutika für Patienten mit Sarkomen.

## 2 Einleitung

### 2.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem von Wirbeltieren umfasst verschiedene Mechanismen zur Abwehr von Pathogenen, Fremdkörpern oder transformierten Zellen. Seine Wirkungsweise bedingt die Fähigkeit, körpereigenen von körperfremd zu unterscheiden, um Immunreaktionen gegen eigene, gesunde Zellen zu verhindern. Um einen wirksamen Schutz zu erfüllen, muss das Immunsystem potentielle Bedrohungen erkennen, Effekte gegen diese ausüben, sich selbst regulieren und ein immunologisches Gedächtnis bilden. Daher ist die Immunabwehr des Menschen ein komplexes System mit vielfältigen Aufgaben, welches aus dem Zusammenspiel von zellulären und humoralen Bestandteilen besteht.<sup>1</sup>

Den zellulären Teil der Immunabwehr bilden die weißen Blutkörperchen (Leukozyten), die sich aus multipotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark entwickeln. Während der Entwicklung teilen sich die Leukozyten in eine myeloische und eine lymphatische Reihe auf, um anschließend weitere Differenzierungsschritte zu durchlaufen. Aus der myeloischen Reihe entstehen Granulozyten, dendritische Zellen (DC) und Monozyten/Makrophagen, aus der lymphatischen Reihe T Zellen, B Zellen und natürliche Killer (NK) Zellen.<sup>2</sup>

Den humoralen Bestandteil des Immunsystems bilden eine Vielzahl löslicher Faktoren, wie z.B. das Komplementsystem, Zytokine, Lysozyme und Antikörper. Neben der Unterscheidung in zelluläre und humorale Bestandteile wird das Immunsystem in Abhängigkeit der beteiligten Effektorzellen, dem zeitlichen Verlauf und einer nachfolgenden Immunität in einen angeborenen und adaptiven Teil unterschieden.<sup>1</sup>

#### 2.1.1 Angeborene Immunität

Die angeborene Immunität umfasst den Teil der Immunabwehr, der von Beginn an besteht und sich zeitlebens nicht verändert. Sie bildet die erste, wichtige Verteidigungslinie gegen Krankheitserreger, welche durch die Epithelbarriere von Haut und Schleimhaut in den Körper eingedrungen sind. Sie zeichnet sich vor allem durch eine frühe Erkennung und rasche Bekämpfung der Pathogene aus (innerhalb von Stunden und Minuten).<sup>1</sup> Humorale Faktoren der angeborenen Immunität umfassen die Lysozyme und Serumproteine des Komplementsystems, welches nach Aktivierung über unterschiedliche Mechanismen wie Zellyse, Chemotaxis und Opsonierung agiert.<sup>3,4</sup> Außerdem spielen verschiedene Zytokine, die in erster Linie dazu dienen, Zellen des Immunsystems zu rekrutieren und zu aktivieren, eine Rolle bei der angeborenen humoralen Immunität.

Zu den zellulären Bestandteilen des angeborenen Immunsystems gehören DC, Monozyten/Makrophagen, Granulozyten und NK Zellen. Das angeborene Immunsystem besitzt zwar eine schnelle Reaktionsfähigkeit, weist dafür aber keine große Vielfalt auf. Erkannt werden zum Beispiel konservierte Struktur motive auf der Oberfläche pathogener Mikroorganismen (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs), die auf eukaryontischen Zellen nicht vorkommen, über invariante, Keimbahn-codierte sogenannte *pattern recognition receptors* (PRRs).<sup>5</sup> Wichtige Mitglieder der PRRs sind die *toll like receptors* (TLRs), welche die Produktion von Zytokinen und Chemokinen auslösen, damit weitere Immun-Effektorzellen aktivieren und zum Infektionsort locken.<sup>6</sup> Dies wiederum führt u.a. zur Aktivierung von Komponenten des adaptiven Immunsystems.<sup>7</sup>

Die Vermittlung zwischen angeborener und adaptiver Immunität wird hauptsächlich von DC übernommen, sogenannten antigen-präsentierenden Zellen (*antigen-presenting cell*, APC). Nach der Phagozytose durch diese werden Antigene prozessiert, auf der Zelloberfläche gemeinsam mit kostimulatorischen Molekülen den Zellen des adaptiven Immunsystems präsentiert und so eine adaptive Immunreaktion ausgelöst.<sup>8</sup>

Auf die Rolle von NK Zellen bei der Immunüberwachung wird im Folgenden im Detail eingegangen.

### 2.1.2 Natürliche Killerzellen

Als Teil des angeborenen Immunsystems zirkulieren NK Zellen im Blut und stammen von lymphatischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab.<sup>9</sup> Beim Menschen machen NK Zellen 5-15 % der zirkulierenden Lymphozyten aus und sind neben dem peripheren Blut auch an vielen anderen Stellen des Körpers zu finden, z. B. in sekundären lymphatischen Geweben.<sup>10</sup>

Sie wurden 1975 erstmals als Zellen beschrieben, welche Tumorzellen *in vitro* ohne vorhergehende Aktivierung mittels der Freisetzung von zytotoxischen Granula lysieren können.<sup>11</sup> NK Zellen haben zwei wichtige Immun-Effektorfunktionen: Die Lyse von infizierten oder maligne transformierten Zielzellen und die Produktion von Interferon (IFN) $\gamma$  in der frühen Phase einer Immunantwort, welches in der Lage ist, direkte krebsbekämpfende Wirkungen zu entfalten, aber vor allem zur Stimulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort und den damit einhergehenden Effektormechanismen führt.<sup>12-15</sup> Sie agieren also an der Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunität.<sup>16, 17</sup> Neben dieser Rolle wurden in den letzten Jahren für NK Zellen Eigenschaften beschrieben, die eigentlich dem adaptiven Immunsystem zugeordnet werden.<sup>18, 19</sup> Sogenannte *Memory-like* NK Zellen können sich auch Wochen oder Monate nach einer Infektion im Körper befinden und werden bei erneuter Infektion reaktiviert.<sup>20</sup>



Die NK Zell-Zytotoxizität wird durch die Freisetzung von Perforin (ein membranstörendes Protein) und Granzymen (eine Familie proteolytischer Enzyme) aus zytotoxischen Granula vermittelt.<sup>21, 22</sup> Sie kann jedoch auch durch Liganden der Tumornekrose (TNF)-Familie, wie Fas-Ligand (FasL) und TNF-*related apoptosis-inducing* Ligand (TRAIL) vermittelt werden, die mit den entsprechenden Todesrezeptoren auf Tumorzellen interagieren.<sup>23-26</sup> Darüber hinaus produzieren NK Zellen neben IFN $\gamma$  auch eine Reihe von entzündungsfördernden und entzündungshemmenden Zytokinen wie TNF, Interleukin (IL)-6, IL-8 und IL-10 sowie andere Faktoren.<sup>27-29</sup> Während neuere Untersuchungen auf eine große Vielfalt von charakteristisch unterschiedlichen NK Zellen hinweisen,<sup>30-32</sup> wurden im peripheren Blut ursprünglich zwei Hauptgruppen identifiziert: die CD3<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> und CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> Lymphozyten, wobei letztere die große Mehrheit darstellen.<sup>33</sup> Es wird davon ausgegangen, dass die Gruppe der CD56<sup>bright</sup> Zellen hauptsächlich immunmodulatorisch wirkt. Ausgelöst durch lösliche Faktoren wie IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-12, IL-15 und IL-18 freigesetzt von aktivierten DC, Monozyten und T Zellen produzieren sie große Mengen an Zytokinen wie IFN $\gamma$ .<sup>10, 34</sup> Im Gegensatz dazu wurden der Gruppe der CD56<sup>dim</sup> NK Zellen mit ihrer hohen Expression von Granzymen, Perforin und CD16 eher zytotoxische Funktionen zugeschrieben. Allerdings wurde gezeigt, dass Letztere durch die Interaktion mit Zielzellen ebenfalls große Mengen an IFN $\gamma$  und anderen Zytokinen produzieren können.<sup>10, 35</sup> Grundsätzlich lässt sich sagen, dass die Gruppe der CD56<sup>bright</sup> Zellen stärker auf lösliche, die der CD56<sup>dim</sup> Gruppe stärker auf Oberflächenfaktoren reagieren.<sup>36, 37</sup>

Verglichen mit B und T Zellen haben NK Zellen ein relativ überschaubares Repertoire an Rezeptoren ohne Antigenpezifität und fehlende klonale Selektion.<sup>38</sup> Die Aktivierung von NK Zellen wird von verschiedenen inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren reguliert, und hängt von der Balance aus diesen aktivierenden und hemmenden Signalen ab.<sup>39</sup> Die Hypothesen „*missing self*“ und „*induced self*“ beschreiben die Mechanismen, welche zur Aktivierung von NK Zellen führen.<sup>40</sup> Die „*missing self*“ Hypothese postuliert, dass Zellen mit einer geringen oder fehlenden Expression von *major histocompatibility complex* (MHC) Klasse I auf ihrer Oberfläche von NK Zellen lysiert werden. Bestimmte NK Zell-Rezeptoren, die zur KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptor*) Familie gehören, erkennen MHC Klasse I und übermitteln nach Aktivierung hemmende Signale in die NK Zelle, sodass keine Lyse von Zellen mit ausreichender Expression von MHC Klasse I erfolgt.<sup>39</sup> Eine Herunterregulierung der MHC I Moleküle findet zum Beispiel bei virusinfizierten Zellen oder Tumorzellen statt. Der Wegfall dieses hemmenden Signals führt dazu, dass die Zielzelle von NK Zellen eliminiert werden kann.<sup>41</sup>

Es gibt jedoch Zellen wie z.B. Erythrozyten, die keine Expression von MHC Klasse I Molekülen aufweisen und trotzdem nicht von NK Zellen lysiert werden, so dass die „*missing-*

*self*“ Hypothese keine ausreichende Erklärung für die Regulation der NK Zell-Reaktivität bietet. Mittlerweile weiß man, dass die Expression von Stress-induzierten Liganden, z.B. nach Befall durch pathogene Erreger oder maligne Transformation, zur Abtötung der Zielzellen führt („*induced self*“).<sup>42</sup> Zu den aktivierenden Rezeptoren dieser Liganden gehören unter anderem Mitglieder der NCR (*natural cytotoxicity receptor*)-Familie, wie *natural killer protein* (NKp)46, NKp30 und NKp44, sowie der Rezeptor NKG2D (*Natural Killer Group 2D*).<sup>43</sup> Einer der wichtigsten aktivierenden Rezeptoren auf NK Zellen ist CD16 (Fc-gamma Rezeptor III, Fc $\gamma$ RIII), welcher ein Mitglied der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie ist. CD16 Rezeptoren binden mit hoher Spezifität, allerdings niedriger Affinität an Fc Fragmente der Immunglobuline IgG1 und IgG3.<sup>44</sup> Darüber können die Effektorfunktionen von NK Zellen als sogenannte antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (*antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) ausgelöst werden.<sup>45</sup> Die alleinige Stimulation von CD16 reicht aus, um eine starke Reaktivität der NK Zellen hervorzurufen.<sup>46</sup> Darüber hinaus wird die Aktivität von NK Zellen durch Zytokine beeinflusst, beispielsweise durch IL-15 bzw. *transforming growth factor* (TGF)- $\beta$ .<sup>21, 47</sup> Insgesamt lässt sich sagen, dass NK Zellen und die NK Zell-Reaktivität durch die Summe von Signalen inhibierender und aktivierender Rezeptoren reguliert werden und zu den wichtigsten, unmittelbaren Mechanismen der angeborenen Immunität gehören.<sup>48</sup>

### 2.1.3 Adaptive Immunität

Zur adaptiven Immunität gehören T Zellen, B Zellen und, als humoraler Bestandteil, die von B Zellen produzierten Antikörper. Im Gegensatz zu Bestandteilen des angeborenen Immunsystems besitzen B und T Zellen eine Vielzahl hochspezifischer Antigenrezeptoren auf ihrer Oberfläche, die B Zell-Rezeptoren bzw. Antikörper und T Zell-Rezeptoren, und können ein immunologisches Langzeitgedächtnis entwickeln. Dadurch werden beispielsweise Infektionen desselben Erregers oder einer verwandten Spezies bei erneutem Kontakt schneller und effektiver abgewehrt.<sup>49</sup> Die hoch variablen Antigen-Rezeptoren der B und T Zellen gehören zur Ig-Superfamilie und stellen membrangebundene Vorläufer der Antikörper dar. Sie entstehen durch somatische Rekombination der keimbahnkodierten V, (D), J und C Segmente, die sich auf den Chromosomen 2, 14 und 22 befinden. Der Mechanismus der Rekombination ermöglicht die Generierung einer hohen Rezeptor- bzw. Antikörpervielfalt.<sup>50, 51</sup> Die klonale Selektion ist ein wichtiger Schritt bei der Entstehung der Rezeptoren und Antikörper, bei der kontrolliert wird, ob körpereigene von körperfremden Bestandteilen unterschieden werden können. Damit soll eine Immunreaktion des Körpers gegen eigene, gesunde Zellen verhindert werden.<sup>52</sup>

B Zellen sind ein Bestandteil des zellulären Teils der adaptiven Immunität. Membranständige B Zell-Rezeptoren werden nach Bindung des passenden Antigens internalisiert und über MHC Moleküle der Klasse II den T Helferzellen präsentiert.<sup>53</sup> Nach Aktivierung durch T Zellen differenzieren B Zellen in Plasmazellen und produzieren Antikörper, welche humorale Abwehrmechanismen vermitteln.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unter anderem bispezifische Fusionsproteine (BFP) zur tumorspezifischen Aktivierung von T Zellen untersucht. Deshalb werden im Folgenden die zellbiologischen Grundlagen der T Zellen als wichtigste Effektorzellen des adaptiven Immunsystems näher erläutert.

#### 2.1.4 T Zellen

Neben den B Zellen vermitteln hauptsächlich T Zellen die zelluläre Immunantwort der adaptiven Immunität. Ein wichtiger Rezeptor, um ihre Funktionen in der Immunabwehr zu erfüllen, ist der T Zell-Rezeptor (*T cell receptor*, TCR), welcher in der Struktur dem Antigenbindenden Fragment (*fragment antigen binding*, Fab) eines Antikörpers ähnlich ist. Mit dem TCR erkennen T Zellen hochspezifisch MHC Molekül-gebundene Peptide.<sup>50, 54</sup> Der TCR besteht im Wesentlichen aus zwei über Disulfidbrücken verbundene Polypeptidketten. Jede dieser Ketten wiederum enthält eine variable Region, eine konstante Domäne und einen kurzen C-terminalen zytoplasmatischen Bereich, welcher gemeinsam mit dem Adapterprotein CD3 nach Aktivierung intrazelluläre Signale auslöst.<sup>55, 56</sup> Dabei involviert sind die beiden Korezeptoren CD4 und CD8 auf den jeweiligen T Zell-Populationen.<sup>57</sup> Nach Kontakt der T Zelle mit dem für sie spezifischen Antigenepitop auf der APC, das sogenannte Erstsinal, und zusätzlichen Signalen durch kostimulatorische Moleküle wie beispielsweise CD28 und seinen auf APC exprimierten Liganden CD80 und CD86, wird das Heranreifen von naiven T Zellen (T Zellen, die bisher keinen Antigenkontakt hatten) zu T Effektorzellen induziert.<sup>58, 59</sup>

Aus den naiven T Zellen entstehen zwei unterschiedliche T Effektorzellen: CD8<sup>+</sup> zytotoxische T Zellen erkennen Antigenepitope, die von MHC Klasse I Molekülen präsentiert werden, und können virusinfizierte oder transformierte Zellen durch beispielsweise Ausschüttung von Perforin und Granzymen oder durch Expression des FasL und nachfolgender Induktion von Apoptose abtöten.<sup>60</sup> Dagegen interagieren CD4<sup>+</sup> T Zellen mit MHC Molekülen der Klasse II, die beispielsweise von DC exprimiert werden und Peptide phagozytierter Zellen präsentieren. Nach Erkennen des spezifischen Antigenepitops differenzieren CD4<sup>+</sup> T Zellen in verschiedene Subpopulationen, wie zum Beispiel T Helferzellen.<sup>61</sup> Ihre Aufgaben bestehen hauptsächlich darin, durch Interaktion mit B Zellen die Ausschüttung von Antikörpern auszulösen und mit Unterstützung von Makrophagen die

Effektorfunktionen der CD8<sup>+</sup> T Zellen zu verstärken.<sup>62</sup> Sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T Zellen produzieren außerdem verschiedene immunmodulatorische Moleküle, wie IFN $\gamma$ , TNF und IL-2.<sup>63</sup>

Das kostimulatorische Signal, auch das Zweitsignal der T Zell-Aktivierung genannt, spielt eine besondere Rolle bei der Aktivierung und Induktion der T Zell-Proliferation, da es ohne dieses zweite Signal nicht zu einer langanhaltenden Aktivierung der T Zelle kommt, sondern diese in einen inaktiven Zustand fällt oder sogar stirbt.<sup>64, 65</sup> Neben der B7 Familie, zu der auch CD28 gehört,<sup>66</sup> spielen Mitglieder aus der TNF Rezeptorfamilie eine wichtige Rolle als Zweitsignalgeber. Dazu zählen insbesondere 4-1BB (CD137) und OX40 (CD134), welche anders als CD28 erst nach Aktivierung der T Zelle durch das erste Signal auf der Oberfläche exprimiert werden.<sup>59, 67-69</sup> Zusätzlich zu den direkten Zell-Zell-Kontakten zwischen T Zellen und APC werden Zytokine benötigt, das dritte Signal der T Zell-Aktivierung.<sup>70</sup> Zu Beginn einer Infektion wird von Makrophagen TNF ausgeschüttet, welches die Migration und Aktivierung von Lymphozyten in das Gewebe verursacht. Durch die nachfolgende Bildung von IL-12 kommt es zur Differenzierung naiver CD4 Zellen und zur Aktivierung zytotoxischer T Zellen,<sup>71</sup> welche daraufhin IL-2 ausschütten.<sup>72</sup> Dies wiederum führt zur verstärkten Proliferation und der Bildung von IFN $\gamma$  und TNF.

Bei der Aktivierung von T Zellen führt die Integration der drei benötigten Signale zur Proliferation und Differenzierung von naiven T Zellen zu sogenannten Effektorzellen und verhindert den anergen Zustand der T Zellen.<sup>73</sup> Als Folge einer T Zell-Immunantwort werden für bereits erkannte Antigene spezifische zentrale Gedächtniszellen (*central memory cells*) gebildet, welche für lange Zeit im Körper verbleiben.<sup>74</sup> Sie halten sich wie naive T Zellen vorwiegend in den lymphatischen Organen auf, können aber nach erneutem Antigenkontakt als Effektor-Gedächtniszellen wieder in das periphere Gewebe migrieren und sind mit einem hohen zytotoxischen Potential ausgestattet.<sup>75</sup>

Mittlerweile sind viele weitere Moleküle und Faktoren bekannt, welche eine Rolle in der T Zell-Aktivierung und -Immunantwort spielen.<sup>58</sup> Insbesondere der PD-1/PDL-1 (*programmed cell death protein 1/PD ligand-1*) Signalweg erfährt seit Etablierung der Checkpoint-Inhibitoren in der klinischen Anwendung besondere Aufmerksamkeit.<sup>76, 77</sup> Die Expression von PD-1 wird auf den T Zellen durch Aktivierung induziert und als weitere Folge der Immunaktivierung kommt es zur Expression von PDL-1 im umliegenden Gewebe. Dadurch kann die Immunantwort reguliert werden und eine überschießende Reaktion des Immunsystems wird verhindert.<sup>78</sup>

## 2.2 Das Immunsystem und maligne Tumore

Das Verständnis, was ein Tumor ist, hat sich durch die Erkenntnisse der letzten Jahre grundlegend verändert. Ein Tumor wird nicht mehr nur als eine isolierte Masse proliferierender Tumorzellen betrachtet, sondern als ein komplex aufgebautes Gewebe mit verschiedenen Zelltypen, welche über unterschiedlichste Mechanismen im Austausch miteinander stehen. Bis zur Etablierung eines Tumors durchlaufen die Zellen viele funktionelle Veränderungen, welche durch das Immunsystem und das umliegende Gewebe beeinflusst werden. Diese Veränderungen und Fähigkeiten, welche die Tumorzellen durchlaufen und erlangen, sind als die mittlerweile acht „*Hallmarks of Cancer*“ bekannt.<sup>79-81</sup> Sie beschreiben im Wesentlichen, welche Veränderungen Zellen durchlaufen müssen, um maligne Eigenschaften zu erhalten und welche Prozesse allen Tumoren zugrunde liegen. Die nachfolgenden Kapitel beschreiben Sarkome als Beispiel für solide Tumore. Diese seltene Tumorerkrankung ist Gegenstand der Untersuchungen in dieser Doktorarbeit.

### 2.2.1 Sarkome der Weichteile und des Skelettsystems

Sarkome sind maligne Tumore, welche aus mesenchymalem Gewebe entstehen und können daher auch an nahezu jeder Stelle des Körpers auftreten. Bisher werden einige genetische Defekte und Umwelteinflüsse wie radioaktive Strahlung mit der Entwicklung eines Sarkoms in Zusammenhang gebracht, allerdings ist die Ursache für diese Tumorerkrankung trotz neuerer Erkenntnisse über vorhandene genetische Veränderungen fast immer unbekannt.<sup>82</sup> Da sie nur ca. 1% der malignen Erkrankungen ausmachen, zählen sie zu den seltenen Tumoren, allerdings sind Sarkome mit 12-15% die zweit-häufigste Tumorerkrankung bei Kindern und Jugendlichen.<sup>83</sup> Sie werden historisch anhand des Ursprungsgewebes in zwei Hauptklassen unterteilt: Sarkome des Skelettsystems, auch Knochensarkome genannt, und Sarkome der Weichteile.<sup>84, 85</sup> Innerhalb der beiden Hauptgruppen gibt es eine große Vielzahl an heterogenen Subtypen, bisher wurden mehr als 100 verschiedene Sarkome beschrieben. Diese variieren hinsichtlich der biologischen und klinischen Merkmale von niedrig-malignen Tumoren bis hin zu hochaggressiven Tumorarten mit einem enormen Metastasierungspotenzial.<sup>86-88</sup> Mittlerweile basiert die Diagnostik und Klassifizierung der Sarkome neben morphologischen und immunohistochemischen Charakteristika zunehmend auch auf molekularen Merkmalen. Die Heterogenität dieser Tumorerkrankung zeigt sich auch bei den genetischen Veränderungen, welche sehr unterschiedlich sein können. Einige Entitäten sind durch bestimmte genetische Veränderungen gekennzeichnet, darunter EWS-ATF1 bei Ewing-Sarkomen, cKIT-Mutationen bei gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) oder PAX3-FKHR bei alveolären Rhabdomyosarkomen.<sup>89</sup> Komplexe Karyotypen, die in der Regel mit

einer schlechteren klinischen Prognose einhergehen, stehen häufig in Zusammenhang mit PTEN-, RB1-, BRCA2-, PIK3CA- oder APC-Mutationen.<sup>90-92</sup> Neuere Erkenntnisse zeigen, dass manche Sarkom-Subtypen mit epigenetischen Dysregulationen in Verbindung stehen, welche durch nur eine oder wenige genetische Veränderungen ausgelöst werden.<sup>89, 93</sup>

Diese deutlichen Unterschiede in ihrem biologischen Verhalten führen auch zu einem unterschiedlichen Ansprechen auf die Behandlung und erfordern eine interdisziplinäre Therapie. Die Behandlungsmöglichkeiten und -empfehlungen hängen von mehreren Faktoren ab, zu denen der diagnostizierte Subtyp, das Stadium und der Grad des Sarkoms zählen, es werden aber auch Alter, Allgemeinzustand und Komorbiditäten der Patienten berücksichtigt. Die Standardtherapie der Sarkome setzt sich aus einer Kombination von Chirurgie, Chemotherapie und Bestrahlung zusammen.<sup>94</sup> Chirurgie bedeutet oft eine biologische Rekonstruktion oder Amputation im Zuge der „weiten Resektion“. Für Patienten, die sich einer chirurgischen Resektion mit anschließender Chemotherapie unterziehen, wurden Fünfjahresüberlebensraten von 60-80 % berichtet.<sup>83, 95</sup> Bei Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Metastasen aufweisen oder bei denen die Krankheit erneut aufgetreten ist, sind die Überlebenschancen deutlich schlechter.<sup>96, 97</sup> Auch wenn die Erstlinienbehandlung mit Anthrazyklinen und Alkylierungsmitteln bei jungen Sarkompatienten günstige Ergebnisse hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens zeigt, wird das Gesamtüberleben nur geringfügig beeinflusst.<sup>98</sup> Aufgrund der komplexen und heterogenen Biologie von Sarkomen sind selbst molekulare zielgerichtete Therapien nur teilweise erfolgreich.<sup>83</sup> Obwohl sich die Behandlungsmöglichkeiten für viele bösartige Tumorerkrankungen in den letzten Jahren deutlich verbessert haben, konnten Sarkompatienten bisher nur wenig von diesen Entwicklungen profitieren.

### 2.2.2 Tumorimmunologie

Bereits vor über 100 Jahren wurde vermutet, dass das Immunsystem eine Rolle bei der Entstehung und Bekämpfung von Tumorerkrankungen spielt. Damals wurden Sarkompatienten mit *Coley's Toxin* behandelt, einer Injektion bestehend aus abgetöteten Bakterien direkt in den Tumor.<sup>99</sup> Rückblickend kann dies als Vorläufer der modernen Immuntherapie betrachtet werden. Vor etwa 50 Jahren wurde dann das Konzept der Immunüberwachung (*immunesurveillance*) vorgeschlagen,<sup>100</sup> und über mehrere Jahrzehnte zum Begriff „*cancer immunoediting*“ weiterentwickelt.<sup>101</sup> Die Immunüberwachung und das *cancer immunoediting* umfassen komplexe biologische Prozesse, welche beschreiben, wie Tumorzellen und das Immunsystem miteinander interagieren und sich gegenseitig beeinflussen. Dabei nimmt das Immunsystem eine Doppelrolle ein: Die Tumorzellen werden durch Effektorzellen des Immunsystems erkannt,

wobei das Immunsystem sich selbst streng durch regulatorische Immunzellen kontrolliert. Dabei können auch die Tumorzellen selbst die Immunreaktion beeinflussen, indem sie beispielsweise lösliche Faktoren wie Zytokine freisetzen oder immunregulatorische Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren und damit das Immunsystem dämpfen.<sup>102</sup>

Der Prozess des *cancer immunoediting* besteht im Wesentlichen aus drei Phasen. In der ersten Phase erkennen und infiltrieren Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems den entstehenden Tumor. Dabei spielen insbesondere NK, T und B Zellen neben lösliche Faktoren eine wichtige Rolle.<sup>103, 104</sup> Dadurch werden in dieser Phase, auch Eliminierung (*elimination*) genannt, Tumorzellen erkannt und zerstört, welche für die Immunantwort empfänglich sind. Diese Phase entspricht dem Konzept der Immunüberwachung. In der zweiten Phase des *cancer immunoediting* besteht ein dynamisches Gleichgewicht (*equilibrium*) zwischen überlebenden Tumorzellen und Immunzellen, welche einen Selektionsdruck auf die Tumorzellen ausüben. Dieser Selektionsdruck führt zur Selektion von Tumorzellen, die der Immunüberwachung entgehen konnten und damit zum Entstehen von Tumorzellpopulationen mit spezifischen Eigenschaften.<sup>105</sup> Die überlebenden Tumorzellen sind dadurch charakterisiert, dass sie in der Lage sind, eine effektive Immunantwort aktiv zu unterdrücken oder/und resistent gegen die Immunabwehr sind. Diese Phase kann viele Jahre dauern, bis sich ein Tumor etabliert und in die dritte Phase, genannt *escape*, übergeht. Nun sind die Tumorzellen in der Lage, trotz eines funktionierenden Immunsystems zu proliferieren und sogar zu metastasieren. Diese sogenannte Immunevasion (*immune escape*) wird durch unterschiedlichste Mechanismen der Tumorzellen möglich, mit denen die Interaktion des Immunsystems mit den Tumorzellen direkt und indirekt beeinflusst wird. Beschrieben wurde, dass die malignen Zellen die Oberflächenexpression von Tumorantigenen, mit denen sie vom Immunsystem erkannt werden können, wie beispielsweise den Stress-induzierten Liganden des NKG2D Rezeptors (NKG2DL) verringern oder weniger MHC Moleküle exprimieren und damit weniger Peptid-MHC Komplexe präsentieren.<sup>106-109</sup> Weitere bekannte Mechanismen der Immunevasion sind Veränderungen der Tumorzellen in ihren Signalwegen, welche z.B. durch IFN $\gamma$  vermittelt werden<sup>110</sup> oder eine erhöhte Expression von anti-apoptotischen Molekülen und somit Resistenz gegen Effektormechanismen des Immunsystems.<sup>111, 112</sup> Die Immunantwort des Körpers auf Tumorzellen wird von diesen auch manipuliert, indem sie Moleküle wie PDL-1 überexprimieren, um der T Zell-Immunantwort zu entkommen.<sup>78, 113</sup> Zusammengefasst findet eine intensive Interaktion zwischen Immunsystem und Tumor statt. Die große Chance der Immuntherapie besteht darin, in das Zusammenspiel zwischen Tumor und Immunsystem einzugreifen, die Interaktion zu Gunsten des Immunsystems zu verschieben und den *immune escape* des Tumors aufzuheben.

### 2.3 Immuntherapie bei Sarkomen

Die standardisierte Therapie von Tumorerkrankungen besteht vor allem aus der Kombination von Chirurgie, Chemo- und/oder Strahlentherapie. Bei der Behandlung von Weichteil- und Knochensarkomen spielt die chirurgische Resektion - falls ein operabler Tumor besteht - eine entscheidende Rolle. Sowohl eine Bestrahlung als auch eine neoadjuvante Chemotherapie können vor der operativen Entfernung des Tumors erfolgen, um das Tumolvolumen zu verringern oder trotz nicht entfernbarem Gewebe möglichst viel Tumor zu schädigen. Mit Einführung der „modernen“ Chemotherapie bei der Behandlung von Sarkomen in den 1970er Jahren konnten beachtliche Erfolge für die Patienten erreicht werden und das Überleben deutlich gesteigert werden.<sup>114, 115</sup> Trotz dieser Verbesserung entwickelt sich je nach diagnostizierter Sarkom Untergruppe bei etwa 25-50% der Patienten nach der chirurgischen Entfernung der primären Tumormasse ein lokales Rezidiv und/oder eine metastatische Erkrankung.<sup>116, 117</sup> Im Falle einer metastasierten Erkrankung ist ein vollständiges Ansprechen auf eine Chemotherapie bei Sarkomen eher selten, und damit die Prognose mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 10 bis 15 Monaten schlecht.<sup>118, 119</sup> Zusätzlich haben die Chemo- und Bestrahlungstherapie die wesentliche Limitation, dass sie nicht nur auf maligne, sondern auch auf normale Zellen des Körpers wirken, was die teils beträchtlichen Nebenwirkungen verursacht.

Als eine weitere Möglichkeit in der Behandlung von Tumorerkrankungen etabliert sich derzeit die Immuntherapie, d.h. die gezielte Aktivierung und Nutzung immunologischer Effektormechanismen zur Eliminierung der malignen Zellen. Die Immuntherapie umfasst ein breites Feld an vielversprechenden Möglichkeiten in der Behandlung von Tumorpatienten, basierend auf jüngsten Erkenntnissen über die Interaktion von Immunsystem und Tumoren. Die aktuell am meisten beachteten Strategien der Immuntherapie sind die Immun-Checkpoint Inhibitoren, die Tumor-Vakzinierung, der adoptive Zelltransfer (*adoptive cell transfer*, ACT) und die Immuntherapie mit rekombinanten Antikörpern. Diese Strategien nutzen das Zusammenspiel des Immunsystems mit dem Tumor auf unterschiedlichste Weise, um gegen die Tumorzellen aktiv zu werden. Größtenteils befinden sich diese Optionen im Falle der Sarkome noch in der Erprobungsphase.

Immun-Checkpoint Rezeptoren sind inhibitorische Moleküle, welche auf der Oberfläche von Immunzellen, Tumorzellen und anderen Zellen des Tumormikromilieus exprimiert sind. Dies können Moleküle wie PD-1, PDL-1, CTLA-4, LAG-3 oder TIM-3 sein.<sup>120</sup> Als Immun-Checkpoint-Inhibitoren bezeichnet man mAb, welche an diese Moleküle binden und damit die inhibitorische Wirkung der nachfolgenden Signalwege außer Kraft setzen. Bisher sind für die Therapie von Sarkomen zwei Immun-Checkpoint Inhibitoren zugelassen:



Dostarlimab, ein Antikörper gegen PD-1, für die Therapie von Patienten mit einem fortgeschrittenen Sarkom, welches eine Mismatch-Reparatur-Defizienz (*DNA mismatch repair deficiency*, dMMR) aufweist. Außerdem ist Pembrolizumab, ebenfalls ein PD-1 Inhibitor, für die Behandlung von Patienten mit einem fortgeschrittenen Sarkom mit dMMR und infolgedessen hoher Mikrosatelliteninstabilität (*high microsatellite instability*, MSI-H) oder einer hohen Tumormutationslast (*high tumor mutational burden*, TMB-H) zugelassen.<sup>121</sup>

Bei der Tumor-Vakzinierung werden den Patienten DC, tumorspezifische Peptide oder dafür codierende RNA zusammen mit einem immunstimulierenden Adjuvans appliziert.<sup>122, 123</sup> Durch die Immunisierung beispielsweise mit einem Tumorpeptid soll das Immunsystem des Patienten zu einer spezifischen Reaktion gegen den Tumor angeregt werden. Bisher ist für die Behandlung von Sarkomen keiner dieser Ansätze zugelassen. Im Rahmen einer klinischen Studie wurden beispielsweise Peptide für eine Vakzinierung verwendet basierend auf den Gangliosiden GM2, GD2 und GD3 (NCT01141491).

Beim ACT werden Immunzellen wie NK oder T Zellen des Patienten bzw. von gesunden Spendern isoliert, *ex vivo* manipuliert, anschließend expandiert und dann bei dem Tumorpatienten angewendet.<sup>124, 125</sup> Bisher wurden mit T Zellen, welche mit einem TCR oder einem chimären Antigenrezeptor (*chimeric antigen receptor*, CAR) verändert wurden, beeindruckende Ergebnisse bei der Therapie von hämatologischen Neoplasien erreicht.<sup>126, 127</sup> Für die Therapie von Sarkomen ist dieser Ansatz bisher noch nicht etabliert.

Eine weitere Strategie der Immuntherapie ist die Verwendung von monoklonalen Antikörpern (*monoclonal antibody*, mAb). Therapeutische mAb sind heute bereits vielfach zur Therapie maligner Erkrankungen zugelassen und konnten die Prognose einzelner Tumorerkrankungen deutlich verbessern.<sup>128</sup> Beispielsweise ist mit dem mAb Rituximab, welcher gegen CD20 gerichtet ist, ein durchschlagender therapeutischer Erfolg in der Behandlung des B Zell-Lymphoms gelungen, welcher Wegweisend für weitere Forschung auf diesem Gebiet war.<sup>129</sup> Allerdings hat die Therapie der Sarkome bisher nicht von den Entwicklungen anderer Tumorerkrankungen profitiert.

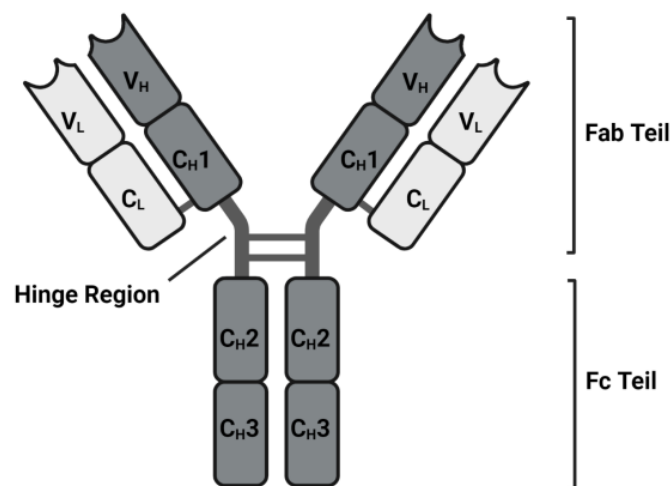
In den folgenden Kapiteln wird aufgrund der Bedeutung für die vorliegende Doktorarbeit im Besonderen auf therapeutische Antikörper eingegangen.

### **2.3.1 Struktur und Eigenschaften von Antikörpern**

Als Teil des humoralen adaptiven Immunsystems werden Antikörper von Plasmazellen nach Antigen-Kontakt produziert, freigesetzt und können nach Bindung an ihr spezifisches Antigen ihre Aufgaben erfüllen: die Erkennung, Markierung, Neutralisierung und Bekämpfung von Pathogenen wie Viren und Bakterien, aber auch fremden Zellen.<sup>130</sup> Paul

Ehrlich erkannte bereits vor mehr als 100 Jahren, dass die Bindung eines Antikörpers an sein Antigen auf dem Schlüssel-Schloss Prinzip basiert.<sup>131</sup> Antikörper, auch Ig genannt, sind biochemisch gesehen Glykoproteine bestehend aus vier Polypeptidketten. Insgesamt gibt es fünf unterschiedliche Klassen von Antikörpern, IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Im Blut des Menschen kommen vor allem IgG und die pentameren IgM Moleküle vor, erstere können aufgrund ihrer geringen molekularen Größe leicht Blutgefäße durchdringen und haben im Vergleich mit den anderen Antikörper Klassen eine längere Serumhalbwertszeit.<sup>132</sup> Daher eignen sich Ig vom Typ IgG vor allem zur Produktion von therapeutischen Antikörpern.

Durch zwei identische leichte Ketten (25 kDa) sowie zwei identische schwere Ketten (50 kDa), welche kovalent miteinander verbunden sind, entsteht die bekannte Y-Struktur der IgG Antikörper (Abbildung 1).<sup>133, 134</sup> Die schweren Ketten eines IgG bestehen jeweils aus einer N-terminalen variablen ( $V_H$ ) sowie drei konstanten Domänen ( $C_H1$ ,  $C_H2$ ,  $C_H3$ ) und definieren den Isotyp des Antikörpers. Dabei sind die  $C_H1$  und  $C_H2$  Domäne über eine flexible *Hinge* Region miteinander verbunden. Die leichten Ketten besitzen ebenfalls eine N-terminale variable ( $V_L$ ) bei nur einer konstanten Domäne ( $C_L$ ).<sup>135-137</sup> IgG lassen sich in zwei Fab, sowie einen Fc (*fragment crystallizable*) Teil unterteilen. Die variablen Domänen der schweren und leichten Ketten enthalten drei hypervariable Domänen, die sogenannten *complementarity determining regions* (CDR) 1-3 und werden von einer Gerüstregion umgeben (*framework regions*, FR). Diese CDR der  $V_H$  und  $V_L$  bestimmen gemeinsam die Antigen-spezifität des Antikörpers.



**Abbildung 1 Aufbau eines humanen IgG.**

Dunkelgrau: schwere Ketten mit variablen ( $V_H$ ) und konstanten Domänen ( $C_H$ ). hellgrau: leichte Ketten mit variablen ( $V_L$ ) und konstanten Domänen ( $C_L$ ). Erstellt mit biorender.com.

Die große Vielfalt der CDR, bedingt durch somatische Rekombination und weiteren Prozessen wie junktionale Diversität, resultiert in einer extrem großen Zahl an möglichen Antigen-Spezifitäten und somit Diversität der Antikörper.<sup>138-141</sup> Diese enorme Vielfalt wird noch durch die Möglichkeit, verschiedene  $V_H$  und  $V_L$  zu kombinieren vergrößert und führt zu einem Repertoire von geschätzt  $10^{11}$  Antikörpern.<sup>141-143</sup> Die 1975 von Köhler und Milstein eingeführte Hybridomtechnologie mit der Möglichkeit, mAb künstlich mit definierter Spezifität herzustellen, hat den Grundstein für den Einsatz von therapeutischen Antikörpern gelegt.<sup>144</sup> Heute spielen unterschiedlichste mAb in der Therapie von malignen Erkrankungen eine wichtige Rolle.

### 2.3.2 Wirkungsweise von IgG Antikörpern

Essentiell für die Auslösung der Wirkmechanismen eines Antikörpers ist die Immobilisierung an sein Zielantigen, erst dadurch kann er seine Wirkung entfalten. Dabei kann vermittelt durch die Bindung der Fab Fragmente an das Epitop auf der Zielzelle eine direkte Wirkung ausgeübt werden. Es können beispielsweise Signalwege der Interaktionen eines Rezeptors durch agonistische oder antagonistische Antikörper stimuliert bzw. blockiert werden. Ein Beispiel dafür ist die Induktion von Apoptose durch Bindung von agonistischen Antikörpern an Apoptose-Rezeptoren.<sup>145, 146</sup> Der gegen den Gefäßwachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*) gerichtete Bevacizumab oder der gegen HER2 gerichtete Trastuzumab sind klinisch angewendete Beispiele für mAb, die tumorogene Signale blockieren und dadurch ihre Wirkung ausüben.<sup>147, 148</sup>

Die Wirkungen auf Effektormoleküle oder -zellen des Immunsystems werden als indirekte Wirkung eines Antikörpers bezeichnet. Dabei entfalten sie nach Bindung ihres Antigens ihre Wirkung zum großen Teil über ihr Fc Fragment.<sup>149</sup> Dazu gehört beispielsweise die Komplement-abhängige Zytotoxizität (*complement dependent cytotoxicity*, CDC), welche über die Bindung von mindestens zwei immobilisierten Fc Teilen an den Komplementfaktor C1q vermittelt wird. Dadurch wird eine Signalkaskade ausgelöst, welche schließlich in der Zielzell-Lyse resultiert.<sup>150</sup> Eine weitere wichtige indirekte Wirkung ist die Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen, die einen spezifischen Rezeptor für den Fc Teil des Antikörpers besitzen.<sup>44</sup> Fc Rezeptoren (FcγR) exprimierende Zellen mit einem unterschiedlichen Repertoire von FcγRI, FcγRII und FcγRIII sind beim Menschen fast alle hämatopoetischen Zellen - im Hinblick auf die in dieser Dissertation durchgeführten Arbeiten soll bereits hier darauf hingewiesen werden, dass insbesondere CD4- und CD8-positive T Zellen keine FcγR exprimieren. Die Rezeptoren FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIc und FcγRIIIa (CD16a) sind aktivierende Rezeptoren, während FcγRIIb ein inhibierender Rezeptor ist. Die meisten Zellen besitzen sowohl inhibierende als auch aktivierende FcγR

auf ihrer Oberfläche, während B Zellen nur FcγRIIb und NK Zellen nur aktivierende FcγR, vor allem FcγRIIIa exprimieren.<sup>44, 151, 152</sup> NK Zellen, die ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit behandelt werden, sind die wichtigste Zellpopulation bei der Vermittlung der ADCC. Nach Bindung des Fc Teils eines Antikörpers an FcγRIIIa werden über intrazelluläre Signalwege, bei denen *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* (ITAM) beteiligt sind, die Bildung und Freisetzung von Immun-Effektormolekülen wie Perforin und Granzym B oder den Apoptose-induzierenden FasL und schließlich die Zielzell-Lyse induziert.<sup>45, 153</sup> Außerdem kommt es zur Freisetzung von IFNγ, mit welchem NK Zellen, wie bereits beschrieben, die Immunreaktion des adaptiven Immunsystems auslösen und vermitteln.<sup>153</sup> Mittlerweile wurde gezeigt, dass auch andere Zellen wie NKT Zellen, γδ T Zellen oder Monozyten ADCC ausüben können.<sup>154-157</sup>

Zu den weiteren Mechanismen, die über die Interaktion des Fc Teils mit FcγR induziert werden, gehört die antikörperabhängige zelluläre Phagozytose (*antibody dependent cellular phagocytosis*, ADCP) durch Makrophagen, DC, Neutrophile und Granulozyten.<sup>158</sup> Nach Bindung eines Antikörpers an sein Antigen können diese Zellen ihn beispielsweise mit dem FcγRIIa erkennen und die Antigen-Antikörper Komplexe aufnehmen. Durch eine nachfolgende Antigenpräsentation auf MHC Klasse I Molekülen kann durch APC dann das adaptive Immunsystem involviert werden.

Insbesondere die ADCC als wichtige Effektorfunktion der IgG Antikörper wird inzwischen bei zahlreichen therapeutischen Antikörpern genutzt und durch den Einsatz von rekombinanten Technologien deren Wirksamkeit auf unterschiedliche Art und Weise verbessert.<sup>159</sup>

### 2.3.3 Fc-optimierte Anti-Tumor Antikörper

Im Laufe der Jahrzehnte wurden Anti-Tumor Antikörper fortlaufend durch neue Erkenntnisse verbessert. Die ersten therapeutisch eingesetzten mAb bestanden aus murinen IgG, allerdings war die Effektivität dieser Moleküle eher gering. Die Ursache war vor allem die schwache Affinität humaner FcγR für murine Antikörper, außerdem kam es vielfach zur Bildung von humanen Anti-Maus Antikörpern und dadurch zur Neutralisation der therapeutischen mAb.<sup>160</sup> Bei der zweiten Generation von therapeutischen Antikörpern wurde dieses Problem gelöst, indem chimäre Moleküle durch Einführung eines humanen Fc Teils oder mittels der *phage display* Technologie vollständig humanisierte Antikörper generiert wurden. Damit wurde die Wirksamkeit der therapeutischen mAb deutlich verbessert und die Immunogenität herabgesetzt.<sup>161-164</sup>

Um den hauptsächlichen Wirkungsmechanismus der mAb auf Immun-Effektorzellen, die ADCC, für die Behandlung von Tumorerkrankungen zu verbessern, wird bei der

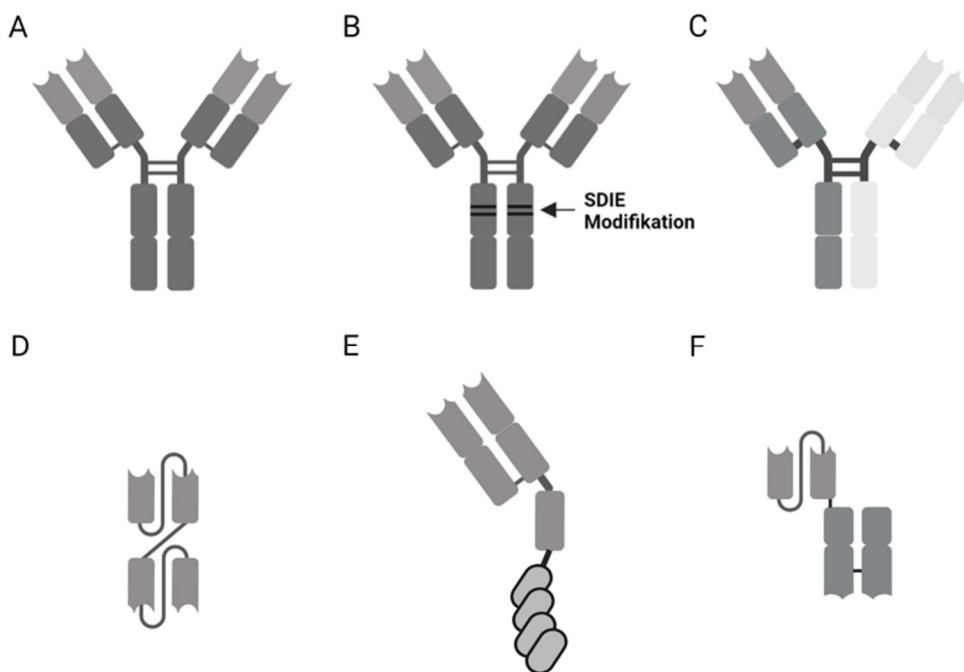
sogenannten dritten Generation der therapeutischen Antikörper versucht, eine Affinitätssteigerung des Fc Fragments zu den FcγR zu erreichen. Bekannt ist, dass dabei die Glykosylierung des Fc Teils eine Rolle spielt. Durch das Fehlen von Fucose im Glykosylierungsmuster des IgG kommt es zu einer gesteigerten Affinität zu FcγRIIIa und als Folge zu einer verbesserten ADCC.<sup>165</sup> Ein prominentes Beispiel dafür ist Obinutuzumab, ein anti-CD20 Antikörper für die Therapie der CLL, mit einem modifizierten Fc Teil ohne Fucose und dadurch einer überlegenen Wirkung gegenüber Rituximab.<sup>166, 167</sup> Eine weitere Möglichkeit, die ADCC zu verstärken, besteht in der Veränderung der Aminosäuresequenz des Fc Fragments der mAb. Neben mehreren bekannten Modifikationen, welche die Affinität zu FcγRIIa und FcγRIIIa erhöhen, jedoch zu anderen FcγR unverändert lässt,<sup>168</sup> ist bekannt, dass die sogenannte SDIE Modifikation zur Verbesserung der ADCP und ADCC führt (Abbildung 2A, B).<sup>169, 170</sup> Dabei wird ein Aminosäureaustausch (S239D und I332E) in der C<sub>H</sub>2 Domäne durchgeführt, wodurch die Affinität zu den aktivierenden FcγRIIa und FcγRIIIa erhöht wird, jedoch auch zu dem inhibitorischen FcγRIIb. Trotz dieser Einschränkung konnte gezeigt werden, dass die ADCC und ADCP durch SDIE-optimierte Antikörper deutlich verbessert sind.<sup>171</sup>

#### 2.3.4 Bispezifische Antikörper und Fusionsproteine

Eine weitere Strategie, um die Effektivität der Antikörper-basierten Immuntherapie zu verbessern, ist die Entwicklung von bispezifischen Antikörpern (*bispecific antibodies*, bsAb), welche zwei unterschiedliche Antigen-bindende Strukturen besitzen. Durch ihre zwei Spezifitäten können sie gleichzeitig an ein tumorassoziiertes Antigen (TAA) und an ein immunmodulierendes Molekül binden. Der Vorteil dieses bispezifischen Formats liegt darin, dass sie eine gezieltere Immunaktivierung als mAb ermöglichen, da sie spezifische Rezeptoren aktivieren und dadurch eine definierte Effektorzell-Population rekrutieren können. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Interaktion von mAb mittels ihrer Fc Teile mit FcγR durch Komponenten des Komplementsystems beeinträchtigt und von FcγR Polymorphismen wie V158F in FcγRIIIa abhängig ist.<sup>171, 172</sup> So kann mit bsAb eine Stimulation von CD16, CD3, CD28 oder anderen Effektorantigenen eine spezifischere Stimulation erreicht werden. Dadurch wird vor allem ermöglicht, neben einer Immunantwort der NK Zellen und anderer FcγR exprimierender Zellpopulationen auch eine T Zell-vermittelte Immunantwort zu induzieren, welche im Vergleich zu ersteren ein höheres Effektorpotential besitzt.<sup>173</sup> Dies führt im Idealfall zu einer Tumorzell-restringierten Aktivierung der T Zellen und zu einer Reduktion der unerwünschten Nebenwirkungen.<sup>174</sup> Unter physiologischen Bedingungen erkennen T Zellen, wie oben beschrieben, spezifisch Antigen-beladene MHC Komplexe und werden, nachdem ihr TCR diese gebunden hat, mit

Hilfe des CD3 Komplexes aktiviert. BsAb können T Zellen aktivieren, nachdem sie ihr Zielantigen gebunden haben und es durch die gleichzeitige Bindung an CD3 zu einer Quervernetzung des TCR-CD3 Komplexes kommt.<sup>175</sup> Damit ist die Aktivierung der T Zellen nicht mehr von der Bindung eines MHC-Peptid Komplexes abhängig.

Der erste zugelassene bsAb war im Jahre 2009 Catumaxomab zur Behandlung des Peritonealkarzinoms, ein *epithelial cell adhesion molecule* (EpCAM)xCD3 Antikörper mit funktionellem Fc Teil.<sup>176</sup> Er wurde mittels Quadroma Technologie generiert und besteht aus je einer schweren und leichten Kette zweier verschiedener mAb (Abbildung. 2C). Ein weiteres, prominenteres Beispiel für einen bsAb ist Blinatumomab (Amgen), ein CD19xCD3 Antikörper im *bispecific T cell engager* (BiTE) Format (Abbildung. 2D). Er wurde 2015 in Europa für die Therapie der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) und des Non-Hodgkin-Lymphoms zugelassen.<sup>177, 178</sup> Ein BiTE wird aus zwei miteinander verbundenen *single chain variable fragments* (scFv) bestehend jeweils aus V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub> eines Antikörpers hergestellt.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung von unterschiedlichen anti-Tumor Antikörpern.  
**A** Monospezifischer IgG. **B** Monospezifischer Fc-optimierter IgG. **C** Bispezifischer Quadroma Antikörper. **D** BiTE. **E** Bispezifisches Fusionsprotein mit NKG2D (NKG2D BFP). **F** Bispezifisches Fusionsprotein Tebentafusp. Erstellt mit biorender.com.

Mittlerweile kennt man unzählige weitere Formate von bsAb, welche sich in ihren Eigenschaften unterscheiden. Formate, die ein Fc Fragment enthalten und ein hohes Molekulargewicht haben, zeichnen sich etwa durch eine hohe Serumhalbwertszeit aus,

während bei kleineren Molekülen wie BiTE häufig eine Dauerinfusion aufgrund der niedrigen Serumhalbwertszeit notwendig ist. Dafür zeichnen sich diese häufig durch eine verbesserte Gewebspenetration und einen besseren Zugang zu Antigenen aus.<sup>179, 180</sup>

Eine besondere Form der bsAb sind die BFP. Das besondere an BFP ist, dass über eine Verbindungsstruktur (Linker) Moleküle, welche keine Antikörper sind, mit einem Antikörper oder einem Antikörper Fragment fusioniert werden. Auch hier gibt es viele unterschiedliche Formate.<sup>179</sup> Bisher ist aus dieser Gruppe der bsAb Tebentafusp für die Behandlung des metastasierten Aderhautmelanoms seit 2022 zugelassen, ein TCR/CD3 BFP, welches ein CD3 scFv und einen HLA-A\*02:01 spezifischen TCR mit verbesserter Affinität enthält (Abbildung 2F).<sup>181</sup>

In eigenen Vorarbeiten wurden NKG2D-CD16 und NKG2D-CD3 BFP entwickelt, die aus der extrazellulären Domäne des Immunrezeptors NKG2D bestehen und über einen Fc Teil mit anti-CD16 bzw. anti-CD3 Fab Fragmenten fusioniert sind (Abbildung 2E) und nach Bindung an die Liganden des NKG2D Rezeptors (NKG2DL) die Rekrutierung von NK bzw. T Zellen über NKG2D ermöglichen.<sup>182</sup>

## **2.4 Tumorassoziierte Antigene (TAA)**

Um die Effizienz der Behandlung und die therapeutische Sicherheit der anti-Tumor Antikörper zu gewährleisten, müssen Zielantigene bestimmt werden, die im Tumorgewebe homogen exprimiert werden, während sie im Idealfall auf gesundem Gewebe nicht vorhanden sind. Bisher sind wenige tumorspezifische Antigene, welche ausschließlich von malignen Zellen aufgrund von tumorspezifischen Mutationen exprimiert werden, bekannt. Hingegen können die meisten gebräuchlichen TAA auch auf gesunden Körperzellen vorkommen, wobei oft eine starke Überexpression der Antigene auf Tumorzellen zu beobachten ist. Bei Sarkomen ist dies eine besondere Herausforderung, da es bisher keine gut etablierten Zielantigene gibt, unter anderem wegen der großen Unterschiede zwischen den vielen Subtypen.<sup>121</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurden TAA herangezogen, für welche die Expression bei einigen Tumorentitäten bekannt ist und erst wenig für Weichteil- und Knochensarkome beschrieben wurden. Daher wird im Folgenden näher auf diese eingegangen.

### **2.4.1 NKG2D Liganden (NKG2DL)**

Der Immunrezeptor NKG2D erkennt mehrere MHC Klasse I Molekül-ähnliche Liganden (NKG2DL) und ist der einzige Rezeptor für die bisher bekannten NKG2DL. In gesunden humanen Zellen werden NKG2DL weitestgehend nicht oder nur sehr niedrig exprimiert.

Daher sind NKG2DL von großem Interesse als TAA für immuntherapeutische Strategien.<sup>183</sup> Durch pathologische Veränderungen, wie beispielsweise maligne Transformation, Infektion oder Hitzeschock, wird die Expression von NKG2DL auf der Oberfläche von Zellen induziert und damit Zellstress signalisiert.<sup>184, 185</sup> Anhand der Sequenz und Struktur werden die NKG2DL in zwei Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe umfasst die *MHC class I related chain* (MIC) Moleküle, die andere die *UL16 binding protein* (ULBP) Moleküle, welche auch RAET1 (*Retinoic Acid Early inducible Transcript 1*) genannt werden.<sup>184</sup> Die Bezeichnung ULBP leitet sich von der ursprünglichen Charakterisierung dreier ULBP-Moleküle als Liganden des UL16-Proteins des Cytomegalievirus ab.<sup>186</sup> Bisher bekannt sind die NKG2DL MICA und B sowie ULBP1-6.

Die Expression der NKG2DL wird über komplexe, noch nicht vollständig verstandene Abläufe geregelt und durch eine Vielzahl von Mechanismen sorgfältig reguliert.<sup>187</sup> Diese umfassen Prozesse auf verschiedenen Ebenen, zu denen transkriptionelle, post-transkriptionelle sowie post-translationale gehören.<sup>188</sup> Neben zellintrinsic Mechanismen wird die NKG2DL Expression auch durch lösliche Faktoren moduliert, die in der Tumorumgebung freigesetzt werden.<sup>189</sup> An der Induktion von NKG2DL beteiligt sind unter anderem *DNA damage pathways*. Zusätzlich unterliegen die NKG2DL einem hohen Maß an posttranskriptionaler Regulierung wie z.B. dem *Shedding*, einem Vorgang, bei dem der extrazellulären Teile der NKG2DL proteolytisch freigesetzt wird.<sup>107, 190</sup>

NKG2DL weisen eine große Vielfalt auf, allerdings ist der Grund dieser Diversität bisher noch unklar. Die Vielfalt der NKG2DL wird zusätzlich durch ihren genetischen Polymorphismus vergrößert. Für MICA wurden beispielsweise bisher über 100 Allele und für MICB mehr als 40 Allele beschrieben. Eine Vermutung ist, dass die Vielzahl an NKG2DL durch konstante evolutionäre Weiterentwicklung zum Vorteil für die Überwachung durch das Immunsystem wurde. Dadurch könnte es für Tumore und Pathogene schwieriger geworden sein, dem Immunsystem zu entkommen.<sup>191</sup> Zusätzlich könnte wegen der unterschiedlichen Bindungsaffinitäten eine feine Abstimmung der NKG2D-vermittelten Immunantwort möglich sein.<sup>188</sup> NKG2DL können nicht nur membrangebunden auf der Zelloberfläche vorkommen, sondern auch abgespalten in löslicher Form (sNKG2DL) oder als Teil von Exosomen.<sup>192</sup>

Neben ihrer evolutionär entwickelten Rolle in der Immunüberwachung bieten sich NKG2DL auf Tumorzellen als geeignetes Ziel für immuntherapeutische Ansätze wie mAb oder BFP an.<sup>183, 193</sup> Beschrieben wurde ihre Expression in variabler Zusammensetzung in humanen Tumorzellen wie beispielsweise bei der akuten myeloischen Leukämie (AML), dem Bronchialkarzinom, Mammakarzinom sowie bei Sarkomen.<sup>194-198</sup>



### 2.4.2 B7-H3

B7-H3 (CD276 oder B7RP-2) gehört zur B7 Proteinfamilie und wird als integrales Transmembranprotein klassifiziert. Das Protein besteht aus einer Transmembrandomäne, einer kleinen intrazellulären und einer extrazellulären Domäne. Diese besteht aus zwei identischen Paaren bestehend jeweils aus einer variablen Domäne und einer konstanten Domäne eines Ig.<sup>199, 200</sup> Bislang wird die immunregulatorische Rolle von B7-H3 noch diskutiert, auch sein Rezeptor ist noch nicht bekannt. Zumindest für das murine B7-H3 wird eine eher immunsupprimierende Wirkung vermutet, seine Expression auf APC reduziert sowohl die T Zell-Aktivierung als auch die Freisetzung von Zytokinen.<sup>201</sup> Für humanes B7-H3 ist seine Expression auf APC bekannt, so kann es auf DC durch verschiedene Stimuli wie IFN $\gamma$  und LPS induziert werden.<sup>202, 203</sup> Aufgrund seiner immunmodulatorischen Eigenschaften scheint humanes B7-H3 die anti-Tumor Reaktivität von T und NK Zellen einzuschränken.<sup>204-206</sup> Dieser Effekt konnte durch die Blockade von B7-H3 aufgehoben werden, die anti-Tumor Effekte von zytotoxischen T Zellen und NK Zellen wurden dadurch erhöht.<sup>207, 208</sup>

Die Expression von B7-H3 wurde für eine Vielzahl von humanen Tumorarten nachgewiesen, darunter sind Gliome, AML, Lungenadenokarzinom, Ovarialkarzinom, Pankreaskarzinom und auch bestimmte Sarkome, während es in gesundem Gewebe kaum oder nur schwach vorhanden ist.<sup>209-211</sup> Weiterhin wird die Expression von B7-H3 auf Tumorgewebe mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf und einer schlechten Prognose für die Patienten in Verbindung gebracht, beschrieben wurde dies bereits auch für Patienten mit Knochensarkomen.<sup>212-215</sup> Darüber hinaus ist bekannt, dass B7-H3 bei vielen malignen Tumoren auf Tumorgefäßen exprimiert wird.<sup>216, 217</sup>

Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse scheint B7-H3 ein attraktives Zielantigen für die Immuntherapie zu sein.<sup>218</sup>

### 3 Zielsetzung der Arbeit

Die Erkenntnisse der letzten Jahre über das Zusammenspiel von Tumorzellen und Immunzellen haben die Einführung der Immuntherapie für die Behandlung von vielen Tumorerkrankungen ermöglicht.<sup>219</sup> In diesem Zusammenhang sind anti-Tumor Antikörper seit längerem in der klinischen Anwendung etabliert und haben die therapeutischen Möglichkeiten bei vielen malignen Erkrankungen erheblich verbessert. Trotz ihrer Erfolge lässt die therapeutische Wirksamkeit von anti-Tumor Antikörpern jedoch erheblichen Raum für Verbesserungen, und in vielen Fällen, insbesondere in der Therapie von Weichteil- und Knochensarkomen, sind geeignete Antikörper noch nicht verfügbar. Eine wichtige Grundvoraussetzung für die zielgerichtete Therapie mit anti-Tumor Antikörpern ist die Identifizierung von Antigenen, welche möglichst breit auf malignem, aber kaum auf gesundem Gewebe vorhanden sind. Insbesondere für die heterogene Gruppe der Sarkome sind bisher wenige solcher TAA etabliert.

Eine Möglichkeit, um mAb in ihrer Effizienz bei der Tumorbehandlung zu verbessern besteht darin, Antikörper mit zwei Spezifitäten auszustatten. Dadurch bindet der entstandene bsAb oder das BFP neben dem TAA auch an ein immunstimulatorisches Molekül und kann so Immunzellen wie NK und T Zellen zum Tumor rekrutieren und ihre Effektormechanismen, welche letztendlich zur Tumorlyse führen, verstärken. Ein weiterer vielversprechender Ansatz zur Verbesserung der Wirksamkeit von mAb zur Tumorbehandlung ist die Steigerung ihrer immunstimulatorischen Fähigkeit, insbesondere durch Verbesserung der Fähigkeit, ADCC zu induzieren.<sup>159</sup> Eine erhöhte Affinität zu FcγRIIIa und eine damit verstärkte ADCC kann beispielsweise durch Modulation der Aminosäuresequenz des Fc Teils erreicht werden, wie die Substitutionen S239D/I332E.<sup>220</sup> Diese Modifikation ist in mAb enthalten, die gegenwärtig klinisch geprüft werden, außerdem wurden in vorausgehenden eigenen Arbeiten mehrere mAb und Antikörper-basierte Konstrukte mit dieser Fc Modifikation präklinisch getestet.<sup>194, 221-225</sup>

Für Sarkome wie auch für andere Tumorarten ist bekannt, dass NKG2DL häufig exprimiert sind, jedoch in gesundem Gewebe im Allgemeinen nicht vorkommen.<sup>196, 226</sup> Dies liefert die Rationale für die Nutzung von NKG2DL als Zielstrukturen für immuntherapeutische Ansätze. In der Vergangenheit wurden zur Behandlung der AML bereits NKG2D BFP generiert, welche aus der extrazellulären Domäne des NKG2D Rezeptors bestehen und mit Fab Fragmenten fusioniert sind, die entweder gegen CD3 (NKG2D-CD3) oder CD16 (NKG2D-CD16) gerichtet sind.<sup>182</sup>

B7-H3 (CD276), ein Mitglied der B7 Familie, erfährt in jüngster Zeit großes Interesse als neues, vielversprechendes Zielantigen für die Immuntherapie.<sup>218</sup> B7-H3 wird in vielen Tumorarten stark exprimiert, während die Expression in gesundem Gewebe eher gering ist.

Auch für viele Weichteil- und Knochensarkome aus der mehr als 100 Subtypen umfassenden, heterogenen malignen Erkrankungsgruppe ist die Überexpression von B7-H3 bekannt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein Fc-optimierter, gegen B7-H3 gerichteter mAb entwickelt und evaluiert.

In der vorliegenden Arbeit sollten somit neuartige therapeutische Antikörper präklinisch zur Verwendung bei Weichteil- und Knochensarkomen untersucht werden.

## 4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Folgenden sind die Ergebnisse der beiden Forschungsartikel, die dieser kumulativen Dissertation zugrunde liegen, zusammengefasst.<sup>227, 228</sup> Beide Publikationen sind im Anhang beigefügt.

### 4.1 Bispezifische NKG2D-CD3 und NKG2D-CD16 Fusionsproteine als neue Behandlungsoption für fortgeschrittene Sarkome

In dieser Arbeit wurden BFP mit NKG2DL als Zielantigen und einem anti-CD16 oder anti-CD3 (NKG2D BFP) zur Rekrutierung von NK oder T Zellen als Effektorzellen gegen Sarkome präklinisch untersucht.<sup>227</sup>

Es wurde bereits für verschiedene Weichteil- und Knochensarkome beschrieben, dass sie unterschiedliche NKG2DL mit variierender Intensität exprimieren.<sup>197, 229</sup> Zunächst wurde die mRNA Expression der NKG2DL MICA, MICB und ULBP1-4 in Sarkom-Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs charakterisiert. Die untersuchten Zellen beinhalten: Rhabdomyosarkom (RD-ES), Osteosarkom (SaOs), Liposarkom (SW872), Synovialsarkom (SW982) und Chondrosarkom (SW1353). Die Analyse der mRNA mittels qPCR bestätigte die Expression von mehreren NKG2DL mit variablen Expressionsmustern in allen getesteten Sarkom-Zelllinien. Während die mRNA von MICA, ULBP2 und ULBP3 in allen Sarkomen nachweisbar war, konnte die mRNA von MICB und ULBP4 nur in sehr geringen Mengen detektiert werden.

Im nächsten Schritt wurde die Proteinexpression der NKG2DL auf der Zelloberfläche mit spezifischen Antikörpern gegen MICA, MICB und ULBP1-4 bestimmt. Für die Analyse der Expression von ULBP5 und 6 wurde ein mAb verwendet, welches beide Proteine in Kombination mit ULBP2 erkennt. Die auf der Oberfläche der Zelllinien nachweisbare Expression der NKG2DL spiegelte nicht die ermittelten mRNA Mengen wider, was dadurch erklärbar ist, dass die NKG2DL Proteinexpression einer posttranslationalen Regulation unterliegt.<sup>189, 230</sup> MICA und ULBP2 wiesen unter den getesteten Zelllinien die höchste Prävalenz sowie das höchste Oberflächenexpressionsniveau auf, während ULBP1 und ULBP4 nicht auf der Oberfläche nachgewiesen werden konnten. Die Untersuchung mittels eines chimären NKG2D-Fc Fusionsproteins zur gleichzeitigen Analyse aller verschiedenen NKG2DL zeigte ebenfalls unterschiedliche Färbeintensitäten bei den Zelllinien. Die Unterschiede zur Färbung mit Antikörpern basieren möglicherweise auf der Tatsache, dass jeder einzelne NKG2DL eine unterschiedliche Affinität für den NKG2D Rezeptor hat,<sup>188</sup> die nicht mit der Bindung eines Antikörpers an sein jeweiliges Epitop vergleichbar ist. Auf der

Grundlage der Ergebnisse für die NKG2DL Expression wurden die Zelllinien SaOs, RD-ES und SW1353 für die folgenden funktionellen Untersuchungen ausgewählt.

In einem weiteren Schritt wurde die NKG2DL Expression auf primären Sarkomzellen von Patienten mit Sarkomen unterschiedlicher Subgruppen durchflusszytometrisch analysiert. Die Sarkomzellen der Patienten wurden dabei durch Dissoziation des operativ entfernten Primärtumors und anschließender Kultur zur Gewinnung der adhären Ten Tumorzellen erhalten. Eine durchflusszytometrische Analyse ergab erneut eine unterschiedliche Anfärbung der NKG2DL mit dem NKG2D-Fc Fusionsprotein und den murinen Antikörpern gegen MICA, MICB und ULBP1-4. Bei in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten der Primärtumore wurde zusätzlich eine H&E-Färbung zur Identifizierung der Sarkomzellen durchgeführt und die Diagnose bestätigt.

Als Nächstes wurde die Fähigkeit der BFP NKG2D-CD16 und NKG2D-CD3, NK und T Zellen zu den Sarkomzellen zu rekrutieren, untersucht. Dazu wurden PBMC von gesunden Spendern mit Sarkomzellen in Gegenwart oder Abwesenheit von NKG2D-CD16 und NKG2D-CD3 BFP inkubiert. Die Rekrutierung der Immunzellen zu den Sarkomen wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung optisch quantifiziert, indem die Anzahl der kolokalisierten Effektor- und Zielzellen pro Sichtfeld (*Field of view*, FoV) bestimmt wurde. In drei unabhängigen Experimenten und mit zwei verschiedenen Zelllinien wurde nach Behandlung mit NKG2D-CD16 ein signifikanter Anstieg der CD16<sup>+</sup> Zellen beobachtet, welche mit Sarkomzellen interagierten. Ein ähnlicher Effekt wurde für CD3<sup>+</sup> Zellen beobachtet, wenn Sarkomzellen mit PBMC in Anwesenheit des NKG2D-CD3 Konstrukts inkubiert wurden. Dabei wurde eine verstärkte Rekrutierung von NK und T Zellen im Vergleich zu mitgeführten Kontrollen nach Behandlung mit dem jeweiligen BFP bestätigt. Weiterhin wurde das Potenzial der NKG2D BFP ermittelt, eine Reaktivität der Immun-Effektorzellen gegen Sarkomzellen auszulösen. Zu diesem Zweck wurden PBMC von gesunden Spendern mit den Sarkomzellen SW1353, RD-ES oder SaOs in Gegenwart oder Abwesenheit von BFP kultiviert. Die durchflusszytometrische Analyse des Aktivierungsmarkers CD69 auf NK und T Zellen ergab, dass bei Behandlung mit beiden Konstrukten eine signifikante Aktivierung von NK bzw. CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen ausgelöst wurde. Die Bestimmung der Degranulierung der Effektorzellen mittels des Markers CD107a bestätigte, dass NKG2D-CD16 und NKG2D-CD3 Degranulation von NK bzw. T Zellen induzieren. Eine zusätzliche Analyse freigesetzter immunmodulatorischer Moleküle in den Kokultur-Überständen mit Hilfe eines Legendplex Assays zeigte einen signifikanten Anstieg der IFN $\gamma$  Sekretion nach der Behandlung mit NKG2D-CD3. Die Sekretion von Perforin war in den Überständen der mit NKG2D-CD16 behandelten Zellen deutlich erhöht. Darüber hinaus wurde nach der Behandlung mit NKG2D-CD16 eine tendenziell erhöhte Sekretion

von Granzym A und Granulysin festgestellt. Um die Induktion von Perforin und IFN $\gamma$  in den Effektorzellen durch die Behandlung mit den BFP zu belegen, wurde die intrazelluläre Bildung der beiden Moleküle durchflusszytometrisch untersucht. Nach Behandlung mit den NKG2D BFP war die Expression von Perforin sowohl bei CD4 $^+$  als auch bei CD8 $^+$  T Zellen signifikant erhöht. Die Bildung von IFN $\gamma$  wurde in CD8 $^+$  T Zellen stark induziert, während die Auswirkungen auf CD4 $^+$  T Zellen nur marginal waren. Die Analyse der NK Zellen ergab, dass sie bereits konstitutiv große Mengen an Perforin und IFN $\gamma$  enthielten, signifikante Unterschiede durch die Behandlung konnten hierbei nicht beobachtet werden. Zusätzlich zum Nachweis von Perforin mittels Legendplex und intrazellulärer durchflusszytometrischer Färbung wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von Perforin in CD16 $^+$  und CD3 $^+$  Effektorzellen durchgeführt. Es konnte eine deutliche Anfärbung von Perforin nach Behandlung mit NKG2D-CD16 bzw. NKG2D-CD3 innerhalb von 1 h und 3 h nachgewiesen werden.

Um festzustellen, ob die Immunzellen von Sarkompatienten krankheits- und behandlungsbedingt verändert sind, was die Wirksamkeit einer Behandlung mit NKG2D BFP beeinträchtigen könnte, wurden PBMC von gesunden Spendern (*healthy donors*, HD) und Patienten, bei welchen ein Weichteil- oder Knochensarkom diagnostiziert wurde, vergleichend analysiert. Die untersuchten Sarkom-Proben stammten von Patienten, welche während der Probengewinnung mit einer intensiven neo- oder adjuvanten zytotoxischen Chemotherapie behandelt wurden. In der vorbehandelten Patienten-Kohorte waren die Leukozyten-, Neutrophilen- und Monozytenwerte im normalen Bereich, es wurde eine leicht verringerte Gesamtzahl an Lymphozyten der Patienten festgestellt. Um die Verteilung der wichtigsten Subpopulationen wie B Zellen (CD19 $^+$ ), Monozyten (CD14 $^+$ ), DC (HLA-DR $^+$ ), NK (CD3 $^+$ CD56 $^+$ ) und T Zellen (CD3 $^+$ CD4 $^+$ , CD3 $^+$ CD8 $^+$ ) innerhalb der PBMC Proben näher zu untersuchen, wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Im Vergleich zu HD wurde eine Reduktion der B und T Zellen beobachtet. Bei den T Zellen waren die CD8 $^+$  Zellen weniger betroffen als die CD4 $^+$  Zellen. Der Anteil der DC war in beiden untersuchten Kohorten ähnlich, während in der Gruppe der Sarkompatienten erhöhte Mengen an Monozyten und NK Zellen beobachtet wurden. Eine detailliertere Analyse der NK Zellen zeigte, dass insbesondere der Anteil der CD56 $^{\text{dim}}$ CD16 $^+$  Population erhöht war.

Um festzustellen, ob mittels NKG2D-CD3 und NKG2D-CD16 Effektorzellen von vorbehandelten Sarkompatienten in ähnlicher Weise stimuliert werden können wie bei HD, wurde dies zunächst unabhängig von der Bindung an Zielzellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden PBMC von 5 HD und 4 Sarkompatienten 24 Stunden lang auf immobilisierten BFP kultiviert und anschließend mittels Durchflusszytometrie auf CD69 Expression untersucht. Obwohl die NK Zellen der Sarkompatienten nach der Behandlung

mit NKG2D-CD16 im Vergleich zu Gesunden eine leicht verringerte CD69 Expression aufwiesen, erreichte dieser Unterschied keine statistische Signifikanz. Nach der Behandlung mit NKG2D-CD3 zeigten die T Zellen der Patienten eine leicht höhere Expression von CD69 als die der HD.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die zytotoxische Kapazität von PBMC der Sarkompatienten mit der von gesunden Spendern vergleichbar ist. Dazu wurden sowohl PBMC von Sarkompatienten als auch von HD mit Sarkomzellen (RD-ES, SaOs und SW1353) in Gegenwart von NKG2D-CD3 oder -CD16 für 24 Stunden kultiviert, gefolgt von einer intrazellulären Färbung der PBMC für Perforin und IFN $\gamma$ . Es wurde kein Unterschied zwischen den NK und T Zellen gesunder Spender und Patienten in Bezug auf die Perforin Expression festgestellt. Die Proben der Sarkompatienten wiesen nach der Behandlung mit BFP signifikant mehr IFN $\gamma$ -positive NK Zellen auf, während bei T Zellen eine vergleichbare IFN $\gamma$  Induktion beobachtet wurde.

Schließlich wurde untersucht, ob sich die Aktivierung der Effektorzellen, welche durch die NKG2D BFP induziert wurde, in einer Lyse von Tumorzielzellen widerspiegelt. Da NKG2D-CD3 und NKG2D-CD16 jeweils T Zellen oder NK Zellen stimulieren, die sich im Hinblick auf die Kinetik ihrer Effektorfunktion unterscheiden, wurde die Zytotoxizität nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit verschiedenen geeigneten experimentellen Systemen untersucht. Europium-basierte Zytotoxizitätsanalysen zeigten eine potente Zielzell-Lyse durch die Behandlung mit NKG2D-CD16 bereits nach 2 Stunden, während mit NKG2D-CD3 kein signifikanter Effekt beobachtet wurde. Nach 72 Stunden zeigten durchflusszytometrische Analysen der Zielzell-Viabilität eine deutlich stärkere Wirkung von NKG2D-CD3. Der Befund, dass die Lyse-Kapazität von NKG2D-CD3 zu späteren Zeitpunkten auftritt und dann die Wirkung von NKG2D-CD16 übertrifft, wurde auch mit Hilfe eines Systems zur automatisierten Bildgebung von Zellwachstum (IncuCyte) über eine Inkubationszeit von 136 Stunden bestätigt.

Zusammenfassend belegen die vorliegenden Ergebnisse das Potenzial von NKG2D-CD3 und NKG2D-CD16 BFP zur Bekämpfung von Weichteil- und Knochensarkomen selbst bei fortgeschrittener Erkrankung unter Chemotherapie.

#### **4.2 Fc-optimierte Antikörper gegen B7-H3 zur Induktion von NK Zell-Reaktivität gegen Sarkome**

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde die Wirksamkeit eines Fc-optimierten B7-H3 Antikörpers, 8H8\_SDIE, zur Induktion von NK Zell-Reaktivität gegen Sarkome im Vergleich

zu einem B7-H3 Antikörper mit einem unveränderten Fc Teil (8H8\_WT) präklinisch untersucht.<sup>228</sup>

In einem ersten Schritt wurden B7-H3 mRNA-Expressionsdatensätze aus der TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) Datenbank von Tumor- und entsprechendem Normalgewebe auf relative B7-H3 Expression analysiert. Die Analyse umfasste Datensätze für 275/349 (Tumor/Normalgewebe) Kolon-Adenokarzinome, 286/60 Nierenkarzinome, 179/171 Pankreas-Adenokarzinome, 486/338 Plattenepithelkarzinome der Lunge und 262/2 Sarkome. Im Vergleich zur RNA Expression in normalem Gewebe war die Expression von B7-H3 in Tumorzellen in allen analysierten Datensätzen stark erhöht. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde die Expression von B7-H3 mRNA in Rhabdomyosarkom- (RD-ES), Osteosarkom- (SaOs), Liposarkom- (SW872), Synovialsarkom- (SW982) und Chondrosarkom- (SW1353) Zellen mittels qPCR untersucht. Bei allen getesteten Weichteil- und Knochensarkom-Zelllinien wurde eine Expression von B7-H3 mRNA beobachtet, wobei sich die Niveaus unterschieden. In einem nächsten Schritt wurde die B7-H3 Oberflächenexpression auf den Sarkomzellen ermittelt. Die FACS-basierte Quantifizierung der B7-H3 Moleküle auf der Zelloberfläche von unterschiedlichen Sarkom-Zelllinien verschiedener Subtypen ergab eine variierende Anzahl an B7-H3 Molekülen auf den untersuchten Zellen, die Anzahl der B7-H3-Moleküle pro Zelle lag zwischen 2.960 (SaOs) und 23.797 (SW872).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass B7-H3 auf unterschiedlichsten Weichteil- und Knochensarkomzellen vorhanden ist, wurde aus vorhandenen gegen B7-H3 gerichteten Antikörpern (beschrieben in der Patentanmeldung EP3822288A1) ein Antikörper-Klon mit geeigneten Bindungseigenschaften (Klon 8H8) für die Generierung chimärer mAb ausgewählt. Die B7-H3 mAb wurden entweder mit einem unveränderten humanen IgG1 Fc (8H8\_WT) oder mit einem Fc Teil generiert, welcher die Aminosäuresubstitutionen S239D/I332E (8H8\_SDIE) enthält. Diese Modifikation der Aminosäuresequenz erhöht die Affinität zum ADCC vermittelnden Fc Rezeptor CD16. Als Kontrollen dienten Wildtyp und Fc-optimierte mAb mit nicht relevanter Antigenpezifität, bezeichnet als Iso\_WT und Iso\_SDIE.<sup>223</sup> Die mAb wurden mit Hilfe des kommerziellen ExpiCHO *cell system* (Gibco) produziert und über Protein A Affinitätschromatographie aufgereinigt. Zur biochemischen Charakterisierung der hergestellten mAb wurden eine SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis*, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) und eine Gelfiltration durchgeführt, welche die erwarteten Molekulargewichte für die leichte Kette (LC) und schwere Kette (HC) unter denaturierenden Bedingungen sowie der vollständigen mAb sowohl für 8H8\_WT als auch für 8H8\_SDIE ergaben und bestätigten,



dass keine Aggregate vorhanden waren. Anschließend wurden Dosis-Titrationsexperimente (Bereich 3-30.000 ng/ml) mit fünf verschiedenen Sarkom-Zelllinien mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Eine gesättigte Bindung sowohl von 8H8\_WT als auch von 8H8\_SDIE wurde bei Konzentrationen von etwa 1000 ng/ml beobachtet. Spezifität und Affinität der B7-H3 mAb wurden durch die Fc-Optimierung also nicht beeinträchtigt, und die Konzentration von 1000 ng/ml (1 µg/ml) wurde als sättigende Konzentration für die nachfolgenden Analysen verwendet. Die Bindung von 8H8\_WT und 8H8\_SDIE an Sarkomzellen wurde auch mit primären malignen Zellen von Patienten bestätigt, bei welchen Sarkome verschiedener Subtypen diagnostiziert worden waren. Weiterhin wurde die Bindung beider mAb an CD16 auf NK Zellen in ruhenden PBMC gesunder Spender untersucht. Die Bindung von 8H8\_WT an NK Zellen wurde bestätigt, und 8H8\_SDIE wies eine deutlich ausgeprägtere Bindung auf.

Die Bindung eines Antikörpers an sein Zielmolekül führt häufig zu einer dosisabhängigen Modulation der Expression auf der Zelloberfläche. Dies wiederum beeinträchtigt die therapeutische Wirksamkeit des Antikörpers.<sup>231</sup> Daher wurde analysiert, ob die Bindung von 8H8\_SDIE an Sarkomzellen eine Reduktion des Antigens hervorruft. Nach Kultivierung der Sarkomzellen mit verschiedenen Konzentrationen von 8H8\_SDIE (Bereich 3-10 000 ng/ml) für 24 h oder 72 h wurde nur eine marginale Verringerung von B7-H3 auf der Zelloberfläche beobachtet.

Als Nächstes wurde untersucht, ob und wie die gegen B7-H3 gerichteten mAb eine NK Zell-Reaktivität gegen Sarkomzellen induzieren. Für diese Untersuchungen wurden PBMC gesunder Spender, welche NK Zellen als Immun-Effektorzellen beinhalten, mit Sarkom-Zelllinien in An- oder Abwesenheit von 8H8\_WT, 8H8\_SDIE oder den entsprechenden Isotyp-Kontrollen kultiviert. Die Analyse der CD69 Expression auf NK Zellen nach 24 h mittels Durchflusszytometrie ergab, dass 8H8\_WT bereits die NK Zell-Aktivierung erhöhte, wohingegen die Aktivierung der NK Zellen durch die Behandlung mit 8H8\_SDIE in der Kokultur mit allen Sarkom-Zelllinien noch einmal deutlich verstärkt wurde. Die Kontroll mAb mit nicht relevanter Zielspezifität hatten keine relevante Wirkung auf die Aktivierung der NK Zellen. Da CD25<sup>+</sup> NK Zellen eine höhere proliferative Aktivität aufweisen,<sup>232</sup> wurde durchflusszytometrisch die Induktion des Aktivierungsmarkers CD25 auf NK Zellen in Ko-Kulturen von PBMC mit allen unterschiedlichen Sarkom-Zelllinien untersucht. Nach 72 h Inkubation der PBMC in Anwesenheit von 8H8\_SDIE war die Expression von CD25 signifikant erhöht, nicht jedoch mit 8H8\_WT oder den entsprechenden Kontroll mAb. Durchflusszytometrische Analysen der CD107a Expression ergaben, dass die Anwesenheit von 8H8\_WT in Kokulturen mit den Sarkomzellen RD-ES, SaOs und SW1353 die Degranulation von NK Zellen bereits signifikant erhöhte, jedoch wurde mit allen Zelllinien

eine deutlich ausgeprägtere Wirkung bei Behandlung mit 8H8\_SDIE beobachtet. Die Analyse der IFN $\gamma$  Freisetzung in Überstände von PBMC und Sarkom-Zelllinien mittels Legendplex Assays zeigte einen Anstieg der Zytokinfreisetzung nach der Behandlung mit 8H8\_WT, wohingegen wiederum die Inkubation mit 8H8\_SDIE eine signifikant höhere Bildung von IFN $\gamma$  zur Folge hatte. Analysen mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie bestätigten, dass die Menge an IFN $\gamma$  sowohl bei Behandlung mit 8H8\_WT als auch mit 8H8\_SDIE spezifisch in NK Zellen signifikant erhöht war, wobei 8H8\_SDIE erneut eine deutlich stärkere Wirkung hatte. Schließlich wurde die Freisetzung von Effektor- und immunmodulatorischen Molekülen in Überständen nach Kokultur von PBMC und Sarkomzellen in An- oder Abwesenheit der mAb oder entsprechenden Kontroll mAb mit Hilfe von Legendplex Assays analysiert. Die Anwesenheit von 8H8\_WT erhöhte bereits die Konzentrationen von Granzym B, Perforin, Granulysin, sFasL und IFN $\gamma$  während für 8H8\_SDIE eine deutliche Tendenz zu erhöhten Konzentrationen der analysierten Moleküle zu beobachten war, während in den Überständen die Konzentrationen von Granzym A, TNF, IL-4 und IL-10 signifikant erhöht waren.

Als Nächstes wurde untersucht, ob sich die erhöhte NK Zell-Aktivität durch die B7-H3 mAb 8H8\_SDIE und 8H8\_WT in der Auslösung von Zytotoxizität widerspiegelte. Die Analyse der Zytotoxizität nach 2 h in Ko-Kulturen von Sarkom-Zelllinien RD-ES, SaOs, SW1353, SW872 und SW982 mit PBMC gesunder Spender zeigte, dass bereits 8H8\_WT die Lyse der Zielzellen nach kurzer Zeit erhöht. Die durch 8H8\_SDIE induzierte Lyse von Sarkomzellen war bei den unterschiedlichen Sarkom-Zelllinien deutlich stärker ausgeprägt als mit 8H8\_WT, während die Kontroll mAb keine Auswirkungen auf die Lyse von Zielzellen hatte. Auch nach einer Zeit von 72 Stunden zeigte die Zytotoxizitäts-Analyse mittels Durchflusszytometrie eine ausgeprägtere Wirksamkeit von 8H8\_SDIE gegen Sarkomzellen im Vergleich zu 8H8\_WT. In Analysen über eine Zeit von 120 Stunden mittels Live-Cell-Imaging wurde beobachtet, dass 8H8\_WT eine klare Tendenz zeigte, NK Zell-Reaktivität gegen Sarkom-Zellen zu induzieren, wohingegen bei Behandlung mit 8H8\_SDIE eine effiziente Lyse von Sarkom-Zellen beobachtet wurde, obwohl alle fünf verwendeten Zelllinien unterschiedliche Mengen an B7-H3 auf der Zelloberfläche aufweisen.

Schließlich wurde die Wirksamkeit der B7-H3 mAb in vergleichenden Analysen mit Sarkomzellen von Patienten untersucht. Die Sarkomzellen wurden von Patienten mit Diagnosen unterschiedlichster Weichteil- und Knochensarkome erhalten und beinhalteten Liposarkom, Chondrosarkom, Rhabdomyosarkom, Osteosarkom und Synovialsarkom. Durchflusszytometrische Analysen von Kokulturen mit PBMC gesunder Spender und B7-H3 exprimierenden primären Sarkomzellen ergaben, dass nach 24 h die Behandlung mit 8H8\_WT bereits die Aktivierung (CD69 Expression) der NK Zellen auslöst, während

Behandlung mit 8H8\_SDIE zu einem deutlichen und signifikanten Anstieg der Aktivierung führte und die Kontrollantikörper keine relevanten Auswirkungen hatten. Die Analyse der Degranulation (CD107a) nach 4 h zeigte die gleichen Effekte auf die NK Zellen. Weiterhin wurde in Europium-basierten Lyse Assays gezeigt, dass diese NK Zell-Aktivierung und Degranulation auch zu einer starken Induktion von ADCC und letztlich zur Lyse von Tumorzellen führte. Ebenso wie in den durchgeführten Analysen mit Sarkom-Zelllinien bestätigte sich, dass 8H8\_SDIE bei allen getesteten Weichteil- und Knochensarkom-Zellen von Patienten - unabhängig vom Subtyp - eine überlegene Abtötung bewirkte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass 8H8\_SDIE durch Targeting von B7-H3, welches sowohl bei Weichteil- als auch bei Knochensarkomen unabhängig von der Untergruppe exprimiert wird, gezielt und effizient NK Zell-Reaktivität induziert werden kann. 8H8\_SDIE ist somit ein vielversprechender Wirkstoff für die Immuntherapie bei dieser malignen Tumorerkrankung.

## 5 Diskussion

Die therapeutischen Möglichkeiten für Patienten mit bösartigen Tumoren, zu welchen auch die Weichteil- und Knochensarkome gehören, haben sich in den letzten Jahren deutlich verbessert, dennoch bleibt die Behandlung und insbesondere die Heilung von Sarkomen eine Herausforderung. Sowohl die komplexe Tumorbilologie als auch die klinische Heterogenität der Sarkome, bestehend aus den beiden Hauptklassen Weichteil- und Knochensarkomen mit mehr als 100 bekannten Subtypen, erschweren die Entwicklung standardisierter und effektiver Behandlungskonzepte.<sup>86, 88, 96</sup> Vor allem bei fortgeschrittener, inoperabler oder metastasierter Erkrankung wird in der Regel nach einem multimodalen Hochdosis-Chemotherapie Regime behandelt, allerdings oft mit nur begrenztem Erfolg.<sup>97, 98</sup> Die Resultate, die in der klinischen Anwendung mit der Antikörper-basierten Immuntherapie wie Checkpoint-Inhibitoren, anti-Tumor Antikörpern, aber auch mit Zell-basierter wie CAR T Zellen bei anderen Tumorarten in den letzten Jahren erreicht werden konnten, sind vielversprechend.<sup>219</sup> Für die Immuntherapie mit Antikörpern sind die zytotoxischen Lymphozyten, vorrangig NK und T Zellen, die Vermittler der anti-Tumor Aktivität. Neben dem Erfolg der T Zell-basierten Ansätze spielen anti-Tumor Antikörper, welche hauptsächlich NK Zellen als Effektorzellen nutzen, eine große Rolle. Ein prominentes Beispiel dafür ist der gegen CD20 gerichtete mAb Rituximab, welcher erfolgreich zur Behandlung von malignen B Zell-Lymphomen eingesetzt wird.<sup>233</sup> Auch Trastuzumab, ein HER2 Antikörper zur Therapie des HER2-positiven Mammakarzinoms hat seinen festen Bestandteil in der klinischen Anwendung.<sup>234</sup> Als chimäre, monoklonale Antikörper gehören sie zur zweiten Generation therapeutischer Antikörper, welche neben chimären auch humanisierte Moleküle umfasst und eine verbesserte Immunogenität im Vergleich zu murinen Antikörpern zeigt. Eine Verbesserung der Effektorfunktionen und damit der therapeutischen Wirksamkeit kann mit einer Veränderung des Fc Teils erreicht werden. Vielversprechende Vorgehensweisen sind die Manipulation der Glykosylierung oder eine Modifikation der Aminosäuresequenz. Ein Beispiel für einen klinisch angewendeten Glykosylierungs-optimierten Antikörper ist der gegen CD20 gerichtete mAb Obinutuzumab.<sup>166</sup> Ein weiteres Beispiel für einen klinisch verfügbaren Antikörper mit Modifikation der Aminosäuresequenz ist Tafasitamab, der gegen CD19 gerichtet ist.<sup>235</sup> Beide ermöglichen eine verbesserte Induktion von ADCC durch NK Zellen als zellulärem Bestandteil des angeborenen Immunsystems. NK Zellen besitzen ein Repertoire an keimbahnkodierten aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren, mit welchem sie veränderte und normale Zellen unterscheiden und erkennen können. Dabei wird ihre Aktivität durch eine Balance aus inhibierenden und aktivierenden Signalen reguliert.<sup>39</sup> Somit ist für die Auslösung der Funktionen von NK Zellen meistens eine Stimulation mehrerer

Rezeptoren notwendig, mit Ausnahme des Fc Rezeptor CD16a (FcγRIIIa).<sup>236</sup> Diese Eigenschaft wird mit der Induktion der ADCC durch therapeutische Antikörper genutzt. Durch Bindung eines mAb und nachfolgender Quervernetzung von CD16a kommt es zur Induktion der Effektormechanismen wie die Zielzell-Lyse. Ein Nachteil von mAb ist die unerwünschte Bindung an für die Auslösung von Effektormechanismen unrelevante oder inhibitorische FcγR. Über diese FcγR haben die mAb damit keine oder eine hemmende Wirkung. Zu den supprimierenden FcγR gehört beispielsweise FcγRIIb auf Granulozyten.<sup>44</sup> Außerdem kann die Wirkung von mAb durch Interaktion ihres Fc Teils mit FcγR durch Komponenten des Komplementsystems beeinträchtigt werden.<sup>150</sup> Zusätzlich ist bekannt, dass die Affinität des Fc Teils von mAb für die Bindung an FcγR von Polymorphismen wie V158F in FcγRIIIa abhängig ist.<sup>172</sup> Obwohl die gesteigerte Induktion der ADCC eines Fc-optimierten mAb die potentiellen Effekte der inhibitorischen FcγR überkompensiert, wie in funktionellen Untersuchungen mit Fc-optimierten mAb gezeigt wurde,<sup>221, 222</sup> könnten unerwünschte FcγR-abhängige Effekte einen Einfluss auf die therapeutische Effizienz haben.

Diese mögliche Einschränkung der therapeutischen Effizienz kann mit der Verwendung von bsAb umgangen werden. Mit ihnen können nicht nur aktivierende FcγR exprimierende Zellen wie NK Zellen spezifisch aktiviert werden, sondern auch T Zellen. Während NK Zellen beim Menschen ca. 5-15% der Lymphozyten umfassen, sind T Zellen mit ca. 70% die größte Zellpopulation der peripheren Lymphozyten,<sup>237</sup> schon allein dadurch weisen letztere ein größeres Effektorpotential auf. Unter physiologischen Bedingungen werden sie durch die Bindung ihres TCR an einen MHC-Peptid Komplex aktiviert, können aber auch „unphysiologisch“ durch die Quervernetzung ihres CD3-TCR Komplexes mit Hilfe von Antikörpern aktiviert werden. Dies kann gegen Tumorzellen mit bsAb erreicht werden, die mit zwei Spezifitäten ausgestattet sind: zum einen für ein TAA und zum anderen für ein immunmodulatorisches Effektormolekül auf den Immunzellen.

Damit die Aktivierung durch bsAb von der Bindung an das Zielantigen abhängt, darf ein bsAb keinen funktionellen Fc Teil besitzen, um eine Immobilisierung an FcγR exprimierende Zellen wie Makrophagen, Monozyten oder Granulozyten zu verhindern. Dazu werden Modifikationen im Fc Teil vorgenommen, die die Affinität für den FcγR aufheben oder bsAb Formate ohne Fc Teil gewählt. Ein erfolgreiches Beispiel für einen in der klinischen Praxis etablierten bsAb ist Blinatumomab, ein gegen CD19 und CD3 gerichteter bsAb im BiTE Format zur Anwendung bei CD19-positiver ALL.<sup>178</sup>

Allerdings konnte die Behandlung vieler Tumore, insbesondere der soliden wie die Weichteil- und Knochensarkome, bisher kaum von den Entwicklungen der Antikörperbasierten Immuntherapie profitieren. Aktuell sind die zugelassenen therapeutischen

Antikörper zur Behandlung von Sarkomen wie die PD-1/PDL-1 Checkpoint-Inhibitoren (Dostarlimab und Pembrolizumab) auf die Behandlung von wenigen bestimmten Fällen von Sarkomen bzw. eine Minderheit von Patienten beschränkt.<sup>121</sup> Einer der Hauptgründe, warum für die Behandlung der Sarkome bisher kaum therapeutische Antikörper zur Verfügung stehen, ist das Fehlen von charakterisierten TAA, welche bei möglichst vielen Weichteil- und Knochensarkomen exprimiert sind, insbesondere in Anbetracht der Seltenheit der Erkrankung mit zusätzlich vielen verschiedenen Untergruppen. Dies gilt, obwohl interessanterweise bereits vor mehr als 100 Jahren das sogenannte *Coleys Toxin* bei Sarkompatienten angewandt wurde und damit Sarkome zu den ersten immuntherapeutisch behandelten Tumorarten gehören.<sup>99</sup>

In der vorliegenden Arbeit wurden anti-Tumor Antikörper in unterschiedlichen Formaten zur Mobilisierung von NK und T Zellen als Effektorzellen zur Anwendung bei Weichteil- und Knochensarkomen entwickelt und präklinisch charakterisiert. Die untersuchten Konstrukte waren zum einen BFP, die aus der extrazellulären NKG2DL-bindenden Domäne des NKG2D Rezeptors bestehen und mit Fab Fragmenten fusioniert sind, die entweder gegen CD3 (NKG2D-CD3) oder CD16 (NKG2D-CD16) gerichtet sind. Der NKG2D Rezeptor wurde auf NK und T Zellen als wichtiger Vermittler der Immunzellaktivierung beschrieben.<sup>238, 239</sup> Zu seinen bisher bekannten Liganden gehören MICA, MICB und ULBP1-6,<sup>240, 241</sup> welche auf zahlreichen humanen Tumorzellen wie AML, Ovarial-, Mamma- und Bronchialkarzinom, Melanomen, Gliomen und auch einigen Sarkomen beschrieben sind.<sup>183</sup> Es wurde gezeigt, dass die Expression von NKG2DL auf Tumorzellen infolge von Chemo- und Strahlentherapie, durch welche sogenannte *DNA damage pathways* induziert werden, hochreguliert werden kann.<sup>242</sup> Interessanterweise wurde die Expression mehrerer NKG2DL wie ULBP1-4 als negativer prognostischer Marker bei Sarkomen identifiziert.<sup>196</sup> Aufgrund der breiten Expression von NKG2DL auf vielen Tumorentitäten ist es nicht überraschend, dass derzeit mehrere immuntherapeutische Ansätze, die auf NKG2DL abzielen, in der Entwicklung sind oder klinisch erprobt werden. Strategien, welche die NKG2DL als Ziel für immuntherapeutische Ansätze nutzen, sind beispielsweise NKG2D-BiTE Konstrukte sowie CAR NK und T Zellen (NKR-2: NCT03018405; CYAD-02: NCT04167696, NKX101: NCT 04623944).<sup>243-245</sup> Auch in eigenen Vorarbeiten konnte bereits präklinisch eine anti-Tumor Wirkung der verwendeten NKG2D BFP und von NKG2D-IgG Fusionsproteinen bei anderen Tumorarten gezeigt werden, darunter solide Tumore wie das Mammakarzinom.<sup>182, 194, 195</sup> Weiterhin wurde ein B7-H3 mAb mit einem Wildtyp Fc Teil (8H8\_WT) und dessen Fc-optimierter Gegenpart (8H8\_SDIE) vergleichend als weitere therapeutische Strategie untersucht. In vorangehenden eigenen Arbeiten wurden verschiedene mAb und Fusionsproteine, welche die SDIE-Modifikation enthalten, im Hinblick auf eine verbesserte

Induktion von ADCC und damit verbesserte therapeutische Effizienz untersucht. Als Beispiele sind FLT3 und CD133 Fc-optimierte mAb zur Behandlung der AML oder des Kolonkarzinoms zu nennen.<sup>222-225, 246</sup> Die B7-H3 mAb wurden entwickelt, da bereits bekannt ist, dass B7-H3 in vielen soliden Tumoren überexprimiert wird,<sup>210, 214</sup> während seine Expression in gesundem Gewebe kaum nachweisbar ist.<sup>247, 248</sup>

Für Weichteil- und Knochensarkome war die Expression von B7-H3 zumindest für einige Untergruppen bereits bekannt. Daher erschien B7-H3 als geeignete Zielstruktur für mögliche Behandlungsoptionen bei Sarkomen. Mit B7-H3 als Zielantigen auf Tumorzellen werden aktuell unterschiedlichste Strategien bei verschiedenen Tumorentitäten erprobt: Antikörperkonjugate (MGC018: NCT03729596; DS7300a: NCT04145622), Fc-optimierte mAb (MGA271, Enoblituzumab: NCT02923180, NCT02475213, NCT04634825; DS-5573a: NCT02192567, klinische Studie abgebrochen), radioaktiv markierte mAb (131I-8H9: NCT03275402, NCT04022213; 177Lu-DPTA Omburtamab: NCT04315246, NCT04167618), und bsAb (MGD009: NCT026285351, klinische Studie beendet).<sup>249</sup>

Im ersten Teil der Arbeit konnte zunächst auf allen untersuchten Weichteil- und Knochensarkom-Zellen, unabhängig von ihrer Untergruppe, eine Expression von NKG2DL mit variabler Intensität nachgewiesen werden. Dabei unterschied sich die Bindung von murinen Antikörpern gegen die entsprechenden NKG2DL von der Bindungskapazität der NKG2D BFP an die Sarkomzellen. Die Bindung von NKG2D mAb mit hoher Affinität kann nur bedingt mit der Bindung des in den BFP enthaltenen NKG2D Rezeptor verglichen werden. Die Bindungsaffinität von NKG2D zu seinem Repertoire an Liganden ist sehr variabel und liegt zwischen  $10^{-6}$  und  $10^{-9}$  mol/L und somit im Allgemeinen deutlich niedriger als die von Antikörpern. Darüber hinaus weisen allelische Varianten einiger NKG2DL wie MICA große Unterschiede in der Bindung an NKG2D auf. Außerdem wurde berichtet, dass sich eine mögliche Glykosylierung von MICA Varianten auf die Komplexbildung mit NKG2D auswirkt und diese beeinflussen kann.<sup>241</sup> Das unterschiedliche Bindungsverhalten der NKG2DL Varianten an ihren Rezeptor NKG2D und ihre Diversität könnte die Ergebnisse erklären, dass die verwendeten Sarkom-Zelllinien eine unterschiedliche Bindung des NKG2D Moleküls aufwiesen. Daher könnte auch die Wirksamkeit der Behandlung mit den BFP im Einzelfall vom Expressionsmuster der NKG2DL auf den Tumorzellen abhängen. Allerdings besteht mit der Verwendung der extrazellulären Domäne des NKG2D Rezeptors zur Bindung an NKG2DL auf Tumorzellen der große Vorteil, dass alle NKG2DL simultan gebunden werden können, unabhängig von der variablen Expressionsintensität der einzelnen NKG2DL auf unterschiedlichen Tumorzellen.

Das zweite TAA, welches in dieser Arbeit untersucht wurde, das Mitglied der immunregulatorischen B7 Familie B7-H3 ist wie bereits erwähnt bei vielen hämatologischen

und soliden Tumoren, darunter auch einigen Sarkom Subtypen, überexprimiert,<sup>210, 214</sup> während die Expression in gesundem Gewebe minimal ist.<sup>247, 248</sup> Die genaue Rolle von B7-H3 bei der Modulation der Immunreaktion wird noch diskutiert. In einigen neueren Untersuchungen wurde das B7-H3 Protein als Checkpoint-Molekül charakterisiert, welches eine immunsuppressive und damit tumorfördernde Wirkung ausübt.<sup>212, 218</sup> In vielen Studien wurde gezeigt, dass eine erhöhte Oberflächenexpression von B7-H3 mit einer schlechteren Prognose und einem aggressiveren Tumor einhergeht.<sup>218</sup> Die mRNA von B7-H3 ist in vielen gesunden Geweben nachweisbar, allerdings findet sich das Protein nur bei sehr wenigen gesunden Zellen auf der Oberfläche, da seine Expression stark post-transkriptionell reguliert wird.<sup>211, 250</sup> Mittels Expressionsanalysen wurde festgestellt, dass Sarkomzellen unterschiedlichen Ursprungs sowie primäre Sarkomzellen von Patienten mit Weichteil- und Knochensarkomen B7-H3 deutlich und homogen exprimieren. Sowohl der 8H8\_WT als auch der optimierte mAb 8H8\_SDIE zeigten optimale Bindungseigenschaften auf allen untersuchten Sarkomzellen. Es zeigte sich, dass das Bindungsverhalten von 8H8\_SDIE durch die Fc-Optimierung nicht verändert wurde. Aufgrund der Fc-Optimierung zeigte der 8H8\_SDIE im Vergleich zu dem 8H8\_WT die erwartete überlegene Bindung an CD16-positive NK Effektorzellen. Weiterhin wurde bei der Inkubation von Sarkomzellen mit 8H8\_SDIE keine relevante Herabregulierung der B7-H3 Expression auf der Zelloberfläche (*Antigen shift*) beobachtet. Der *Antigen shift* beschreibt einen Mechanismus, welcher durch die Bindung des mAb an sein Zielantigen zur proteolytischen Spaltung oder Internalisierung des Zielantigens führen kann. Damit verschwindet das Zielantigen bzw. der Komplex aus mAb und Antigen von der Zelloberfläche, was die therapeutische Wirksamkeit beeinträchtigen kann.<sup>231, 251</sup> Diese Einschränkung ist beispielsweise für das Zielantigen CD19 und dagegen gerichtete immuntherapeutische Strategien wie Blinatumomab oder CAR T Zellen bekannt.<sup>252, 253</sup>

Bei der funktionellen Charakterisierung der Konstrukte zeigte sich mit den BFP, dass sowohl NKG2D-CD16 als auch NKG2D-CD3 eine ausgeprägte NK und T Zell Aktivierung, Degranulation, IFN $\gamma$ - und Perforin-Sekretion induzieren. In einer früheren Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass NKG2D-CD16 hinsichtlich der Aktivierung von NK Zellen einem NKG2D Fusionsprotein mit einem optimierten Fc Teil (NKG2D-Fc-ADCC) überlegen ist.<sup>182</sup> Mit dem NKG2D-CD3 Konstrukt wurde eine potente T Zell-Aktivierung mit vergleichbaren Effekten auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen ausgelöst. Da CD4<sup>+</sup> T Zellen eine wichtige Rolle bei der Tumormunität spielen, indem sie die Expansion von CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T Zellen fördern, die Bildung von CD8<sup>+</sup> T Gedächtniszellen unterstützen und eine Rolle beim *Priming* ausüben,<sup>254-256</sup> könnte die gleichzeitige Aktivierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen die Effizienz der Tumorbekämpfung verbessern.



Auch eine effiziente Tumorzell-Lyse war mit den NKG2D BFP zu beobachten, wobei NKG2D-CD16 nach kurzen Zeitpunkten die stärkste Zytotoxizität induzierte. Im Gegensatz dazu benötigten die durch NKG2D-CD3 vermittelten Effekte eine längere Zeit, um die maximale anti-Tumor Aktivität zu entfalten. Die Effizienz der Lyse von Sarkomzellen war bei T Zellen, die durch NKG2D-CD3 stimuliert wurden, letztlich besser als bei NK Zellen, die durch NKG2D-CD16 stimuliert wurden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass NKG2D-CD3 eine relevante T Zell-Proliferation induzieren kann, wie in vorangegangenen Arbeiten bereits in einem [Methyl  $^3\text{H}$ ] Thymidinaufnahme Assay gezeigt werden konnte. Eine NK Zell-Proliferation wurde nach der Aktivierung durch NKG2D-CD16 nicht beobachtet.<sup>182</sup>

Im Falle des mAb 8H8\_SDIE wurde eine potente Aktivierung, Degranulation, IFN $\gamma$ -Sekretion sowie Freisetzung immunmodulatorischer Moleküle wie Granzym A, IL-2 oder sFasL induziert, welche seinem Gegenstück mit einem Wildtyp Fc-Teil klar überlegen war, was in Versuchen mit Sarkom-Zelllinien und Sarkomzellen von Patienten bestätigt wurde. Auch im Hinblick auf die induzierte NK Zell vermittelte ADCC wurde mit der Fc-Optimierung im Vergleich zu 8H8\_WT eine signifikante Steigerung der Effektivität gegen Sarkomzellen erreicht, was sowohl in Kurzzeit-Lyse Assays als auch nach längeren Zeiträumen gezeigt werden konnte. Mit primären Sarkomzellen von Patienten konnten die Ergebnisse für die Aktivierung, Degranulierung und Kurzzeit-Lyse, welche mit den Zelllinien erhoben wurden, bestätigt werden.

In zukünftigen Untersuchungen können sowohl mit den NKG2D BFP als auch mit dem mAb 8H8\_SDIE *in vivo* Untersuchungen zur therapeutischen Effizienz und zu weiteren offenen Fragestellungen wie der Verfügbarkeit und Zugänglichkeit der Antikörper am Tumorgewebe durchgeführt werden. Es wurden bereits einige *in vivo* Modelle zur Untersuchung von Sarkomen beschrieben, welche für weitere Studien zur Wirksamkeit genutzt werden könnten.<sup>257-259</sup> Auch die Serumhalbwertszeit, welche einen Einfluss auf die spätere therapeutische Dosierung hat, sollte in zukünftigen Untersuchungen bestimmt werden. Es ist davon auszugehen, dass die NKG2D BFP aufgrund ihres Fab Formats eine geringere Serumhalbwertszeit besitzen als 8H8\_SDIE, der ein vollständiges IgG Molekül darstellt.<sup>260</sup> Bereits gezeigt wurde für einen dem 8H8\_SDIE ähnlichen mAb, welcher gegen CD20 gerichtet ist, dass die Fc-Optimierung keinen Einfluss auf die Serumhalbwertszeit hat und vergleichbar zu seinem Gegenstück mit einem Wildtyp Fc Teil ist.<sup>261</sup>

Die Standardtherapie von Sarkompatienten umfasst in vielen Fällen eine neoadjuvante Chemotherapie, die chirurgische Resektion, eine nachfolgende Chemotherapie und/oder Bestrahlung. Um zu untersuchen, ob die immuntherapeutische Behandlung auch unter einer zytotoxischen Behandlung wie der Chemotherapie möglich wäre, wurde der

Immunstatus von Sarkompatienten untersucht. Dabei zeigte sich, dass PBMC von Sarkompatienten trotz Behandlung mit Chemotherapie nach Stimulation mit NKG2D-CD16 und NKG2D-CD3 eine deutliche NK und T Zell-Aktivierung aufwiesen. Das deutet darauf hin, dass eine kombinatorische Therapie aus Chemotherapie und BFP vielversprechend sein könnte und NK sowie T Zellen ihre Effektorfunktionen weiterhin vermitteln könnten. Zusätzlich kann die Expression von NKG2DL auf Tumorzellen mittels Chemo- oder Strahlentherapie, welche DNA *damage pathways* induzieren, hochreguliert werden.<sup>242</sup>

Angesichts des höheren Effektorpotentials von T Zellen im Vergleich zu NK Zellen werden ADCC-induzierende mAb sicherlich nicht die Wirksamkeit von T Zell-basierten Strategien gegen eine hohe Tumorlast erreichen. Allerdings besteht bei der Anwendung von T Zell-basierten Strategien die Gefahr von starken Nebenwirkungen, welche durch unkontrollierbare Immunaktivierung und Zytokinfreisetzung ausgelöst werden, das sogenannte *cytokine release syndrom* (CRS).<sup>262, 263</sup> Für die NKG2D BFP liegen dazu noch keine Daten vor, allerdings wurde für das BFP Tebentafusp zur Therapie des metastasierten Aderhautmelanoms bereits gezeigt, dass es bei einer therapeutisch wirksamen Dosis zu moderaten Nebenwirkungen kommt, zu denen auch das CRS beiträgt, die Therapie konnte allerdings trotzdem fortgesetzt werden.<sup>264</sup> Für den CD19xCD3 BiTE Blinatumomab ist bekannt, dass er Dosis-abhängige Toxizität wie das CRS verursacht und dies ein limitierender Faktor für die therapeutische Dosierung ist.<sup>265</sup> Im Gegensatz dazu erwiesen sich in einer klinischen Phase-I Studie mit AML Patienten selbst Dosierungen von 45 mg/m<sup>2</sup> eines selbst entwickelten Fc-optimierten FLT-3 mAb als sicher und sehr gut verträglich und lösten keine Dosis-abhängigen Toxizitäten aus.<sup>266, 267</sup> Da die Nebenwirkungen von T Zell-basierten Strategien der Immuntherapie häufig von älteren Patienten nicht toleriert werden, scheinen NK Zell-basierte Strategien wie Fc-optimierte mAb bei solchen Patienten eher einsetzbar. Daher könnte man vor einem klinischen Hintergrund überlegen, dass NKG2D-CD16 und 8H8\_SDIE zum Beispiel bei älteren Sarkompatienten, welche die Folgen einer massiven Immunaktivierung nicht vertragen würden, eine mögliche Option wäre, während bei fitteren Patienten NKG2D-CD3 zum Einsatz kommen könnte. Die Konzentration von 1 µg/ml 8H8\_SDIE, bei der eine gesättigte Bindung an das Zielantigen beobachtet wurde und in einer starken *in vitro* Wirksamkeit resultierte, scheint in der therapeutischen Anwendung für Patienten erreichbar zu sein. Die Serumspiegel des Fc-optimierten mAb Tafasitamab bei empfohlener Dosierung liegen beispielsweise bei ungefähr 190 µg/ml.<sup>268</sup>

Sowohl NKG2DL als auch B7-H3 sind, wie viele andere immuntherapeutische Zielantigene, nicht ausschließlich auf Tumorzellen zu finden. Für die NKG2DL MICA und B wurde eine geringe konstitutive Expression auf gesunden gastrointestinalen Epithelzellen

beschrieben.<sup>269</sup> NKG2DL können zudem von gesunden Immunzellen nach Aktivierung exprimiert werden.<sup>270, 271</sup> B7-H3 ist neben seiner Expression auf Tumorzellen auch auf der Oberfläche von APC vorhanden, sowohl konstitutiv als auch induzierbar.<sup>199, 200</sup> Beschrieben wurde weiterhin eine basale Expression auf Endothelzellen, ruhenden Fibroblasten, Stammzellen aus dem Fruchtwasser und Osteoblasten.<sup>248, 272</sup> Allerdings zeigten sich bisher in präklinischen Untersuchungen und klinischen Studien keine starken Nebenwirkungen mit immuntherapeutischen Strategien wie CAR NK Zellen oder CAR T Zellen, welche auf NKG2DL abzielen.<sup>245, 273-275</sup> Auch bei der Verwendung von B7-H3 als therapeutisches Ziel in präklinischen Untersuchungen und klinischen Studien, wie beispielsweise gegen B7-H3 gerichtete mAb oder CAR T Zellen, wurde bei signifikanten anti-Tumor Effekten keine übermäßige Toxizität beobachtet.<sup>210, 249, 276, 277</sup> Dies ist wahrscheinlich auf die letztlich geringeren Antigenmengen im gesunden Gewebe zurückzuführen.<sup>278</sup>

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl die BFP NKG2D-CD16 und NKG2D-CD3 als auch der Fc-optimierte mAb 8H8\_SDIE in den vorliegenden präklinischen Untersuchungen eine starke Wirkung gegen Sarkome zeigten. Bemerkenswert ist, dass diese Behandlungsansätze mit NKG2DL und B7-H3 als TAA nicht auf eine bestimmte Weichteil- und Knochensarkom Untergruppe beschränkt sind. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die *in vitro* NK und T Zell-Aktivierung bei Sarkompatienten, trotz einer intensiven Behandlung mit Chemotherapeutika, nicht signifikant beeinträchtigt ist. Auch wenn weitere Untersuchungen erforderlich sind, um das Potenzial der untersuchten Konstrukte vollständig zu charakterisieren, unterstreichen die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Daten das Potenzial der NKG2D BFP und 8H8\_SDIE als mögliche immuntherapeutische Option für die Behandlung von Sarkompatienten.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Murphy K, Weaver C. Janeway Immunologie. *Springer Spektrum* 2018.
2. Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol* 2006 2006; **24**: 287-320.
3. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 2010 9/2010; **11**(9): 785-797.
4. Trouw LA, Daha MR. Role of complement in innate immunity and host defense. *Immunol Lett* 2011 7/2011; **138**(1): 35-37.
5. Ezekowitz RA, Sastry K, Bailly P, Warner A. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp Med* 1990 12/1/1990; **172**(6): 1785-1794.
6. Medzhitov R, Janeway C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews* 2000 2/2000; **173**: 89-97.
7. Underhill DM, Bassetti M, Rudensky A, Aderem A. Dynamic interactions of macrophages with T cells during antigen presentation. *J Exp Med* 1999 12/20/1999; **190**(12): 1909-1914.
8. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002 2002; **20**: 197-216.
9. Yoon SR, Chung JW, Choi I. Development of natural killer cells from hematopoietic stem cells. *Mol Cells* 2007 8/31/2007; **24**(1): 1-8.
10. Freud AG, Mundy-Bosse BL, Yu J, Caligiuri MA. The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity* 2017 Nov 21; **47**(5): 820-833.
11. Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* 1975 2/1975; **5**(2): 117-121.
12. Mager LF, Wasmer MH, Rau TT, Krebs P. Cytokine-Induced Modulation of Colorectal Cancer. *Front Oncol* 2016; **6**: 96.
13. Wang QS, Shen SQ, Sun HW, Xing ZX, Yang HL. Interferon-gamma induces autophagy-associated apoptosis through induction of cPLA2-dependent mitochondrial ROS generation in colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2018 Apr 15; **498**(4): 1058-1065.
14. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 2006 11/2006; **6**(11): 836-848.
15. Moretta L, Bottino C, Cantoni C, Mingari MC, Moretta A. Human natural killer cell function and receptors. *Curr Opin Pharmacol* 2001 8/2001; **1**(4): 387-391.

16. Hall LJ, Clare S, Dougan G. NK cells influence both innate and adaptive immune responses after mucosal immunization with antigen and mucosal adjuvant. *J Immunol* 2010 Apr 15; **184**(8): 4327-4337.
17. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, *et al.* Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 2011 Jan 7; **331**(6013): 44-49.
18. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* 2009 Jan 29; **457**(7229): 557-561.
19. Paust S, von Andrian UH. Natural killer cell memory. *Nat Immunol* 2011 Jun; **12**(6): 500-508.
20. Pahl JHW, Cerwenka A, Ni J. Memory-Like NK Cells: Remembering a Previous Activation by Cytokines and NK Cell Receptors. *Front Immunol* 2018; **9**: 2796.
21. Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer* 2016 Jan; **16**(1): 7-19.
22. Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2006 2006/12/01; **6**(12): 940-952.
23. Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002 Nov; **2**(11): 850-861.
24. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, *et al.* Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 2005 2/2005; **42**(4): 501-510.
25. Screpanti V, Wallin RPA, Grandien A, Ljunggren H-G. Impact of FASL-induced apoptosis in the elimination of tumor cells by NK cells. *Mol Immunol* 2005 2005/02/01; **42**(4): 495-499.
26. Moretta L, Bottino C, Pende D, Vitale M, Mingari MC, Moretta A. Human natural killer cells: Molecular mechanisms controlling NK cell activation and tumor cell lysis. *Immunol Lett* 2005 8/15/2005; **100**(1): 7-13.
27. Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 2010 3/18/2010; **115**(11): 2167-2176.
28. Lanier LL. Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 2003 6/2003; **15**(3): 308-314.
29. Dorner BG, Smith HRC, French AR, Kim S, Poursine-Laurent J, Beckman DL, *et al.* Coordinate expression of cytokines and chemokines by NK cells during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* 2004 3/1/2004; **172**(5): 3119-3131.

30. Horowitz A, Strauss-Albee DM, Leipold M, Kubo J, Nemat-Gorgani N, Dogan OC, *et al.* Genetic and environmental determinants of human NK cell diversity revealed by mass cytometry. *Sci Transl Med* 2013 Oct 23; **5**(208): 208ra145.
31. Strauss-Albee DM, Fukuyama J, Liang EC, Yao Y, Jarrell JA, Drake AL, *et al.* Human NK cell repertoire diversity reflects immune experience and correlates with viral susceptibility. *Sci Transl Med* 2015 Jul 22; **7**(297): 297ra115.
32. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol* 2018; **9**: 1869.
33. Miller JS, Lanier LL. Natural Killer Cells in Cancer Immunotherapy. *Annu Rev Cancer Biol* 2019; **3**(1): 77-103.
34. Fehniger TA, Shah MH, Turner MJ, VanDeusen JB, Whitman SP, Cooper MA, *et al.* Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol* 1999 Apr 15; **162**(8): 4511-4520.
35. Bjorkstrom NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson MA, *et al.* Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* 2010 Nov 11; **116**(19): 3853-3864.
36. Malmberg KJ, Carlsten M, Bjorklund A, Sohlberg E, Bryceson YT, Ljunggren HG. Natural killer cell-mediated immunosurveillance of human cancer. *Semin Immunol* 2017 Jun; **31**: 20-29.
37. Rothfelder K. Die Abwesenheit von NKG2D-Liganden auf leukämieinduzierenden Zellen vereint Stammzelleigenschaften und Immunevasion in der akuten myeloischen Leukämie. *Dissertation Eberhard Karls University Tübingen* 2018.
38. Moretta L, Biassoni R, Bottino C, Cantoni C, Pende D, Mingari MC, *et al.* Human NK cells and their receptors. *Microbes Infect* 2002 12/2002; **4**(15): 1539-1544.
39. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005 2005; **23**: 225-274.
40. Moretta L, Bottino C, Pende D, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur J Immunol* 2002 5/2002; **32**(5): 1205-1211.
41. Anfossi N, Andre P, Guia S, Falk CS, Roetynck S, Stewart CA, *et al.* Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 2006 Aug; **25**(2): 331-342.
42. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990 7/1990; **11**(7): 237-244.
43. Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998 1998; **16**: 359-393.

44. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc gamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2008 1/2008; **8**(1): 34-47.
45. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008 5/2008; **9**(5): 495-502.
46. Bryceson YT, March ME, Barber DF, Ljunggren HG, Long EO. Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J Exp Med* 2005 10/3/2005; **202**(7): 1001-1012.
47. Wu J, Lanier LL. Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res* 2003 2003; **90**: 127-156.
48. Sivori S, Vacca P, Del Zotto G, Munari E, Mingari MC, Moretta L. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cell Mol Immunol* 2019 May; **16**(5): 430-441.
49. Zinkernagel RM. On immunological memory. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 2000 3/29/2000; **355**(1395): 369-371.
50. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 1988 8/4/1988; **334**(6181): 395-402.
51. Schatz DG, Ji Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat Rev Immunol* 2011 4/2011; **11**(4): 251-263.
52. Nemazee D. Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 2000 2000; **18**: 19-51.
53. Parker DC. T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 1993 1993; **11**: 331-360.
54. Tonegawa S. Antibody and T-cell receptors. *JAMA* 1988 3/25/1988; **259**(12): 1845-1847.
55. Al-Lazikani B, Lesk AM, Chothia C. Canonical structures for the hypervariable regions of T cell alpha beta receptors. *J Mol Biol* 2000 Jan 28; **295**(4): 979-995.
56. Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* 2006; **24**: 419-466.
57. O'Rourke AM, Mescher MF. Cytotoxic T-lymphocyte activation involves a cascade of signalling and adhesion events. *Nature* 1992 7/16/1992; **358**(6383): 253-255.
58. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 2013 Apr; **13**(4): 227-242.
59. Hurtado JC, Kim SH, Pollok KE, Lee ZH, Kwon BS. Potential role of 4-1BB in T cell activation. Comparison with the costimulatory molecule CD28. *J Immunol* 1995 Oct 1; **155**(7): 3360-3367.

60. Squier MK, Cohen JJ. Cell-mediated cytotoxic mechanisms. *Curr Opin Immunol* 1994 6/1994; **6**(3): 447-452.
61. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996 10/31/1996; **383**(6603): 787-793.
62. Parker DC. The functions of antigen recognition in T cell-dependent B cell activation. *Semin Immunol* 1993 12/1993; **5**(6): 413-420.
63. Dong C. Cytokine Regulation and Function in T Cells. *Annu Rev Immunol* 2021 Apr 26; **39**: 51-76.
64. Crespo J, Sun H, Welling TH, Tian Z, Zou W. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol* 2013 Apr; **25**(2): 214-221.
65. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* 2015 Aug; **15**(8): 486-499.
66. Collins M, Ling V, Carreno BM. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol* 2005; **6**(6): 223.
67. Hurtado JC, Kim YJ, Kwon BS. Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death. *J Immunol* 1997 Mar 15; **158**(6): 2600-2609.
68. Akiba H, Oshima H, Takeda K, Atsuta M, Nakano H, Nakajima A, *et al.* CD28-independent costimulation of T cells by OX40 ligand and CD70 on activated B cells. *J Immunol* 1999 Jun 15; **162**(12): 7058-7066.
69. Higgins LM, McDonald SAC, Whittle N, Crockett N, Shields JG, MacDonald TT. Regulation of T cell activation in vitro and in vivo by targeting the OX40-OX40 ligand interaction: Amelioration of ongoing inflammatory bowel disease with an OX40-IgG fusion protein, but not with an OX40 ligand-IgG fusion protein. *Journal of Immunology* 1999 1/1/1999; **162**(1): 486-493.
70. Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kiedl RM, Jenkins MK, *et al.* Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 1999 Mar 15; **162**(6): 3256-3262.
71. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993 Apr 23; **260**(5107): 547-549.
72. Olejniczak K, Kasprzak A. Biological properties of interleukin 2 and its role in pathogenesis of selected diseases--a review. *Med Sci Monit* 2008 Oct; **14**(10): RA179-189.



73. Croft M. Activation of naive, memory and effector T cells. *Curr Opin Immunol* 1994 Jun; **6**(3): 431-437.
74. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol* 2013 Nov; **43**(11): 2797-2809.
75. Golubovskaya V, Wu L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel)* 2016 Mar 15; **8**(3).
76. Nguyen LT, Ohashi PS. Clinical blockade of PD1 and LAG3--potential mechanisms of action. *Nat Rev Immunol* 2015 Jan; **15**(1): 45-56.
77. Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol* 2020 Nov; **20**(11): 651-668.
78. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res* 2020; **10**(3): 727-742.
79. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000 1/7/2000; **100**(1): 57-70.
80. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011 3/4/2011; **144**(5): 646-674.
81. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 2022 Jan; **12**(1): 31-46.
82. Hui JY. Epidemiology and Etiology of Sarcomas. *Surg Clin North Am* 2016 Oct; **96**(5): 901-914.
83. 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 Nov 6; **12**(11): e11131.
84. Choi JH, Ro JY. The 2020 WHO Classification of Tumors of Soft Tissue: Selected Changes and New Entities. *Adv Anat Pathol* 2021 Jan; **28**(1): 44-58.
85. Choi JH, Ro JY. The 2020 WHO Classification of Tumors of Bone: An Updated Review. *Adv Anat Pathol* 2021 May 1; **28**(3): 119-138.
86. Clark MA, Fisher C, Judson I, Thomas JM. Soft-tissue sarcomas in adults. *N Engl J Med* 2005 Aug 18; **353**(7): 701-711.
87. Hoang NT, Acevedo LA, Mann MJ, Tolani B. A review of soft-tissue sarcomas: translation of biological advances into treatment measures. *Cancer Manag Res* 2018; **10**: 1089-1114.
88. Brown HK, Schiavone K, Gouin F, Heymann MF, Heymann D. Biology of Bone Sarcomas and New Therapeutic Developments. *Calcif Tissue Int* 2018 Feb; **102**(2): 174-195.

89. Schaefer IM, Cote GM, Hornick JL. Contemporary Sarcoma Diagnosis, Genetics, and Genomics. *J Clin Oncol* 2018 Jan 10; **36**(2): 101-110.
90. Barretina J, Taylor BS, Banerji S, Ramos AH, Lagos-Quintana M, Decarolis PL, *et al.* Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. *Nat Genet* 2010 Aug; **42**(8): 715-721.
91. Movva S, Wen W, Chen W, Millis SZ, Gatalica Z, Reddy S, *et al.* Multi-platform profiling of over 2000 sarcomas: identification of biomarkers and novel therapeutic targets. *Oncotarget* 2015 May 20; **6**(14): 12234-12247.
92. Shern JF, Chen L, Chmielecki J, Wei JS, Patidar R, Rosenberg M, *et al.* Comprehensive genomic analysis of rhabdomyosarcoma reveals a landscape of alterations affecting a common genetic axis in fusion-positive and fusion-negative tumors. *Cancer Discov* 2014 Feb; **4**(2): 216-231.
93. Nacev BA, Jones KB, Intlekofer AM, Yu JSE, Allis CD, Tap WD, *et al.* The epigenomics of sarcoma. *Nat Rev Cancer* 2020 Oct; **20**(10): 608-623.
94. D'Adamo DR. Appraising the current role of chemotherapy for the treatment of sarcoma. *Semin Oncol* 2011 Oct; **38 Suppl 3**: S19-29.
95. Blasius F, Delbruck H, Hildebrand F, Hofmann UK. Surgical Treatment of Bone Sarcoma. *Cancers (Basel)* 2022 May 29; **14**(11).
96. In GK, Hu JS, Tseng WW. Treatment of advanced, metastatic soft tissue sarcoma: latest evidence and clinical considerations. *Ther Adv Med Oncol* 2017 Aug; **9**(8): 533-550.
97. 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 Apr 10; **15**(1): 78.
98. Tap WD, Papai Z, Van Tine BA, Attia S, Ganjoo KN, Jones RL, *et al.* Doxorubicin plus evofosfamide versus doxorubicin alone in locally advanced, unresectable or metastatic soft-tissue sarcoma (TH CR-406/SARC021): an international, multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2017 Aug; **18**(8): 1089-1103.
99. McCarthy EF. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J* 2006; **26**: 154-158.
100. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 1970; **13**: 1-27.
101. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004 8/2004; **21**(2): 137-148.
102. Guillerrey C, Smyth MJ. NK Cells and Cancer Immunoediting. *Curr Top Microbiol Immunol* 2016; **395**: 115-145.

103. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, *et al.* RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 1992 Mar 6; **68**(5): 855-867.
104. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, *et al.* IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001 4/26/2001; **410**(6832): 1107-1111.
105. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 2002 Nov; **3**(11): 999-1005.
106. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002 Oct 17; **419**(6908): 734-738.
107. Salih HR, Rammensee HG, Steinle A. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* 2002 10/15/2002; **169**(8): 4098-4102.
108. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 2000 2000; **74**: 181-273.
109. Travers PJ, Arklie JL, Trowsdale J, Patillo RA, Bodmer WF. Lack of expression of HLA-ABC antigens in choriocarcinoma and other human tumor cell lines. *Natl Cancer Inst Monogr* 1982; **60**: 175-180.
110. Wang L, Wang Y, Song Z, Chu J, Qu X. Deficiency of interferon-gamma or its receptor promotes colorectal cancer development. *J Interferon Cytokine Res* 2015 Apr; **35**(4): 273-280.
111. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, *et al.* Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 6/23/1998; **95**(13): 7556-7561.
112. Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, *et al.* Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 1999 Jan; **10**(1): 105-115.
113. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK, *et al.* PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front Pharmacol* 2017; **8**: 561.
114. Ratan R, Patel SR. Chemotherapy for soft tissue sarcoma. *Cancer* 2016 Oct; **122**(19): 2952-2960.

115. Link MP, Goorin AM, Miser AW, Green AA, Pratt CB, Belasco JB, *et al.* The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of the extremity. *N Engl J Med* 1986 Jun 19; **314**(25): 1600-1606.
116. Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Oosterhuis JW, Mouridsen H, Crowther D, Somers R, *et al.* Prognostic factors for the outcome of chemotherapy in advanced soft tissue sarcoma: an analysis of 2,185 patients treated with anthracycline-containing first-line regimens--a European Organization for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group Study. *J Clin Oncol* 1999 Jan; **17**(1): 150-157.
117. Bajpai J, Susan D. Adjuvant chemotherapy in soft tissue sarcomas...Conflicts, consensus, and controversies. *South Asian J Cancer* 2016 Jan-Mar; **5**(1): 15-19.
118. Weitz J, Antonescu CR, Brennan MF. Localized extremity soft tissue sarcoma: improved knowledge with unchanged survival over time. *J Clin Oncol* 2003 Jul 15; **21**(14): 2719-2725.
119. 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 May; **229**(5): 602-610; discussion 610-602.
120. Qin S, Xu L, Yi M, Yu S, Wu K, Luo S. Novel immune checkpoint targets: moving beyond PD-1 and CTLA-4. *Mol Cancer* 2019 Nov 6; **18**(1): 155.
121. 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 Feb; **9**(2).
122. Walter S, Weinschenk T, Stenzl A, Zdrojowy R, Pluzanska A, Szczylik C, *et al.* Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat Med* 2012 Aug; **18**(8): 1254-1261.
123. Clemente O, Ottaiano A, Di Lorenzo G, Bracigliano A, Lamia S, Cannella L, *et al.* Is immunotherapy in the future of therapeutic management of sarcomas? *J Transl Med* 2021 Apr 26; **19**(1): 173.
124. June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science* 2018 Mar 23; **359**(6382): 1361-1365.
125. Thanindratarn P, Dean DC, Nelson SD, Hornicek FJ, Duan Z. Chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell immunotherapy for sarcomas: From mechanisms to potential clinical applications. *Cancer Treat Rev* 2020 Jan; **82**: 101934.
126. Zhao L, Cao YJ. Engineered T Cell Therapy for Cancer in the Clinic. *Front Immunol* 2019; **10**: 2250.

127. Huang R, Li X, He Y, Zhu W, Gao L, Liu Y, *et al.* Recent advances in CAR-T cell engineering. *J Hematol Oncol* 2020 Jul 2; **13**(1): 86.
128. Weiner GJ. Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2015 Jun; **15**(6): 361-370.
129. Cartron G, Watier H, Golay J, Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood* 2004 Nov 1; **104**(9): 2635-2642.
130. Brandtzaeg P. Role of secretory antibodies in the defence against infections. *Int J Med Microbiol* 2003 Apr; **293**(1): 3-15.
131. Ehrlich P. Croonian lecture.—On immunity with special reference to cell life 1900; <https://doi.org/10.1098/rspl.1899.0121>.
132. Tabrizi M, Bornstein GG, Suria H. Biodistribution mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies in health and disease. *AAPS J* 2010 Mar; **12**(1): 33-43.
133. Porter RR. Chemical Structure of Gamma-Globulin and Antibodies. *Br Med Bull* 1963 Sep; **19**: 197-201.
134. Edelman GM, Gall WE, Waxdal MJ, Konigsberg WH. The covalent structure of a human gamma G-immunoglobulin. I. Isolation and characterization of the whole molecule, the polypeptide chains, and the tryptic fragments. *Biochemistry* 1968 May; **7**(5): 1950-1958.
135. Edelman GM, Cunningham BA, Gall WE, Gottlieb PD, Rutishauser U, Waxdal MJ. The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969 May; **63**(1): 78-85.
136. Wu TT, Kabat EA. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med* 1970 Aug 1; **132**(2): 211-250.
137. Harris LJ, Skaletsky E, McPherson A. Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. *J Mol Biol* 1998 Feb 6; **275**(5): 861-872.
138. Brack C, Hiramata M, Lenhard-Schuller R, Tonegawa S. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* 1978 Sep; **15**(1): 1-14.
139. Tonegawa S, Brack C., Hozumi, N., and Pirrotta, V. Organization of immunoglobulin genes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1978; **42 Pt 2:921–931**.
140. Kurosawa Y, von Boehmer H, Haas W, Sakano H, Trauneker A, Tonegawa S. Identification of D segments of immunoglobulin heavy-chain genes and their rearrangement in T lymphocytes. *Nature* 1981 Apr 16; **290**(5807): 565-570.
141. Sakano H, Kurosawa Y, Weigert M, Tonegawa S. Identification and nucleotide sequence of a diversity DNA segment (D) of immunoglobulin heavy-chain genes. *Nature* 1981 Apr 16; **290**(5807): 562-565.

142. Grawunder U, West RB, Lieber MR. Antigen receptor gene rearrangement. *Curr Opin Immunol* 1998 Apr; **10**(2): 172-180.
143. McKean D, Huppi K, Bell M, Staudt L, Gerhard W, Weigert M. Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984 May; **81**(10): 3180-3184.
144. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975 Aug 7; **256**(5517): 495-497.
145. Richman LP, Vonderheide RH. Role of crosslinking for agonistic CD40 monoclonal antibodies as immune therapy of cancer. *Cancer Immunol Res* 2014 Jan; **2**(1): 19-26.
146. Wilson NS, Yang B, Yang A, Loeser S, Marsters S, Lawrence D, *et al.* An Fcγ receptor-dependent mechanism drives antibody-mediated target-receptor signaling in cancer cells. *Cancer Cell* 2011 Jan 18; **19**(1): 101-113.
147. Hsu JY, Wakelee HA. Monoclonal antibodies targeting vascular endothelial growth factor: current status and future challenges in cancer therapy. *BioDrugs* 2009; **23**(5): 289-304.
148. Hudis CA. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 2007 7/5/2007; **357**(1): 39-51.
149. Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2012 2012/04/01; **12**(4): 278-287.
150. Wang SY, Weiner G. Complement and cellular cytotoxicity in antibody therapy of cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2008 Jun; **8**(6): 759-768.
151. Hogarth PM, Pietersz GA. Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 2012 Mar 30; **11**(4): 311-331.
152. Metes D, Ernst LK, Chambers WH, Sulica A, Herberman RB, Morel PA. Expression of functional CD32 molecules on human NK cells is determined by an allelic polymorphism of the FcγRIIC gene. *Blood* 1998 Apr 1; **91**(7): 2369-2380.
153. 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.
154. Ochoa MC, Minute L, Rodriguez I, Garasa S, Perez-Ruiz E, Inogés S, *et al.* Antibody-dependent cell cytotoxicity: immunotherapy strategies enhancing effector NK cells. *Immunol Cell Biol* 2017 2017/04/01; **95**(4): 347-355.
155. Lafont V, Liautard J, Liautard JP, Favero J. Production of TNF-α by human Vγ9Vδ2 T cells via engagement of FcγRIIIA, the low affinity type 3

- receptor for the Fc portion of IgG, expressed upon TCR activation by nonpeptidic antigen. *J Immunol* 2001 Jun 15; **166**(12): 7190-7199.
156. Chen Z, Freedman MS. CD16+ gammadelta T cells mediate antibody dependent cellular cytotoxicity: potential mechanism in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2008 Aug; **128**(2): 219-227.
157. Seidel UJ, Vogt F, Grosse-Hovest L, Jung G, Handgretinger R, Lang P. gammadelta T Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity with CD19 Antibodies Assessed by an Impedance-Based Label-Free Real-Time Cytotoxicity Assay. *Front Immunol* 2014; **5**: 618.
158. 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 Dec 1; **75**(23): 5008-5013.
159. Seidel UJ, Schlegel P, Lang P. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Front Immunol* 2013; **4**: 76.
160. Schroeder TJ, First MR, Mansour ME, Hurtubise PE, Hariharan S, Ryckman FC, *et al.* Antimurine antibody formation following OKT3 therapy. *Transplantation* 1990 Jan; **49**(1): 48-51.
161. Neuberger MS, Williams GT, Mitchell EB, Jouhal SS, Flanagan JG, Rabbitts TH. A hapten-specific chimaeric IgE antibody with human physiological effector function. *Nature* 1985 Mar 21-27; **314**(6008): 268-270.
162. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 1986 May 29-Jun 4; **321**(6069): 522-525.
163. Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G. Bypassing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 1991 Dec 5; **222**(3): 581-597.
164. Green LL, Hardy MC, Maynard-Currie CE, Tsuda H, Louie DM, Mendez MJ, *et al.* Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat Genet* 1994 May; **7**(1): 13-21.
165. Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, *et al.* Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc gamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* 2002 Jul 26; **277**(30): 26733-26740.
166. Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner CM, *et al.* Obinutuzumab plus Chlorambucil in Patients with CLL and Coexisting Conditions. *N Engl J Med* 2014 3/20/2014; **370**(12): 1101-1110.

167. Awasthi A, Ayello J, Van de Ven C, Elmacken M, Sabulski A, Barth MJ, *et al.* Obinutuzumab (GA101) compared to rituximab significantly enhances cell death and antibody-dependent cytotoxicity and improves overall survival against CD20(+) rituximab-sensitive/-resistant Burkitt lymphoma (BL) and precursor B-acute lymphoblastic leukaemia (pre-B-ALL): potential targeted therapy in patients with poor risk CD20(+) BL and pre-B-ALL. *Br J Haematol* 2015 Dec; **171**(5): 763-775.
168. Stavenhagen JB, Gorlatov S, Tuailon N, Rankin CT, Li H, Burke S, *et al.* Fc optimization of therapeutic antibodies enhances their ability to kill tumor cells in vitro and controls tumor expansion in vivo via low-affinity activating fc gamma receptors. *Cancer Res* 2007 9/15/2007; **67**(18): 8882-8890.
169. Richards JO, Karki S, Lazar GA, Chen H, Dang W, Desjarlais JR. Optimization of antibody binding to Fc gamma RIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol Cancer Ther* 2008 Aug; **7**(8): 2517-2527.
170. Moore GL, Chen H, Karki S, Lazar GA. Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *MAbs* 2010 Mar-Apr; **2**(2): 181-189.
171. 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 Mar 14; **103**(11): 4005-4010.
172. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, *et al.* Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fc gamma RIIa gene. *Blood* 2002 2/1/2002; **99**(3): 754-758.
173. Choi BD, Cai M, Bigner DD, Mehta AI, Kuan CT, Sampson JH. Bispecific antibodies engage T cells for antitumor immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther* 2011 Jul; **11**(7): 843-853.
174. Wu Z, Cheung NV. T cell engaging bispecific antibody (T-BsAb): From technology to therapeutics. *Pharmacol Ther* 2018 Feb; **182**: 161-175.
175. Landegren U, Andersson J, Wigzell H. Mechanism of T lymphocyte activation by OKT3 antibodies. A general model for T cell induction. *Eur J Immunol* 1984 Apr; **14**(4): 325-328.
176. Seimetz D, Lindhofer H, Bokemeyer C. Development and approval of the trifunctional antibody catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) as a targeted cancer immunotherapy. *Cancer Treat Rev* 2010 Oct; **36**(6): 458-467.
177. Baeuerle PA, Reinhardt C. Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy. *Cancer Res* 2009 Jun 15; **69**(12): 4941-4944.



178. Kantarjian H, Stein A, Gokbuget N, Fielding AK, Schuh AC, Ribera JM, *et al.* Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 2017 Mar 2; **376**(9): 836-847.
179. Brinkmann U, Kontermann RE. The making of bispecific antibodies. *MAbs* 2017 Feb/Mar; **9**(2): 182-212.
180. Sedykh SE, Prinz VV, Buneva VN, Nevinsky GA. Bispecific antibodies: design, therapy, perspectives. *Drug Des Devel Ther* 2018; **12**: 195-208.
181. Middleton MR, McAlpine C, Woodcock VK, Corrie P, Infante JR, Steven NM, *et al.* Tebentafusp, A TCR/Anti-CD3 Bispecific Fusion Protein Targeting gp100, Potently Activated Antitumor Immune Responses in Patients with Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res* 2020 Nov 15; **26**(22): 5869-5878.
182. 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 May 29; **7**(1): 143.
183. Spear P, Wu MR, Sentman ML, Sentman CL. NKG2D ligands as therapeutic targets. *Cancer Immun* 2013 2013; **13**: 8.
184. Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 2003 10/2003; **3**(10): 781-790.
185. Nausch N, Cerwenka A. NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene* 2008 10/6/2008; **27**(45): 5944-5958.
186. Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, *et al.* ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 2001 2/2001; **14**(2): 123-133.
187. Lanier LL. NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunol Res* 2015 Jun; **3**(6): 575-582.
188. Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng WW, Jung HY. Regulation of Ligands for the NKG2D Activating Receptor. *Annual Review of Immunology, Vol 31* 2013 2013; **31**: 413-441.
189. Stern-Ginossar N, Mandelboim O. An integrated view of the regulation of NKG2D ligands. *Immunology* 2009 Sep; **128**(1): 1-6.
190. Frazao A, Rethacker L, Messaoudene M, Avril MF, Toubert A, Dulphy N, *et al.* NKG2D/NKG2-Ligand Pathway Offers New Opportunities in Cancer Treatment. *Front Immunol* 2019; **10**: 661.

191. Carapito R, Bahram S. Genetics, genomics, and evolutionary biology of NKG2D ligands. *Immunol Rev* 2015 Sep; **267**(1): 88-116.
192. Chitadze G, Bhat J, Lettau M, Janssen O, Kabelitz D. Generation of Soluble NKG2D Ligands: Proteolytic Cleavage, Exosome Secretion and Functional Implications. *Scandinavian Journal of Immunology* 2013 8/2013; **78**(2): 120-129.
193. Ding H, Yang X, Wei Y. Fusion Proteins of NKG2D/NKG2DL in Cancer Immunotherapy. *Int J Mol Sci* 2018 Jan 7; **19**(1).
194. 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 Oct 15; **193**(8): 4261-4272.
195. Steinbacher J, Baltz-Ghahremanpour K, Schmiedel BJ, Steinle A, Jung G, Kubler A, *et al.* An Fc-optimized NKG2D-immunoglobulin G fusion protein for induction of natural killer cell reactivity against leukemia. *Int J Cancer* 2015 Mar 01; **136**(5): 1073-1084.
196. Sayitoglu EC, Georgoudaki AM, Chrobok M, Ozkazanc D, Josey BJ, Arif M, *et al.* Boosting Natural Killer Cell-Mediated Targeting of Sarcoma Through DNAM-1 and NKG2D. *Front Immunol* 2020; **11**: 40.
197. Fernandez L, Valentin J, Zalacain M, Leung W, Patino-Garcia A, Perez-Martinez A. Activated and expanded natural killer cells target osteosarcoma tumor initiating cells in an NKG2D-NKG2DL dependent manner. *Cancer Lett* 2015 Nov 1; **368**(1): 54-63.
198. de Kruijf EM, Sajet A, van Nes JGH, Putter H, Smit VTHB, Eagle RA, *et al.* NKG2D ligand tumor expression and association with clinical outcome in early breast cancer patients: an observational study. *Bmc Cancer* 2012 1/18/2012; **12**.
199. Chapoval AI, Ni J, Lau JS, Wilcox RA, Flies DB, Liu D, *et al.* B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat Immunol* 2001 Mar; **2**(3): 269-274.
200. 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 Feb 15; **172**(4): 2352-2359.
201. 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 Aug 15; **173**(4): 2500-2506.
202. Lee YH, Martin-Orozco N, Zheng P, Li J, Zhang P, Tan H, *et al.* Inhibition of the B7-H3 immune checkpoint limits tumor growth by enhancing cytotoxic lymphocyte function. *Cell Res* 2017 Aug; **27**(8): 1034-1045.

203. Mahnke K, Ring S, Johnson TS, Schallenberg S, Schonfeld K, Storn V, *et al.* Induction of immunosuppressive functions of dendritic cells in vivo by CD4+CD25+ regulatory T cells: role of B7-H3 expression and antigen presentation. *Eur J Immunol* 2007 Aug; **37**(8): 2117-2126.
204. Castriconi R, Dondero A, Augugliaro R, Cantoni C, Carnemolla B, Sementa AR, *et al.* Identification of 4Ig-B7-H3 as a neuroblastoma-associated molecule that exerts a protective role from an NK cell-mediated lysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Aug 24; **101**(34): 12640-12645.
205. Hofmeyer KA, Ray A, Zang X. The contrasting role of B7-H3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Jul 29; **105**(30): 10277-10278.
206. Zang X, Allison JP. The B7 family and cancer therapy: costimulation and coinhibition. *Clin Cancer Res* 2007 Sep 15; **13**(18 Pt 1): 5271-5279.
207. Cai D, Li J, Liu D, Hong S, Qiao Q, Sun Q, *et al.* Tumor-expressed B7-H3 mediates the inhibition of antitumor T-cell functions in ovarian cancer insensitive to PD-1 blockade therapy. *Cell Mol Immunol* 2020 Mar; **17**(3): 227-236.
208. Tyagi A, Ly S, El-Dana F, Yuan B, Jaggupilli A, Grimm S, *et al.* Evidence supporting a role for the immune checkpoint protein B7-H3 in NK cell-mediated cytotoxicity against AML. *Blood* 2022 May 5; **139**(18): 2782-2796.
209. Guery T, Roumier C, Berthon C, Renneville A, Preudhomme C, Quesnel B. B7-H3 protein expression in acute myeloid leukemia. *Cancer Med* 2015 Dec; **4**(12): 1879-1883.
210. Majzner RG, Theruvath JL, Nellan A, Heitzeneder S, Cui Y, Mount CW, *et al.* CAR T Cells Targeting B7-H3, a Pan-Cancer Antigen, Demonstrate Potent Preclinical Activity Against Pediatric Solid Tumors and Brain Tumors. *Clin Cancer Res* 2019 Apr 15; **25**(8): 2560-2574.
211. 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 Apr 10; **31**(4): 501-515 e508.
212. Wang J, Chong KK, Nakamura Y, Nguyen L, Huang SK, Kuo C, *et al.* B7-H3 associated with tumor progression and epigenetic regulatory activity in cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 2013 Aug; **133**(8): 2050-2058.
213. Wang L, Cao NN, Wang S, Man HW, Li PF, Shan BE. Roles of coinhibitory molecules B7-H3 and B7-H4 in esophageal squamous cell carcinoma. *Tumour Biol* 2016 Mar; **37**(3): 2961-2971.

214. 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**(8): e70689.
215. Zang X, Thompson RH, Al-Ahmadie HA, Serio AM, Reuter VE, Eastham JA, *et al.* B7-H3 and B7x are highly expressed in human prostate cancer and associated with disease spread and poor outcome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Dec 4; **104**(49): 19458-19463.
216. 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 376.96. *Gynecol Oncol* 2014 Jan; **132**(1): 203-210.
217. 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 Dec 1; **131**(11): 2528-2536.
218. Kontos F, Michelakos T, Kurokawa T, Sadagopan A, Schwab JH, Ferrone CR, *et al.* B7-H3: An Attractive Target for Antibody-based Immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2021 Mar 1; **27**(5): 1227-1235.
219. Rothschilds AM, Wittrup KD. What, Why, Where, and When: Bringing Timing to Immuno-Oncology. *Trends Immunol* 2019 Jan; **40**(1): 12-21.
220. Kellner C, Otte A, Cappuzzello E, Klausz K, Peipp M. Modulating Cytotoxic Effector Functions by Fc Engineering to Improve Cancer Therapy. *Transfus Med Hemother* 2017; **44**(5): 327-336.
221. Hofmann M, Grosse-Hovest L, Nubling T, Pyz E, Bamberg ML, Aulwurm S, *et al.* Generation, selection and preclinical characterization of an Fc-optimized FLT3 antibody for the treatment of myeloid leukemia. *Leukemia* 2012 1/6/2012.
222. Koerner SP, Andre MC, Leibold JS, Kousis PC, Kubler A, Pal M, *et al.* An Fc-optimized CD133 antibody for induction of NK cell reactivity against myeloid leukemia. *Leukemia* 2017 Feb; **31**(2): 459-469.
223. Schmied BJ, Lutz MS, Riegg F, Zekri L, Heitmann JS, Buhning HJ, *et al.* Induction of NK Cell Reactivity against B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia by an Fc-Optimized FLT3 Antibody. *Cancers (Basel)* 2019 Dec 6; **11**(12).
224. Schmied BJ, Riegg F, Zekri L, Grosse-Hovest L, Buhning HJ, Jung G, *et al.* An Fc-Optimized CD133 Antibody for Induction of Natural Killer Cell Reactivity against Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* 2019 Jun 7; **11**(6).

225. Seidel UJ, Schlegel P, Grosse-Hovest L, Hofmann M, Aulwurm S, Pyz E, *et al.* Reduction of Minimal Residual Disease in Pediatric B-lineage Acute Lymphoblastic Leukemia by an Fc-optimized CD19 Antibody. *Mol Ther* 2016 Sep; **24**(9): 1634-1643.
226. Duan S, Guo W, Xu Z, He Y, Liang C, Mo Y, *et al.* Natural killer group 2D receptor and its ligands in cancer immune escape. *Mol Cancer* 2019 Feb 27; **18**(1): 29.
227. 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.
228. 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.
229. Lehner M, Gotz G, Proff J, Schaft N, Dorrie J, Full F, *et al.* Redirecting T cells to Ewing's sarcoma family of tumors by a chimeric NKG2D receptor expressed by lentiviral transduction or mRNA transfection. *PLoS One* 2012; **7**(2): e31210.
230. Zingoni A, Molfetta R, Fionda C, Soriani A, Paolini R, Cippitelli M, *et al.* NKG2D and Its Ligands: "One for All, All for One". *Front Immunol* 2018; **9**: 476.
231. Feldman EJ, Brandwein J, Stone R, Kalaycio M, Moore J, O'Connor J, *et al.* Phase III randomized multicenter study of a humanized anti-CD33 monoclonal antibody, lintuzumab, in combination with chemotherapy, versus chemotherapy alone in patients with refractory or first-relapsed acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2005 Jun 20; **23**(18): 4110-4116.
232. Clausen J, Vergeiner B, Enk M, Petzer AL, Gastl G, Gunsilius E. Functional significance of the activation-associated receptors CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells. *Immunobiology* 2003; **207**(2): 85-93.
233. Keating GM. Rituximab: a review of its use in chronic lymphocytic leukaemia, low-grade or follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Drugs* 2010 7/30/2010; **70**(11): 1445-1476.
234. 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 Nov 29; **9**(1): 16-32.
235. Salles G, Duell J, Gonzalez Barca E, Tournilhac O, Jurczak W, Liberati AM, *et al.* Tafasitamab plus lenalidomide in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma (L-MIND): a multicentre, prospective, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2020 Jul; **21**(7): 978-988.

236. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 2006 1/1/2006; **107**(1): 159-166.
237. Reichert T, DeBruyere M, Deneys V, Totterman T, Lydyard P, Yuksel F, *et al.* Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopathol* 1991 Aug; **60**(2): 190-208.
238. Houchins JP, Yabe T, McSherry C, Bach FH. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* 1991 Apr 1; **173**(4): 1017-1020.
239. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, *et al.* Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999 7/30/1999; **285**(5428): 727-729.
240. Li PW, Morris DL, Willcox BE, Steinle A, Spies T, Strong RK. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nature Immunology* 2001 5/2001; **2**(5): 443-451.
241. Steinle A, Li P, Morris DL, Groh V, Lanier LL, Strong RK, *et al.* Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* 2001 5/2001; **53**(4): 279-287.
242. Liu H, Wang S, Xin J, Wang J, Yao C, Zhang Z. Role of NKG2D and its ligands in cancer immunotherapy. *Am J Cancer Res* 2019; **9**(10): 2064-2078.
243. Godbersen C, Coupet TA, Huehls AM, Zhang T, Battles MB, Fisher JL, *et al.* NKG2D Ligand-Targeted Bispecific T-Cell Engagers Lead to Robust Antitumor Activity against Diverse Human Tumors. *Mol Cancer Ther* 2017 Jul; **16**(7): 1335-1346.
244. Smits NC, Coupet TA, Godbersen C, Sentman CL. Designing multivalent proteins based on natural killer cell receptors and their ligands as immunotherapy for cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2016 Sep; **16**(9): 1105-1112.
245. Curio S, Jonsson G, Marinovic S. A summary of current NKG2D-based CAR clinical trials. *Immunother Adv* 2021 Jan; **1**(1): Itab018.
246. Hofmann M, Grosse-Hovest L, Nubling T, Pyz E, Bamberg ML, Aulwurm S, *et al.* Generation, selection and preclinical characterization of an Fc-optimized FLT3 antibody for the treatment of myeloid leukemia. *Leukemia* 2012 Jun; **26**(6): 1228-1237.
247. Zhou WT, Jin WL. B7-H3/CD276: An Emerging Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 2021; **12**: 701006.
248. Picarda E, Ohaegbulam KC, Zang X. Molecular Pathways: Targeting B7-H3 (CD276) for Human Cancer Immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2016 Jul 15; **22**(14): 3425-3431.

249. Liu C, Zhang G, Xiang K, Kim Y, Lavoie RR, Lucien F, *et al.* Targeting the immune checkpoint B7-H3 for next-generation cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2022 Jul; **71**(7): 1549-1567.
250. 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 May 7; **21**(5): 707-717.
251. Beers SA, French RR, Chan HTC, Lim SH, Jarrett TC, Vidal RM, *et al.* Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection. *Blood* 2010 6/24/2010; **115**(25): 5191-5201.
252. Kellner C, Peipp M, Gramatzki M, Schrappe M, Schewe DM. Perspectives of Fc engineered antibodies in CD19 targeting immunotherapies in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Oncoimmunology* 2018; **7**(8): e1448331.
253. Shah NN, Fry TJ. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2019 Jun; **16**(6): 372-385.
254. Janssen EM, Droin NM, Lemmens EE, Pinkoski MJ, Bensinger SJ, Ehst BD, *et al.* CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* 2005 Mar 3; **434**(7029): 88-93.
255. Masopust D, Vezys V, Usherwood EJ, Cauley LS, Olson S, Marzo AL, *et al.* Activated primary and memory CD8 T cells migrate to nonlymphoid tissues regardless of site of activation or tissue of origin. *J Immunol* 2004 Apr 15; **172**(8): 4875-4882.
256. Sun JC, Bevan MJ. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 2003 Apr 11; **300**(5617): 339-342.
257. Stebbing J, Paz K, Schwartz GK, Wexler LH, Maki R, Pollock RE, *et al.* Patient-derived xenografts for individualized care in advanced sarcoma. *Cancer* 2014 Jul 1; **120**(13): 2006-2015.
258. Ambati SR, Shieh JH, Pera B, Lopes EC, Chaudhry A, Wong EW, *et al.* BO-1055, a novel DNA cross-linking agent with remarkable low myelotoxicity shows potent activity in sarcoma models. *Oncotarget* 2016 Jul 12; **7**(28): 43062-43075.
259. Nanni P, Landuzzi L, Manara MC, Righi A, Nicoletti G, Cristalli C, *et al.* Bone sarcoma patient-derived xenografts are faithful and stable preclinical models for molecular and therapeutic investigations. *Sci Rep* 2019 Aug 21; **9**(1): 12174.
260. 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 Feb 5; **13**(2): e11902.

261. Nalivaiko K, Hofmann M, Kober K, Teichweyde N, Krammer PH, Rammensee HG, *et al.* A Recombinant Bispecific CD20xCD95 Antibody With Superior Activity Against Normal and Malignant B-cells. *Mol Ther* 2016 Feb; **24**(2): 298-305.
262. Li J, Piskol R, Ybarra R, Chen YJ, Li J, Slaga D, *et al.* CD3 bispecific antibody-induced cytokine release is dispensable for cytotoxic T cell activity. *Sci Transl Med* 2019 Sep 4; **11**(508).
263. Salvaris R, Fedele PL. Targeted Therapy in Acute Lymphoblastic Leukaemia. *J Pers Med* 2021 Jul 25; **11**(8).
264. Carvajal RD, Butler MO, Shoushtari AN, Hassel JC, Ikeguchi A, Hernandez-Aya L, *et al.* Clinical and molecular response to tebentafusp in previously treated patients with metastatic uveal melanoma: a phase 2 trial. *Nat Med* 2022 Nov; **28**(11): 2364-2373.
265. Sawalha Y, Advani AS. Management of older adults with acute lymphoblastic leukemia: challenges & current approaches. *Int J Hematol Oncol* 2018 Mar; **7**(1): IJH02.
266. Dörfel D, Döhner K, Kapp-Schwoerer S, Kayser S, Thol F, Heuser M, *et al.* A first in man study with a Fc-optimized FLT3 antibody for treatment of acute myeloid leukemia with minimal residual disease. *Oncol Res Treat* 2018; **41**(suppl 4)(Suppl. 4): 1-358.
267. Kayser S, Heitmann J, Dörfel D, Thol F, Heuser M, Märklin M, *et al.* Interim Results of a First in Man Study with the Fc-Optimized FLT3 Antibody Flysyn for Treatment of Acute Myeloid Leukemia with Minimal Residual Disease. *Blood* 2019 11/13; **134**: 3928-3928.
268. Nowakowski GS, Yoon DH, Peters A, Mondello P, Joffe E, Fleury I, *et al.* Improved Efficacy of Tafasitamab plus Lenalidomide versus Systemic Therapies for Relapsed/Refractory DLBCL: RE-MIND2, an Observational Retrospective Matched Cohort Study. *Clin Cancer Res* 2022 Sep 15; **28**(18): 4003-4017.
269. Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 10/29/1996; **93**(22): 12445-12450.
270. Jinushi M, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Groh V, Spies T, *et al.* Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2003 2/1/2003; **170**(3): 1249-1256.



271. Kloss M, Decker P, Baltz KM, Baessler T, Jung G, Rammensee HG, *et al.* Interaction of monocytes with NK cells upon Toll-like receptor-induced expression of the NKG2D ligand MICA. *J Immunol* 2008 11/15/2008; **181**(10): 6711-6719.
272. Ling V, Wu PW, Spaulding V, Kieleczawa J, Luxenberg D, Carreno BM, *et al.* Duplication of primate and rodent B7-H3 immunoglobulin V- and C-like domains: divergent history of functional redundancy and exon loss. *Genomics* 2003 Sep; **82**(3): 365-377.
273. Sentman CL, Meehan KR. NKG2D CARs as cell therapy for cancer. *Cancer J* 2014 Mar-Apr; **20**(2): 156-159.
274. 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 Aug 14; **11**(8): 146.
275. 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 Jan; **7**(1): 100-112.
276. Zhang Z, Jiang C, Liu Z, Yang M, Tang X, Wang Y, *et al.* B7-H3-Targeted CAR-T Cells Exhibit Potent Antitumor Effects on Hematologic and Solid Tumors. *Mol Ther Oncolytics* 2020 Jun 26; **17**: 180-189.
277. Souweidane MM, Kramer K, Pandit-Taskar N, Zhou Z, Haque S, Zanzonico P, *et al.* Convection-enhanced delivery for diffuse intrinsic pontine glioma: a single-centre, dose-escalation, phase 1 trial. *Lancet Oncol* 2018 Aug; **19**(8): 1040-1050.
278. Du H, Hirabayashi K, Ahn S, Kren NP, Montgomery SA, Wang X, *et al.* Antitumor Responses in the Absence of Toxicity in Solid Tumors by Targeting B7-H3 via Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Cancer Cell* 2019 Feb 11; **35**(2): 221-237 e228.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

ACT	adoptiver Zelltransfer ( <i>adoptive cell transfer</i> )
ADCC	antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität ( <i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i> )
ADCP	antikörperabhängige zelluläre Phagozytose ( <i>antibody dependent cellular phagocytosis</i> )
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APC	antigen-präsentierende Zelle ( <i>antigen-presenting cell</i> )
bsAb	bispezifischer Antikörper ( <i>bispecific antibody</i> )
BFP	bispezifische Fusionsproteine
BiTE	<i>bispecific T cell engager</i>
CAR	chimärer Antigenrezeptor ( <i>chimeric antigen receptor</i> )
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	<i>complement-dependent cytotoxicity</i>
CDR	<i>complementarity-determining regions</i>
C <sub>H</sub>	<i>constant heavy</i>
C <sub>L</sub>	<i>constant light</i>
CRS	<i>cytokine release syndrome</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i>
DC	dendritische Zellen ( <i>dendritic cells</i> )
dMMR	<i>DNA mismatch repair deficiency</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
EpCAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i>
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FasL	Fas Ligand
Fc	<i>fragment crystallizable</i>
FcγR	IgG bindender Fc Rezeptor
FoV	<i>Field of view</i>
FR	<i>framework region</i>
GIST	gastrointestinale Stromatumore
HC	schwere Kette (heavy chain)
HD	gesunde Spender ( <i>healthy donor</i> )
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
IFN	Interferon

---

Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
kDa	Kilodalton
KIR	<i>killer-cell immunoglobulin-like receptor</i>
LC	leichte Kette ( <i>light chain</i> )
mAb	monoklonaler Antikörper ( <i>monoclonal antibody</i> )
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIC	<i>MHC class I related chain</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MSI-H	<i>microsatellite instability-high</i>
NCR	<i>natural cytotoxicity receptor</i>
NK	natürliche Killer
NKG2D	<i>natural killer group 2 member D</i>
NKG2DL	NKG2D Ligand
NKp	<i>natural killer protein</i>
NKT	natürliche Killer T
PAMP	Struktur motive auf der Oberfläche pathogener Mikroorganismen ( <i>pathogen-associated molecular pattern</i> )
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PD-1	<i>programmed cell death protein</i>
PD-L1	<i>programmed cell death protein 1 ligand 1</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RAET	<i>Retinoic Acid Early inducible Transcript 1</i>
RNA	ribonucleic acid
scFv	<i>single-chain fragment variable</i>
SDIE	S239D/I332E
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TAA	Tumorassoziertes Antigen
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TCR	T Zell-Rezeptor ( <i>T cell receptor</i> )
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TMB-H	hohe Tumormutationslast ( <i>high tumor mutational burden</i> )
TLR	<i>toll-like receptor</i>

TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
ULBP	<i>UL16 binding protein</i>
VEGF	Gefäßwachstumsfaktor ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
V <sub>H</sub>	variable heavy
V <sub>L</sub>	variable light

## 8 Eigene Publikationen

Im Folgenden sind alle veröffentlichten Artikel mit eigener Beteiligung aufgeführt.

An optimized IgG-based B7-H3xCD3 bispecific antibody for treatment of gastrointestinal cancers.

Zekri L, Lutz M, Prakash N, Manz T, Klimovich B, Mueller S, Hoerner S, **Hagelstein I**, Engel M, Chashchina A, Pfluegler M, Heitmann JS, Jung G, Salih HR.

Mol Ther. 2023 Apr 5;31(4):1033-1045. doi: 10.1016/j.ymthe.2023.02.010.

B7-H3-targeting Fc-optimized antibody for induction of NK cell reactivity against sarcoma.

**Hagelstein I**, Engel M, Hinterleitner C, Manz T, Märklin M, Jung G, Salih HR und Zekri L.

Front. Immunol. 2022 Oct. 13:1002898. doi: 10.3389/fimmu.2022.1002898

IgG-Based Bispecific Anti-CD95 Antibodies for the Treatment of B Cell-Derived Malignancies and Autoimmune Diseases.

Hörner S, Moustafa-Oglou M, Teppert K, **Hagelstein I**, Kauer J, Pflügler M, Neumann K, Rammensee HG, Metz T, Herrmann A, Salih HR, Jung G, Zekri L.

Cancers (Basel). 2022 Aug 16;14(16):3941. doi: 10.3390/cancers14163941.

Identification of CD105 (endoglin) as novel risk marker in CLL.

Greiner SM, Märklin M, Holzmayer S, Kaban K, Meyer S, Hinterleitner C, Tandler C, **Hagelstein I**, Jung G, Salih HR, Heitmann JS, Kauer J.

Ann Hematol. 2022 Apr;101(4):773-780. doi: 10.1007/s00277-022-04756-4. Epub 2022 Jan 19.

CD18 Antibody Application Blocks Unwanted Off-Target T Cell Activation Caused by Bispecific Antibodies.

Kauer J, Vogt F, **Hagelstein I**, Hörner S, Märklin M, Maurer S, Salih HR, Jung G, Zekri L.

Cancers (Basel). 2021 Sep 13;13(18):4596. doi: 10.3390/cancers13184596.

Bispecific NKG2D-CD3 and NKG2D-CD16 Fusion Proteins as Novel Treatment Option in Advanced Soft Tissue Sarcomas.

**Hagelstein I\***, Lutz MS\*, Schmidt M, Heitmann JS, Malenke E, Zhou Y, Clar KL, Kopp HG, Jung G, Salih HR, Märklin M, Hinterleitner C.

Front Immunol. 2021 Apr 14;12:653081. doi: 10.3389/fimmu.2021.653081. eCollection 2021.

An IgG-based bispecific antibody for improved dual targeting in PSMA-positive cancer.

Zekri L\*, Vogt F\*, Osburg L, Müller S, Kauer J, Manz T, Pflügler M, Maurer A, Heitmann JS, **Hagelstein I**, Märklin M, Hörner S, Todenhöfer T, Calaminus C, Stenzl A, Pichler B, la Fougère C, Schneider MA, Rammensee HG, Zender L, Sipos B, Salih HR, Jung G.  
EMBO Mol Med. 2021 Feb 5;13(2):e11902. doi: 10.15252/emmm.201911902. Epub 2020 Dec 29.

SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition.

Nelde A\*, Bilich T\*, Heitmann JS\*, Maringer Y, Salih HR, Roerden M, Lübke M, Bauer J, Rieth J, Wacker M, Peter A, Hörber S, Traenkle B, Kaiser PD, Rothbauer U, Becker M, Junker D, Krause G, Strengert M, Schneiderhan-Marra N, Templin MF, Joos TO, Kowalewski DJ, Stos-Zweifel V, Fehr M, Rabsteyn A, Mirakaj V, Karbach J, Jäger E, Graf M, Gruber LC, Rachfalski D, Preuß B, **Hagelstein I**, Märklin M, Bakchoul T, Gouttefangeas C, Kohlbacher O, Klein R, Stevanović S, Rammensee HG, Walz JS.  
Nat Immunol. 2021 Jan;22(1):74-85. doi: 10.1038/s41590-020-00808-x. Epub 2020 Sep 30.

CD105 (endoglin) as risk marker in AML patients undergoing stem cell transplantation.

Märklin M, **Hagelstein I**, Hinterleitner C, Salih HR, Kauer J, Heitmann JS.  
Int J Hematol. 2020 Jul;112(1):57-64. doi: 10.1007/s12185-020-02875-0. Epub 2020 Apr 7.

Fc gamma receptor expression serves as prognostic and diagnostic factor in AML.

Heitmann JS, **Hagelstein I**, Hinterleitner C, Osburg L, Salih HR, Kauer J, Märklin M.  
Leuk Lymphoma. 2020 Oct;61(10):2466-2474. doi: 10.1080/10428194.2020.1775208.  
Epub 2020 Jun 16.

Identification of CD318 (CDCP1) as novel prognostic marker in AML.

Heitmann JS, **Hagelstein I**, Hinterleitner C, Roerden M, Jung G, Salih HR, Märklin M, Kauer J.  
Ann Hematol. 2020 Mar;99(3):477-486. doi: 10.1007/s00277-020-03907-9. Epub 2020 Jan 21.

Bispecific NKG2D-CD3 and NKG2D-CD16 fusion proteins for induction of NK and T cell reactivity against acute myeloid leukemia.

Märklin M, **Hagelstein I**, Koerner SP, Rothfelder K, Pfluegler MS, Schumacher A, Grosse-Hovest L, Jung G, Salih HR.

J Immunother Cancer. 2019 May 29;7(1):143. doi: 10.1186/s40425-019-0606-0.

Expression of the Immune Checkpoint Modulator OX40 in Acute Lymphoblastic Leukemia Is Associated with BCR-ABL Positivity.

Rothfelder K\*, **Hagelstein I\***, Roerden M, Blumenstock G, Hofmann M, Nuebling T, Jung G, Salih HR, Dörfel D.

Neoplasia. 2018 Nov;20(11):1150-1160. doi: 10.1016/j.neo.2018.09.005. Epub 2018 Oct 6.

The Immune Checkpoint Modulator OX40 and Its Ligand OX40L in NK-Cell Immunosurveillance and Acute Myeloid Leukemia.

Nuebling T\*, Schumacher CE\*, Hofmann M, **Hagelstein I**, Schmiedel BJ, Maurer S, Federmann B, Rothfelder K, Roerden M, Dörfel D, Schneider P, Jung G, Salih HR.

Cancer Immunol Res. 2018 Feb;6(2):209-221. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0212. Epub 2018 Jan 10.

\* gleichwertiger Beitrag

## 9 Eigenanteil

Die Arbeiten, die zu den beiden 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.

### Publikation 1:

**Hagelstein I\***, Lutz MS\*, Schmidt M, Heitmann JS, Malenke E, Zhou Y, Clar KL, Kopp HG, Jung G, Salih HR, Märklin M, Hinterleitner C. Bispecific NKG2D-CD3 and NKG2D-CD16 Fusion Proteins as Novel Treatment Option in Advanced Soft Tissue Sarcomas. *Front Immunol.* 2021 Apr 14;12:653081. doi: 10.3389/fimmu.2021.653081.

\* Diese beiden Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen.

Konzeptualisierung: Salih HR, Hinterleitner C, Märklin M

Projektleitung: Clemens C, Hagelstein I, Lutz MS

Supervision: Märklin M, Hinterleitner C

Methodologie: Hagelstein I, Lutz MS

Software: Hagelstein I, Lutz MS, Clar KL

Durchführung der Forschungs- und Untersuchungsprozesse: Hagelstein I, Lutz MS, Schmidt M, Heitmann JS, Malenke E, Zhou Y, Clar KL

Formelle Analyse: Hagelstein I, Lutz MS

Validierung: Hagelstein I, Lutz MS, Hinterleitner C

Datenkuratierung: Hagelstein I, Lutz MS, Hinterleitner C

Visualisierung: Hagelstein I, Lutz MS, Hinterleitner C

Schreiben – Erstellung des Originalentwurfs: Hagelstein I, Lutz MS, Hinterleitner C

Schreiben – Revision und Editieren: Märklin M, Salih HR

Ressourcen: Salih HR, Jung G, Kopp HG

Akquisition von Fördermitteln: Salih HR

### Publikation 2:

**Hagelstein I**, Engel M, Hinterleitner C, Manz T, Märklin M, Jung G, Salih HR und Zekri L. B7-H3-targeting Fc-optimized antibody for induction of NK cell reactivity against sarcoma. *Front. Immunol.* 2022 Oct. 13:1002898. doi: 10.3389/fimmu.2022.1002898

Konzeptualisierung: Salih HR, Zekri L

Projektleitung: Hagelstein I, Salih HR, Zekri L



Supervision: Zekri L, Märklin M

Methodologie: Hagelstein I

Software: Hagelstein I

Durchführung der Forschungs- und Untersuchungsprozesse: Hagelstein I, Engel M, Hinterleitner C, Manz T

Formelle Analyse: Hagelstein I, Zekri L

Validierung: Hagelstein I, Zekri L

Datenkuratierung: Hagelstein I, Zekri L

Visualisierung: Hagelstein I

Schreiben – Erstellung des Originalentwurfs: Hagelstein I

Schreiben – Revision und Editieren: Zekri L, Märklin M, Salih HR

Ressourcen: Salih HR, Jung G

Akquisition von Fördermitteln: Salih HR

## 10 Danksagung

Mein herzlichster Dank geht an Herrn Prof. Dr. Helmut R. Salih: Für die Ermunterung, meine Promotion in Angriff zu nehmen und die Möglichkeit, diese mit einer Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe zu vollbringen. Für das mir entgegengebrachte Vertrauen während dem schon etwas längerem, gemeinsamen Weg, seine uneingeschränkte Förderung und den sowohl fachlichen als auch persönlichen Austausch. Lieber Helmut, von ganzem Herzen Danke für alles!

Ein großes, herzliches Dankeschön gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee für die Betreuung meiner Promotion, seiner Gutachtertätigkeit und außerdem die bemerkenswert freundliche und produktive Atmosphäre in der Immunologie.

Außerdem möchte ich mich ausdrücklich bei Prof. Dr. Gundram Jung bedanken: Es war eine lehrreiche, interessante, schöne und oft lustige Zeit in der AG Jung.

Ganz besonders bedanken möchte mich bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der AG Salih (auch wenn wir so jetzt nicht mehr heißen) und der AG Jung. Ihr seid alle großartig und habt während der ganzen letzten Jahre euren Teil dazu beigetragen, dass ich jeden Tag gerne ins Labor komme, wir eine intensive, erlebnisreiche Zeit hatten/haben und die Doktorarbeit möglich und wahr wurde.

Der wichtigste Teil von mir ist meine Familie: vor allem meine Kinder und Benny, meine Schwestern, meine Eltern und meine angeheiratete Familie. Mein Dank an euch ist nicht in Worte zu fassen.

Zu guter Letzt: Danke an alle Freunde, die mich mit viel Geduld und sehr treu begleiten!

## 11 Anhang

Im Anhang befinden sich die zwei Publikationen, auf denen die vorliegende Doktorarbeit beruht.

Publikation 1 (14 Seiten und 10 Seiten zusätzliche Daten):

Hagelstein I\*, Lutz MS\*, Schmidt M, Heitmann JS, Malenke E, Zhou Y, Clar KL, Kopp HG, Jung G, Salih HR, Märklin M, Hinterleitner C. Bispecific NKG2D-CD3 and NKG2D-CD16 Fusion Proteins as Novel Treatment Option in Advanced Soft Tissue Sarcomas. *Front Immunol.* 2021 Apr 14;12:653081. doi: 10.3389/fimmu.2021.653081

Publikation 2 (15 Seiten und 3 Seiten zusätzliche Daten):

Hagelstein I, Engel M, Hinterleitner C, Manz T, Märklin M, Jung G, Salih HR und Zekri L. B7-H3-targeting Fc-optimized antibody for induction of NK cell reactivity against sarcoma. *Front. Immunol.* 2022 Oct. 13:1002898. doi: 10.3389/fimmu.2022.1002898



# Bispecific NKG2D-CD3 and NKG2D-CD16 Fusion Proteins as Novel Treatment Option in Advanced Soft Tissue Sarcomas

Ilona Hagelstein<sup>1,2†</sup>, Martina S. Lutz<sup>1,2†</sup>, Moritz Schmidt<sup>1,2,3</sup>, Jonas S. Heitmann<sup>1,2</sup>, Elke Malenke<sup>4</sup>, Yanjun Zhou<sup>1,2</sup>, Kim L. Clar<sup>1,2</sup>, Hans-Georg Kopp<sup>5,6</sup>, Gundram Jung<sup>2,7</sup>, Helmut R. Salih<sup>1,2</sup>, Melanie Märklin<sup>1,2\*</sup> and Clemens Hinterleitner<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Clinical Collaboration Unit Translational Immunology, German Cancer Consortium (DKTK), Department of Internal Medicine, University Hospital Tuebingen, Tuebingen, Germany, <sup>2</sup> Cluster of Excellence IFT (EXC 2180) "Image-Guided and Functionally Instructed Tumor Therapies", University of Tuebingen, Tuebingen, Germany, <sup>3</sup> Department of Medical Oncology and Pneumology (Internal Medicine VIII), University Hospital Tuebingen, Tuebingen, Germany, <sup>4</sup> Department of Hematology and Oncology, Eberhard Karls University Tuebingen, Children's Hospital, Tuebingen, Germany, <sup>5</sup> Robert Bosch Center for Tumor Diseases (RBC) Robert Bosch Cancer Center, Stuttgart, Germany, <sup>6</sup> Department of Hematology, Oncology, Clinical Immunology and Rheumatology, University Hospital Tuebingen, Tuebingen, Germany, <sup>7</sup> Department for Immunology, Eberhard Karls University, Tuebingen, Germany

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Jonathan Bramson,  
McMaster University, Canada

### Reviewed by:

Susanne Baumeister,  
Dana-Farber Cancer Institute,  
United States  
Rosa Molfetta,  
Sapienza University of Rome, Italy

### \*Correspondence:

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

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work

### Specialty section:

This article was submitted to  
Cancer Immunity  
and Immunotherapy,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 13 January 2021

**Accepted:** 22 March 2021

**Published:** 14 April 2021

### Citation:

Hagelstein I, Lutz MS, Schmidt M,  
Heitmann JS, Malenke E, Zhou Y,  
Clar KL, Kopp H-G, Jung G, Salih HR,  
Märklin M and Hinterleitner C (2021)  
Bispecific NKG2D-CD3 and NKG2D-  
CD16 Fusion Proteins as Novel  
Treatment Option in Advanced  
Soft Tissue Sarcomas.  
Front. Immunol. 12:653081.  
doi: 10.3389/fimmu.2021.653081

Soft tissue sarcoma (STS) constitutes a rare group of heterogeneous malignancies. Effective treatment options for most subtypes of STS are still limited. As a result, especially in metastatic disease, prognosis is still dismal. The ligands for the activating immunoreceptor NKG2D (NKG2DL) are commonly expressed in STS, but generally absent in healthy tissues. This provides the rationale for utilization of NKG2DL as targets for immunotherapeutic approaches. We here report on the preclinical characterization of bispecific fusion proteins (BFP) consisting of the extracellular domain of the NKG2D receptor fused to Fab-fragments directed against CD3 (NKG2D-CD3) or CD16 (NKG2D-CD16) for treatment of STS. After characterization of NKG2DL expression patterns on various STS cell lines, we demonstrated that both NKG2D-CD16 and NKG2D-CD3 induce profound T and NK cell reactivity as revealed by analysis of activation, degranulation and secretion of IFN $\gamma$  as well as granule associated proteins, resulting in potent target cell lysis. In addition, the stimulatory capacity of the constructs to induce T and NK cell activation was analyzed in heavily pretreated STS patients and found to be comparable to healthy donors. Our results emphasize the potential of NKG2D-CD3 and NKG2D-CD16 BFP to target STS even in an advanced disease.

**Keywords:** sarcoma, NKG2DL, CD3, CD16, fusion protein, mAb, immunotherapy

## INTRODUCTION

Soft tissue sarcomas (STS) comprise a rare, heterogenic group of malignancies derived from tissues of mesenchymal lineage (1). With more than 100 different entities, biological and clinical characteristics in STS vary from low-grade tumors to highly aggressive cancers with an enormous metastatic potential (1, 2). Reflecting its heterogeneity, genetic alterations in STS are

highly variable. Some STS histotypes are characterized by distinct genetic alterations including *EWS-ATF1* in Ewing sarcomas, *cKIT* mutations in GISTs or *PAX3-FKHR* in alveolar rhabdomyosarcomas (3). Complex karyotypes, typically associated with a worse clinical prognosis are frequently related to *PTEN*, *RBI*, *BRCA2*, *PIK3CA* or *APC* mutations (4–6). Interestingly, some STS subtypes have recently been associated with epigenetic dysregulations triggered by a single or small number of genetic alterations (3, 7).

Although therapeutic options have significantly increased over the recent years, long-term survival, especially in a metastatic disease, is still very limited (8, 9). Even if first-line treatment with anthracyclines and alkylating agents shows favorable results regarding progression-free survival in young STS patients, overall survival is only marginally affected (10). Due to the complex and heterogeneous biology of sarcomas even molecular targeted therapy shows only partially success (11).

Immunotherapy of cancer has made sustainable progress in the past few years. While novel immunotherapeutic strategies have already moved into standard clinical practice for various neoplasms, a similar development is lagging behind for the treatment of sarcoma (12). However, since the tumor microenvironment (TME) of sarcomas reportedly is infiltrated by a high amount of different immune cell populations, implementation of immunotherapeutic approaches seems promising (11, 13). Beyond immune-checkpoint inhibitors targeting PD-1 and PD-L1, modified T and NK cell therapies have recently shown first encouraging results in STS and other solid tumors (14).

Bispecific antibodies represent another concept of anti-cancer immune therapy. Their mode of action is to directly attract immune effector cells like NK and T cells to the tumor cell resulting in lysis of the tumor cells (15). In order to ensure treatment efficiency and therapeutic safety of these molecules, it is essential to identify reliable target antigens, broadly expressed on tumor tissue while absent in healthy tissues. Several ligands for the activating immunoreceptor NKG2D (natural killer group 2D) (NKG2DL) including the UL16-binding protein (ULBP) family and MHC class I-related chain (MIC) proteins have been described to be selectively overexpressed in human cancer cells like acute myeloid leukemia, lung cancer, ovarian and breast cancer and sarcomas (15). Moreover, the expression of NKG2DL on tumor cells can be upregulated as a result of chemotherapy and radiotherapy, which induce DNA damage pathways (16). Therefore, this protein family reflects an encouraging target for bispecific antibodies (17, 18).

We previously reported on a Fc-optimized NKG2D-IgG<sub>1</sub> fusion protein (NKG2D-Fc-ADCC) that allows simultaneous targeting of all NKG2DL. Compared to a construct with a wildtype Fc part our NKG2D-Fc-ADCC showed enhanced antitumor efficacy in acute leukemia and breast cancer (19, 20). However, our NKG2D-Fc-ADCC construct lacks the ability to actively stimulate T cells with their, compared to NK cells, higher effector potential. As a consequence, we developed NKG2D-CD16 and NKG2D-CD3 bispecific fusion proteins (BFP) consisting of the extracellular domain of NKG2D fused

to anti-CD16 or anti-CD3 Fab-fragments instead of an optimized Fc part, which allow for recruitment of NK cells and T cells, respectively (**Figure 1**). NKG2D-CD16 and NKG2D-CD3 BFP were previously shown to induce potent lysis of acute myeloid leukemia cells (21). Considering the reported expression of NKG2DL in STS (22, 23), our NKG2D-CD16 and NKG2D-CD3 BFPs might offer a new promising approach in sarcoma treatment (11, 18).

In the present study we provide preclinical evidence that an effective treatment with NKG2D-CD16 and NKG2D-CD3 BFPs might be possible even in heavily pretreated STS patients.

## MATERIAL AND METHODS

### Production and Purification of NKG2D Fusion Proteins

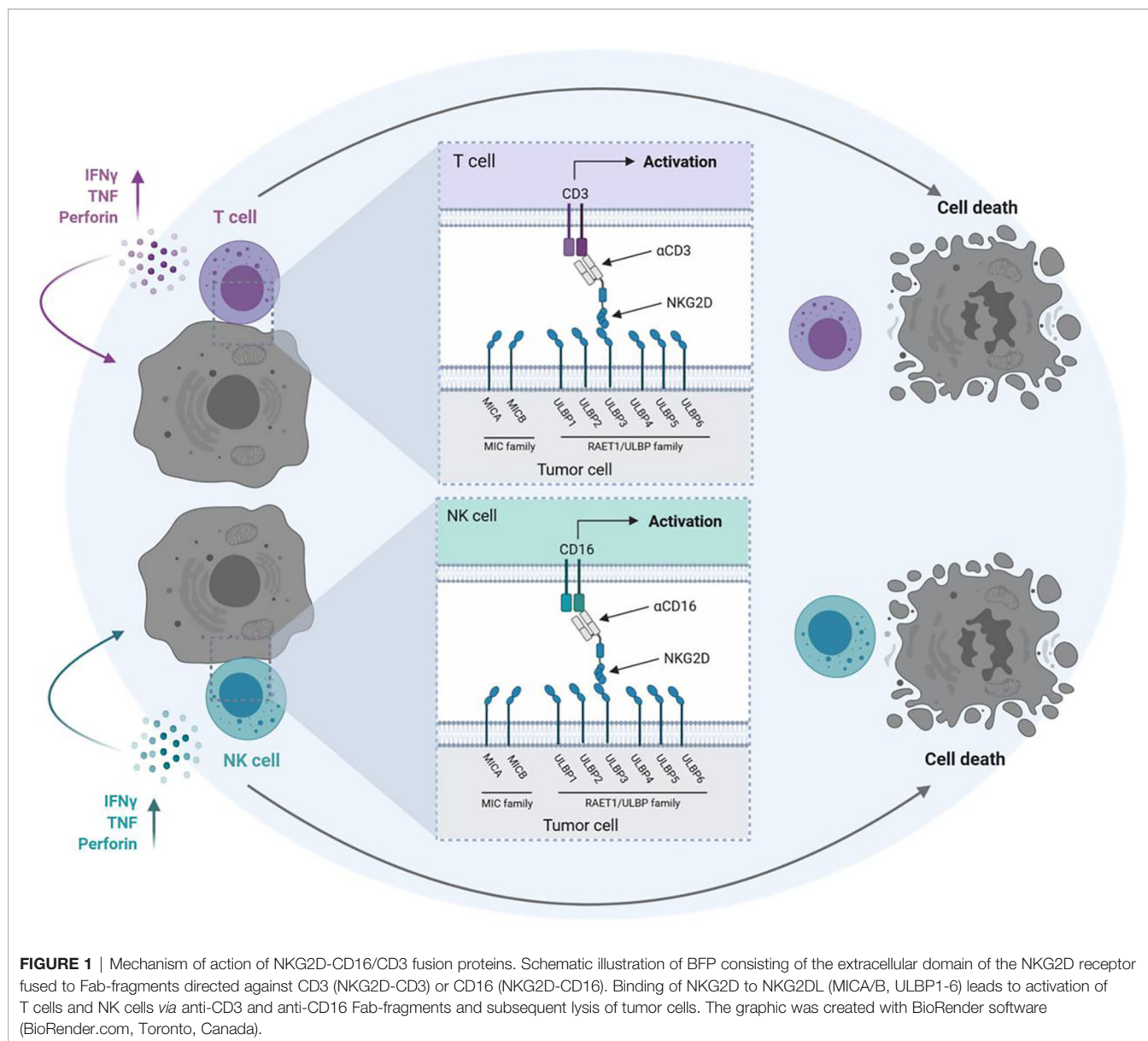
The NKG2D-CD16 and NKG2D-CD3 constructs were generated as described previously (21). In brief, the constructs were produced in SP2/0-Ag14 cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA) and purified from culture supernatant by HiTrap KappaSelect affinity chromatography (GE Healthcare, Munich, Germany) followed by preparative size exclusion chromatography on Superdex HiLoad. Analytical size exclusion chromatography (Superdex 200R PC3.2/30, GE Healthcare) and 4–12% gradient SDS-PAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA) was performed to confirm the quality and exclude aggregation of purified bispecific fusion proteins. Endotoxin levels were measured with EndoZyme II (BioMerieux, Marcy-l'Étoile, France) according to the manufacturer's instructions and below endotoxin levels EU=0.1.

### STS Cell Lines

Human sarcoma cell lines SW1353, SaOs, SW872, RD-ES and SW982 were obtained from ATCC (American Type Culture Collection). Previously described genetic alterations are given in (**Table S1**). Cells were tested routinely for mycoplasma contamination every three months. Authenticity was determined by validating the respective immunophenotype described by the provider using flow cytometry.

### Primary Patient Material

To obtain patient-derived sarcoma cells (**Table S2**), an outgrowth culture from resected primary tumors was generated. Tumors were cut in small fragments of 1–2 mm<sup>3</sup> and washed with PBS (LifeTechnologies, Carlsbad, CA). All sarcoma samples were cultured in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM, LifeTechnologies) containing 4.5 g/l glucose (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) or Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, LifeTechnologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biochrom, Berlin, Germany) and 1x antibiotic-antimycotic solution (LifeTechnologies) with 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 0.25 µg/ml amphotericin B (Thermo Fisher Scientific). After reaching optimal density, cells were cryopreserved with 90% FBS and 10% DMSO (Merck, Darmstadt, Germany) in liquid nitrogen.



Blood samples from 16 consecutive sarcoma patients treated at the Department of Medical Oncology and Pneumology (10-11/2020) were included in our study. The patient characteristics in detail are given in **Table 1** and the respective treatment regimens are given in **Table S3**. Peripheral Blood Mononuclear cells (PBMC) of healthy donors or sarcoma patients were isolated by density gradient centrifugation (Biocoll; Biochrom) and viably stored in liquid nitrogen. After thawing, PBMC were cultured for 18-24 h in media prior the use in functional experiments.

Written informed consent, in accordance with the Helsinki protocol, was given in all cases.

## PCR

Total RNA of 1-3 million sarcoma cells was isolated using the High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Basel, Switzerland) and cDNA synthesis was done using FastGeneScriptase II (NIPPON Genetics

Europe, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions. Primer sequences for MICA, MICB, ULBP1-4 and GAPDH were used as previously described (24, 25) (**Table S4**). Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed as described previously (26). Quantitative PCR (q-PCR) was performed using PerfeCTa SYBR Green FastMix (Quanta Biosciences Beverly, MA) with a LightCycler 480 (Roche) instrument.

## Immunohistochemistry and Immunofluorescence

For H&E staining sarcoma tissue samples were paraffin-embedded. 4 μm paraffin-embedded samples were stained with hematoxylin and eosin following standard protocols. For immunofluorescence staining, SW1353 and RD-ES cells were incubated with PBMC of healthy donors (ratio 2.5:1). After incubation, media was aspirated and cells were fixed using 4%

**TABLE 1 |** Patient characteristics.

Clinical characteristics	Total (n=16)
<b>Gender</b>	
Female sex, n (%)	5 (31)
<b>Age</b>	
Age in years, mean-yr. $\pm$ SD (range)	49,5 $\pm$ 18.5 (19-72)
<b>TNM classification, n (%)</b>	
Stage	
T0	0
T1	3 (18)
T2	8 (50)
T3	2 (13)
T4	2 (13)
Tx	1 (6)
Node	
N0	8 (50)
N1	3 (18)
N2	0
N3	1 (6)
Nx	4 (25)
Metastasis	
M0	10 (63)
M1	6 (37)
<b>Histological subtype</b>	
Ewing sarcoma	2 (13)
Osteosarcoma	6 (37)
Chondrosarcoma	1 (6)
SynovialSarcoma	1 (6)
Liposarcoma	2 (13)
Leiomyosarcoma	2 (13)
Soft tissue sarcoma not otherwise specified	1 (6)
Angiosarcoma	1 (6)
<b>Histological grading, n (%)</b>	
G1	0
G2	5 (31)
G3	5 (31)
Unknown	6 (37)
<b>Treatment, n (%)</b>	
Anthracycline	6 (37)
Anthracycline/platinum	5 (31)
Vincaalcaloid/anthracycline/topoisomerase II inhibitor	2 (13)
Vincaalcaloid/actinomycin	1 (6)
Alcaloid	1 (6)
Purine analogue	1 (6)
<b>Peripheral blood count</b>	
Leucocytes (1/ $\mu$ l)	7465 $\pm$ 2933
Hb (g/dL)	9.07 $\pm$ 1.46
Thrombocytes (10 <sup>3</sup> / $\mu$ l)	239.8 $\pm$ 117.9
<b>Therapy line at the time-point of blood sampling</b>	
Neoadjuvant	4 (25)
Adjuvant, n (%)	12 (75)
1st line, n (%)	13 (81)
2nd line, n (%)	1 (6)
> 2nd line, n (%)	2 (13)
<b>Therapy line at the time-point of blood sampling</b>	
Neoadjuvant	4 (25)
Adjuvant, n (%)	12 (75)

TNM, tumor (T), nodes (N), metastases (M); Hb, hemoglobin.

paraformaldehyde (PFA) in PBS (10 min at 20°C). After PFA was aspirated, cells were washed three times using PBS + 0.1% Tween20 (PBST). Cells were blocked using a Bovine Serum Albumin (BSA) blocking solution containing 5% BSA, 0.2% Triton X-100 and 0.1% Tween20 for 60 min. Blocking buffer was aspirated and cells were washed three times with PBST. Staining was conducted using a rabbit  $\alpha$ -Tubulin antibody (11H10, 1:500, Cell Signaling, Danvers, MA) and murine mAbs against CD3 (clone OKT3, 1:25, Biolegend, San Diego, CA), CD16 (clone #1001049, 1:25, R&D systems, Minneapolis, MN) or Perforin (clone  $\delta$ g9, 1:250, BD Pharmingen, Heidelberg, Germany) (overnight at 4°C), followed by a Alexa-Fluor 488 labeled anti-mouse (1:500) and Alexa-Fluor 594 labeled anti-rabbit (1:500) antibody (both Invitrogen). For staining of actin, fluorescein conjugated Phalloidin (1:1000, Abcam, Cambridge, Great Britain) was used according to manufacturer's instructions. Slides were mounted in fluorescent mounting medium; DAPI was used for counter-staining. Pictures were acquired using an Olympus BX63 microscope and a DP80 camera (Olympus, Shinjuku, Japan).

## Flow Cytometry

For studies on NKG2DL surface expression and NKG2D binding, cells were stained with respective unconjugated mAbs (10  $\mu$ g/mL) for single NKG2DL or the corresponding isotype controls as described previously (19) and biotinylated NKG2D-Fc (20  $\mu$ g/mL) or the corresponding isotype control as described previously (24) followed by a goat anti-mouse PE conjugate (Dako, Glostrup, Denmark) or a streptavidin-conjugated PE conjugate (LifeTechnologies, Carlsbad, CA), respectively.

PBMC subsets of sarcoma patients and healthy control donors were identified by counterstaining with CD3-APC/Fire750, CD4-Pacific Blue, CD8-BV605, CD14-BV785, CD16-APC, CD19-FITC, CD56-PeCy7 and HLA-DR-BV650 (BioLegend).

For studies on NK cell activation and degranulation, the fluorescently labeled mAbs CD69-PE and CD107a-PE (BD Pharmingen) as well as CD3-APC/Fire750, CD4-APC, CD8-FITC and CD56-PeCy7 or CD56-BV711 (BioLegend) were used. For Flow cytometric analysis of target cell lysis, sarcoma cells were loaded with 2.5  $\mu$ M CellTrace™ Violet cell proliferation dye (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and cultured with PBMC (E:T 2.5:1) in the presence or absence of the fusion proteins (2.5  $\mu$ g/mL). Standard calibration beads (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were used to ensure the analysis of equal assay volumes and therefore to account for the number of target cells that had vanished from the culture.

Dead cells were excluded from analysis by 7-AAD (BioLegend). Measurements were performed using a FACS Canto II or FACS Fortessa (BD Biosciences, San Diego, CA) and data analyzed using the software FlowJo V10 (FlowJo LCC, Ashland, OR).

## Analysis of NK and T Cell Activation and Degranulation

To determine the activation status of PBMC obtained from sarcoma patients and healthy donors in the absence of target cells, 7.5  $\mu$ g/mL anti-NKG2D mAb (6H7) was coated on 96-well

plates overnight and, after rinsing with PBS, followed by 2 h incubation with or without the NKG2D fusion proteins (10 µg/mL each). Subsequently, mAb solution was removed and  $5 \times 10^5$  PBMC were added, incubated for 24 h and analyzed by flow cytometry for CD69 expression.

To determine activation and degranulation in the presence of target cells, 200,000 sarcoma cells were cultured with allogenic PBMC of healthy donors (E:T ratio 2.5:1) for 4 h and 24 h, respectively. For analysis of degranulation after 4 h, CD107a-PE (1:25), BD GolgiStop and BD GolgiPlug (1:1000, both BD Biosciences) were added to the coculture of PBMC and sarcoma cells. Analysis was conducted using flow cytometry.

## Analysis of Cytokine Expression and Secretion

PBMC of healthy donors were cultured with sarcoma cells (E:T ratio 2.5:1) in the presence or absence of treatment (2.5 µg/mL). After 4 h, supernatants were harvested and secretion of IFN $\gamma$ , Granzyme A, Perforin and Granulysin was then analyzed using Legendplex assays (BioLegend). For analysis of cytokine expression, PBMC were treated as described above and cultured for 24 h. Monensin (GolgiStop, BD Biosciences) was added 12 h prior to flow cytometric analysis. Cells were stained using the Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD Biosciences). For detection of intracellular levels of IFN $\gamma$  (clone b27) and Perforin (clone dG9), fluorescence-conjugated antibodies (both from BioLegend) were used in 1:20 dilutions.

## Cytotoxicity Assays

Lysis of sarcoma cells by PBMC of healthy donors in the presence or absence of the fusion proteins (2.5 µg/mL) was assessed by 2 hour Europium based cytotoxicity assays as previously described (20). In brief, sarcoma cells were labeled with DELFIA<sup>®</sup> BATDA for 1 h (Perkin Elmer, Waltham, MA). After labeling, the cells were incubated with PBMC at the indicated E:T ratios. After incubation, 20 µl supernatant of each sample was mixed with 200 µl DELFIA<sup>®</sup> Europium solution (PerkinElmer). Subsequent, samples were measured using a VICTOR (Wallac Oy, Finland)

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). Sarcoma cells were cultured with PBMC of healthy donors (E:T ratio 5:1) with or without the indicated treatments (2.5 µg/mL each). Live cell imaging pictures were taken every 4 h with 10x magnification. To quantify living cells, confluences were normalized to the respective measurement at T=0 h.

## Statistics

If not indicated otherwise, values depict means  $\pm$  standard deviation (SD). For continuous variables student's t test, Mann-Whitney U test or one-way ANOVA was used. For statistical analysis, GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA) was used. All statistical tests were considered significant when *p* was below 0.05.

## RESULTS

### Characterization of NKG2DL Expression in Sarcoma Cells

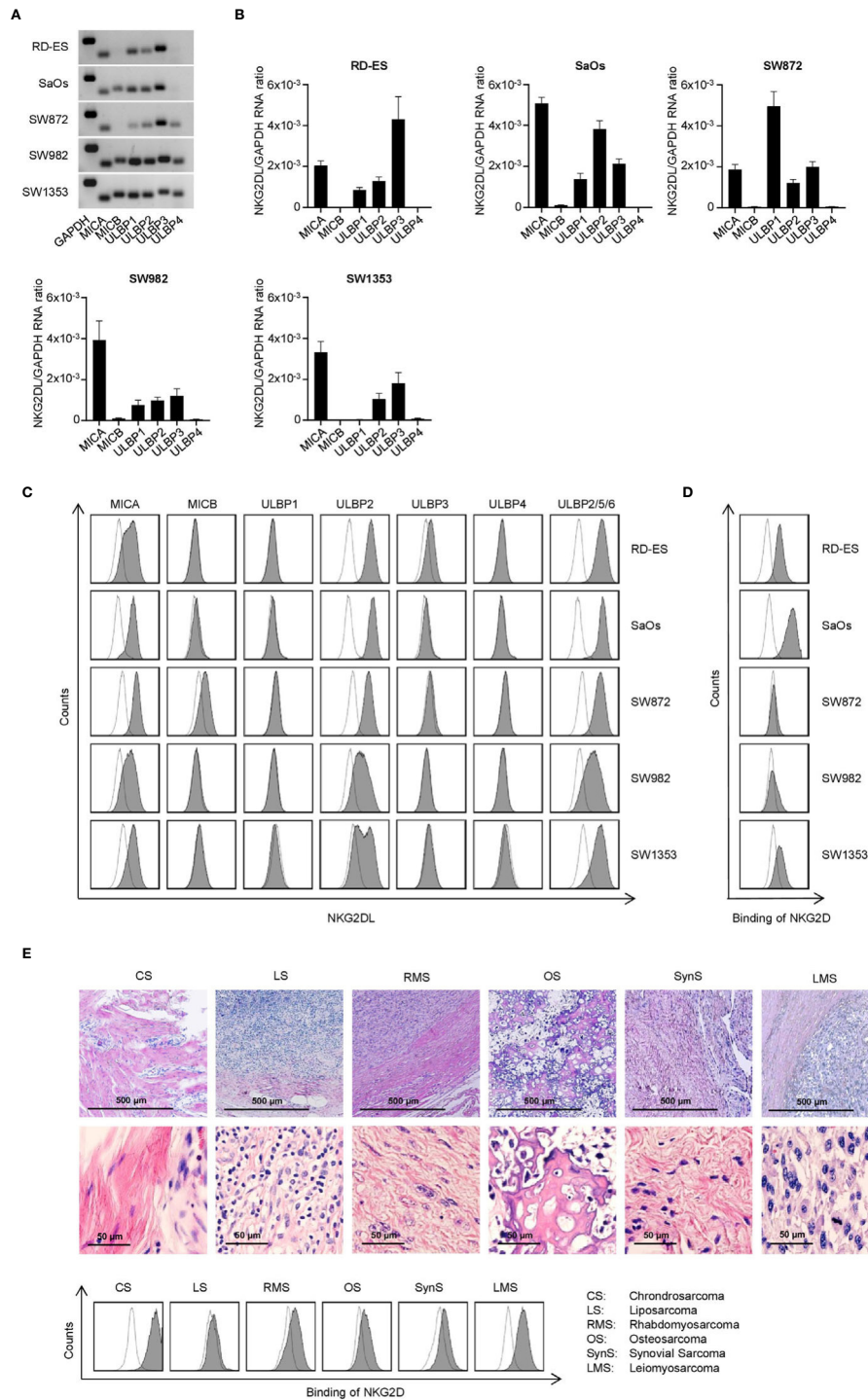
Since different subgroups of STS have been reported to express varying patterns of NKG2DL (22, 23), we initially characterized the NKG2DL mRNA expression in rhabdomyosarcoma (RD-ES), osteosarcoma (SaOs), liposarcoma (SW872), synovial sarcoma (SW982) and chondrosarcoma (SW1353) cell lines. This mRNA analysis confirmed expression of at least one NKG2DL with varying expression patterns in all tested STS cell lines (**Figures 2A, B**). Whereas MICA, ULBP2 and 3 mRNA levels were found to be broadly expressed in all STS cell lines, MICB and ULBP4 mRNA signatures were only detected to a very low amount.

Next we determined the surface protein expression using specific mAbs against MICA, MICB, and ULBP1-4. For analysis of the expression of ULBP5 and 6, an Ab recognizing both in combination with ULBP2 was used. The detectable levels on the surface of the cell lines did not directly mirror the mRNA expression levels detected upon PCR analysis, which is in line with the fact that NKG2DL expression underlies posttranslational regulation (27, 28). MICA and ULBP2 showed the highest prevalence as well as surface expression level among the tested cell lines, whereas ULBP1 and ULBP4 could not be detected (**Figure 2C**). Determination of NKG2DL surface levels using a NKG2D-Fc chimera for simultaneous analysis of all different NKG2DL showed different staining intensities between the cell lines (**Figure 2D**). Each single NKG2DL is characterized by a specific affinity for the NKG2D receptor (29), which results in varying intensities of mAb-based staining compared to the NKG2D-Fc fusion protein staining. Based on the results for NKG2DL expression, we chose the cell lines SaOs, RD-ES and SW1353 for further functional evaluation. In addition, we analyzed binding of NKG2D on 6 patient-derived sarcoma cells from 6 STS subgroups (**Table S2**). Patient-derived sarcoma cells were analyzed by flow cytometry after dissociation and an outgrowth culture from resected primary tumors. For identification of the tumor tissue sections, H&E stainings of paraffin-embedded tissue was performed additionally. The analysis revealed expression of NKG2DL to different extents with the NKG2D-Fc fusion protein and a mAb NKG2DL cocktail staining (**Figures 2E, S1**).

### Modulation of NK and T Cell Binding and Reactivity Against STS cells by NKG2D BFP

Next we analyzed the efficacy of NKG2D-CD16 and NKG2D-CD3 to mediate T and NK cell recruitment to the sarcoma cells. PBMC of healthy donors were incubated with RD-ES and SW1353 cells in the presence or absence of NKG2D-CD16 and NKG2D-CD3 BFP. Immune cell recruitment to STS was visually quantified *via* determination of co-localized effector and target cells per field of view (FoV). We observed a significant increase of CD16<sup>+</sup> cells interacting with sarcoma cells when treated with NKG2D-CD16 in three independent experiments and two different cell lines (RD-ES: *p*<0.0001, SW1353: *p*<0.0001, **Figures 3A, S2A**). A similar effect was observed for CD3<sup>+</sup> cells





**FIGURE 2** | Characterization of NKG2DL expression in STS cell lines. **(A)** MICA, MICB and ULBP1-4 mRNA expression was determined via RT-PCR with GAPDH serving as control. PCR products were visualized by agarose gel electrophoresis. **(B)** Relative mRNA expression of MICA, MICB and ULBP1-4 in five different STS cell lines was determined as described in the method section. Results for n=3 experiments are shown. **(C)** Surface expression of MICA, MICB, ULBP1-4 and ULBP2/5/6 on the indicated cell lines was analyzed by flow cytometry. mAb against the depicted NKG2DL are shown as shaded peaks, corresponding isotype controls are shown as open peaks. **(D)** Binding of NKG2D to the surface of sarcoma cell lines was analyzed by flow cytometry using an NKG2D-Fc-chimera (shaded peaks) and the corresponding isotype control (open peaks). **(E)** H&E staining of paraffin-embedded tissue sections from primary sarcoma tissue was performed (upper panel). Patient-derived sarcoma cells dissociated from the primary tumor were analyzed by flow cytometry using a biotinylated NKG2D-Fc-chimera (shaded peaks) and the corresponding isotype control (open peaks) followed by strep PE.

when RD-ES and SW1353 cells were co-incubated with PBMC and NKG2D-CD3 (RD-ES:  $p < 0.0001$ , SW1353:  $p < 0.0001$ , **Figures 3B, S2B**), confirming enhanced recruitment of NK and T cells upon treatment with the respective BFP.

Next we characterized the potential of our constructs to induce effector cell reactivity against sarcoma cells. To this end, PBMC of healthy donors were cultured with SW1353, RD-ES or SaOs cells in the presence or absence of BFP. Flow cytometry analysis of CD69 on NK and T cells revealed that both constructs significantly induced activation upon treatment with NKG2D-CD16 and NKG2D-CD3, respectively (NK cells:  $p = 0.009$ , CD4:  $p = 0.0001$ , CD8:  $p = 0.0009$ , **Figure 4A**). In line, determination of CD107a upregulation confirmed that NKG2D-CD16 and NKG2D-CD3 potently induced degranulation of NK and T cells, respectively (NK cells:  $p < 0.0001$ , CD4:  $p < 0.0001$ , CD8:  $p < 0.0001$ , **Figure 4B**). Additional analysis of supernatants by Legendplex assays showed a significant increase in IFN $\gamma$  secretion after treatment with NKG2D-CD3, while secretion of Perforin was profoundly increased in supernatants of NKG2D-CD16 treated cells. Furthermore there was a tendency to increased Granzyme A and Granulysin secretion after NKG2D-CD16 treatment (**Figure 4C**). To determine induction of Perforin and IFN $\gamma$  by treatment with the BFP, we analyzed the effector cells using intracellular flow cytometry. Expression of Perforin was significantly increased in both CD4 $^+$  and CD8 $^+$  T cells (**Figure 4D**). IFN $\gamma$  expression was potently induced in CD8 $^+$  T cells with only marginal effects for CD4 $^+$  T cells (**Figure 4E**). NK cells constitutively contained large amounts of Perforin and IFN $\gamma$  (**Figure S3**). In addition to Perforin detection *via* Legendplex assay and intracellular flow cytometric staining, we performed immunofluorescence staining of Perforin in CD16 $^+$  and CD3 $^+$  effector cells. Interestingly, a bright staining for Perforin could be detected after 1 h and 3 h of treatment with NKG2D-CD16 and NKG2D-CD3, respectively (**Figures 4F, S4**).

## Subpopulations of PBMC and Modulation of NK and T Cell Reactivity in Advanced STS Patients

To determine whether there are disease and treatment-associated alterations in the immune cell subsets of sarcoma patients that could impair treatment efficacy of our BFP, we comparatively analyzed PBMC of healthy donors (HD) and sarcoma patients (STS). Of note, during sample generation all tested STS patients were treated with intense neo- or adjuvant cytotoxic chemotherapy. Specific details on treatment regimens of all STS patients are given in **Table 1** and **Table S3**. In our pretreated STS cohort we observed normal counts for leukocytes, neutrophils and monocytes (**Figure 5A**). Due to the chronic treatment-related toxicity we detected slightly decreased total numbers of lymphocytes. To further examine distribution of the main PBMC subsets including B cells (CD19 $^+$ ), Monocytes (CD14 $^+$ ), Dendritic cells (DCs) (HLA-DR $^+$ ), NK cells (CD3 $^+$ CD56 $^+$ ) and T cells (CD3 $^+$ CD4 $^+$  and CD3 $^+$ CD8 $^+$ ), we performed flow cytometric analyses. Compared to healthy donors, we observed a treatment-related decrease of B and T cells (**Figures 5B, F**). In case of T cells, the

CD8 $^+$  subset was less affected than the CD4 $^+$  subset (**Figure 5F**). The proportion of DCs was similar in the two cohorts (**Figure 5D**). In contrast, increased levels of Monocytes and NK cells were observed in the STS cohort (**Figures 5C, E**). A more detailed analysis of NK cell subsets revealed that in particular the proportion of the CD56 $^{\text{dim}}$ CD16 $^+$  subset was increased (**Figure S5**).

To determine whether NKG2D-CD3 and NKG2D-CD16 could stimulate effector cells of pretreated STS patients in a similar manner as in healthy donors, we employed an experimental setting independent of target cell binding. To this end, PBMC of 5 healthy donors and 4 STS patients were cultured on the immobilized BFP for 24 h and analyzed for CD69 expression by flow cytometry. Although NK cells of STS patients showed slightly decreased CD69 expression after treatment with NKG2D-CD16 compared to healthy donors (**Figure 5F**), this trend did not reach statistical significance ( $p = 0.15$ ). Upon treatment with NKG2D-CD3, T cells of STS patients showed slightly higher CD69 expression levels than healthy donors (**Figure 5G**).

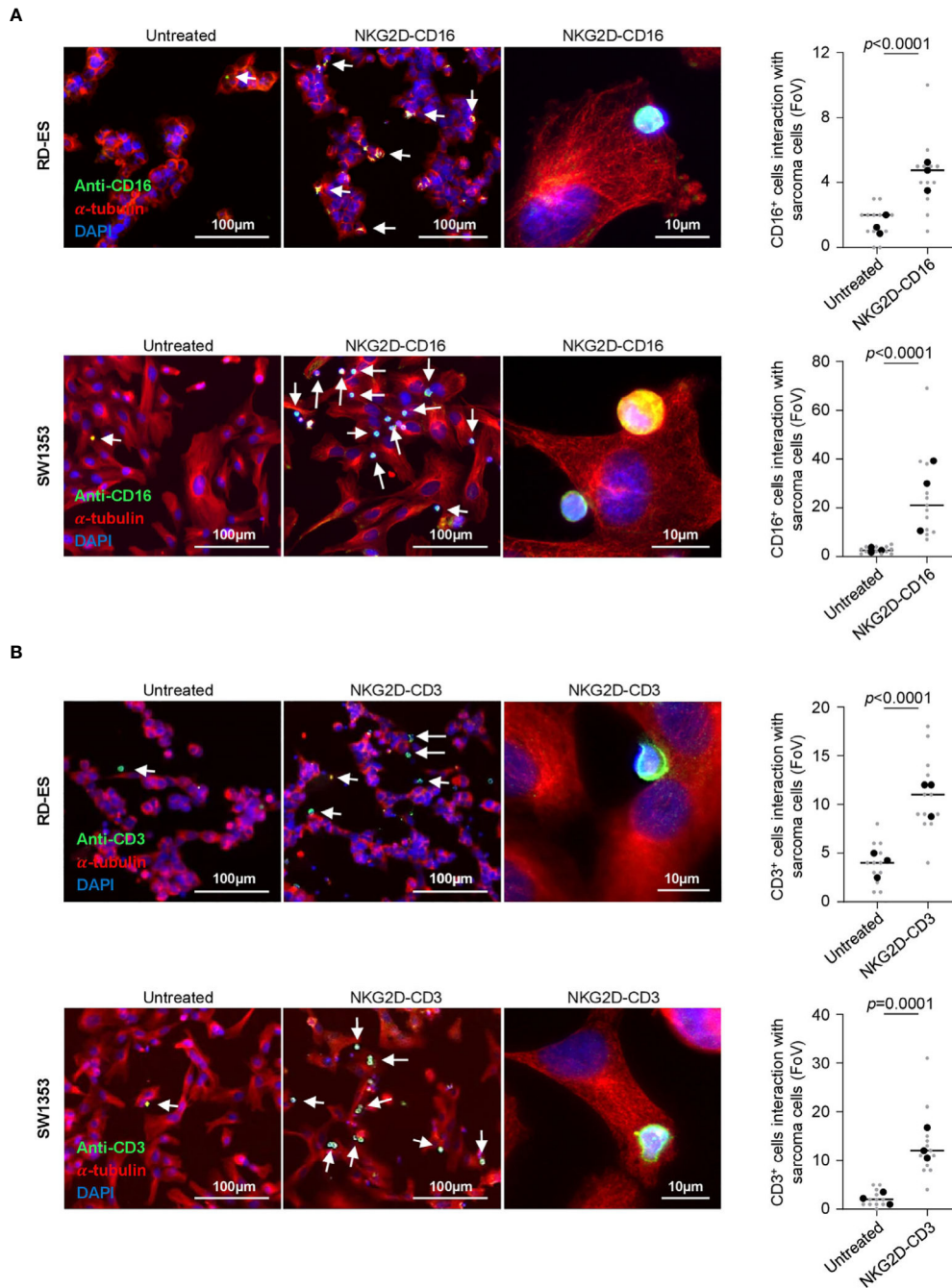
Further, the cytotoxic capacity of PBMC from STS patients was analyzed by co-culturing of PBMC from STS patients and healthy donors with sarcoma cells (RD-ES, SaOs, and SW1353) in the presence of NKG2D-CD3/CD16 for 24 h followed by intracellular staining for Perforin and IFN $\gamma$ . No difference between healthy donors and STS patients NK and T cells with regard to Perforin expression was observed (**Figure 5H**). In contrast, STS patients exhibit significantly increased IFN $\gamma$  positive NK cells after treatment with BFP, while comparable IFN $\gamma$  induction was observed for T cells (**Figure 5I**).

## Induction of Target Cell Lysis by NKG2D Fusion Proteins

Finally, we analyzed whether effector cell activation was mirrored by a lysis of tumor targets. As NKG2D-CD3 and NKG2D-CD16 stimulate T cells and NK cells which differ with regard to efficacy of effector function over time, we performed cytotoxicity assays after various incubation times using different suitable experimental systems. Europium based short-term cytotoxicity assays showed a potent target cell lysis by treatment with NKG2D-CD16 after 2 h, whereas no significant effect was observed with NKG2D-CD3 (**Figures 6A, S6A**). After 72 h, flow cytometry based lysis assays (**Figures 6B, S6B**) revealed profoundly stronger effects with NKG2D-CD3. The finding that the lysis capacity of NKG2D-CD3 occurs at later time points and then surpasses the effects of NKG2D-CD16 was also confirmed by live cell imaging over an incubation period of 136 h (**Figure 6C**).

## DISCUSSION

Although therapeutic options in solid tumors have increased over the recent years, treatment of STS remains still challenging. The complex tumor biology and clinical heterogeneity in STS further complicates the establishment of standardized, efficient

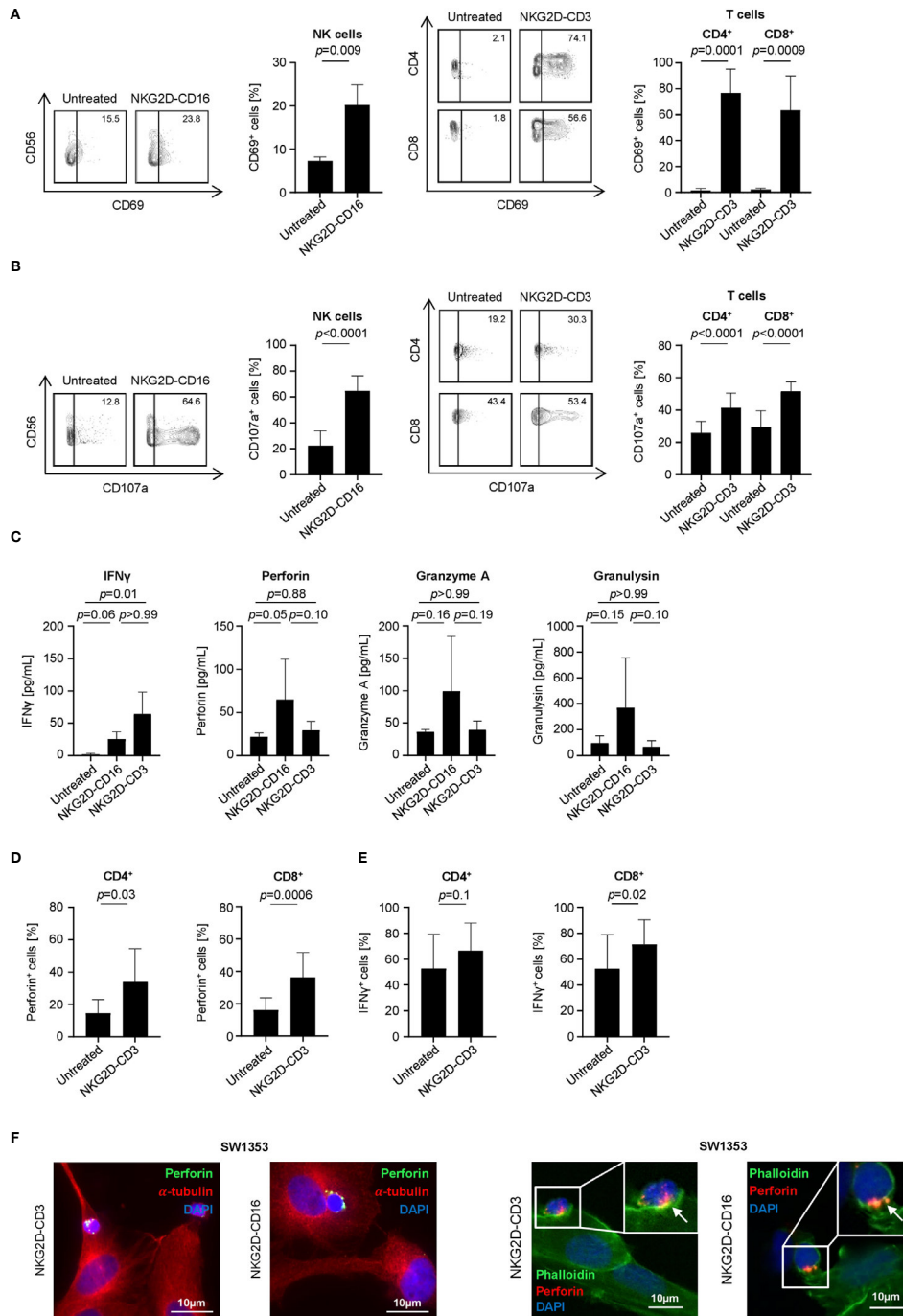


**FIGURE 3 |** Recruitment of NK and T cells to tumor cells *via* binding of NKG2D-CD3/CD16. The Indicated sarcoma cell lines were cultivated with PBMC of healthy donors (E:T 2.5:1) in the presence or absence of NKG2D-CD3/CD16 (2.5  $\mu$ g/ml) and subsequently stained for  $\alpha$ -Tubulin and (A) CD16 or (B) CD3. DAPI was used for counterstaining. Interaction of CD16<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> cells was quantified by counting triple positive cells located at sarcoma cells. Grey and black dots represent individual analysis per FoV (n=12) out of three independent experiments.

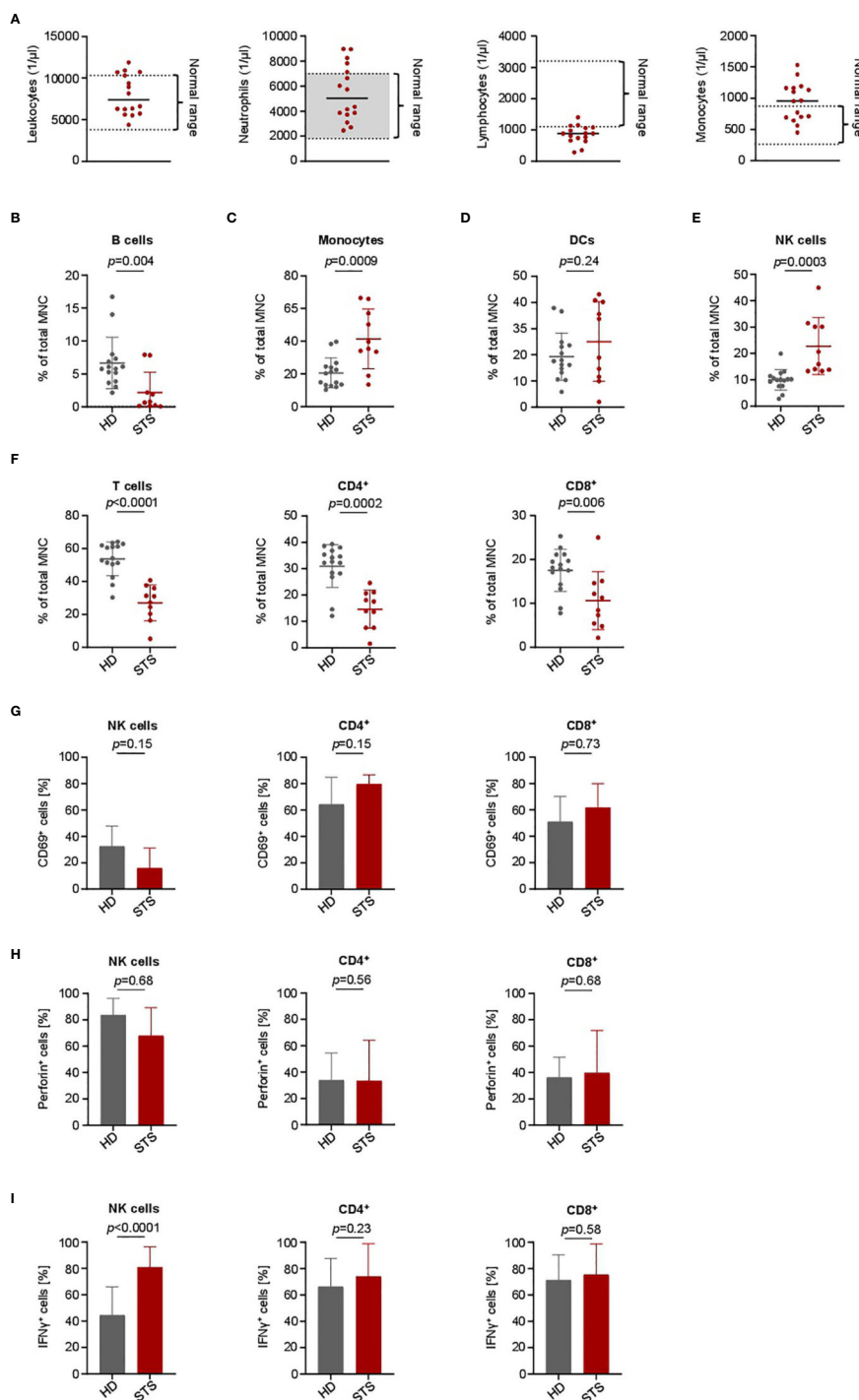
treatment concepts (1, 8). In advanced, unresectable or metastatic disease, multimodal high-dose chemotherapeutic agents are commonly used, however with only limited success (10). Accordingly, new therapeutic concepts are urgently needed.

The NKG2D receptor was initially described on human NK and T cells as mediating immune cell activation (30, 31). The

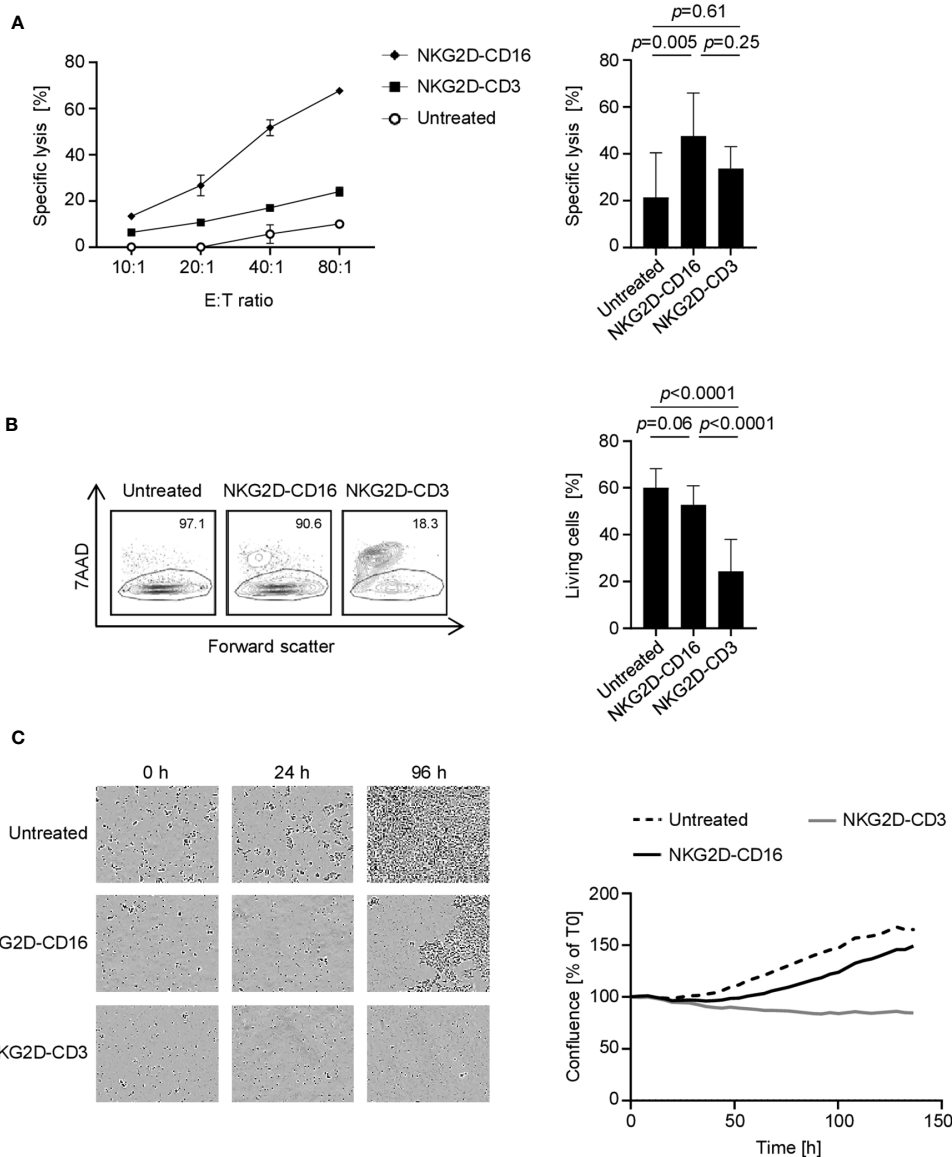
ligands of NKG2D include MICA, MICB and ULBP1-6 (32, 33) and are upregulated in multiple tumor entities like acute myeloid leukemia, ovarian-, breast-, lung-cancer, melanoma, glioma and STS (17). Since NKG2DL show a high potential to stimulate immune cells *via* NKG2D and are mainly absent in healthy tissues, multiple treatment approaches modulating the NKG2D



**FIGURE 4** | Induction of NK and T cell reactivity by NKG2D-CD16/CD3 against sarcoma cells. PBMC of healthy donors were cultured with or without sarcoma cells at an E:T ratio of 2.5:1 in the presence or absence of NKG2D-CD16/CD3 (2.5  $\mu$ g/mL). **(A)** Activation of NK cells and CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells was determined by expression of CD69 after 24 h. In the left panels exemplary flow cytometry results obtained with SaOs and in the right panel combined data with sarcoma cell lines SaOs, RD-ES and SW1353 and with PBMC of 4 different donors are shown. **(B)** Degranulation of NK cells and CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells was determined by expression of CD107a after 4 h. In the left panels exemplary flow cytometry results obtained with SaOs and in the right panel combined data with sarcoma cell lines SaOs, RD-ES and SW1353 and with PBMC of four independent donors are shown. **(C)** Supernatants were analyzed for IFN $\gamma$ , Granzyme A, Perforin and Granulysin after 4 h by Legendplex assays. Shown are pooled results with sarcoma cell lines SaOs, RD-ES and SW1353 and with PBMC of two independent donors. **(D, E)** Intracellular expression of Perforin **(D)** and IFN $\gamma$  **(E)** was analyzed after 24 h by flow cytometry. **(F)** Immunofluorescent staining was performed after 1 h (for NKG2D-CD16 treatment) and 3 h (for NKG2D-CD3 treatment). In the left panels, cells were stained for  $\alpha$ -Tubulin (red) and the granular marker Perforin (green). In the right panels, cells were stained for actin with Phalloidin (green) and perforin (red).



**FIGURE 5** | Immune cell characterization and lymphocyte activation capacity in advanced STS patients and healthy donors. PBMC were collected from healthy donors (HD) and patients with advanced STS (STS). **(A)** Immune cell counts for leukocytes, neutrophils, lymphocytes and monocytes at time point of PBMC collection is shown ( $n=16$ ). **(B–F)** Indicated cell types were identified by counterstaining of PBMC from HD ( $n=13$ ) and from STS patients ( $n=10$ ) for CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD56 and HLA-DR and subsequently analyzed by flow cytometry and displayed as percentage of mononuclear cells (MNC). **(G)** To analyze the effector capacity of STS patient effector cells, bispecific NKG2D-CD16/CD3 fusion proteins were immobilized to plastic as described in the methods section and incubated with PBMC of healthy donors ( $n=5$ ) or sarcoma patients ( $n=4$ ). Expression of CD69 as marker for activation was determined after 24 h using flow cytometry. Percentage of CD69 positive NK cells after treatment with NKG2D-16 and percentage of CD69 positive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells after treatment with NKG2D-CD3 are shown. **(H, I)** PBMC from HD ( $n=6$ ) and STS patients ( $n=5$ ) were cultured with sarcoma cells (SaOs, RD-ES and SW1353) and treated with NKG2D-CD16/CD3 (2.5  $\mu$ g/ml) for 24 h. Intracellular Perforin (h) and IFN $\gamma$  (I) expression was analyzed by flow cytometry for CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and NK cells.



**FIGURE 6** | Induction of target cell lysis by NKG2D-CD16/NKG2D-CD3. PBMC of healthy donors ( $n=4$ ) were incubated with different sarcoma cell lines and treated with the indicated constructs ( $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). **(A)** Lysis of sarcoma cell lines SaOs, RD-ES and SW1353 ( $n=3$ ) was analyzed by 2 h Europium cytotoxicity assays. On the left, exemplary data obtained with SaOs with different E:T ratios and on the right pooled data obtained with PBMC of healthy donors at an E:T ratio of 40:1 are shown. **(B)** Lysis of sarcoma cell lines SaOs, RD-ES and SW1353 ( $n=3$ ) was determined by flow cytometry based lysis assay (E:T 2.5:1) using PBMC of healthy donors. In the left panel, exemplary dot plots with SW1353 and one PBMC donor are shown; the right panel depicts pooled data. **(C)** Cell death of sarcoma cells was determined using a live cell imaging system. Cells were incubated with PBMC of healthy donors at an E:T ratio of 5:1 for 136 h. In the left panel, representative pictures at 0, 24, and 96 h are displayed. In the right panel, pooled data with two different cell lines are shown.

system in cancer have been investigated so far (17). Interestingly, expression of several NKG2DL like ULBP1-4 has been identified as negative prognostic marker in STS (18). Recent data have already investigated the potential of NKG2D expressing NK cells to mediate anti-sarcoma responses. However, NKG2D expression was found to be low in both, peripheral and tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) like NK cells (18). As a result, genetically modified NK-92 cells over-expressing NKG2D were utilized and showed profound cytotoxicity (18). To overcome the

elaborative work required for NK cell generation, in our study we used a novel NKG2D-CD16 BFP to target STS cells. Remarkably, we observed a highly effective tumor cell lysis using NKG2D-CD16 BFP. Since NK cell subpopulations are commonly detected in the TME of STS patients, our preclinical therapeutic approach appears particularly promising (11). Even more important, NKG2D-CD16 overcomes several drawbacks of mAbs with conventional Fc-parts like binding to inhibitory Fc $\gamma$ R, which may decrease immunostimulatory potential, or Fc $\gamma$ R expressed

on non-cytotoxic cells (e.g., platelets and B cells) and Fc $\gamma$ R that do not trigger cytotoxicity (e.g. CD16b on granulocytes). Furthermore, NK cell activation is not dependent on the NKG2D receptor which is advantageous, as NKG2D on NK cells can be downregulated in case of sustained activation *via* NKG2DL from tumor cells or other external inhibitory signals (33, 34).

Besides NK cells, cytotoxic T cells play an important role in tumor immunosurveillance (35, 36). Accordingly, we additionally investigated NKG2D-CD3 BFP in STS. Similar to NKG2D-CD16, our NKG2D-CD3 construct showed a profound anti-sarcoma activity as revealed by T cell activation, degranulation, IFN $\gamma$  and Perforin secretion as well as target cell lysis. Our NKG2D-CD3 construct showed similar enhanced activation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. Since CD4<sup>+</sup> T cells play an important role in tumor immunity *via* promoting CD8<sup>+</sup> T cell expansion, generating CD8<sup>+</sup> T cell memory and priming (37–39) the dual activation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells might support anti-tumor efficiency.

When comparing the therapeutic potential of NKG2D-CD16 and NKG2D-CD3 in STS, it is important to note that NKG2D-CD16 showed most potent cytotoxicity after short time points. In contrast, NKG2D-CD3 required longer times to reveal maximum anti-tumor activity. Killing efficiency was more pronounced in T cells stimulated by NKG2D-CD3 compared to NK cells stimulated *via* NKG2D-CD16. This might reflect the finding that NKG2D-CD3 can induce T cell proliferation. NK cell proliferation however, was not observed after activation *via* NKG2D-CD16 (21).

It should be noted that treatment efficiency of our therapeutic approach might depend on the expression pattern of NKG2DL on tumor cells. This is reflected by the different binding capacity of NKG2D in our tested STS cell lines. The binding affinity of NKG2D to its repertoire of ligands varies from 10<sup>-6</sup> to 10<sup>-9</sup> mol/L (40). Since some NKG2DL only share approximately 25% amino acid homology, this might reflect an “adaptive fit” mechanism (40). In addition, allelic variants of some NKG2DL like MICA show large differences in NKG2D binding, which may affect their efficacy in triggering NK and T cell reactivity (33). Furthermore it has been reported that glycosylation of MICA enhanced complex formation with NKG2D (33). This might reflect our finding that STS cell lines used in this study showed different binding of NKG2D. Nevertheless, treatment strategies which target NKG2DL on tumor cells are promising, as revealed by results obtained e.g. by targeting NKG2D-L with chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells (NKR-2) (NCT03018405), (CYAD-02) (NCT04167696). Other promising constructs which utilize the extracellular domain of NKG2D to target NKG2DL expressed on various tumors are NKG2DL-targeted Bispecific T-cell Engagers (NKG2D-BiTE) (41–43).

On a clinical background, one might speculate that lower NK cell activation *via* NKG2D-CD16 correlates with lower rates of cytokine-release dependent side effects. As a result, NKG2D-CD16 might be promising in older STS patients, which would not stand the sequelae of massive immediate immune activation. Our finding that PBMCs from STS patients receiving poly-

chemotherapy showed profound NK and T cell activation after stimulation with NKG2D-CD16 indicates that combinatorial therapy might be promising. Due to their high anti-tumor efficiency, NKG2D-CD3 BFP in turn might be effective as an adjuvant mono- or combination therapy. Similar to preliminary data on the combination of anti-PD1 and CAR-T cell therapy or bispecific antibodies, a combined immunotherapy could be conceivable for NKG2D-CD3 BFP treatment (44, 45). However, further data are needed to fully elucidate the bioavailability of our NKG2D BFP in the sarcoma TME in a clinical setting. For bispecific antibodies it is known that a PSMAXCD3 antibody applied *in vivo* penetrates tumor tissue, specifically localizes at the tumor site and attracts immune effector cells (46).

In conclusion, NKG2D-CD16 and NKG2D-CD3 BFP showed powerful anti-sarcoma effects in a preclinical setting. Of note, our treatment approach was not restricted to a distinct STS entity, as different sarcoma cell lines including osteosarcoma, rhabdomyosarcoma and chondrosarcoma were sensitive to treatment with both types of BFP. Moreover, we observed that even if total account of lymphocytes in the peripheral blood is decreased, NK and T cell activation *in vitro* was not significantly affected in STS patients receiving intense treatment. Even if further work is needed to fully characterize the potential of our constructs, the data presented in this study highlight the potential of BFP targeting NKG2DL in STS.

## 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 study was approved by IRB (ethics committee of the Faculty of Medicine of the Eberhard Karls Universitaet Tuebingen and of the University Hospital Tuebingen) and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki; reference number 13/2007V and 612/2010BO2. Human material was collected after the patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

IH and ML designed and performed the experiments, analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript. MS and JH collected patient samples and provided clinical data. EM, YZ, and KC designed and performed experiments. H-GK and GJ provided patient samples/reagents and contributed to the study design. HS contributed to the study design, critically revised the manuscript, and supervised the study. MM contributed to the study design, provided important advice, and critically revised the manuscript. CH collected clinical samples and provided

patient data, contributed to the study design, wrote the manuscript, and supervised the study. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

This work was supported by fortune junior grant (2478-0-0) as well as grants from DFG (SA1360/7-3), Germany's Excellence Strategy (EXC 2180/1), Wilhelm Sander-Stiftung (2007.115.3), and Deutsche Krebshilfe (111828, 111134, 70112914). We acknowledge support by Deutsche Forschungsgemeinschaft and Open Access Publishing Fund of University of Tübingen.

## REFERENCES

- Clark MA, Fisher C, Judson I, Thomas JM. Soft-tissue sarcomas in adults. *N Engl J Med* (2005) 353(7):701–11. doi: 10.1056/NEJMra041866
- Hoang NT, Acevedo LA, Mann MJ, Tolani B. A review of soft-tissue sarcomas: translation of biological advances into treatment measures. *Cancer Manag Res* (2018) 10:1089–114. doi: 10.2147/cmar.S159641
- Schaefer IM, Cote GM, Hornick JL. Contemporary Sarcoma Diagnosis, Genetics, and Genomics. *J Clin Oncol* (2018) 36(2):101–10. doi: 10.1200/jco.2017.74.9374
- Barretina J, Taylor BS, Banerji S, Ramos AH, Lagos-Quintana M, Decarolis PL, et al. Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. *Nat Genet* (2010) 42(8):715–21. doi: 10.1038/ng.619
- Movva S, Wen W, Chen W, Millis SZ, Gatalica Z, Reddy S, et al. Multi-platform profiling of over 2000 sarcomas: identification of biomarkers and novel therapeutic targets. *Oncotarget* (2015) 6(14):12234–47. doi: 10.18632/oncotarget.3498
- Shern JF, Chen L, Chmielecki J, Wei JS, Patidar R, Rosenberg M, et al. Comprehensive genomic analysis of rhabdomyosarcoma reveals a landscape of alterations affecting a common genetic axis in fusion-positive and fusion-negative tumors. *Cancer Discovery* (2014) 4(2):216–31. doi: 10.1158/2159-8290.Cd-13-0639
- Nacev BA, Jones KB, Intlekofer AM, Yu JSE, Allis CD, Tap WD, et al. The epigenomics of sarcoma. *Nat Rev Cancer* (2020) 20(10):608–23. doi: 10.1038/s41568-020-0288-4
- In GK, Hu JS, Tseng WW. Treatment of advanced, metastatic soft tissue sarcoma: latest evidence and clinical considerations. *Ther Adv Med Oncol* (2017) 9(8):533–50. doi: 10.1177/1758834017712963
- 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(1):78. doi: 10.1186/s12916-017-0831-7
- Tap WD, Papai Z, Van Tine BA, Attia S, Ganjoo KN, Jones RL, et al. Doxorubicin plus evofosfamide versus doxorubicin alone in locally advanced, unresectable or metastatic soft-tissue sarcoma (TH CR-406/SARC021): an international, multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* (2017) 18(8):1089–103. doi: 10.1016/s1470-2045(17)30381-9
- Grünwald 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(11):e11131. doi: 10.15252/emmm.201911131
- Ayodele O, Razak ARA. Immunotherapy in soft-tissue sarcoma. *Curr Oncol* (2020) 27(Suppl 1):17–23. doi: 10.3747/co.27.5407
- Martin-Broto J, Hindi N, Grignani G, Martinez-Trufero J, Redondo A, Valverde C, et al. Nivolumab and sunitinib combination in advanced soft tissue sarcomas: a multicenter, single-arm, phase Ib/II trial. *J Immunother Cancer* (2020) 8(2). doi: 10.1136/jitc-2020-001561
- Lee A, Huang P, DeMatteo RP, Pollack SM. Immunotherapy for Soft Tissue Sarcoma: Tomorrow Is Only a Day Away. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* (2016) 35:281–90. doi: 10.1200/edbk\_157439

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Michael Beller for excellent technical assistance. Flow cytometry sample acquisition was performed on shared instruments of the Flow Cytometry Core Facility Tuebingen.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.653081/full#supplementary-material>

- Müller D, Kontermann RE. Bispecific antibodies for cancer immunotherapy: Current perspectives. *BioDrugs* (2010) 24(2):89–98. doi: 10.2165/11530960-000000000-00000
- Liu H, Wang S, Xin J, Wang J, Yao C, Zhang Z. Role of NKG2D and its ligands in cancer immunotherapy. *Am J Cancer Res* (2019) 9(10):2064–78.
- Spear P, Wu MR, Sentman ML, Sentman CL. NKG2D ligands as therapeutic targets. *Cancer Immun* (2013) 13:8.
- Sayitoglu EC, Georgoudaki AM, Chrobok M, Ozkazanc D, Josey BJ, Arif M, et al. Boosting Natural Killer Cell-Mediated Targeting of Sarcoma Through DNAM-1 and NKG2D. *Front Immunol* (2020) 11:40:40. doi: 10.3389/fimmu.2020.00040
- 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(8):4261–72. doi: 10.4049/jimmunol.1400872
- Steinbacher J, Baltz-Ghahremanpour K, Schmiedel BJ, Steinle A, Jung G, Kubler A, et al. An Fc-optimized NKG2D-immunoglobulin G fusion protein for induction of natural killer cell reactivity against leukemia. *Int J Cancer* (2015) 136(5):1073–84. doi: 10.1002/ijc.29083
- Marklin M, Hagelstein I, Koerner SP, Rothfelder K, Pflueger 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(1):143. doi: 10.1186/s40425-019-0606-0
- Fernandez L, Valentin J, Zalacain M, Leung W, Patino-Garcia A, Perez-Martinez A. Activated and expanded natural killer cells target osteosarcoma tumor initiating cells in an NKG2D-NKG2DL dependent manner. *Cancer Lett* (2015) 368(1):54–63. doi: 10.1016/j.canlet.2015.07.042
- Lehner M, Gotz G, Proff J, Schaft N, Dorrie J, Full F, et al. Redirecting T cells to Ewing's sarcoma family of tumors by a chimeric NKG2D receptor expressed by lentiviral transduction or mRNA transfection. *PLoS One* (2012) 7(2):e31210. doi: 10.1371/journal.pone.0031210
- Paczulla AM, Rothfelder K, Raffel S, Konantz M, Steinbacher J, Wang H, et al. Absence of NKG2D ligands defines leukaemia stem cells and mediates their immune evasion. *Nature* (2019) 572(7768):254–9. doi: 10.1038/s41586-019-1410-1
- Rothfelder K, Hagelstein I, Roerden M, Blumenstock G, Hofmann M, Nuebling T, et al. Expression of the Immune Checkpoint Modulator OX40 in Acute Lymphoblastic Leukemia Is Associated with BCR-ABL Positivity. *Neoplasia* (2018) 20(11):1150–60. doi: 10.1016/j.neo.2018.09.005
- Schmiedel BJ, Nuebling T, Steinbacher J, Malinowska A, Wende CM, Azuma M, et al. Receptor Activator for NF-kappaB Ligand in Acute Myeloid Leukemia: Expression, Function, and Modulation of NK Cell Immunosurveillance. *J Immunol* (2013) 190(2):821–31. doi: 10.4049/jimmunol.1201792
- Stern-Ginossar N, Mandelboim O. An integrated view of the regulation of NKG2D ligands. *Immunology* (2009) 128(1):1–6. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03147.x
- Zingoni A, Molfetta R, Fionda C, Soriani A, Paolini R, Cipitelli M, et al. NKG2D and Its Ligands: "One for All, All for One". *Front Immunol* (2018) 9:476. doi: 10.3389/fimmu.2018.00476



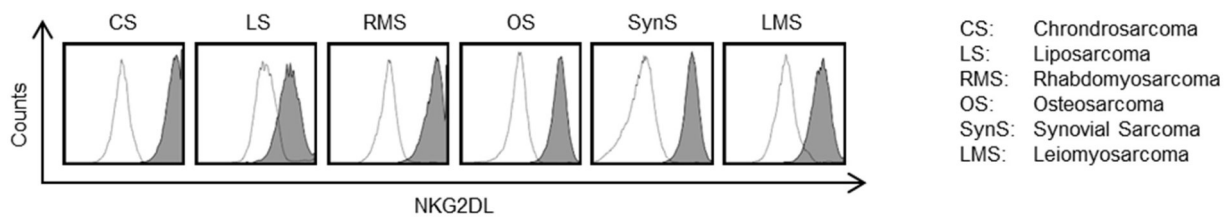
29. Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol* (2013) 31:413–41. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095951
30. Houchins JP, Yabe T, McSherry C, Bach FH. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* (1991) 173(4):1017–20. doi: 10.1084/jem.173.4.1017
31. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* (1999) 285(5428):727–9. doi: 10.1126/science.285.5428.727
32. Li P, Morris DL, Willcox BE, Steinle A, Spies T, Strong RK. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat Immunol* (2001) 2(5):443–51. doi: 10.1038/87757
33. Steinle A, Li P, Morris DL, Groh V, Lanier LL, Strong RK, et al. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* (2001) 53(4):279–87. doi: 10.1007/s002510100325
34. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* (2002) 419(6908):734–8. doi: 10.1038/nature01112
35. St Paul M, Ohashi PS. The Roles of CD8(+) T Cell Subsets in Antitumor Immunity. *Trends Cell Biol* (2020) 30(9):695–704. doi: 10.1016/j.tcb.2020.06.003
36. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* (2002) 3(11):991–8. doi: 10.1038/ni1102-991
37. Janssen EM, Droin NM, Lemmens EE, Pinkoski MJ, Bensinger SJ, Ehst BD, et al. CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* (2005) 434(7029):88–93. doi: 10.1038/nature03337
38. Masopust D, Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. The role of programming in memory T-cell development. *Curr Opin Immunol* (2004) 16(2):217–25. doi: 10.1016/j.coi.2004.02.005
39. Sun JC, Bevan MJ. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* (2003) 300(5617):339–42. doi: 10.1126/science.1083317
40. Li Y, Mariuzza RA. Structural basis for recognition of cellular and viral ligands by NK cell receptors. *Front Immunol* (2014) 5:123:123. doi: 10.3389/fimmu.2014.00123
41. Godbersen C, Coupet TA, Huehls AM, Zhang T, Battles MB, Fisher JL, et al. NKG2D Ligand-Targeted Bispecific T-Cell Engagers Lead to Robust Antitumor Activity against Diverse Human Tumors. *Mol Cancer Ther* (2017) 16(7):1335–46. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0846
42. Smits NC, Coupet TA, Godbersen C, Sentman CL. Designing multivalent proteins based on natural killer cell receptors and their ligands as immunotherapy for cancer. *Expert Opin Biol Ther* (2016) 16(9):1105–12. doi: 10.1080/14712598.2016.1195364
43. Smits NC, Sentman CL. Bispecific T-Cell Engagers (BiTEs) as Treatment of B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* (2016) 34(10):1131–3. doi: 10.1200/JCO.2015.64.9970
44. Ping Y, Li F, Nan S, Zhang D, Shi X, Shan J, et al. Augmenting the Effectiveness of CAR-T Cells by Enhanced Self-Delivery of PD-1-Neutralizing scFv. *Front Cell Dev Biol* (2020) 8:803:803. doi: 10.3389/fcell.2020.00803
45. Kobold S, Pantelyushin S, Rataj F, Vom Berg J. Rationale for Combining Bispecific T Cell Activating Antibodies With Checkpoint Blockade for Cancer Therapy. *Front Oncol* (2018) 8:285. doi: 10.3389/fonc.2018.00285
46. 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(2):e11902. doi: 10.15252/emmm.201911902

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Hagelstein, Lutz, Schmidt, Heitmann, Malenke, Zhou, Clar, Kopp, Jung, Salih, Märklin and Hinterleitner. 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.

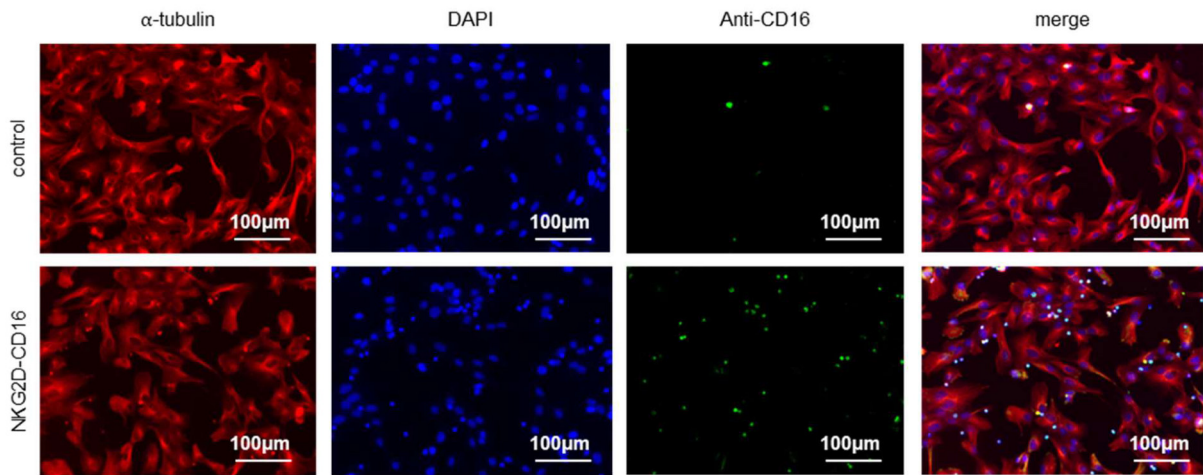
## Supplementary Material

### 1 Supplementary Figures

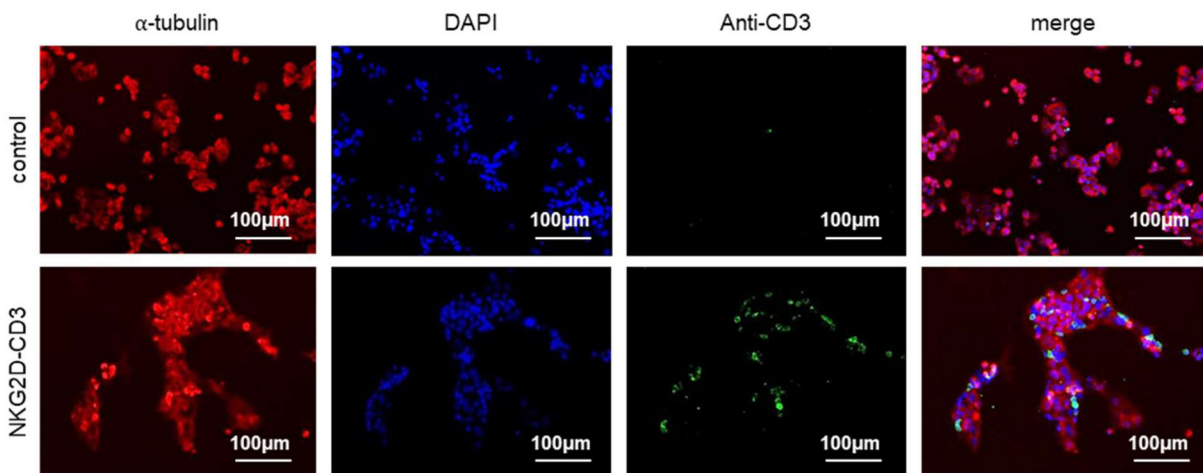


**Supplementary Figure 1** Surface expression of NKG2DL on the indicated patient-derived sarcoma cells was examined using an antibody cocktail containing antibodies against MICA, MICB, ULBP1-4 and ULBP2/5/6 by flow cytometry. mAb against the NKG2DL are shown as shaded peaks, corresponding isotype control is shown as open peaks.

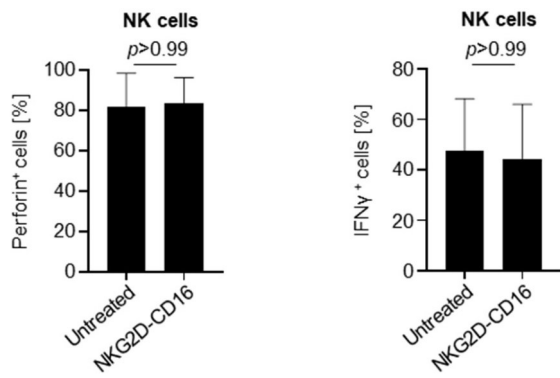
**a**



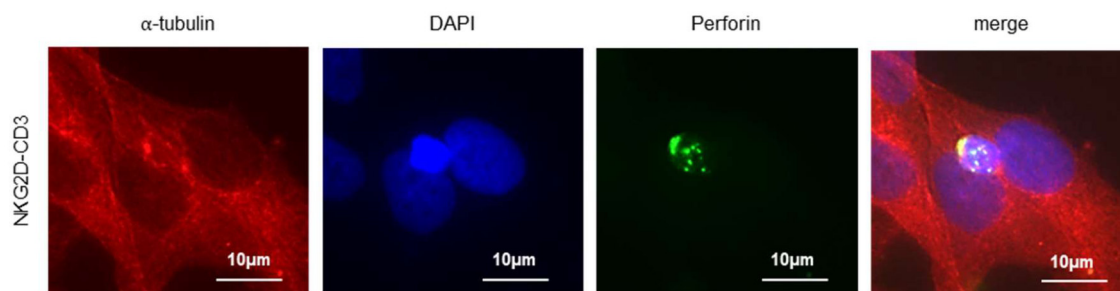
**b**



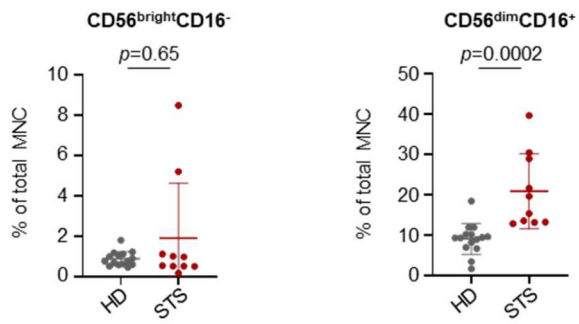
**Supplementary Figure 2** Sarcoma cell lines SW1353 and RD-ES were cultivated with PBMC of healthy donors (E:T 2.5:1) in the presence or absence of **a**: NKG2D-CD16 with SW1353 or **b**: NKG2D-CD3 (2.5  $\mu$ g/mL) with RD-ES for 45 min. After fixation, cells were stained for  $\alpha$ -tubulin (red; Alexa-633), DAPI (blue) and CD16 or CD3 (green; Alexa-488).



**Supplementary Figure 3** PBMC of healthy donors (n=6) were incubated with different sarcoma cell lines (RD-ES, SW1353, SaOs) and treated with the indicated constructs (2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 24 h. Intracellular Perforin and IFN $\gamma$  expression of NK cells was analyzed by flow cytometry.

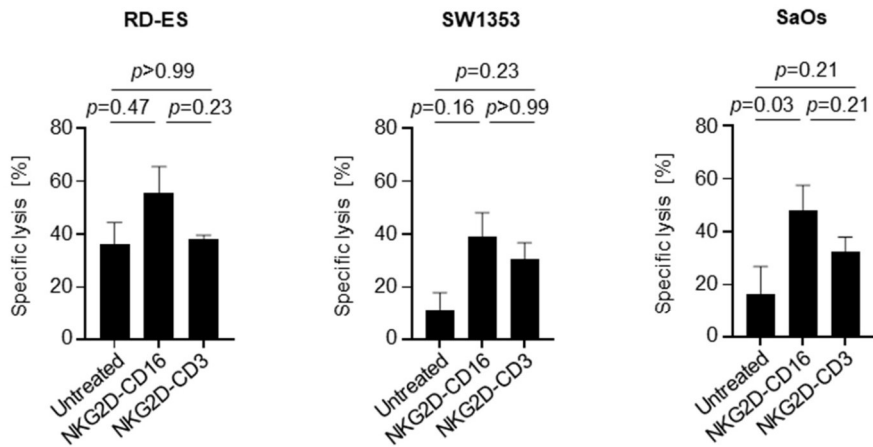


**Supplementary Figure 4** Sarcoma cells (SW1353) were cultivated with healthy PBMC (E:T 2.5:1) in the presence or absence of NKG2D-CD16/CD3 (2.5 μg/mL) for 1 h and 3 h, respectively. Cells were stained for α-Tubulin (red; Alexa-633), DAPI (blue) and the granular marker perforin (green; Alexa-488).

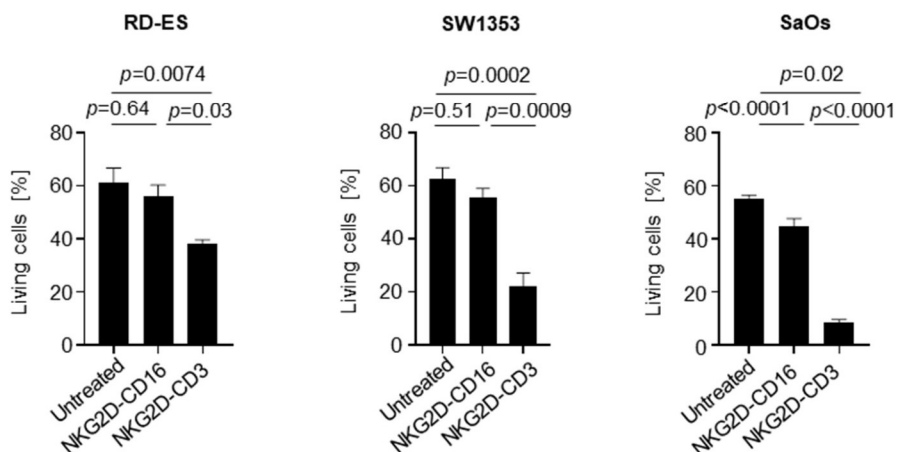


**Supplementary Figure 5** PBMC were collected from healthy donors (n=15) and patients with advanced STS (n=10). Indicated cell types were identified by counterstaining for CD3, CD56 and CD16.

**a**



**b**



**Supplementary Figure 6** PBMC of healthy donors (n=4) were incubated with different sarcoma cell lines and treated with the indicated constructs (2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). a: Lysis of sarcoma cell lines SaOS, RD-ES and SW1353 (n=3) was analyzed by 2 h Europium cytotoxicity assays. Exemplary data obtained with the indicated cell line and with different E:T ratios are shown. b: Lysis of sarcoma cell lines SaOS, RD-ES and SW1353 (n=3) was determined by flow cytometry based lysis assay (E:T 2.5:1) after 72 h using PBMC of healthy donors. Exemplary results with the indicated cell lines are shown.

## 2 Supplementary Tables

**Supplemental Table 1** Soft-tissue sarcoma (STS) cell lines

<b>Cell line</b>	<b>STS subtype</b>	<b>Karyotype</b>	<b>Known mutations</b>
SW982	Synovial sarcoma (SS)	hyperdiploid	BRAF p.V600E Het. CDKN2A p.0? Hom.
SW872	Liposarcoma (LS)	hypertriploid	BRAF p.V600E Het. CDKN2A p.R80 Hom. PTEN p.0? Hom. TP53 p.I251N Hom.
RD-ES	Rhabdomyosarcoma (RMS)	unstable	NRAS p.Q61H Hom. TP53 p.R248W Hom.
SW1353	Chondrosarcoma (CS)	hyperdiploid	nd
SaOs	Osteosarcoma (OS)	hypotriploid	TP53 p.0? Hom. Rb1 p.? Hom.



**Supplemental Table 2** List of sarcoma samples used in this study

<b>Patient sample</b>	<b>STS subtype</b>	<b>Gender</b>	<b>Age</b>	<b>Histopathological Grade (1-3)</b>
LMS	Leiomyosarcoma (LMS)	F	76	3
OS	Osteosarcoma (OS)	M	14	3
RMS	Rhabdomyosarcoma (RMS)	M	51	3
LS	Liposarcoma (LS)	F	58	1
CS	Chondrosarcoma (CS)	F	62	3
SynS	Synovial sarcoma (SynS)	M	76	3

**Supplemental Table 3** Treatment regimens of sarcoma patients

<b>Sarcoma patient</b>	<b>Treatment</b>
I	Anthracycline / platinum
II	Anthracycline / platinum
III	Anthracycline
VI	Vincaalcaloid / actinomycin
V	Vincaalcaloid / anthracycline / topoisomerase II inhibitor
VI	Anthracycline / platinum
VII	Anthracycline
VIII	Anthracycline / platinum
IX	Alkaloid (Trabectedin)
X	Alkylating agent / Purine analog (Dacarbazin)
XI	Vincaalcaloid / anthracycline / topoisomerase II inhibitor
XII	Anthracycline
XIII	Anthracycline / platinum
XIV	Anthracycline
XV	Alkaloid (Trabectedin)
XVI	Anthracycline

**Supplemental Table 4** Primer sequences

MICA	5'-GGCATCTTCCCTTTTGCAC-3'
	5'-GGACAGCACCGTGAGGTTAT-3'
MICB	5'-CTGAGAAGGTGGCGACGTA-3'
	5'-CGAAGACTGTGGGGCTCA-3'
ULBP1	5'-ACTGGGAACAAATGCTGGAT-3'
	5'-GAGAAGGCTCCAGGGACTG-3'
ULBP2	5'-CCGCTACCAAGATCCTTCTG-3'
	5'-GGGATGACGGTGATGTCATAG-3'
ULBP3	5'-TCCCTGGCATCTGAGAAGAG-3'
	5'-CAGAAAGGCACAGTGGTGAGT-3'
ULBP4	5'-AGCACTTGGGGAGAATTGAC-3'
	5'-CTTGCAGAGTGGAAGGATCAC-3'
GAPDH	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'
	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'



## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Christian Klein,  
Roche Innovation Center Zurich,  
Switzerland

## REVIEWED BY

Robert J. Canter,  
University of California, Davis,  
United States  
Bob Valamehr,  
Fate Therapeutics, United States

## \*CORRESPONDENCE

Helmut R. Salih  
helmut.salih@med.uni-tuebingen.de

## SPECIALTY SECTION

This article was submitted to  
Cancer Immunity  
and Immunotherapy,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

RECEIVED 25 July 2022

ACCEPTED 23 September 2022

PUBLISHED 07 October 2022

## CITATION

Hagelstein I, Engel M, Hinterleitner C,  
Manz T, Märklin M, Jung G, Salih HR  
and Zekri L (2022) B7-H3-targeting  
Fc-optimized antibody for induction of  
NK cell reactivity against sarcoma.  
*Front. Immunol.* 13:1002898.  
doi: 10.3389/fimmu.2022.1002898

## COPYRIGHT

© 2022 Hagelstein, Engel, Hinterleitner,  
Manz, Märklin, Jung, Salih and Zekri.  
This is an open-access article  
distributed under the terms of the  
[Creative Commons Attribution License  
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). 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.

# B7-H3-targeting Fc-optimized antibody for induction of NK cell reactivity against sarcoma

Ilona Hagelstein<sup>1,2</sup>, Monika Engel<sup>2,3</sup>, Clemens Hinterleitner<sup>2,4</sup>,  
Timo Manz<sup>3</sup>, Melanie Märklin<sup>1,2</sup>, Gundram Jung<sup>2,3</sup>,  
Helmut R. Salih<sup>1,2\*</sup> and Latifa Zekri<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Clinical Collaboration Unit Translational Immunology, Department of Internal Medicine, German Cancer Consortium (DKTK), University Hospital Tuebingen, Tuebingen, Germany, <sup>2</sup>Cluster of Excellence iFIT (EXC 2180) "Image-Guided and Functionally Instructed Tumor Therapies", University of Tuebingen, Tuebingen, Germany, <sup>3</sup>Department for Immunology and German Cancer Consortium (DKTK), Eberhard Karls University, Tuebingen, Germany, <sup>4</sup>Department of Medical Oncology and Pneumology (Internal Medicine VIII), University Hospital Tuebingen, Tuebingen, Germany

Natural killer (NK) cells largely contribute to antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), a central factor for success of monoclonal antibodies (mAbs) treatment of cancer. The B7 family member B7-H3 (CD276) recently receives intense interest as a novel promising target antigen for immunotherapy. B7-H3 is highly expressed in many tumor entities, whereas expression on healthy tissues is rather limited. We here studied expression of B7-H3 in sarcoma, and found substantial levels to be expressed in various bone and soft-tissue sarcoma subtypes. To date, only few immunotherapeutic options for treatment of sarcomas that are limited to a minority of patients are available. We here used a B7-H3 mAb to generate chimeric mAbs containing either a wildtype Fc-part (8H8\_WT) or a variant Fc part with amino-acid substitutions (S239D/I332E) to increase affinity for CD16 expressing NK cells (8H8\_SDIE). In comparative studies we found that 8H8\_SDIE triggers profound NK cell functions such as activation, degranulation, secretion of IFN $\gamma$  and release of NK effector molecules, resulting in potent lysis of different sarcoma cells and primary sarcoma cells derived from patients. Our findings emphasize the potential of 8H8\_SDIE as novel compound for treatment of sarcomas, particularly since B7-H3 is expressed in bone and soft-tissue sarcoma independent of their subtype.

## KEYWORDS

sarcoma, B7-H3, mAb, Fc-optimized, immunotherapy, NK cells

## Introduction

Sarcomas are malignancies of mesenchymal origin with relatively rare occurrence that are classified depending on the tissue origin (1, 2). They comprise more than 100 distinct subtypes with different biological behavior which eventually results in differing responses to treatment (3, 4). Five-year survival rates of 60–80% have been reported for patients undergoing surgical resection with subsequent chemotherapy (5). Outcome for patients with metastatic disease at time of diagnosis or for patients with recurrence of disease is considerably worse (6, 7). Even though therapeutic options have significantly increased over the last years, there is an urgent need for new treatment approaches that are desperately needed to improve patient outcomes (8, 9).

Treatment outcome in various types of cancer has been significantly improved by introduction of immunotherapy with monoclonal antibodies (mAbs). Prominent examples are Herceptin and Rituximab, which are now established standard treatment options for patients with Her2 expressing breast cancer and B-cell non-Hodgkins lymphoma, respectively (10, 11). Nevertheless, there is still plenty of room for improvement regarding the efficacy of so far available tumor-targeting mAbs, and in many disease entities including sarcoma no immunotherapeutic mAbs are yet available. Antitumor mAbs elicit therapeutic efficacy to a substantial part by induction of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). The major effector cell population which in humans mediates this fundamental mAb function are natural killer (NK) cells (12, 13). To reinforce therapeutic efficacy of tumor-targeting mAbs, modification of the antibody Fc part is one possible approach. Affinity to the Fc receptor CD16 on NK cells can be increased by genetically engineering the glycosylation motifs or the amino-acid sequence of the Fc part. This Fc optimization potentiates the capability of mAbs to engage Fc receptor expressing immune effector cells like NK cells (14, 15). To engraft mAb treatment for additional disease entities, identification of suitable target antigens that are widely expressed on tumor cells while ideally being not expressed on healthy cells is inevitable. In sarcomas, this is particularly challenging due to lack of well-established target antigens, among others because of differences between the many subtypes (8).

B7-H3 (CD276) belongs to the B7 protein family and is classified as an integral transmembrane protein (16–18). So far, the immunoregulatory role of B7-H3 is still under discussion, alike its role in cancer pathogenesis (19–21). Expression of B7-H3 has been reported for a multitude of human cancers which include glioma, acute myeloid leukemia (AML), lung adenocarcinoma, ovarian cancer, neuroblastoma, pancreatic cancer, and also certain sarcomas, whereas it is largely absent in healthy tissues (22–27). In addition, B7-H3 is expressed on the tumor vasculature in many cancers (28–30). Overexpression of B7-H3 is linked to unfavorable disease course and poor prognosis for patients (25, 31, 32) and has been suggested to

impair antitumor reactivity of T cells and NK cells (19, 29, 33). Based on these findings, B7-H3 appears to be an attractive target antigen for immunotherapy, as (i) B7-H3 expression is almost exclusively limited to tumor tissue, (ii) expression on tumor vasculature allows for additional targeting of both cancer cells and vasculature, allowing for dual mode of anticancer action and (iii) blocking of B7-H3 might reduce its immunosuppressive properties. Accordingly, several B7-H3-directed therapeutics are presently under investigation.

In the present study, we report on the overexpression of B7-H3 in various sarcoma subtypes and the development of an Fc-optimized B7-H3 mAb, which was characterized with regard to its potential to induce ADCC of NK cells against sarcoma cells.

## Material and methods

### Cells

Isolation of healthy donor peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was carried out by density gradient centrifugation (Biochrom, Berlin, Germany). PBMC were collected from healthy donors of mixed age and gender and randomly selected, for each experiment. Cryopreserved cells were cultured at 37°C overnight in media prior the use in functional experiments. In all cases, written informed consent, in accordance with the Helsinki protocol, was given. The study was conducted according to the guidelines of the local ethics committee.

The sarcoma cell lines RD-ES (rhabdomyosarcoma), SaOs (osteosarcoma), SW1353 (chondrosarcoma), SW872 (liposarcoma) and SW982 (synovial sarcoma) were purchased from ATCC (American Type Culture Collection) and cultured as previously described (34). Cell lines used in experiments were cultivated for a maximum of two months. To validate cell authenticity, the respective immunophenotype provided by the supplier was examined. To exclude contamination of cultured cells with mycoplasma, cells were tested regularly every three months. Patient-derived sarcoma cells from patients diagnosed with liposarcoma, chondrosarcoma, rhabdomyosarcoma, osteosarcoma or synovial sarcoma were obtained from outgrowth cultures of resected primary tumors as previously described (34).

### Production of antibodies

Generation of 8H8\_SDIE and 8H8\_WT as well as corresponding controls was carried out by chimerization (human immunoglobulin G1/κ constant region) of the anti-B7-H3 mAb 8H8 and control mAb MOPC21, respectively and Fc-optimization (S239D/I332E modification) for mAbs as described previously (35). Briefly, respective light chain (LC) and heavy chain (HC) plasmids were received using the EndoFree Plasmid Maxi kit from Qiagen (Hilden, Germany)

as described in the manufacturer's instructions. For antibody production, the ExpiCHO cell system (Gibco, Carlsbad, CA) was used according to the manufacturer's recommendations. mAbs were purified from media by protein A affinity chromatography (GE Healthcare, Chicago, IL) followed by preparative size exclusion chromatography (HiLoad 16/60 Superdex 200; GE Healthcare). To ensure quality and purity of produced antibodies, analytical size exclusion chromatography (Superdex 200 Increase 10/300 GL; GE Healthcare) and 4–12% gradient SDS-PAGE gels (Invitrogen; Carlsbad, CA) was performed using the gel filtration and Precision Plus standard from Bio-Rad (Hercules, CA), respectively.

## Expression of B7-H3 mRNA based on TCGA database analysis

Data on relative expression of B7-H3 mRNA for tumor tissue and normal tissue samples was obtained from the Cancer Genome Atlas (TCGA) database and the GTEx project utilizing the Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) web server as described previously (26). Data sets for 5 different tumor subtypes (275 tumor/349 normal tissue) colon adenocarcinoma, (286/60) kidney renal papillary cell carcinoma, (179/171) pancreatic adenocarcinoma, (486/338) lung squamous cell carcinoma, and (262/2) sarcoma samples were downloaded from TCGA (<http://www.oncolnc.org>) and analyzed employing the online web server GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn>).

## PCR

B7-H3 primers were QuantiTect Primer Assay Hs\_CD276\_1\_SG (Qiagen), GAPDH primers were 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3' and 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'. 1–2 × 10<sup>6</sup> cells were used for total RNA isolation utilizing the High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Basel, Switzerland) followed by cDNA synthesis using FastGeneScriptase II (NIPPON Genetics Europe, Düren, Germany) as described in the manufacturer's instructions, respectively. Reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed as described previously (36, 37). Quantitative PCR (qPCR) was performed using PerfeCTa SYBR Green FastMix (Quanta Biosciences Beverly, MA) with a LightCycler 480 (Roche) instrument.

## Flow cytometry

For analysis of B7-H3 surface expression, fluorescence-conjugates of B7-H3 mAb or isotype control (Biolegend, San Diego, CA) were used. For dose titration and binding experiments, cells were incubated with 8H8\_WT, 8H8\_SDIE,

Iso\_WT and Iso\_SDIE followed by anti-human PE conjugate (Jackson ImmunoResearch West Grove, PA).

To stain CD16 positive NK cells, fluorescence-conjugates CD3-APC/Fire, CD14-BV785, CD16-APC, CD19-FITC and CD56-PECy7 (all from Biolegend) were used.

Quantitative analysis of immunofluorescence to determine the number of B7-H3 molecules on the cell surface was performed using a murine B7-H3 Hybridoma-derived antibody and the QIFIKIT (Dako, Hamburg, Germany) as described previously (35).

For staining of intracellular IFN $\gamma$ , cells were stained with CD3-FITC and CD56-PECy (both from BioLegend) followed by fixation and permeabilization and staining with mouse anti-human IFN $\gamma$ -BV421 (clone b27) in 1:25 dilution using the Fixation/Permeabilization Solution Kit with BD GolgiPlug from BD Biosciences according to manufacturer's instructions.

Flow cytometry-based determination of target cell lysis was conducted as previously described (34). In brief, sarcoma cells were loaded with 2.5  $\mu$ M CellTrace<sup>TM</sup> Violet cell proliferation dye (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) prior to seeding in cocultures with PBMC of healthy donors in the presence or absence of the antibodies (1  $\mu$ g/mL each). Measurement of equal assay volumes was allowed by using beads (Sigma). The percentage of living target cells was calculated as follows: 7-AAD<sup>-</sup> cells upon treatment/7-AAD<sup>-</sup> cells in control × 100.

7-AAD (BioLegend) staining (1:200) was used to exclude dead cells from flow cytometric analysis or LIVE/DEAD<sup>TM</sup> Fixable Aqua (Thermo Fisher Scientific). All samples were analyzed using the BD FACS Canto II or BD FACSCalibur (BD Biosciences). Data analysis was performed using FlowJo software (FlowJo LCC, Ashland, OR).

## Analysis of NK cell activation and degranulation

To determine activation and degranulation of NK cells within healthy donor PBMC, 20,000 sarcoma cells or 5,000 patient-derived sarcoma cells were cocultured with PBMC (E:T ratio 2.5:1) in the presence or absence (untreated) of treatment (1  $\mu$ g/mL). For analysis of degranulation, Brefeldin A (GolgiPlug, BD Biosciences) was added into the coculture. Cells were harvested after 4 h and stained for CD107a expression followed by flow cytometric analysis. After 24 h, cells were harvested and stained for CD69 expression followed by flow cytometric analysis. Analysis of CD25 expression was performed after 72 h by FACS analysis. NK cells were selected as CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> cells within PBMC.

## Analysis of cytokine expression and secretion

For analysis of cytokine secretion, healthy donor PBMC were cultured with 20,000 sarcoma cells or 5,000 patient-derived

sarcoma cells (E:T ratio 2.5:1) with or without (untreated) the indicated mAbs (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  each). After 24 h, coculture supernatants were analyzed for secretion of Granzyme A, Granzyme B, Perforin, Granulysin, sFasL, TNF, IL-2, IFN $\gamma$ , IL-4 and IL-10 by Legendplex assays (BioLegend) according to the manufacturers protocol. For analysis of intracellular cytokine expression, PBMC were handled as described above and cultured for 4 h in the presence of Brefeldin A (GolgiPlug, BD Biosciences) and Monensin (GolgiStop, BD Biosciences). After incubation, cells were stained for flow cytometry-based analysis. NK cells were selected as CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> cells within PBMC.

## Analysis of target cell lysis

Cytotoxicity of PBMC against sarcoma cells was analyzed by BATDA Europium assays after 2 hours as described previously (38). Percentage of specific lysis was calculated as follows:  $100 \times [(\text{experimental release}) - (\text{spontaneous release})] / [(\text{maximum release}) - (\text{spontaneous release})]$ .

To perform long-term cytotoxicity analyses, the IncuCyte<sup>®</sup> S3 Live-Cell Analysis System (Essenbioscience, Sartorius, Göttingen) was used. Sarcoma cells were seeded in 96-well plates and cocultured with PBMC of healthy donors (E:T ratio 5:1) with or without the indicated mAbs (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  each). To determine the confluence of sarcoma cells, images were taken with 10x magnification every 4 h. To quantify living cells, confluences were normalized to the respective measurement at T=0 h. Cell confluence at T=0 h was set to 100%.

## Statistical analysis

Data are represented as mean  $\pm$  standard deviation of replicates or individual values. Statistical analyses were performed utilizing the GraphPad Prism software (version 9). Significant differences were calculated using the Student's t tests, one-way ANOVA, nonparametric Mann-Whitney test, or log-rank test. P values are represented as: \* $p < 0.05$ .

## Results

### B7-H3 is expressed in bone and soft-tissue sarcoma independent of subtype

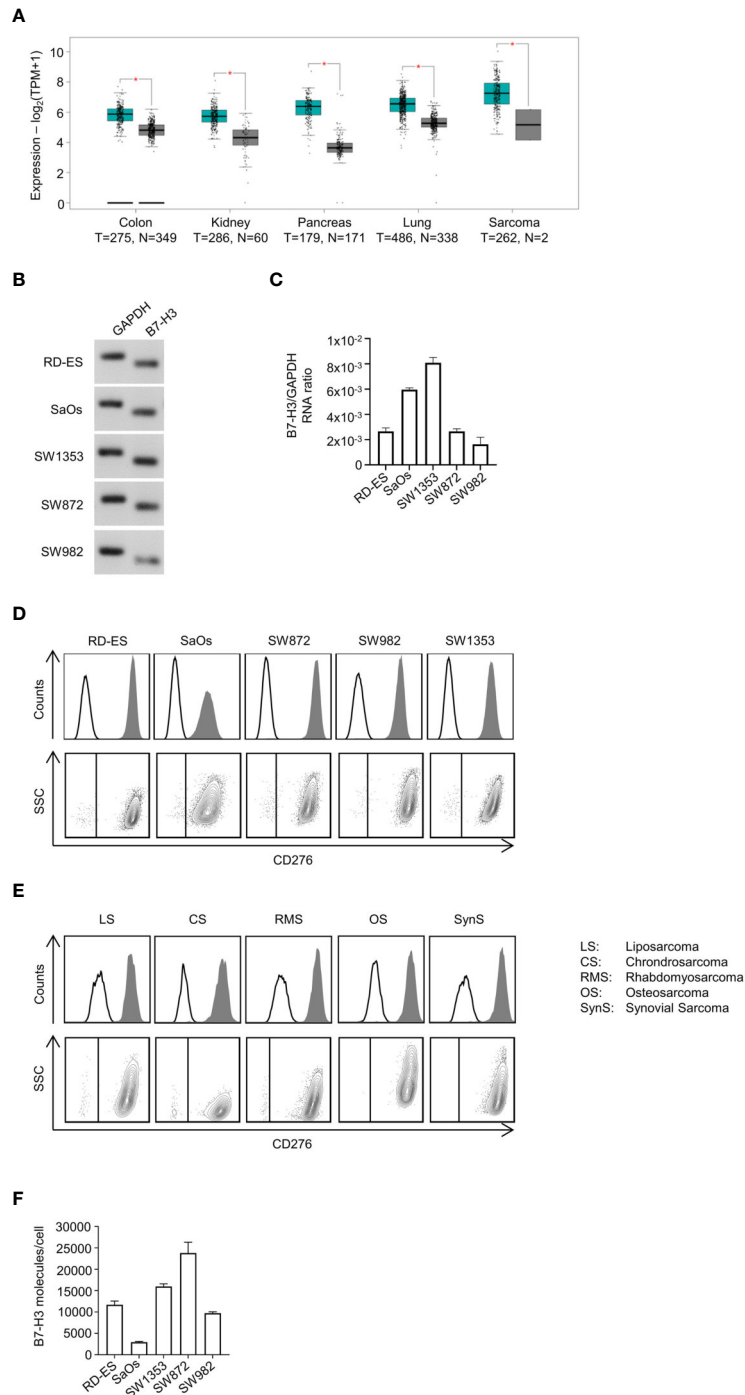
So far, B7-H3 expression has been reported for many solid tumors (39), but little is known regarding its expression in the multiple subtypes of bone and soft-tissue sarcoma. As a first step, B7-H3 mRNA expression level data sets derived from TCGA of tumor and corresponding normal tissues were analyzed for relative B7-H3 expression. Analysis included data sets for 275/349 (tumor/normal tissue) colon adenocarcinoma, 286/60

kidney renal papillary cell carcinoma, 179/171 pancreatic adenocarcinoma, 486/338 lung squamous cell carcinoma, and 262/2 sarcoma. Compared with RNA expression in normal tissues, the expression of B7-H3 was profoundly increased in all analyzed data sets (Figure 1A). Based on these findings, we analyzed expression of B7-H3 mRNA in rhabdomyosarcoma (RD-ES), osteosarcoma (SaOs), liposarcoma (SW872), synovial sarcoma (SW982) and chondrosarcoma (SW1353) cells. Ubiquitous expression of B7-H3 with varying expression intensity in all tested soft-tissue and bone sarcoma cell lines was observed (Figures 1B, C). As a next step, we studied surface expression of B7-H3 on sarcoma cells. FACS based analysis of different sarcoma cell lines and patient-derived sarcoma cells derived from multiple subtypes revealed a varying extent of B7-H3 surface expression (Figures 1D, E). B7-H3 molecule counts were found to range between 2,960 (SaOs) and 23,797 (SW872) (Figure 1F).

### Generation and characterization of Fc wildtype and Fc-optimized B7-H3 mAbs

From a panel of mAbs directed to B7-H3 (described in patent application EP3822288A1), a humanized mAb with suitable binding characteristics (clone 8H8) was selected for generation of our B7-H3-targeting mAbs with either a human IgG1 wildtype Fc part (8H8\_WT) or a human IgG1 part, which contains the amino-acid substitutions S239D/I332E (8H8\_SDIE) described to increase the affinity to the Fc receptor CD16, which mediates ADCC (Figure 2A). As controls served wildtype and Fc optimized mAbs with non-relevant target specificity termed Iso\_WT and Iso\_SDIE (40). The mAbs were then produced as described in the material and methods section. To biochemically characterize the produced mAbs, SDS-PAGE and gel filtration was conducted and revealed the expected molecular weights for LC, HC, and full mAb, for both 8H8\_WT and 8H8\_SDIE, and confirmed the lack of aggregates (Figure 2B). Next, dose titration experiments (range 3-30,000 ng/ml) with the five different sarcoma cell lines were performed using flow cytometry. We observed saturated binding of both 8H8\_WT and 8H8\_SDIE at concentrations of about 1000 ng/ml. Specificity and affinity of the B7-H3 mAbs was not affected by the Fc optimization (Figure 2C), and the concentration of 1000 ng/ml was used for further analyses. Binding of 8H8\_WT and 8H8\_SDIE to sarcoma cells was confirmed with samples derived from patients with sarcomas of various subtypes (Figure 2D). Next, we analyzed the binding of both mAbs to CD16 on NK cells within resting PBMC. 8H8\_WT bound to NK cells, while 8H8\_SDIE displayed substantially more pronounced binding (Figure 2E; Supplementary Figures 1, 2).

Binding of an antibody to its target molecule often results in a dose-dependent modulation of target antigen expression. This in turn impairs therapeutic efficacy (41). Therefore, we analyzed the antigen shift induced by our 8H8\_SDIE on sarcoma cells.



**FIGURE 1**

Characterization of B7-H3 expression in sarcoma cell lines and patient-derived sarcoma cells. **(A)** Relative mRNA expression of B7-H3 in indicated tumor and corresponding normal tissues was analyzed using the online web server GEPIA. T, tumor tissue; N, normal tissue **(B)** B7-H3 mRNA expression of sarcoma cell lines RD-ES, SaOs, SW1353, SW872 and SW982 was determined via RT-PCR with GAPDH serving as control. PCR products were visualized by agarose gel electrophoresis. **(C)** mRNA expression analysis of B7-H3 mRNA relative to GAPDH mRNA in five different sarcoma cell lines. Results for n=3 experiments are shown. **(D, E)** Surface B7-H3 expression on the indicated sarcoma cells was analyzed by flow cytometry using mAb against B7-H3 (shaded peaks) and corresponding isotype control (open peaks). Exemplary histograms (upper panels) and dot plots (lower panels) from one representative experiment of a total of three with similar results are shown. B7-H3 expression of **(D)** sarcoma cell lines and **(E)** patient-derived sarcoma cells of different subtypes dissociated from primary tumor samples are shown, respectively. **(F)** B7-H3 molecule counts on sarcoma cell lines were determined by FACS. Results for two independent experiments are shown.



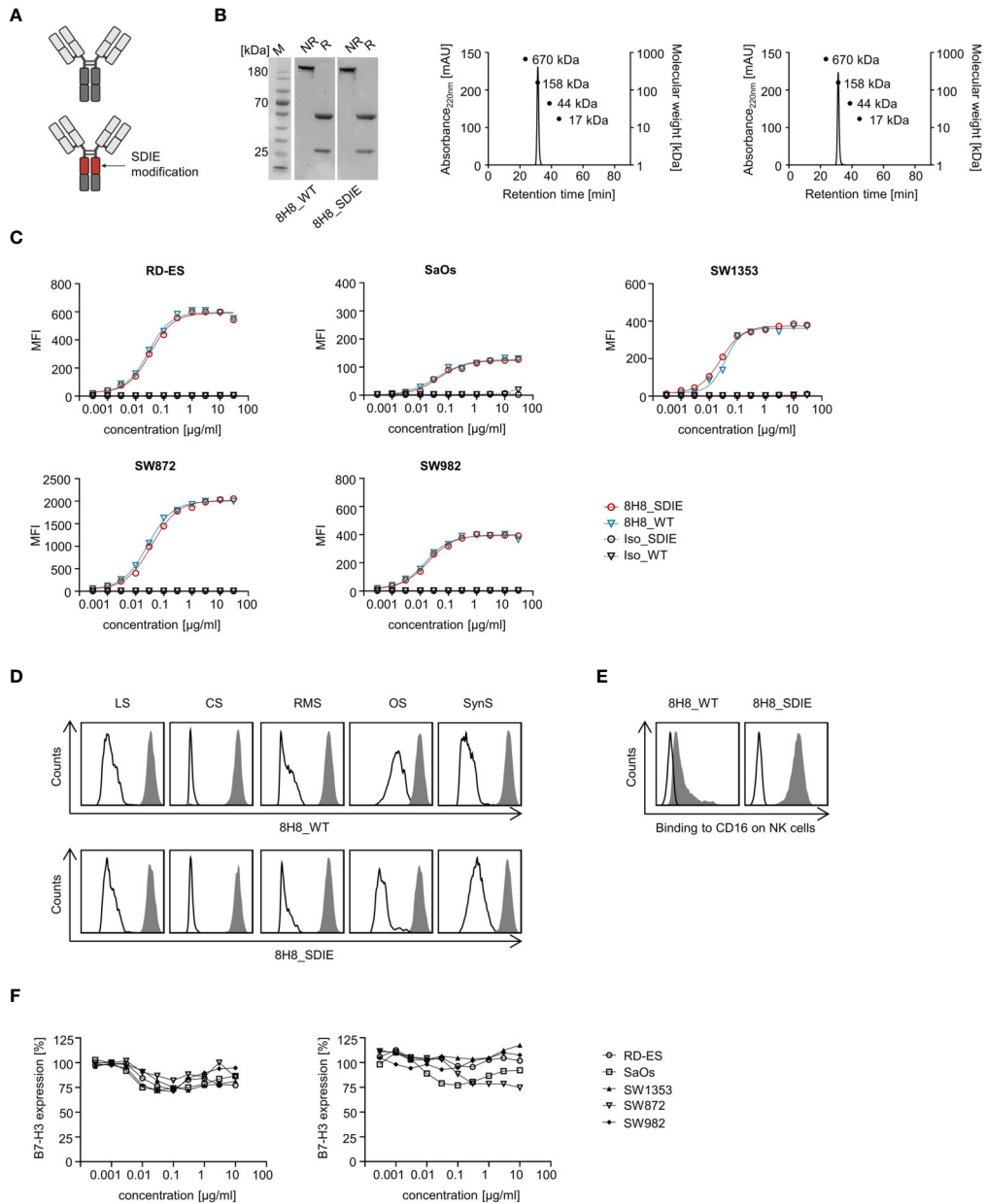


FIGURE 2

Generation and binding characteristics of B7-H3 specific antibodies. **(A)** Schematic illustration of the generated B7-H3 specific antibodies, either with wildtype Fc part (8H8\_WT) (top) or Fc optimized part to enhance affinity to CD16 (8H8\_SDIE) (bottom). Created with BioRender.com. **(B)** Exemplary results of an SDS PAGE (left panel) for both B7-H3 antibodies and of size exclusion chromatography for 8H8\_WT (middle panel) and 8H8\_SDIE (right panel). **(C)** Sarcoma cell lines were incubated with the indicated concentrations of 8H8\_WT, 8H8\_SDIE or the corresponding isotype controls followed by an anti-human PE conjugate and analyzed by flow cytometry. Exemplary data for mean fluorescence intensity (MFI) levels from one representative experiment of a total of three with similar results are shown. **(D)** Binding of 8H8\_WT and 8H8\_SDIE or the corresponding controls (1 µg/ml) to the surface of patient-derived sarcoma cells was analyzed by flow cytometry using the 8H8 antibodies (shaded peaks) and the corresponding isotype controls (open peaks). **(E)** Specific binding of 8H8 mAbs to CD16 on NK cells was analyzed by flow cytometry using NK cells (CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>) within healthy donor PBMC incubated without (open peaks) or with the 8H8 mAbs (shaded peaks) followed by an anti-human PE conjugate. **(F)** Sarcoma cells RD-ES, SaOs, SW1353, SW872 and SW982 were incubated with indicated concentrations of 8H8\_WT, 8H8\_SDIE or the corresponding controls for 24 h (left panel) or 72 h (right panel), respectively. Then, cells were washed and reincubated with 1 µg/ml of 8H8\_SDIE, followed by an anti-human PE conjugate (1:100) and then analyzed by flow cytometry. Relative surface expression of B7-H3 was calculated by defining the mean fluorescence intensity of cells preincubated without antibody as 100%. Exemplary data from one representative experiment of a total of three are shown.

Upon exposure to different concentrations of 8H8\_SDIE (range 3–10 000 ng/ml) for 24 h or 72 h, only marginal reduction of B7-H3 on the cell surface was observed (Figure 2F).

## B7-H3-targeting mAbs induce NK cell reactivity against sarcoma cells

Next, we determined whether and how our B7-H3-targeting mAbs induce NK cell anti-sarcoma reactivity. For these studies, healthy donor PBMC bearing NK cells as immune effector cells were cultivated with sarcoma cell lines with or without 8H8\_WT, 8H8\_SDIE or the corresponding isotype controls. Analysis of NK cells within PBMC for CD69 expression after 24 h by flow cytometry revealed that 8H8\_WT already enhanced NK cell activation, and NK cell activation was further significantly enhanced upon treatment with 8H8\_SDIE for all sarcoma cell lines. The control mAbs with nonrelevant target specificity had no significant effect (Figure 3A). Since CD25<sup>+</sup> NK cells exhibit a higher proliferative activity (42), we analyzed induction of the activation marker CD25 on NK cells. CD25 expression was significantly increased upon incubation of PBMC with all sarcoma cell lines for 72 h with 8H8\_SDIE, but not with 8H8\_WT for cocultures with all cell lines or controls (Figure 3B). CD107a serves as surrogate marker for degranulation of NK cells. Flow cytometry analysis of CD107a expression revealed that presence of 8H8\_WT in cocultures with sarcoma cells RD-ES, SaOs and SW1353 already significantly enhanced CD107a expression, and a significantly more pronounced effect was observed for all cell lines upon treatment with 8H8\_SDIE, whereas control mAbs had no relevant effect (Figure 3C). Analysis of IFN $\gamma$  secretion into culture supernatants of PBMC and sarcoma cell lines by Legendplex assays showed an increase in cytokine release after treatment with 8H8\_WT with a significantly higher effect upon incubation with 8H8\_SDIE (Figure 4A). IFN $\gamma$  is a cytokine that mediates various immunomodulatory effects including direct anti-tumor effects, but also enables NK cells to shape subsequent adaptive immune responses (43). Analysis by intracellular flow cytometry confirmed that induction of IFN $\gamma$  was significantly increased in NK cells upon treatment with both 8H8\_WT and 8H8\_SDIE, with again superior effects of 8H8\_SDIE (Figure 4B). Finally, we analyzed the release of effector and immunomodulatory molecules mediating NK cell effector functions in supernatants after coculturing PBMC and sarcoma cells using Legendplex assays. The presence of 8H8\_WT already enhanced levels of analyzed molecules, whereas a clear tendency for enhanced levels of Granzyme B, Perforin, Granulysin, sFasL and IFN $\gamma$  was observed for 8H8\_SDIE, whereas levels of Granzyme A, TNF, IL-4 and IL-10 were significantly increased (Figure 4C).

## Induction of target cell lysis by B7-H3-targeting mAbs 8H8\_SDIE and 8H8\_WT

Next, we investigated whether the enhanced NK cell activity was mirrored in analyses of cytotoxicity. To this end, we determined the capacity of 8H8\_SDIE and 8H8\_WT to induce target cell lysis by NK cells. Cocultures of bone and soft tissue sarcoma cell lines RD-ES, SaOs, SW1353, SW872 and SW982 with healthy donor PBMC revealed that 8H8\_WT enhanced target cell lysis in short-term cytotoxicity assays. Sarcoma cell lysis induced by 8H8\_SDIE was clearly superior to 8H8\_WT for all different sarcoma cell lines, whereas presence of control mAbs had no effect on target cell lysis (Figure 5A). In line, analysis in long-term FACS based lysis assays over 72 h showed pronounced efficacy of 8H8\_SDIE against sarcoma cells (Figure 5B) compared to 8H8\_WT. Despite the heterogenous morphology and growth rates of the different sarcoma cell lines, the superior capacity of 8H8\_SDIE to induce target cell lysis compared to 8H8\_WT was additionally confirmed in extended analyses of sarcoma cell lysis observed for 120 h by live cell imaging (Figure 5C, Supplementary Figure 3). Of note, 8H8\_WT also showed a clear tendency to induce NK cell reactivity against sarcoma targets, but upon treatment with 8H8\_SDIE, profound sarcoma cell lysis was observed with all five cell lines displaying varying levels of B7-H3 on the cell surface.

## B7-H3-targeting mAbs induce NK reactivity against patient-derived sarcoma cells

Finally, we investigated the efficacy of our B7-H3-targeting mAbs in comparative analyses of 8H8\_SDIE versus 8H8\_WT and respective controls to induce NK reactivity against sarcoma cells derived from patients diagnosed with liposarcoma, chondrosarcoma, rhabdomyosarcoma, osteosarcoma or synovial sarcoma. Cocultures of healthy donor PBMC containing NK cells as effector cells with B7-H3 expressing patient-derived sarcoma cells revealed, alike our flow cytometric analyses with sarcoma cell lines, that treatment with 8H8\_WT already enhanced NK cell activation and degranulation (Figures 6A, B). Treatment with 8H8\_SDIE caused a pronounced and significant increase in activation and degranulation as compared to 8H8\_WT, whereas presence of control antibodies Iso\_WT and Iso\_SDIE had no relevant effect. In line, the findings for 8H8\_SDIE on NK cell activation and degranulation resulted in potent induction of ADCC and ultimately tumor cell lysis. Short-term cytotoxicity assays confirmed that treatment with 8H8\_WT and 8H8\_SDIE induced a clearly target-antigen restricted lysis, whereas 8H8\_SDIE induced superior killing as observed with all tested

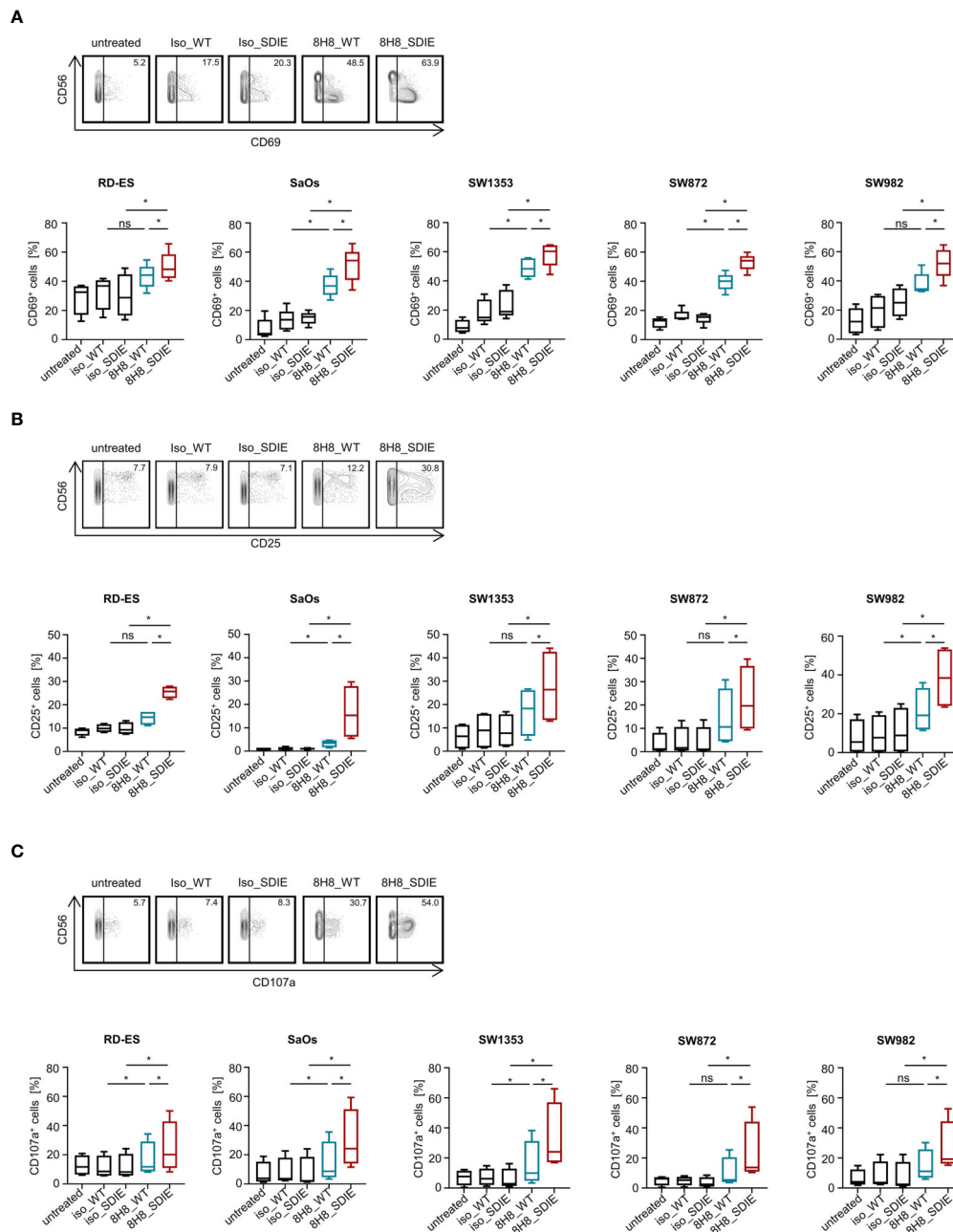


FIGURE 3

Induction of NK cell reactivity by B7-H3 antibodies against sarcoma cells. PBMC of healthy donors were cultured with or without sarcoma cells at an E:T ratio of 2.5:1 in the presence or absence of B7-H3 antibodies or the corresponding isotype controls (1 μg/ml). **(A)** Activation of NK cells was determined by expression of CD69 after 24h. In the upper panels, exemplary flow cytometry results obtained with SaOs and in the lower panels data for sarcoma cell lines RD-ES, SaOs, SW1353, SW872 and SW982 (n=5) with PBMC of 4 different donors are shown. **(B)** Activation of NK cells was determined by expression of CD25 after 72h. In the upper panels exemplary flow cytometry results obtained with RD-ES and in the lower panels data with sarcoma cell lines RD-ES, SaOs, SW1353, SW872 and SW982 with PBMC of 4 different donors are shown. **(C)** Degranulation of NK cells was determined by expression of CD107a after 4h. In the upper panels exemplary flow cytometry results obtained with SW872 and in the lower panels data with sarcoma cell lines RD-ES, SaOs, SW1353, SW872 and SW982 with PBMC of four independent donors are shown. ns, not significant; \*statistically significant differences (p-value < 0.05).

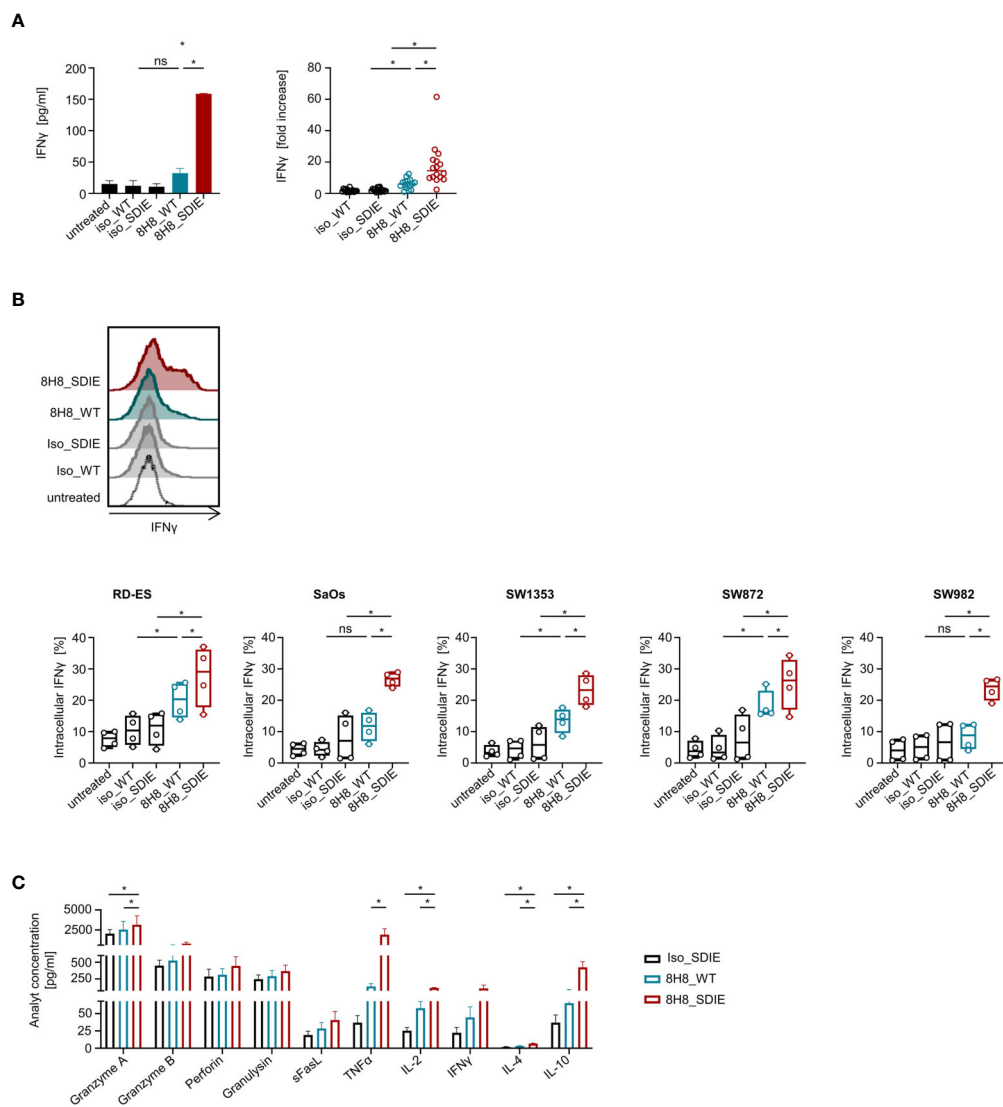


FIGURE 4

Induction of immunoregulatory molecules by B7-H3 antibodies against sarcoma cells. Healthy donor PBMC were cultured with sarcoma cells at an E:T ratio of 2.5:1 in the presence or absence of 8H8-WT, 8H8\_SDIE or the corresponding isotype controls (1  $\mu$ g/ml) (A, B) Supernatants and NK cells within PBMC were analyzed for IFN $\gamma$ . (A) Release of IFN $\gamma$  after 24 h was analyzed in supernatants of cocultures by Legendplex assays. In the left panel, exemplary results with SW1353 are shown, in the right panel results obtained with sarcoma cell lines RD-ES, SaOs, SW1353 and SW872 and with PBMC of four independent donors are shown. (B) Intracellular expression of IFN $\gamma$  in NK cells within PBMC identified by counterstaining with CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> was analyzed after 4 h by flow cytometry. In the upper panel, exemplary results obtained with SaOs and in the lower panel data obtained with sarcoma cells (RD-ES, SaOs, SW1353, SW872 and SW982) and with PBMC of four independent donors are shown. (C) Supernatants were analyzed for effector molecules Granzyme A, Granzyme B, Perforin, Granulysin and sFasL and for release of immunoregulatory molecules TNF $\alpha$ , IL-2, IFN $\gamma$ , IL-4, IL-10 after 4 h by Legendplex assays. Shown are pooled results with sarcoma cell lines SW1353 and SW872 and with PBMC of two independent donors. ns, not significant; \*statistically significant differences (p-value < 0.05).

patient-derived sarcoma cells of different origin (Figure 6C). Likewise, B7-H3 mAb induced profoundly higher and long-lasting lysis of sarcoma cells. Hence, 8H8\_SDIE is able to potently elicit NK cell immunity against primary sarcoma cells regardless of their subtype.

## Discussion

Therapeutic modalities for sarcoma patients have improved in recent years, yet treatment and especially cure of sarcomas remains a challenge. So far, FDA-approved antibody-based approaches in

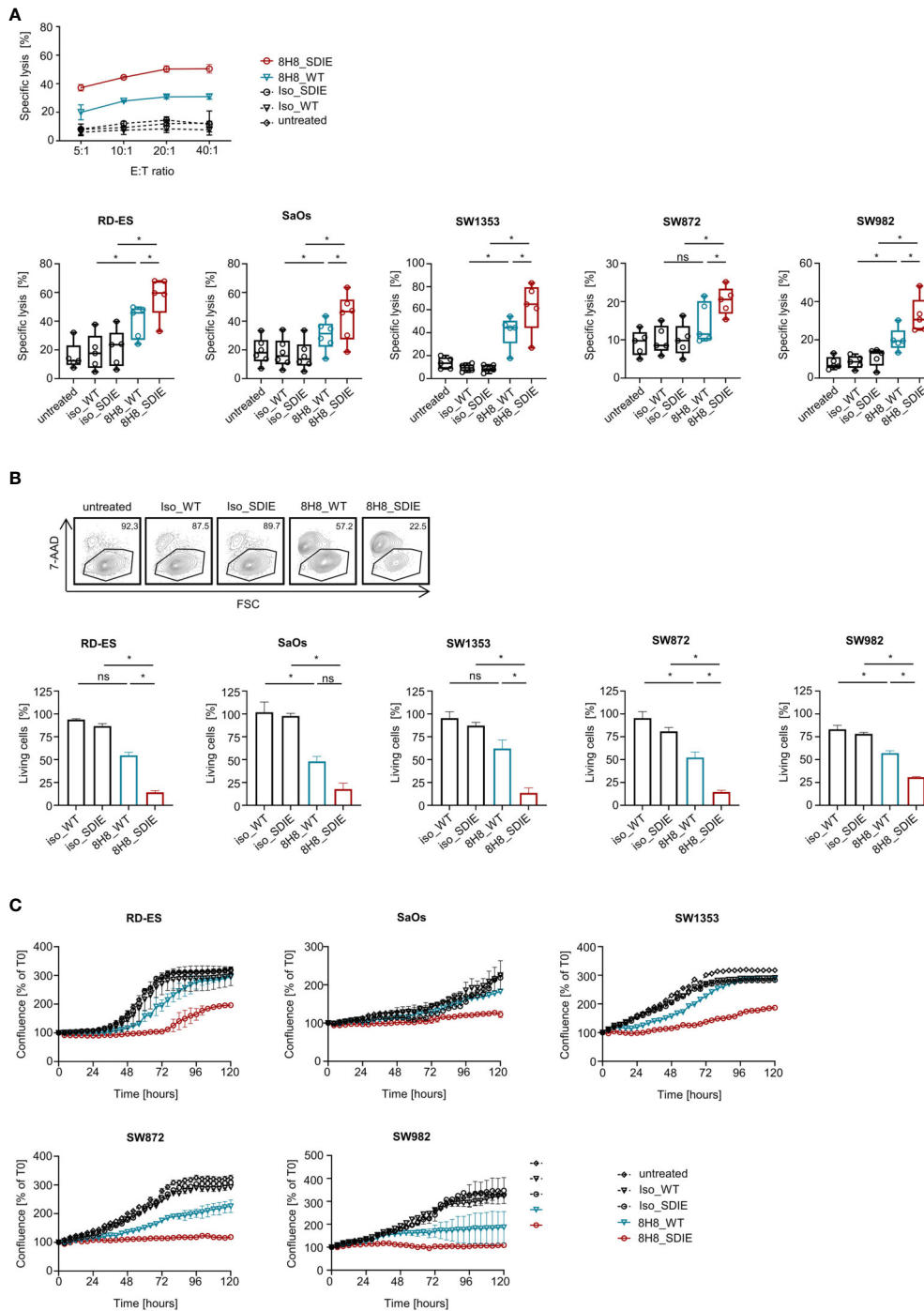


FIGURE 5

Induction of target cell lysis by Fc optimized B7-H3 antibody. PBMC of healthy donors were incubated with different sarcoma cell lines ( $n = 5$ ) and treated without or with indicated B7-H3 antibodies or corresponding isotype controls ( $1 \mu\text{g/mL}$ ). **(A)** Lysis of sarcoma cell lines RD-ES, SaOs, SW1353, SW872 and SW982 ( $n=5$ ) was analyzed by 2 h Europium cytotoxicity assays. In the top panel, exemplary data obtained with SW982 and one PBMC donor with different E:T ratios and in the bottom panel, pooled data for each cell line obtained with PBMC of healthy donors ( $n=5$ ) at an E:T ratio of 20:1 are shown. **(B)** Lysis of sarcoma cell lines RD-ES, SaOs, SW1353, SW872 and SW982 ( $n=5$ ) was determined after 72 h by flow cytometry-based lysis assays at an E:T ratio of 10:1. In the top panel exemplary dot plots with SW872 and one PBMC donor are shown, the bottom panel depicts combined results for each cell line with PBMC ( $n=5$ ) of healthy donors. **(C)** Cell death of sarcoma cells was determined using a live cell imaging system. Sarcoma cell lines RD-ES, SaOs, SW1353, SW872 and SW982 were incubated with PBMC of two healthy donors at an E:T ratio of 10:1 for 120h. T=0 h corresponds to a confluence of 100%. Results are shown as mean  $\pm$  SD. ns, not significant; \*statistically significant differences ( $p$ -value  $< 0.05$ ).

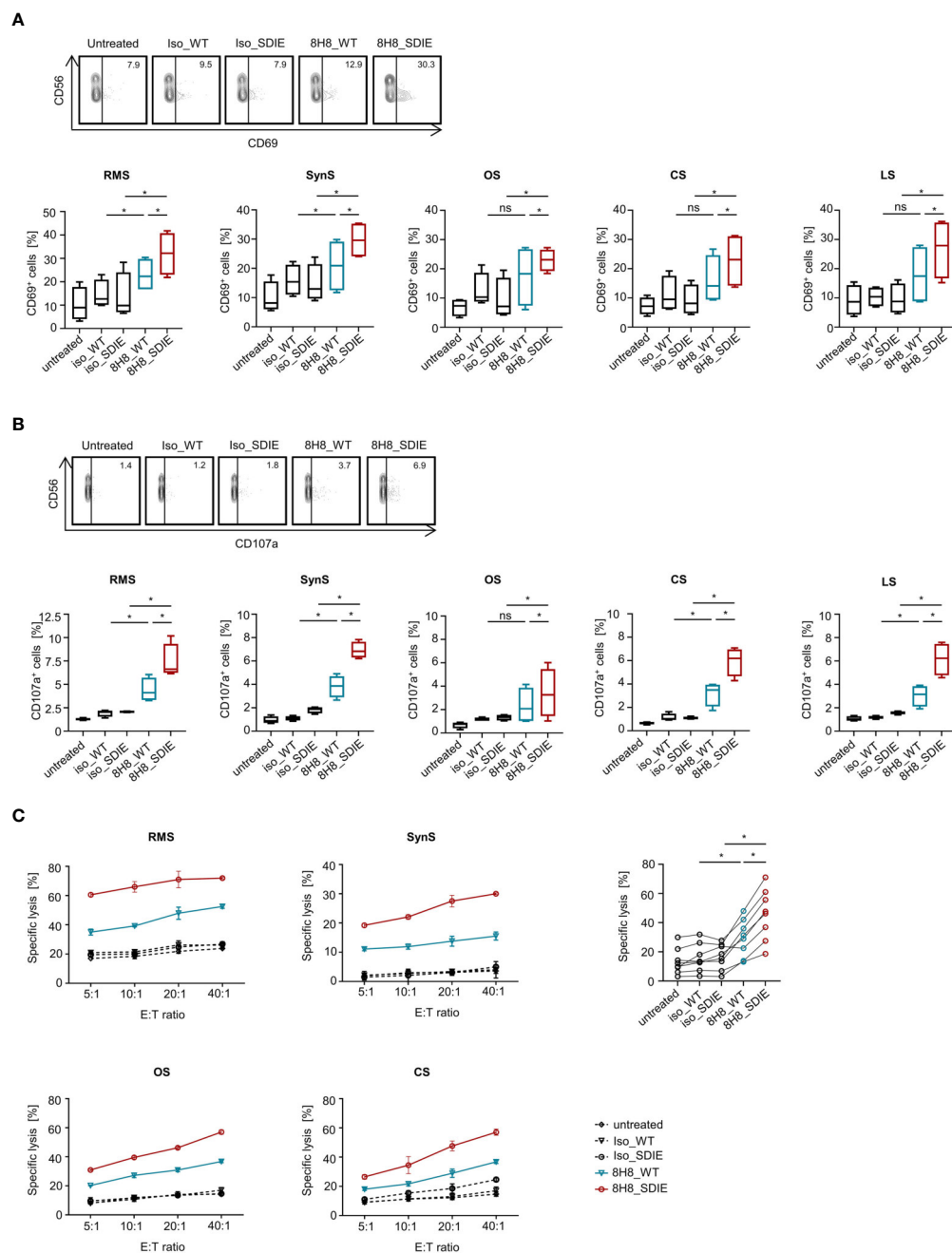


FIGURE 6

8H8\_SDIE induces NK cell reactivity and cytotoxicity against patient-derived sarcoma cells. PBMC of healthy donors were incubated with patient-derived sarcoma cells of different subtypes and treated with the indicated B7-H3 antibodies or the corresponding isotype controls (1  $\mu$ g/mL). **(A)** Activation of NK cells was determined by expression of CD69 after 24h. In the top panels, exemplary flow cytometry results obtained with patient-derived synoviosarcoma cells and one PBMC donor and in the bottom panel, combined data with patient-derived sarcoma cells (n=5) and with PBMC of four different donors (n=4) are shown. **(B)** Degranulation of NK cells was determined by expression of CD107a after 4h. In the upper panels, exemplary flow cytometry results obtained with patient-derived rhabdomyosarcoma cells and one PBMC donor and in the lower panel, data with patient-derived sarcoma cells (n=5) and with PBMC of four independent donors (n=4) are shown. **(C)** Killing of patient-derived sarcoma cells (n=4) was analyzed by 2 h Europium cytotoxicity assays. In the left panels, exemplary data obtained with PBMC of one healthy donor and patient-derived rhabdomyosarcoma, osteosarcoma, synoviosarcoma and chondrosarcoma cells as indicated with different E:T ratios and on the right, pooled data obtained with PBMC of healthy donors (n=2) and patient-derived sarcoma cells (n=4) at an E:T ratio of 20:1 are shown. ns, not significant; \*statistically significant differences (p-value < 0.05).

sarcoma like PD-1/PDL-1 checkpoint inhibition (Dostarlimab and Pembrolizumab) or Denosumab for treatment of a subset of bone sarcomas are restricted to a minority of patients (8). Accordingly, new therapeutic concepts are urgently needed. Interestingly, sarcomas were already treated with Coley's toxins about 100 years ago, the latter in retrospective being a precursor of modern immunotherapy (44).

In the presented study, we report the preclinical characterization of an Fc-optimized B7-H3-targeting mAb termed 8H8\_SDIE for treatment of sarcoma. Sarcoma cell lines of different origin as well as primary sarcoma cells from patients diagnosed with soft-tissue and bone sarcomas were identified to express substantial quantities of B7-H3. Our optimized mAb 8H8\_SDIE showed optimal binding characteristics with all sarcoma cells and NK effector cells. No relevant downregulation of B7-H3 expression (antigen shift) that can impair efficacy of mAb treatment (41) was observed upon incubation with 8H8 mAbs. The anti-tumor activity induced by 8H8\_SDIE against sarcomas was superior to its counterpart with a wildtype Fc part, and this was confirmed in multiple experimental settings using sarcoma cell lines as well as patient-derived sarcoma cells.

An important subset of cytotoxic lymphocytes are NK cells, which largely contribute to cancer immune surveillance. Their efficacy is based on their ability not only to mediate direct cytotoxicity, but also to influence subsequent immune responses of the adaptive immune system. Accordingly, numerous attempts are currently aiming at using NK cells for treatment of cancer (45, 46). Application of antitumor antibodies which induce ADCC represents a promising therapeutic approach for many cancers, as demonstrated for example by the clinical success of rituximab. The effect of the latter mAb is mainly based on induction of ADCC. Meanwhile, rituximab is well established for treatment of various B cell malignancies (47). To further enhance ADCC induced by therapeutically utilized antibodies and thus to increase efficacy, several strategies currently aim at generation of improved antitumor mAbs using the approach of Fc-optimization to increase affinity for CD16. Besides modifying glycosylation motifs (15), increased affinity to CD16 can also be attained by changing the amino acid sequence in the CH2 domain of the Fc part for example by the S239D/I332E substitutions (SDIE modification) (14) that is also contained in our B7-H3-targeting mAb 8H8\_SDIE. The Fc optimization resulted in a significant increase in NK-mediated ADCC against sarcoma cells as compared to 8H8\_WT that contains a wildtype Fc part. At present, many Fc-optimized mAbs that comprise the SDIE modification successfully undergo clinical evaluation, for example FLYSYN (anti-FLT3; NCT02789254), margetuximab (anti-HER2; NCT01828021), BI 836858 (anti-CD33; NCT02240706, NCT03013998), and MEN1112 (anti-CD157; NCT02353143) or FDA approved tafasitamab (anti-CD19).

In previous studies, we evaluated various mAbs and fusion proteins containing the SDIE modification for improved

induction of ADCC, e.g. in leukemia, colorectal cancer, breast cancer as well as sarcoma, some of them until the stage of clinical application (34, 35, 38, 40, 48–51). Here we set out to develop an B7-H3 directed Fc-optimized mAb for treatment of sarcomas based on the reasoning that B7-H3 is reportedly overexpressed in many solid tumors (23, 25), whereas expression in healthy tissues is limited (39, 52), and that sarcomas are NK cell-sensitive cancer types (45). Our efforts were further prompted by our observation that B7-H3 is overexpressed in bone and soft tissue sarcomas independently of subtype, as tumor associated antigens with homogenous overexpression are a prerequisite for success of immunotherapeutic treatment. Of note, in some recent reports the B7-H3 protein has been characterized as a checkpoint molecule that exerts immunosuppressive and tumor promoting activity (53, 54). There is also first evidence that the B7-H3 positive cell fraction within cancer cells potentially represents cancer stem cells (55–57). Based on these findings, it is not surprising that multiple immunotherapeutic approaches directed against B7-H3 are currently under clinical investigation. This includes, but is not limited to strategies like antibody-drug conjugates (MGC018: NCT03729596; DS7300a: NCT04145622), Fc-optimized mAbs (MGA271, enoblituzumab: NCT02923180, NCT02475213, NCT04634825; DS-5573a: NCT02192567, clinical trial terminated), radiolabeled mAbs (<sup>131</sup>I-8H9: NCT03275402, NCT04022213; <sup>177</sup>Lu-DPTA omburtamab: NCT04315246, NCT04167618), and bispecific antibodies (MGD009: NCT026285351, clinical trial terminated) (58). Our work expands this armamentarium to Fc-optimized mAbs for potent induction of NK cell ADCC.

Regarding toxicity/side effects expected by targeting B7-H3, it must be considered that B7-H3 is not only (inducible) expressed on antigen-presenting cells (16), but basal expression is also reported for endothelial cells, resting fibroblasts, amniotic fluid stem cells and osteoblasts (52, 59). However, in preclinical studies which used B7-H3 as therapeutic target including B7-H3-targeting chimeric antigen receptor (CAR) T cells, significant anti-tumor effects in preclinical models (23, 26, 27, 60, 61), but no toxicity was observed, likely due to profoundly lower B7-H3 antigen levels in healthy tissue (27). In line, the first evaluations of B7-H3-targeting immunotherapeutics in clinical studies like anti-B7-H3 antibodies and B7-H3 CAR-T cells did not reveal any unbearable toxicity and off-tumor effects against healthy B7-H3 expressing cells (58, 62). Nevertheless, this issue requires further elucidation.

In conclusion, 8H8\_SDIE showed powerful anti-sarcoma effects in a preclinical setting. Of note, our treatment approach was not restricted to a distinct sarcoma entity, as different sarcoma cell lines as well as patient-derived sarcoma cells including osteosarcoma, rhabdomyosarcoma, synovial sarcoma liposarcoma and chondrosarcoma were sensitive to treatment with our B7-H3-targeting mAbs. 8H8\_SDIE could thus constitute an immunotherapeutic option for sarcoma patients. Although future studies including *in vivo* experiments are

certainly warranted to fully characterize 8H8\_SDIE, the data presented in this study underscore the potential of our B7-H3-targeting Fc-optimized mAb for sarcoma treatment.

## Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

## Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by IRB (ethics committee of the Faculty of Medicine of the Eberhard Karls Universitaet Tuebingen and of the University Hospital Tuebingen) and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki; reference number 13/2007V and 612/2010BO2. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## Author contributions

IH designed and performed the experiments, analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript. ME designed and performed experiments. TM provided the B7-H3 mAb. MM contributed to the study design and contributed to writing of the manuscript. CH provided patient samples and contributed to writing of the manuscript, GJ contributed to study design and writing of the manuscript. HS contributed to the study design, critically revised the manuscript, and co-supervised the study. LZ designed and supervised the study and contributed to writing of the manuscript. All authors approved the submitted version of the manuscript.

## Funding

This project was supported by the Deutsche Krebshilfe (70113999, 70114180), Wilhelm Sander-Stiftung (2017.100.2), and Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research

Foundation) under Germany's Excellence Strategy - EXC 2180 - 39090067 and DFG, project number SA 1360/9-3).

## Acknowledgments

The authors thank Andrea Dobler und Carolin Walker for excellent technical assistance. Flow cytometry sample acquisition was performed on shared instruments of the Flow Cytometry Core Facility Tuebingen.

## Conflict of interest

GJ, HS, LZ, and TM are listed as inventors on the patent application "Antibodies targeting, and other modulators of, the CD276 antigen, and uses thereof," EP3822288A1, applicant German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany.

The remaining authors declare 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.2022.1002898/full#supplementary-material>

## References

- Choi JH, Ro JY. The 2020 WHO classification of tumors of bone: An updated review. *Adv Anat Pathol* (2021) 28(3):119–38. doi: 10.1097/PAP.0000000000000293
- Choi JH, Ro JY. The 2020 WHO classification of tumors of soft tissue: Selected changes and new entities. *Adv Anat Pathol* (2021) 28(1):44–58. doi: 10.1097/PAP.0000000000000284
- Brown HK, Schiavone K, Gouin F, Heymann MF, Heymann D. Biology of bone sarcomas and new therapeutic developments. *Calcif Tissue Int* (2018) 102(2):174–95. doi: 10.1007/s00223-017-0372-2
- Clark MA, Fisher C, Judson I, Thomas JM. Soft-tissue sarcomas in adults. *N Engl J Med* (2005) 353(7):701–11. doi: 10.1056/NEJMra041866
- 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(11):e11131. doi: 10.15252/emmm.201911131
- In GK, Hu JS, Tseng WW. Treatment of advanced, metastatic soft tissue sarcoma: latest evidence and clinical considerations. *Ther Adv Med Oncol* (2017) 9(8):533–50. doi: 10.1177/1758834017712963
- 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(1):78. doi: 10.1186/s12916-017-0831-7



8. 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(2):e001580. doi: 10.1136/jitc-2020-001580
9. Thanindrarn P, Dean DC, Nelson SD, Hornicek FJ, Duan Z. Chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell immunotherapy for sarcomas: From mechanisms to potential clinical applications. *Cancer Treat Rev* (2020) 82:101934. doi: 10.1016/j.ctrv.2019.101934
10. Keating GM. Rituximab: a review of its use in chronic lymphocytic leukaemia, low-grade or follicular lymphoma and diffuse large b-cell lymphoma. *Drugs* (2010) 70(11):1445–76. doi: 10.2165/11201110-000000000-00000
11. 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(1):16–32. doi: 10.1038/nrclinonc.2011.177
12. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* (2008) 9(5):503–10. doi: 10.1038/ni1582
13. Seidel UJ, Schlegel P, Lang P. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Front Immunol* (2013) 4:76. doi: 10.3389/fimmu.2013.00076
14. 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(11):4005–10. doi: 10.1073/pnas.0508123103
15. Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, et al. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem* (2003) 278(5):3466–73. doi: 10.1074/jbc.M210665200
16. Chapoval AI, Ni J, Lau JS, Wilcox RA, Flies DB, Liu D, et al. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN- $\gamma$  production. *Nat Immunol* (2001) 2(3):269–74. doi: 10.1038/85339
17. 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(4):2500–6. doi: 10.4049/jimmunol.173.4.2500
18. Steinberger P, Majdic O, Derdak SV, Pfistershammer K, Kirchberger S, Klausner 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(4):2352–9. doi: 10.4049/jimmunol.172.4.2352
19. Hofmeyer KA, Ray A, Zang X. The contrasting role of B7-H3. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) 105(30):10277–8. doi: 10.1073/pnas.0805458105
20. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* (2005) 23:515–48. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115611
21. Flem-Karlsen K, Fodstad O, Tan M, Nunes-Xavier CE. B7-H3 in cancer - beyond immune regulation. *Trends Cancer* (2018) 4(6):401–4. doi: 10.1016/j.trecan.2018.03.010
22. Guery T, Roumier C, Berthon C, Renneville A, Preudhomme C, Quesnel B. B7-H3 protein expression in acute myeloid leukemia. *Cancer Med* (2015) 4(12):1879–83. doi: 10.1002/cam4.522
23. Majzner RG, Theruvath JL, Nellan A, Heitzeneder S, Cui Y, Mount CW, et al. CAR T cells targeting B7-H3, a pan-cancer antigen, demonstrate potent preclinical activity against pediatric solid tumors and brain tumors. *Clin Cancer Res* (2019) 25(8):2560–74. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0432
24. 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(4):501–15.e8. doi: 10.1016/j.ccell.2017.03.005
25. 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(8):e70689. doi: 10.1371/journal.pone.0070689
26. Zhang Z, Jiang C, Liu Z, Yang M, Tang X, Wang Y, et al. B7-H3-Targeted CAR-T cells exhibit potent antitumor effects on hematologic and solid tumors. *Mol Ther Oncolytics* (2020) 17:180–9. doi: 10.1016/j.omto.2020.03.019
27. Du H, Hirabayashi K, Ahn S, Kren NP, Montgomery SA, Wang X, et al. Antitumor responses in the absence of toxicity in solid tumors by targeting B7-H3 via chimeric antigen receptor T cells. *Cancer Cell* (2019) 35(2):221–37.e8. doi: 10.1016/j.ccell.2019.01.002
28. Fauci JM, Sabbatino F, Wang Y, Londono-Joshi AI, Straughn JMJr., Landen CN, et al. Monoclonal antibody-based immunotherapy of ovarian cancer: targeting ovarian cancer cells with the B7-H3-specific mAb 376.96. *Gynecol Oncol* (2014) 132(1):203–10. doi: 10.1016/j.ygyno.2013.10.038
29. Zang X, Allison JP. The B7 family and cancer therapy: costimulation and coinhibition. *Clin Cancer Res* (2007) 13(18 Pt 1):5271–9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1030
30. 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(11):2528–36. doi: 10.1002/ijc.27566
31. Zang X, Thompson RH, Al-Ahmadie HA, Serio AM, Reuter VE, Eastham JA, et al. B7-H3 and B7x are highly expressed in human prostate cancer and associated with disease spread and poor outcome. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) 104(49):19458–63. doi: 10.1073/pnas.0709802104
32. Wang L, Cao NN, Wang S, Man HW, Li PF, Shan BE. Roles of coinhibitory molecules B7-H3 and B7-H4 in esophageal squamous cell carcinoma. *Tumour Biol* (2016) 37(3):2961–71. doi: 10.1007/s13277-015-4132-5
33. Castriconi R, Dondero A, Augugliaro R, Cantoni C, Carnemolla B, Sementa AR, et al. Identification of 4Ig-B7-H3 as a neuroblastoma-associated molecule that exerts a protective role from an NK cell-mediated lysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) 101(34):12640–5. doi: 10.1073/pnas.0405025101
34. 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. doi: 10.3389/fimmu.2021.653081
35. Hofmann M, Grosse-Hovest L, Nubling T, Pyz E, Bamberg ML, Aulwurm S, et al. Generation, selection and preclinical characterization of an fc-optimized FLT3 antibody for the treatment of myeloid leukemia. *Leukemia* (2012) 26(6):1228–37. doi: 10.1038/leu.2011.372
36. Nuebling T, Schumacher CE, Hofmann M, Hagelstein I, Schmiedel BJ, Maurer S, et al. The immune checkpoint modulator OX40 and its ligand OX40L in NK-cell immunosurveillance and acute myeloid leukemia. *Cancer Immunol Res* (2018) 6(2):209–21. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0212
37. Schmiedel BJ, Nuebling T, Steinbacher J, Malinowska A, Wende CM, Azuma M, et al. Receptor activator for NF- $\kappa$ B ligand in acute myeloid leukemia: expression, function, and modulation of NK cell immunosurveillance. *J Immunol* (2013) 190(2):821–31. doi: 10.4049/jimmunol.1201792
38. Koerner SP, Andre MC, Leibold JS, Kousis PC, Kubler A, Pal M, et al. An fc-optimized CD133 antibody for induction of NK cell reactivity against myeloid leukemia. *Leukemia* (2017) 31(2):459–69. doi: 10.1038/leu.2016.194
39. Zhou WT, Jin WL. B7-H3/CD276: An emerging cancer immunotherapy. *Front Immunol* (2021) 12:701006. doi: 10.3389/fimmu.2021.701006
40. Schmiedel BJ, Lutz MS, Riegg F, Zekri L, Heitmann JS, Buhning HJ, et al. Induction of NK cell reactivity against b-cell acute lymphoblastic leukemia by an fc-optimized FLT3 antibody. *Cancers (Basel)* (2019) 11(12). doi: 10.3390/cancers11121966
41. Feldman EJ, Brandwein J, Stone R, Kalaycio M, Moore J, O'Connor J, et al. Phase III randomized multicenter study of a humanized anti-CD33 monoclonal antibody, lintuzumab, in combination with chemotherapy, versus chemotherapy alone in patients with refractory or first-relapsed acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* (2005) 23(18):4110–6. doi: 10.1200/JCO.2005.09.133
42. Clausen J, Vergeiner B, Enk M, Petzer AL, Gastl G, Gunsilius E. Functional significance of the activation-associated receptors CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells. *Immunobiology* (2003) 207(2):85–93. doi: 10.1078/0171-2985-00219
43. Fortes-Andrade T, Almeida JS, Sousa LM, Santos-Rosa M, Freitas-Tavares P, Casanova JM, et al. The role of natural killer cells in soft tissue sarcoma: Prospects for immunotherapy. *Cancers (Basel)* (2021) 13(15). doi: 10.3390/cancers13153865
44. McCarthy EF. The toxins of William b. colely and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J* (2006) 26:154–8.
45. Lachota M, Vincenti M, Winiarska M, Boye K, Zagodzón R, Malmberg KJ. Prospects for NK cell therapy of sarcoma. *Cancers (Basel)* (2020) 12(12). doi: 10.3390/cancers12123719
46. Ljunggren HG, Malmberg KJ. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol* (2007) 7(5):329–39. doi: 10.1038/nri2073
47. Weiner GJ. Rituximab: mechanism of action. *Semin Hematol* (2010) 47(2):115–23. doi: 10.1053/j.seminhematol.2010.01.011
48. Marklin M, Hagelstein I, Koerner SP, Rothfelder K, Pflugler 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(1):143. doi: 10.1186/s40425-019-0606-0
49. 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(8):4261–72. doi: 10.4049/jimmunol.1400872
50. Schmiedel BJ, Riegg F, Zekri L, Grosse-Hovest L, Buhning HJ, Jung G, et al. An fc-optimized CD133 antibody for induction of natural killer cell reactivity against colorectal cancer. *Cancers (Basel)* (2019) 11(6). doi: 10.3390/cancers11060789
51. Seidel UJ, Schlegel P, Grosse-Hovest L, Hofmann M, Aulwurm S, Pyz E, et al. Reduction of minimal residual disease in pediatric b-lineage acute

lymphoblastic leukemia by an fc-optimized CD19 antibody. *Mol Ther* (2016) 24 (9):1634–43. doi: 10.1038/mt.2016.141

52. Picarda E, Ohaegbulam KC, Zang X. Molecular pathways: Targeting B7-H3 (CD276) for human cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* (2016) 22(14):3425–31. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2428

53. Kontos F, Michelakos T, Kurokawa T, Sadagopan A, Schwab JH, Ferrone CR, et al. B7-H3: An attractive target for antibody-based immunotherapy. *Clin Cancer Res* (2021) 27(5):1227–35. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-2584

54. Wang J, Chong KK, Nakamura Y, Nguyen L, Huang SK, Kuo C, et al. B7-H3 associated with tumor progression and epigenetic regulatory activity in cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* (2013) 133(8):2050–8. doi: 10.1038/jid.2013.114

55. 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(2):396–403. doi: 10.1016/j.jss.2014.01.014

56. Liu Z, Zhang W, Phillips JB, Arora R, McClellan S, Li J, et al. Immunoregulatory protein B7-H3 regulates cancer stem cell enrichment and drug resistance through MVP-mediated MEK activation. *Oncogene* (2019) 38 (1):88–102. doi: 10.1038/s41388-018-0407-9

57. Zhang Y, He L, Sadagopan A, Ma T, Dotti G, Wang Y, et al. Targeting radiation-resistant prostate cancer stem cells by B7-H3 CAR T cells. *Mol Cancer Ther* (2021) 20(3):577–88. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-20-0446

58. Liu C, Zhang G, Xiang K, Kim Y, Lavoie RR, Lucien F, et al. Targeting the immune checkpoint B7-H3 for next-generation cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* (2022) 71(7):1549–67. doi: 10.1007/s00262-021-03097-x

59. Ling V, Wu PW, Spaulding V, Kieleczawa J, Luxenberg D, Carreno BM, et al. Duplication of primate and rodent B7-H3 immunoglobulin V- and c-like domains: divergent history of functional redundancy and exon loss. *Genomics* (2003) 82(3):365–77. doi: 10.1016/S0888-7543(03)00126-5

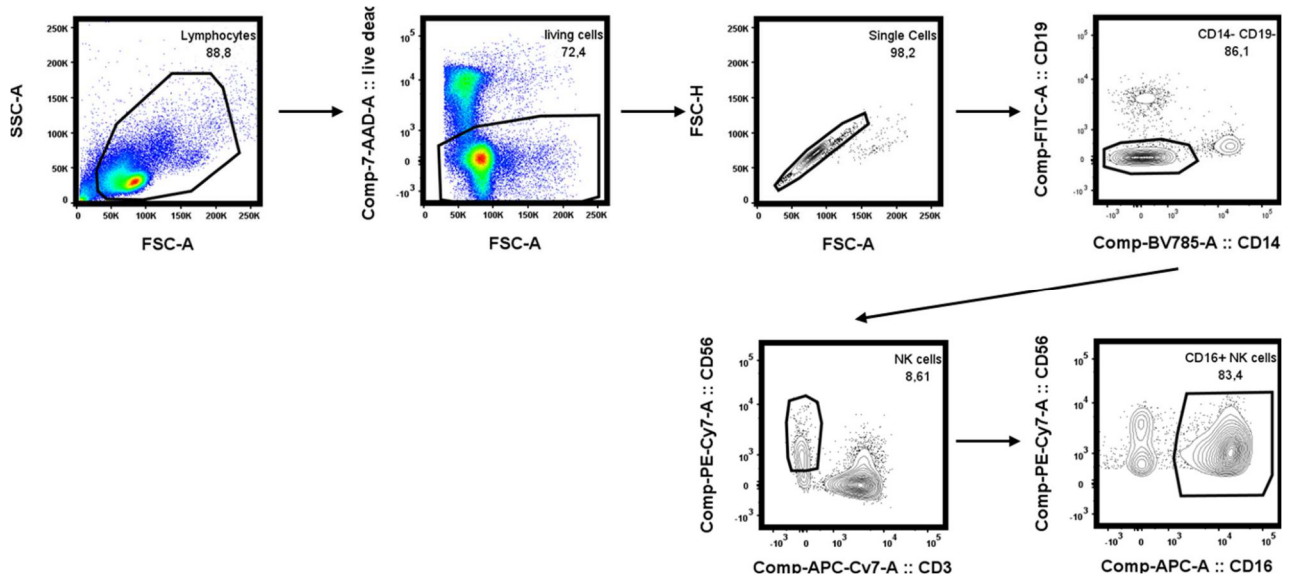
60. Nehama D, Di Ianni N, Musio S, Du H, Patane M, Pollo B, et al. B7-H3-redirected chimeric antigen receptor T cells target glioblastoma and neurospheres. *EBioMedicine* (2019) 47:33–43. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.08.030

61. Yang M, Tang X, Zhang Z, Gu L, Wei H, Zhao S, et al. Tandem CAR-T cells targeting CD70 and B7-H3 exhibit potent preclinical activity against multiple solid tumors. *Theranostics* (2020) 10(17):7622–34. doi: 10.7150/thno.43991

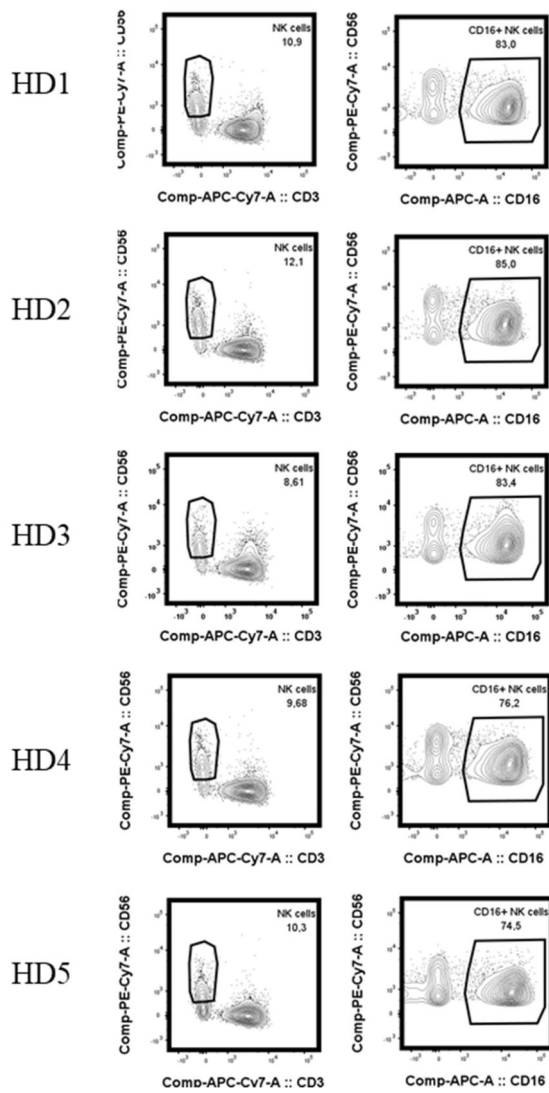
62. Souweidane MM, Kramer K, Pandit-Taskar N, Zhou Z, Haque S, Zanzonico P, et al. Convection-enhanced delivery for diffuse intrinsic pontine glioma: a single-centre, dose-escalation, phase 1 trial. *Lancet Oncol* (2018) 19(8):1040–50. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30322-X

*Supplementary Material*

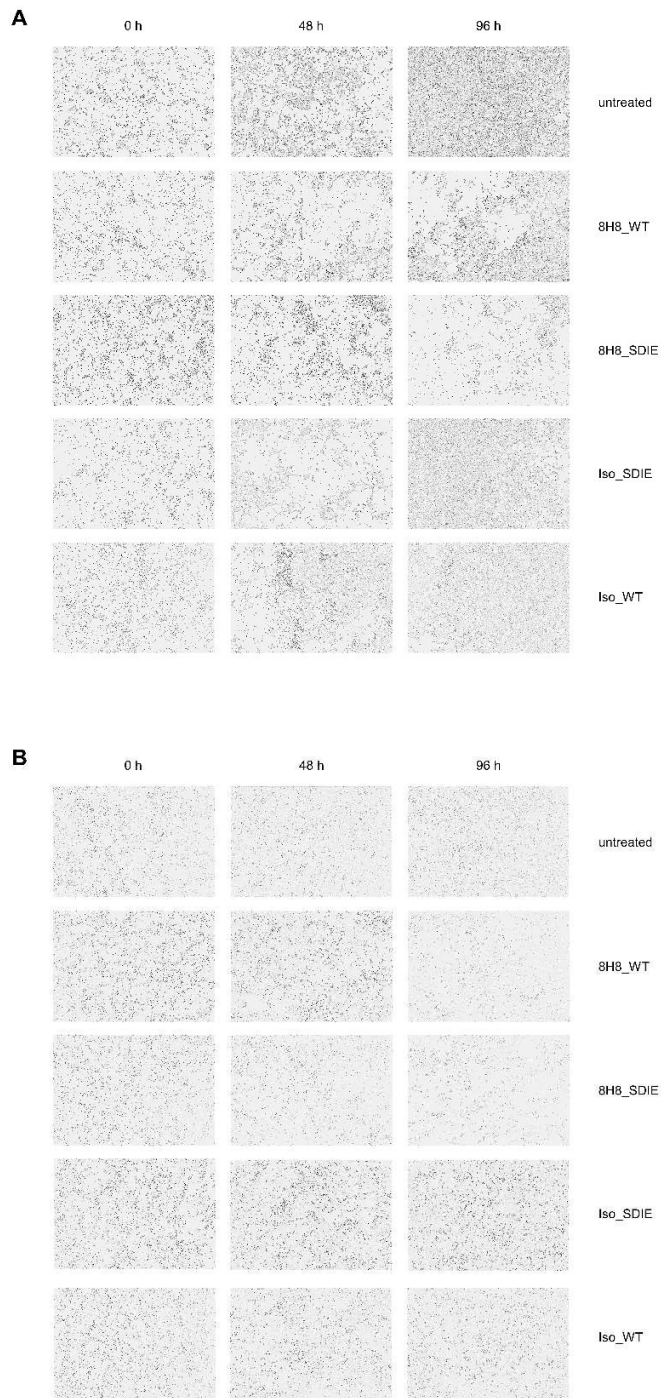
1 Supplementary Figures



**Supplementary Figure 1.** Representative gating strategy (Lymphocytes → 7-AAD<sup>-</sup> living cells → single cells → CD14<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup> cells → CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells → CD16) for NK cells within healthy donor PBMC.



**Supplementary Figure 2.** Exemplary results for NK cells within healthy donor (HD) PBMC and CD16 expression on NK cells for n=5 HD PBMC.



**Supplementary Figure 3.** Cell death of sarcoma cells was determined using a live cell imaging system. Cells were incubated with PBMC of healthy donors at an E:T ratio of 10:1 for 120 h. Representative images at 0, 24, and 96 h for cell lines RD-ES (**A**) and SaOs (**B**) with one PBMC donor are displayed. 10x magnification.