

Doktori (PhD) értekezés tézisei

HER2-specifikus kiméra antigén receptorral (CAR) módosított természetes ölüsejtek fejlesztése és optimalizálása szolid tumorok célzott kezelésére

Gergely Bence

Témavezető: Dr. Szöőr Árpád



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2026.

HER2-specifikus kiméra antigén receptorral (CAR) módosított természetes ölüsejtek fejlesztése és optimalizálása szolid tumorok célzott kezelésére

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban.

Írta: Gergely Bence okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskolája
(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája) keretében

Témavezető: Dr. Szöőr Árpád, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Lányi Árpád, PhD

Dr. Grolmusz Vince Kornél, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Virág László, MTA doktora

tagok: Dr. Lányi Árpád, PhD

Dr. Grolmusz Vince Kornél, PhD

Dr. Kókai Endre, PhD

Dr. Tóvári József, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2026. szeptember 7., 13:00 óra
Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme

Bevezetés

A daganatos megbetegedések világszerte a vezető halálokok közé tartoznak, és bár az elmúlt évtizedekben a sebészeti, kemoterápiás és célzott molekuláris terápiás megközelítések jelentős fejlődésen mentek keresztül, számos tumor esetében továbbra is korlátozott a hosszútávú gyógyulás esélye. Különösen igaz ez azokra a daganatokra, amelyek molekuláris heterogenitásuk, adaptív rezisztenciamechanizmusaik és immunszuppresszív mikrokörnyezetük révén képesek elkerülni a hagyományos kezelési stratégiákat. A modern onkológiai kutatás egyik legdinamikusabban fejlődő területe az immunonkológia, amely a szervezet saját immunrendszerének daganatellenes potenciálját kívánja felszabadítani és célzottan megerősíteni. Az utóbbi években egyre nagyobb figyelem irányult a természetes ölősejtek (NK-sejtek) alkalmazására az adoptív immunterápiában. Az NK-sejtek a veleszületett immunrendszer effektor sejtjei, amelyek természetes citotoxikus aktivitással rendelkeznek, és képesek antigén-prezentációtól függetlenül eliminálni a transzformált sejteket. CAR-módosításuk lehetőséget teremt arra, hogy az innate és az adaptív immunválasz előnyeit kombinálva biztonságosabb és potenciálisan szélesebb körben alkalmazható terápiás platform jöjjön létre. Különösen fontos szempont az allogén alkalmazhatóság és a kedvezőbb toxicitási profil, amelyek a CAR-T terápiákkal összehasonlítva klinikai előnyt jelenthetnek.

A jelen értekezés célja HER2-specifikus CAR-NK sejtek fejlesztése és funkcionális optimalizálása, különös tekintettel a kostimulációs jelátviteli domének szerepére a sejtek proliferációjában, perzisztenciájában és tumorelles hatékonyágában. A kutatás középpontjában annak vizsgálata áll, hogy az NK-sejt-specifikus jelátviteli útvonalak integrálása miként járul hozzá a rezisztens, HER2-pozitív szolid tumorok elleni hatékonyabb immunválasz kialakításához. A munka eredményei hozzájárulhatnak a CAR-alapú sejtherápiák racionális tervezéséhez, és új perspektívát nyithatnak a HER2-pozitív daganatok kezelésében, különösen azokban az esetekben, ahol a jelenlegi terápiás lehetőségek korlátozott hatékonyságúak.

Bevezetés az immunterápiákba

A daganatok kialakulása és progressziója során az immunrendszer mind a felismerés, mind az elimináció szintjén fontos szerepet tölt be. A tumorimmunitás alapját a veleszületett (nem specifikus) és az adaptív (specifikus) immunitás közötti dinamikus kölcsönhatás képezi, amelyek együttesen alkotják a szervezet védekezési rendszerének komplex hálózatát a malignus transzformációval szemben. A veleszületett immunválasz első vonalbeli komponensei közé tartoznak az epitélsejtek, a fagociták és a természetes ölősejtek (NK-sejtek), amelyek széles spektrumú, gyors és örökölt válaszméchanizmusaik révén képesek felismerni és eliminálni a potenciálisan veszélyes sejteket, köztük a daganatsejteket is. A specifikus (adaptív) immunválasz ezzel szemben célzott és memóriával rendelkező védelmi mechanizmust biztosít a tumorokkal szemben. Központi szereplői a T- és B-limfociták, amelyek antigén-specifikus receptorok révén ismerik fel a daganatsejtek felszínén megjelenő tumorasszociált antigéneket (TAA-kat) vagy tumorspecifikus antigéneket (TSA-kat). A citotoxikus CD8⁺ T-sejtek közvetlenül képesek elpusztítani a daganatsejteket perforin- és granzim-mediált apoptózis-indukcióval, míg a CD4⁺ segítő T-sejtek citokinek termelésével támogatják mind a sejtes, mind a humorális immunválaszt. A B-sejtek által termelt ellenanyagok hozzájárulhatnak a tumorsejtek opszonizációjához és az antitest-függő sejtközvetített citotoxicitáshoz (ADCC), ezáltal fokozva az immunrendszer hatékonyságát.

Noha a tumorelles immunválasz kiemelkedő hatékonyságot mutat a daganatok korai felismerésében és kontrollálásában, a tumorsejtek különféle immunelkerülési stratégiákat fejlesztenek ki, amelyek lehetővé teszik számukra az immunrendszer kikerülését és a progresszió fenntartását. Ezek közé tartozik az antigén-prezentáció zavarása, az immunszuppresszív citokinek és molekulák expressziója, valamint olyan sejtek, mint a regulátor T-sejtek (Treg) vagy a mieloid eredetű szuppresszor sejtek (MDSC) toborzása a tumor mikrokörnyezetébe. Ezek a mechanizmusok súlyosan gátolják az effektor immunsejtek funkcióját, lehetővé téve a tumor számára a túlélést és proliferációt, amely az „immunoediting” folyamatának három fázisában (elimináció, egyensúly, immunelkerülés) manifesztálódik.

A fent említett jelenségek egyre pontosabb megértése teremtette meg a modern tumorimmunterápia alapjait, amely a konvencionális terápiákkal ellentétben nem közvetlenül a daganatot célozza, hanem az immunrendszer tumorelles aktivitását állítja helyre, illetve fokozza.

A daganatellenes immunterápia (célzott antitestek, immunomodulátorok, onkolitikus vírusok, tumorvakcinák és adoptív immunterápiák) célja tehát nem más, mint az immunmenekülés gátlása, az immunválasz újraaktiválása, és a tumor mikrokörnyezetének immunstimulálónak alakítása.

A kimeria antigén receptorokon alapuló T-sejt terápia

A CAR T sejt terápia alapvető újdonsága abban rejlik, hogy a páciens saját T-limfocitáit genetikai úton ruházzák fel egy mesterséges receptorral, amely egyesíti a monoklonális antitestek antigénfelismerő specificitását a T-sejtek jelátviteli és effektor funkcióival, így egyedülállóan célzott és erőteljes tumorellenes választ tesz lehetővé. A terápia eljárás fő lépései közé tartozik a beteg perifériás véréből származó T-sejtek izolálása és aktiválása, a CAR-konstrukció génjének - leggyakrabban retrovirális vagy lentivirális vektorokkal történő - bejuttatása, majd az expanzált CAR T-sejtek autológ transzfúziója. A terápia hatékonyságát rendszerint limfoablatív előkezelés fokozza, amely a kompetitív endogén limfocitapopulációk kiiktatásával elősegíti a transzferált sejtek proliferációját és perzisztenciáját. A T-sejteket aktiválni képes CAR molekulák alapvető szerkezeti felépítése négy komponensből áll: (i) egy extracelluláris antigénfelismerő doménből, amely jellemzően egy monoklonális antitestből származó egyetlen láncból álló variábilis fragmentum (scFv), (ii) egy "hinge" régióból, amely a flexibilitást biztosítja, (iii) egy transzmembrán régióból, amely a receptor stabilitását rögzíti, valamint (iv) egy vagy több intracelluláris jelátvivő doménből (pl. CD3 ζ elsődleges aktivációs motívumként, kiegészítve kostimulációs doménnel, mint a CD28 vagy a 4-1BB).

A CAR T-sejt terápia klinikuma és perspektívái

A hematológiai daganatokban elért eredmények jól mutatják a CAR T terápia áttörő jelentőségét, ugyanakkor fontos hangsúlyozni, hogy nem minden hematológiai malignitás reagál egyformán kedvezően. Például relapszáló/refrakter akut mieloid leukémiában (AML) eddig csupán mérsékelt hatékonyságot láthatunk, amit részben a megfelelő, egyértelműen specifikus célantigén hiánya, részben pedig az infundált T-sejtek funkcionális kimerülése magyaráz. Ez jól mutatja, hogy a CAR T terápia klinikai sikeressége erősen függ a választott célfehérjétől, a tumor immunbiológiai környezetétől, valamint a sejtek hosszú távú perzisztenciás képességétől.

Szolid tumorok esetében a CAR T sejtek klinikai hatékonysága eddig korlátozott maradt, amit több tényező együttes hatása magyaráz. Az egyik legnagyobb kihívást a célantigén heterogén és

gyakran alacsony szintű expressziója jelenti, amely hozzájárul a daganatsejtek immunológiai meneküléséhez. Emellett a tumormikrokörnyezet immunszuppresszív komponensei - például a regulatorikus T-sejtek, a mieloid eredetű szupresszor sejtek, valamint az immuninhibitoros citokinek (TGF- β , IL-10) - szintén jelentősen rontják az infundált CAR T sejtek perzisztenciáját és funkcionális aktivitását. Továbbá a T-sejtek kimerülése és apoptózisra való hajlama hosszabb távon korlátozza az immunválasz fenntarthatóságát, ami különösen szolid tumorokban okoz terápiás kudarcot.

A CAR NK-sejtes immunterápia

A CAR-NK-sejtterápia az immunonkológia egyik legújabb innovációs területe, ami ötvözi a CAR-T-sejtekre jellemző célzott felismerési és jelátviteli pontosságot az NK-sejtek veleszületett tumorelles aktivitásával és kedvező biztonsági profiljával. Ez a hibrid megközelítés képes egyesíteni az adaptív és a veleszületett immunitás előnyeit egyesíti egyetlen sejttérapiás platformban. A CAR NK-sejtek esetében a kiméra antigénreceptor beépítése lehetővé teszi a tumorantigének antigénspecifikus felismerését és eliminációját, miközben a természetes ölősejtek endogén receptorai (NKG2D, DNAM-1, NKp30, NKp44, NKp46) révén továbbra is képesek reagálni az MHC-független stressz-szignálokra. Ez a kettős felismerési mechanizmus növeli a tumorelles válasz robusztusságát, és csökkenti annak esélyét, hogy a daganatsejtek az antigénvesztés vagy HLA-downreguláció révén elkerüljék az immunfelismerést.

A CAR NK-sejtek további előnye a fiziológiás biztonsági profiljukban rejlik. Mivel az NK-sejtek nem igénylik az MHC-antigén-prezentációt az aktivációhoz, allogén környezetben sem váltanak ki graft-versus-host betegséget, szemben a T-sejtekből származó CAR-termékekkel. Ez lehetővé teszi az univerzális, úgynevezett „off-the-shelf” CAR NK-sejtek létrehozását, amelyek előre gyártott, tárolható és klinikai szinten gyorsan hozzáférhető sejt készítmények formájában használhatók. E koncepció áttörő jelentőségű, mivel lehetővé teszi, hogy a terápiát ne betegre szabottan, hanem standardizált, „gyári” módon lehessen alkalmazni, drasztikusan csökkentve az előállítási időt és költséget, valamint növelve a kezelések hozzáférhetőségét.

Az NK-sejtek természetes citotoxicitása és citokinprofilja is kedvezőbb a klinikai tolerálhatóság szempontjából. Klinikai vizsgálatokban a CAR-NK-sejtes terápiákkal összefüggő CRS előfordulása ritka és enyhébb lefolyású volt. Az MD Anderson Cancer Center kulcsfontosságú fázis I/II. klinikai vizsgálata (NCT03056339) például kimutatta, hogy a köldökzsínórvérből

származó CD19-specifikus CAR NK-sejtek nem okoztak sem CRS-t, sem neurotoxicitást, miközben jelentős antitumor hatást mutattak refrakter hematológiai malignitásokban. Ez a biztonsági profil fontos érv a CAR NK-platform mellett, különösen a szolid tumorok terápiás fejlesztésében, ahol a lokális gyulladásos válasz súlyos szisztémás következményekkel járhat.

A CAR-NK-sejtes terápiák klinikai sikerei hematológiai kórképekben

A CAR-NK-sejtterápiák klinikai fejlesztése az elmúlt évtizedben jelentős előrelépéseket ért el, elsősorban a hematológiai malignitások területén. A klinikai fejlesztés úttörő munkái a 2010-es évek közepére nyúlnak vissza, amikor az első preklinikai modellek sikeresen demonstrálták a CD19-specifikus CAR NK-sejtek hatékonyságát B-sejtes leukémiákban és limfómákban. Az áttörést a MD Anderson Cancer Center kutatócsoportja érte el, amely 2020-ban publikálta a korábban már említett, több betegen is tartós választ mutató vizsgálatát. Ez a fázis I/II. klinikai vizsgálat (NCT03056339) köldökzsínórvérből származó, CD19-specifikus CAR NK-sejteket alkalmazott relabált/refrakter B-sejtes malignitásokban, beleértve a diffúz nagy B-sejtes limfómát (DLBCL), a krónikus limfocitás leukémiát (CLL) és az indolens non-Hodgkin limfómákat (NHL). A vizsgálat eredményei kimagaslóak voltak a sejtes immunterápiák területén: a 11 betegből 8-nál objektív klinikai válasz alakult ki, közülük 7-nél komplett remissziót (CR) értek el, és egyik esetben sem tapasztaltak citokinfelszabadulási szindrómát, neurotoxicitást vagy graft-versus-host betegséget. Külön figyelemre méltó, hogy a beadott CAR NK-sejtek több, mint 12 hónapig kimutathatók voltak a betegek perifériás vérében, ami a korábbi feltételezésekkel szemben a tartós *in vivo* perzisztencia lehetőségét jelezte. A terápia „off-the-shelf” jellegű volt, tehát nem autológ, hanem allogén, fagyasztva tárolt sejteket alkalmaztak, amelyeket előzetesen IL-15-expresszióval stabilizáltak, fokozva ezzel az NK-sejtek életképességét.

A CAR NK-sejtterápia kihívásai szolid tumorokban

Bár a CAR NK-sejtterápia biztonságossági és gyártástechnológiai szempontból egyértelmű előnyöket kínál a CAR T-sejtekkel szemben, klinikai hatékonyságát mindeddig elsősorban hematológiai malignitásokban igazolták. A szolid tumorok esetében az eddigi eredmények egyértelműen szerényebbek, amit az NK-sejtek sajátos biológiai tulajdonságai és a tumor mikrokörnyezet komplex immunszuppresszív hatásai magyaráznak. A jelenlegi kutatások legnagyobb kihívásai közé tartozik az NK-sejtek korlátozott *in vivo* perzisztenciája, az elégtelen szöveti penetráció, valamint a tumor-asszociált gátló szignálok és a metabolikus stressz elleni

alacsony rezisztencia. A perzisztencia-probléma a CAR NK-terápiák Achilles-sarka. Ellentétben a T-sejtekkel, amelyek megfelelő kostimuláció mellett memóriasejt-formációra és hosszan fennmaradó klonális expanszióra képesek, az NK-sejtek biológiailag rövid életű effektorsejtek, amelyek nem rendelkeznek klasszikus memóriefunkcióval. A perifériás vérből izolált NK-sejtek élettartama általában néhány napra, legfeljebb egy-két hétre korlátozódik *in vivo*, ami drasztikusan lerövidíti a terápiás időablakot. Bár a citokintámogatás (pl. IL-2, IL-15) képes meghosszabbítani az NK-sejtek aktivitását, ez önmagában nem elegendő a tartós tumorregresszióhoz, és bizonyos esetekben a szisztémás citokinszintek emelkedése újabb mellékhatásokat is okozhat.

Ezt a hiányosságot részben a CAR-molekula intracelluláris jelátviteli doménjeinek optimalizálásával lehet orvosolni. A T-sejt eredetű CAR-konstrukciókban alkalmazott CD28 és 4-1BB kostimulációs motívumok közvetlenül aktiválják a PI3K/AKT és NF- κ B útvonalakat, ami fokozza a proliferációt és az anti-apoptotikus génexpressziót. NK-sejtek esetében azonban ezek a domének nem mindig illeszkednek a természetes jelátviteli hálózathoz, mivel az NK-sejtek nem TCR-mediált aktivációra épülnek, hanem az ITAM- és SAP-adapterek által vezérelt receptorcsoportokra (pl. DAP10, DAP12, 2B4, NKG2D). Ennek következtében a klasszikus T-sejt-CAR architektúrák gyakran csak átmeneti NK-aktivációt és rövid élettartamot eredményeznek, anélkül, hogy tartós proliferációs vagy memória-jellegű válasz kialakulna.

Célkitűzések

Az utóbbi évtizedben a daganatellenes immunterápiák robbanásszerű fejlődésen mentek keresztül, melyek közül kiemelkednek azok a megközelítések, amelyek az immunrendszer effektor sejtjeinek – különösen a T- és NK-sejteknek – célzott újraprogramozására épülnek. A kiméra antigén receptorral (CAR) módosított T-sejtek (CAR-T) jelentős áttörést hoztak a hematológiai daganatok terápiájában, azonban alkalmazásuk szolid tumorok esetében számos korláttal szembesül, mint például a tumormikrokörnyezet immunszuppresszív jellege, a célantigének heterogén megjelenése, valamint a szöveti penetráció akadályai.

Mindezek fényében az immunterápiás kutatások egyre nagyobb érdeklődéssel fordulnak más effektor sejttípusok felé, amelyek bizonyos szempontból előnyösebb biológiai tulajdonságokkal rendelkeznek. Az NK-sejtek természetes tumorölő aktivitása, MHC-független célfelismerése, valamint alacsonyabb graft-versus-host betegség kockázata különösen alkalmassá teszi őket arra, hogy alternatív vagy kiegészítő terápiás lehetőséget kínáljanak a CAR-alapú sejtes immunterápiák területén. A CAR-NK sejtek klinikai jelentősége tovább növelhető olyan konstrukciók alkalmazásával, amelyek optimalizált jelátviteli doménekkel fokozzák ezeknek a sejteknek a túlélését, proliferációját és tumorelleses aktivitását.

Kutatásaink főbb célkitűzései az alábbiak voltak:

1. Olyan CAR-konstrukciók fejlesztése NK-sejtek számára, amelyek fokozott aktivációt, proliferációt és tumorpenetrációt biztosítanak szolid tumor mikrokörnyezetben.
2. A különböző kostimulációs doménekkel ellátott CAR-NK sejtek funkcionális teljesítményének összehasonlítása *in vitro* 2D és 3D kokultúrákban.
3. Az *in vitro* leghatékonyabban bizonyult CAR-NK sejtek tumorelleses hatékonyságának összehasonlítása *in vivo* preklinikai modellekben, különös tekintettel a konvencionális monoklonális antitest terápiákkal szemben rezisztens szolid tumorokra.

Anyagok és módszerek

A kísérletekhez használt sejtvonalak

Az effektor sejtekként alkalmazott CD16.176V.NK-92 (a továbbiakban NK-92) sejteket Dr. Kerry S. Campbell (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, USA) bocsátotta rendelkezésünkre a Brink Biologics, Inc. (San Diego, CA, USA) közvetítésével. Ez a sejtvonal az eredeti, endogén CD16 receptort nem expresszáló NK-92 sejtvonalból származik, amelyet retrovirális transzdukcióval módosítottak annak érdekében, hogy a sejtek kifejezzék a nagy affinitású CD16 variánst (FcγRIIIA-176V).

A HER2-CAR NK-92 sejterápiás készítmények *in vitro* tumorellenes aktivitását három különböző HER2-pozitív tumorsejtvonalon hasonlítottuk össze konvencionális kokultúra vizsgálatokban. Ezek a következők voltak: az eredetileg ösztrogén-, progeszteron- és HER2-receptorokat nem expresszáló, tripla-negatív MDA-MB-468 sejtvonalból retrovirális transzdukcióval előállított, a HER2-t transzgén formájában stabilan kifejező, a továbbiakban MDA-HER2-ként hivatkozott sejtvonal, az N87 humán gyomorkarcinóma sejtvonal, valamint a JIMT-1 sejtvonal, amit egy 62 éves, trastuzumab-rezisztens emlődaganatos beteg mellhártya-metasztázisából izolálták a finnországi Tamperei Egyetem Orvosi Technológiai Intézetében. Ez a sejtvonal kiváló rezisztencia-modellnek tekinthető, mivel a belőle származó xenotranszplantátumok a tumorprogresszió során hialuronán/MUC4 polimer komplexekből álló extracelluláris mátrixot képeznek, amely sztérikus akadályt jelent a terápiás antitestek kötődésével szemben. HER2 negatív kontrollként a tripla-negatív MDA-MB-468 sejtvonalat (továbbiakban: MDA) alkalmaztuk.

A retrovírusok előállítása, és a CAR-NK-92 sejtvonalak transzdukciója

A retrovirális részecskéket HER293T csomagolósejtek tranziens transzfekcióval bejuttatott HER2-CAR-t kódoló pSFG plazmid segítségével állítottuk elő. A transzfekció során a különböző HER2-CAR konstrukciók génjeit kódoló plazmidok mellett vírus partikulák RD114 kapszid felépítését biztosító pMax.RD114, és a virális replikációhoz szükséges enzimkészletet kódoló gag-pol MoMLV Peg-Pem plazmidokat juttattuk be a HEK293T sejtekbe jet-Prime transzfekciós reagens segítségével. Három napos inkubációt követően a HEK293T sejtek felülszójában található

pszéudovírus partikulákat 0,22 µm-es steril fecskendőszűrővel tisztítottuk, és felhasználásig - 80oC-on tároltuk.

A HER2-specifikus CAR-NK92 sejtek előállításához 400 NE/ml IL-2-vel kezelt 5×10^5 /ml NK-92 sejtet tenyésztünk komplett NK-médiumban. Az NK sejtek pszéudovírus részecskékkal való transzdukcióját 20 µg/ml RetroNectin-nel bevont sejttenyésztő edényben végeztük 400 NE/ml IL-2 jelenlétében, melyben a nem transzdukált NK-92 sejteket is szaporítottuk. Az így előállított CAR NK-92 sejteket 2 ml friss 400 NE/ml IL-2 tartalmú komplett NK médiumban 24 kamrás tenyésztőedénybe helyeztük át. A CAR NK sejteket a felhasználásukig 400 NE/ml IL-2 jelenlétében, 2 ml komplett NK médiumban tenyésztettük. A felszaporítást követően minden HER2-CAR NK-92 sejtvonalból - a kiméra antigénreceptor specifikus jelölését követően - áramlási citometriás sejtválogatással (FACS) a HER2-CAR konstruktokat legalább 90%-ban kifejező sejt kultúrákat hoztunk létre. Később, minden kísérletben csak ezeket a készítményeket használtuk. A HER2-CAR expresszió mértékét rutinszerűen teszteltük.

Az alkalmazott HER2-CAR konstrukciók

Az első generációs CAR molekuláris szerkezetét a HER2 specifikus FRP5 eredetű egyláncú variábilis régió (scFV), az IgG1 „short hinge” (SH), a humán CD28 eredetű transzmembrán régió (TM), továbbá a humán T sejt receptorból (TCR) származó CD3ζ effektor doménből épült fel. (HER2.z CAR). A második generációs CAR-ok ezen kívül tartalmaztak egy a CD28, a 41BB vagy a 2B4 (HER2.CD28.z, HER2.41BB.z CAR, HER2.2B4.z) receptorokból származó intracelluláris kostimulációs domén egységet. A harmadik generációs CAR-ok az imént említett CD28 és 41BB (HER2.CD28.41BB.z CAR), illetve a 2B4 és 41BB kostimulációs endodoméneket tartalmazták.

A HER2.z, HER2.CD28.z, HER2.41BB.z, valamint HER2.CD28.41BB.z CAR konstrukciókat Dr. Stephen Gottschalk (Department of Bone Marrow Transplantation and Cellular Therapy, St. Jude Children’s Research Hospital, Memphis, TN, USA), bocsátotta rendelkezésünkre.

Áramlási citometria

A különböző HER2-CAR konstrukciók expressziójának ellenőrzéséhez a sejteket direkt immunfluoreszcenciával jelöltük 5 µg/ml Alexa Fluor 647-konjugált monomer HER2 extracelluláris doménnel 10 percig jégen. Az áramlási citometriás elemzést NovoCyte RYB

áramlási citométerrel végeztük és az adatokat a NovoExpress v1.2.1 szoftverrel értékeltük ki. A vizsgálat során legalább 10 000 sejtet elemeztünk.

A CAR NK sejtek citokin szekréciójának mérése

A genetikailag módosított NK-92 sejtek funkcionális aktivitásának meghatározásához 1×10^5 CAR NK-92 vagy nem transzdukált (NT) NK-92 sejtet (10 $\mu\text{g/ml}$ trastuzumab jelenlétében) 1 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú - a sejtenyésző edény felszínén immobilizált - rekombináns HER2-Fc molekuláris target jelenlétében, vagy HER2-pozitív célsejtek (MDA-HER2, JIMT-1 és N87) 1:1 effektor/célsejt arányú (E:T arány) kokultúrájában inkubáltuk 24 órán keresztül 96 lyukú sejtenyésző edényben. A felülúszó $\text{IFN}\gamma$ -koncentrációját enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálattal határoztuk meg. A mérésekhez Tecan Spark® mikroplate olvasót használtunk. Negatív kontroll targetként az HER2-negatív MDA-MB-468, míg effektor kontrollként az NT NK-92 sejtvonalak szolgáltak.

A CAR NK sejtek *in vitro* citotoxicitásának meghatározása

A különböző generációjú HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtek *in vitro* citotoxicitását HER2^+ , és a luciferáz markert stabilan expresszáló MDA-HER2, JIMT-1 és N87 tumor sejtvonalak jelenlétében vizsgáltuk. A mérés alapját a D-luciferin bomlását követő biolumineszcens jel detektálása adta. 3×10^4 MDA-HER2-ffLuc, JIMT-1.ffLuc, N87.ffLuc sejtet tenyésztettünk 96 lyukú lapos sejtenyésző edényben 100 μl komplett NK médiumban, melyekhez 4 óra elteltével 1:1, 0.3:1, 0.1:1, 0.03:1, 0.01:1 és 0.003:1 E:T arányban HER2-CAR vagy NT NK-92 sejteket adtunk 100 μl komplett NK médiumban. A kokultúrákat 24 órán keresztül inkubáltuk. Az effektor sejtek nélküli lyukak kezeletlen kontrollként szolgáltak. Az inkubációt követően a luciferáz aktivitást a sejtekhez adott D-luciferin szubsztrát segítségével határoztuk meg. A keletkező lumineszcens jelet azonnal mértük Tecan Spark® mikroplate olvasóval. A méréseket két technikai párhuzamosban, három független kísérletben végeztük.

A CAR NK sejtek proliferációs képességének meghatározása

A HER2-CAR NK-92 sejtek proliferációs képességét szakaszos sejtszámláláson alapuló *in vitro* tenyésztési kísérletben vizsgáltuk. Kiindulásként 1×10^4 sejtet inkubáltunk duplikátumokban 96 lyukú sejtenyésző edénybe, 400 NE/ml IL-2-t tartalmazó komplett NK-tenyésző közegben. A sejtek számát 3,5 naponta áramlási citométerrel határoztuk meg. Minden mérési pont után a

sejtekből ismét 1×10^4 életképes sejtet inkubáltunk ugyanazon körülmények között, és a proliferációs ciklust újraindítottuk. Így a kísérlet során minden 3,5 napos periódus a sejtek egy-egy növekedési ciklusát reprezentálta. A kumulatív proliferációs rátát a 3,5 napos ciklusok során mért relatív sejtszámnövekedések szorzataként számítottuk ki.

A CAR NK sejtek tumorellenes hatásának vizsgálata három-dimenziós sejt kultúrákban

5×10^3 JIMT-1.ffLuc és N87.ffLuc sejtet 96 lyukú, U-aljú sejtenyésző edényben komplett JIMT-1, illetve DMEM médiumban 3 napon át kultiváltunk. A sejtek ez idő alatt háromdimenziós (3D) tumor szferoidokat képeztek.

A HER2-CAR NK-92 és a nem transzdukált (NT) NK-92 sejtek citotoxikus hatását a szferoidokkal alkotott 3D kokultúrákban vizsgáltuk. A kísérletek során az egyes szferoidokat 2×10^5 effektor sejt hozzáadásával inkubáltuk, majd 24 órát követően a kultúrákat $1 \mu\text{g/mL}$ propidium-jodiddal kezeltük az elhalt sejtek jelölése céljából.

A sejtpusztulás mértékét a propidium-jodid fluoreszcens jelének detektálásával határoztuk meg Zeiss LSM 880 konfokális mikroszkóppal.

***In vivo* xenograft tumorok kezelése HER2-CAR NK sejtekkel**

A HER2-CAR NK-92 sejtek JIMT-1 és N87 eredetű xenograft daganatokra gyakorolt tumorellenes hatását immundeficiens NSG egérmodellben (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) vizsgáltuk. Az állatokat a The Jackson Laboratory-tól (Bar Harbor, Maine, USA) szereztük be, és a Debreceni Egyetem Élettudományi Központ Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetének Kísérleti Állatházában (nyilvántartási szám: III/4-KÁT/2015) tartottuk, SPF-minősítésű környezetben.

A hét hetes nőstény NSG egereket szubkután (s.c.) 3×10^6 JIMT-1.ffLuc vagy N87.ffLuc sejttel oltottuk be. A sejtek $100 \mu\text{L}$ PBS-ben és azzal azonos térfogatú Matrigelben kerültek szuszpendálásra, majd a keveréket a hátoldali bőrfelület alá injektáltuk. A tumorok növekedését biolumineszcens képalkotással követtük nyomon IVIS Spectrum CT készülék segítségével. Ehhez a képalkotás előtt az állatokat izofluránnal altattuk, majd intraperitoneálisan (i.p.) 150 mg/kg dózisú D-luciferint adtunk be. A 10 perces inkubációt követően biolumineszcens felvételeket készítettünk, amelyeket a Living Image 4.0 szoftverrel elemeztünk. A jel intenzitását foton/másodperc/négyzetcentiméter/szteradián ($\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$) egységben határoztuk meg, azonos méretű régiók (ROI) kijelölését követően.

A tumoros állatokat különféle kezelési csoportokba soroltuk. Az első, HER2-CAR NK-92 csoportban az állatok 5×10^6 különböző generációjú HER2-CAR NK-92 sejtet kaptak intravénásan (i.v.) a tumor oltását követő 14. naptól kezdődően, kéthetente ismételve. A nem transzdukált (NT) NK-92 kontrollcsoportban az egerek 5×10^6 NT NK-92 sejtet kaptak intravénásan, azonos időközönként. Az ADCC-kontrollcsoportban (NT + trastuzumab) az állatok kéthetente 5×10^6 NT NK-92 sejtet, illetve hetente kétszer 100 μg trastuzumab-ot kaptak intraperitoneálisan, 100 μL PBS-ben szuszpendálva.

Minden kezelt állat intraperitoneálisan humán IL-2 pótlást is kapott, hetente kétszer, 50 000 NE/ml koncentrációban 100 μL PBS-ben. A kezeléseket a tumorok mérhető növekedésének megjelenését követően kezdtük meg, és az állapotromlás vagy az etikai végpont eléréséig folytattuk.

A tumorok növekedését és a kezelések hatását rendszeres időközönként, azonos beállítások mellett rögzített biolumineszcens felvételekkel követtük nyomon. Az adatok kvantitatív kiértékelését a Living Image szoftver segítségével végeztük.

Minden állatkísérletet a FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) irányelveinek és a DIN EN ISO 9001 szabvány előírásainak megfelelően végeztünk. A kísérletek elvégzésére az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács engedélye alapján (#5-1/2017/DEMÁB) került sor.

A HER2-CAR NK sejtek tumorpenetrációjának vizsgálata immunhisztokémiával

A HER2-specifikus CAR NK-92 sejtek jelenlétét a xenograft daganatokban immunfluoreszcens mikroszkópos módszerrel igazoltuk. A JIMT-1 és N87 eredetű daganatszöveteket kipreparáltuk, majd Cryomatrix beágyazó anyagba helyeztük, végül lefagyasztottuk. A mintákból 7 μm vastagságú kriometszeteket készítettünk, amelyeket azonnal tárgylemezre helyeztünk és jégen tartottunk.

A metszeteket 200 μL PBS-sel mostuk, majd a CD16 sejtfelszíni receptor kimutatásához 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ végkoncentrációjú Alexa Fluor 647-konjugált anti-humán IgG (H+L) ellenanyaggal inkubáltuk 4 °C-on, egy éjszakán keresztül. A jelölést követően a metszeteket 1, 5 és 10 perces PBS-mosásoknak vetettük alá, melyek során a sejtmagokat 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ végkoncentrációjú DAPI-oldattal festettük. A jelölést követően mintákat 1%-os paraformaldehidben (PFA) fixáltuk 10 percen keresztül, majd PBS-sel leöblítettük. A metszeteket Panoramic Confocal mikroszkóppal vizsgáltuk

és digitalizáltuk, a fluorofórok (Alexa647 és DAPI) emissziós csatornáinak megfelelő beállítások mellett.

Statisztikai analízis

A statisztikai elemzés során a GraphPad Prism 5 szoftvert alkalmaztuk. Az adatokat átlag $\pm$ SD vagy SEM formájában adtuk meg. Két csoport összehasonlításához kétoldali t-próbát, három vagy több csoport összehasonlítására egyirányú ANOVA-t és Bonferroni-féle post hoc tesztet alkalmaztunk, mely tesztel az eltérő mintaelemszámú csoportok kerültek összehasonlításra. Az különbségeket szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$ volt.

Eredmények

A T sejt eredetű kostimulációs doméneket tartalmazó HER2-specifikus CAR NK-92 sejtek átmeneti, célzott tumorelles aktivitást fejtenek ki *in vivo* xenograft modellekben

HER2-specifikus kiméra antigén receptort kifejező NK-92 sejt vonalak előállítása

A kísérleteinkben használt CAR-konstrukciók extracelluláris antigénfelismerő egységét az FRP5 eredetű egy láncú variábilis fragment (scFv) alkotta, amely egy rövid IgG1 hinge régió keresztül kapcsolódott a CD28 transzmembrán doménhez. Az intracelluláris jelátviteli egységeket a T-sejt-specifikus CD28, illetve a T- és NK-sejtekben egyaránt funkcionáló 4-1BB receptor intracelluláris doménjei képezték. A CD28 elsősorban a korai aktivációs jelátviteli folyamatokban játszik meghatározó szerepet, míg a 4-1BB a sejtek proliferációját, túlélését és effektor funkcióinak fenntartását elősegítő jelátviteli útvonalakat aktiválja. A kostimulációs domént nem tartalmazó első generációs (HER2.z), a CD28-at (HER2.CD28.z) vagy a 4-1BB-t (HER2.41BB.z) hordozó második generációs, valamint a CD28 és 4-1BB endodoméneket egyaránt tartalmazó harmadik generációs (HER2.CD28.41BB.z) CAR-NK-92 sejteket retrovirális transzdukcióval állítottuk elő.

A HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtek hatékonyan felismerik és elpusztítják a trastuzumab-rezisztens HER2-pozitív daganatsejteket egyrétegű *in vitro* kultúrákban

A HER2-specifikus CAR NK-92 sejtek *in vitro* aktivációját IFN γ szekréciójuk, valamint lumineszcencia detektálásán alapuló citotoxicitási assay-ek segítségével értékeltük a módszerekben leírtak szerint. A HER2.CAR-NK-92 sejtek immobilizált HER2 rekombináns fehérje jelenlétében, mind HER2-pozitív tumorsejtekkel (MDA-HER2, JIMT-1, N87) alkotott kokultúrákban szignifikáns aktivációs citokinfelszabadulást mutattak. A különböző CAR-konstrukciók összehasonlítása alapján a CD28 és 4-1BB kostimulációs doméneket egyaránt tartalmazó CD28.41BB.z CAR-NK-92 sejtek indukálták a legnagyobb mértékű IFN γ -felszabadulást valamennyi vizsgált kokultúrában.

A HER2-specifikus CAR-NK-92 sejt vonalak citotoxikus tulajdonságait vizsgáltuk IL-2 aktivációs citokin jelenlétében, illetve annak hiányában. Megállapítottuk, hogy 400 IU/ml IL-2 jelenlétében a nem transzdukált NK-92 sejtek is jelentős citolitikus aktivitást mutattak, amely nagyságrendileg összevethető volt mind a HER2-CAR, mind a trastuzumabbal kezelt NT NK-92 sejtek citotoxikus hatékonyságával. Ezzel szemben IL-2 hiányában a nem transzdukált NK-92 sejtek citotoxikus aktivitása elhanyagolható volt, még magas effektor:célsejt (E:T) arányok alkalmazása mellett is.

Ebben a kísérleti elrendezésben sem az egyes CAR-konstrukciók citolitikus hatékonysága között, sem az ADCC-kontrollként alkalmazott trastuzumabbal kezelt NT NK-92 sejtek és a HER2-CAR NK-92 sejtekkel kokultivált minták között nem volt kimutatható szignifikáns különbség.

A 4-1BB kostimulációs endodomént hordozó HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtek hatékonyan penetrálják a CD44-negatív N87 háromdimenziós tumorszferoidokat, míg a CD44-pozitív JIMT-1 szferoidok rezisztensek maradnak

Korábban munkacsoportunk igazolta, hogy a trastuzumab-rezisztens daganatok, így a JIMT-1 sejtvonalból származó tumorxenograftok CD44-ben gazdag extracelluláris mátrixa (ECM) hatékony fizikai és funkcionális védelmet biztosít a háromdimenziós kultúrát kialakító daganatsejtek számára. Ez a kompakt ECM-struktúra jelentősen korlátozza az antitestek hozzáférését a tumorszferoidok magi régiójához, és ezáltal nagymértékben csökkenti a trastuzumab által közvetített NK-sejt citotoxicitást. Ezzel szemben korábbi eredményeink azt is kimutatták, hogy a hagyományos HER2-specifikus CAR T-sejtek képesek áthatolni ezen az ECM által kialakított gáton, felismerni a szferoid belső régióiban lokalizálódó HER2 molekulákat, és ennek következtében kifejezett citotoxikus választ indukálni.

Ezen megfigyelések alapján vizsgáltuk a HER2-specifikus CAR NK-92 sejtek tumorelles hatékonyságát háromdimenziós tumorszferoid modellekben, trastuzumab-rezisztens (CD44-pozitív JIMT-1), illetve trastuzumab-érzékeny (CD44-negatív N87) sejtvonalak alkalmazásával.

Eredményeink azt mutatták, hogy a CD44-pozitív, trastuzumab-rezisztens JIMT-1 szferoidok nagyrészt rezisztensek maradtak a HER2-CAR NK-92 sejtes kezeléssel szemben, mivel csak minimális PI-felvételt mutattak, amely elsősorban a szferoidok perifériás régiójára korlátozódott (14. ábra, JIMT-1, HER2-CAR csoportok). A trastuzumab-irányított NT NK-sejtekkel kezelt mintákban enyhe, de továbbra is korlátozott citotoxikus hatást figyeltünk meg, amely szintén kizárólag a külső sejtrétegeket érintette (14. ábra, JIMT-1, NT+TRAST).

Ezzel szemben a HER2-specifikus CAR NK-92 sejtek hatékonyan felismerték és penetrálták a CD44-negatív, trastuzumab-érzékeny N87 szferoidokat. Különösen figyelemre méltó volt, hogy a 4-1BB-t tartalmazó (41BB.z), valamint a kettős kostimulációs doménnel rendelkező (CD28.41BB.z) CAR-konstrukcióval módosított NK-92 sejtek kifejezetten intenzív citotoxikus választ mutattak, és a szferoidok szerkezete 24 órán belül nagymértékben károsodott. Ezzel

szemben mind a trastuzumab-irányított NT NK-sejtekkel, mind a kezeletlen kontroll NT NK-sejtekkel kezelt N87 szferoidok elhanyagolható tumorelles hatást mutattak.

A HER2-CAR NK sejtek nem képesek a CD44+, trastuzumab-rezisztens JIMT-1 xenograftok *in vivo* eliminálására

Annak vizsgálatára, hogy a különböző penetrációs kapacitások miként befolyásolják a daganatok *in vivo* eliminációjának hatékonyságát, HER2-pozitív, CD44-pozitív, trastuzumab-rezisztens JIMT-1.ffLuc sejtekből származó szubkután xenograft modelleket hoztunk létre immundeficiens NSG egerekben. Ez a modell lehetőséget biztosított annak értékelésére, hogy a háromdimenziós tumorszerkezetben és komplex tumormikrokörnyezetben megfigyelt *in vitro* rezisztenciamechanizmusok *in vivo* körülmények között is fennmaradnak-e.

A HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtek, valamint a trastuzumab-közvetített nem transzdukált (NT) NK-92 sejtek tumorelles aktivitását 5×10^6 effektor sejt intravénás beadásával vizsgáltuk. A sejtkezeléseket a daganatsejtek inokulálását követő 14. naptól kezdtük meg, és kéthetes időközönként ismételtük. Az antitestfüggő sejt citotoxicitás (ADCC) *in vivo* modellezése céljából a megfelelő csoportokban trastuzumab-kezelést is alkalmaztunk, amelynek során 100 µg monoklonális antitestet adtunk be hetente kétszer, szintén a 14. naptól kezdődően. A daganatok növekedését longitudinálisan biolumineszcens képalkotással követtük nyomon, amely lehetővé tette a tumorprogresszió kvantitatív értékelését, valamint az egyes kezelési csoportok közötti összehasonlítást. Emellett Kaplan-Meier módszerrel elemeztük az állatok túlélését is a módszerekben leírtaknak megfelelően.

Az adatok összegzése alapján megállapítottuk, hogy sem a különböző HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtkezelések, sem a trastuzumab és NK-92 sejtek kombinált alkalmazása nem eredményezett kimutatható tumorregressziót, illetve nem járt az általános túlélés szignifikáns javulásával a trastuzumab-rezisztens JIMT-1.ffLuc xenograft modellben.

A HER2-CAR NK-sejtek jelentős *in vivo* tumorelles hatást fejtenek ki a CD44-, trastuzumab-érzékeny N87 xenograftokkal szemben

A HER2-CAR módosított NK-92 sejtek daganatellenes hatékonyságát a trastuzumab-érzékeny, CD44-negatív *in vivo* modellben is megvizsgáltuk, összehasonlítva a HER2-specifikus CAR-NK-92 sejteket és a trastuzumab-irányított NK-sejteket. Ennek érdekében NSG egerekbe HER2⁺/CD44⁻ N87.ffLuc tumor sejteket injektáltunk szubkután, a JIMT-1 xenograft modellnél alkalmazott kísérleti felépítéssel analóg módon.

Eredményeink alapján mind a második, mind a harmadik generációs HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtek hatékonyan felismerték és elpusztították a CD44-negatív N87 xenograftokat. Ugyanakkor a CAR NK-92 sejtek és a trastuzumab-irányított NK-sejtek tumornövekedést gátló hatékonysága között nem mutatkozott szignifikáns különbség, ami arra utal, hogy ebben a trastuzumab-érzékeny modellrendszerben az antitestközvetített és a CAR-alapú megközelítések összevethető tumorellenes aktivitást fejtettek ki.

Mindkét kezelési stratégia szignifikánsan meghosszabbította az állatok túlélését a kezeletlen kontrollcsoporthoz képest, azonban egyik megközelítés sem eredményezett teljes tumorregressziót.

Eredményeink egyrészt alátámasztják a HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtek potenciálját a célzott daganatellenes terápiában, másrészt rámutatnak arra, hogy a terápiás hatékonyság további fokozásához további konstrukciós és funkcionális fejlesztésekre van szükség.

A 2B4 és 4-1BB kostimulációs domének kombinációja fokozott tumorellenes aktivitást biztosít HER2-specifikus CAR-NK sejtek számára CD44-pozitív JIMT-1 xenograftokban

NK-sejt-specifikus jelátviteli doméneket tartalmazó HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtvonalak előállítása retrovirális transzdukciónal

A genetikailag módosított természetes ölüsejtek citotoxikus hatékonyságának fokozása érdekében a korábban részletezett retrovirális transzdukciónal alkalmazásával különböző, HER2-specifikus, NK-sejt-specifikus intracelluláris jelátviteli doméneket tartalmazó CAR-konstrukciókat hoztunk létre. Ennek során 2B4.z, 41BB.z, valamint a két jelátviteli domént egyesítő 2B4.41BB.z konstrukciókat fejeztettünk ki az NK-92 sejtvonalban.

A különböző HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtvonalak hatékonyan felismerik és elpusztítják a HER2-pozitív célsejteket egyrétegű *in vitro* kokultúrában

Az NK-sejtek jelátvitelét specifikusan iniciáló intracelluláris szignáldoméneket tartalmazó HER2-CAR NK-92 sejtek funkcionális aktivitását több, egymást kiegészítő *in vitro* megközelítéssel vizsgáltuk. Az effektor sejtek aktivációját az IFN γ -termelés mértékével jellemeztük, míg citotoxikus kapacitásukat rövidtávú, biolumineszcencia-alapú ölési assay segítségével határoztuk meg, különböző effektor:célsejt (E:T) arányok alkalmazása mellett. Ez a kísérleti felépítés lehetővé tette a CAR-mediált felismerés és az NK-sejtek effektor válaszában kvantitatív összehasonlítását az eltérő intracelluláris jelátviteli konfigurációk esetében. A különböző CAR-konstrukciók funkcionális összehasonlítása során megállapítottuk, hogy a 2B4 és 4-1BB jelátviteli doméneket egyesítő 2B4.41BB.z CAR-t expresszáló NK-92 sejtek következetesen a legmagasabb IFN γ -szekréciót produkálták a többi konstrukcióhoz viszonyítva. Ez az eredmény arra utal, hogy a két NK-sejt-specifikus kostimulációs domén kombinációja additív vagy szinergista módon járul hozzá az NK-sejtek aktivációs válaszában felerősítéséhez.

A HER2-CAR NK-92 sejtek tumorölő potenciálját a korábban már leírt biolumineszcencia-alapú citotoxicitási kokultúra rendszerben vizsgáltuk, 24 órás inkubációs idő alkalmazásával. Eredményeink alapján valamennyi HER2.CAR-expresszáló NK-92 sejtpopuláció hatékonyan eliminálta a HER2-pozitív humán daganatsejt-vonalakat (MDA-HER2, JIMT-1, N87) 1:1 E:T arány mellett, ami a CAR-mediált felismerés és effektor válasz hatékonyságát igazolja. A citotoxikus aktivitás mértéke azonban az E:T arány csökkentésével fokozatosan mérséklődött, ami arra utal, hogy a HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtek tumorölő hatékonysága dózisfüggő módon alakul ebben a rendszerben.

A különböző CAR-konstrukciók összehasonlítása során megfigyeltük, hogy azok a HER2-specifikus CAR-molekulák, amelyek a 4-1BB (CD137) kostimulációs domént is tartalmazzák, alacsonyabb E:T arányok mellett is fokozott citotoxikus aktivitást mutattak a 4-1BB-t nem tartalmazó konstrukciókhoz képest.

A 2B4.41BB.z CAR-NK-92 sejtek tartós proliferációs előnyt mutatnak HER2-pozitív célsejtekkel végzett ismételt stimuláció során

A különböző HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtek expanziós képességét ún. ismételt stimulációs, vagy másnéven „rechallenge” assay alkalmazásával vizsgáltuk, amely lehetővé tette az ismételt antigén-expozícióra adott proliferációs válasz értékelését. Eredményeink alapján a 2B4.41BB.z CAR-konstrukciót expresszáló NK-92 sejtek szignifikánsan gyorsabb és nagyobb mértékű proliferációt mutattak a második generációs CAR-konstrukciókhoz képest HER2-pozitív MDA-HER2 célsejtekkel szemben.

Ugyanakkor ez a fokozott proliferációs kapacitás nem járt együtt szignifikánsan erősebb citotoxikus aktivitással a HER2-pozitív célsejtekkel szemben. Ezen túlmenően megfigyeltük, hogy a HER2-pozitív célsejtek ismételt expozíciója - különösen a hatodik stimulációs ciklust követően - fokozatosan kimerítette az effektor sejtek tumorelleses válaszkészségét. Ennek következtében a HER2-CAR NK-92 sejtek citolitikus hatékonysága a további ciklusok során progresszíven csökkent, ami az effektor sejtpopuláció funkcionális kimerülésére utal.

A harmadik generációs 2B4.41BB.z CAR NK-92 sejtek hatékonyan penetrálják mind a CD44-pozitív, mind a CD44-negatív tumorszferoidokat háromdimenziós kokultúrákban

A „rechallenge” kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy a harmadik generációs 2B4.41BB.z CAR-NK-92 sejtek kiemelkedő és tartós proliferációs kapacitással rendelkeznek mind a CD44-pozitív JIMT-1, mind a CD44-negatív N87 HER2-pozitív célsejtekkel szemben. Ennek megfelelően indokoltá vált annak vizsgálata, hogy a 2B4.41BB.z CAR NK-92 sejtek fokozott expanziós képessége háromdimenziós környezetben is együtt jár-e hatékony tumorpenetrációval és tumorsejt-öléssel. E célból háromdimenziós tumorszferoid modelleket hoztunk létre, amelyek eltérő extracelluláris mátrix-szerkezettel és CD44-expressziós profillal rendelkeztek.

Eredményeink azt mutatták, hogy a magas CD44 expresszióval és trastuzumab-rezisztenciájával jellemzett JIMT-1 tumorszferoidok esetében a 2B4.41BB.z CAR NK-92 sejtek hatékonyan áthatoltak a szferoid kompakt szerkezetén, és elérték annak belső rétegeit is. A propidium-jodid

(PI) kiterjedt és egyenletes beépülése a szferoid teljes keresztmetszetében mély és homogén tumorsejt-pusztulásra utalt, ami arra enged következtetni, hogy ezek az effektor sejtek képesek voltak leküzdeni a CD44-ben gazdag extracelluláris mátrix által kialakított fizikai és funkcionális gátakat. Ez a megfigyelés különösen jelentős, mivel a JIMT-1 szferoidok ismertén korlátozzák mind az antitestek, mind az immunsejtek hozzáférését a tumor belső régióihoz.

Ezzel szemben a nem transzdukált NK-92 sejtek a JIMT-1 szferoidokkal szemben nem mutattak kimutatható citolitikus aktivitást, ami megerősíti, hogy a megfigyelt tumorsejt-ölés CAR-mediált mechanizmus következménye. A kizárólag 2B4.z vagy 4-1BB.z jelátviteli domént tartalmazó CAR-NK-92 sejtek esetében csupán mérsékelt, a szferoidok perifériájára lokalizálódó PI-pozitivitást figyeltünk meg. Ezek az adatok arra utalnak, hogy bár ezen konstrukciók képesek voltak a célsejtek felismerésére és a felszíni tumorsejtek eliminálására, önmagukban nem biztosítottak elegendő jelátviteli támogatást a mélyebb tumorpenetrációhoz.

Ezzel párhuzamosan N87 tumorszferoidokon is elvégeztük a vizsgálatokat. Ezek a szferoidok HER2-pozitívak, ugyanakkor nem expresszálnak CD44-et, és trastuzumab-érzékeny fenotípussal rendelkeznek. Ebben a modellrendszerben mindhárom HER2-specifikus CAR-NK-92 variáns – a 2B4.z, a 4-1BB.z és a 2B4.4-1BB.z konstrukciók – kifejezett citotoxikus aktivitást mutattak. A PI-festés mindegyik konstrukció esetében a szferoid teljes térfogatában megfigyelhető volt, ami arra utal, hogy CD44 hiányában és az extracelluláris mátrix gátló szerepének csökkenésével a CAR-NK-92 sejtek hatékonyan hozzáférnek a tumorszferoid belső régióihoz, függetlenül a kostimulációs konfigurációtól.

A 2B4.41BB.z jelátviteli domént tartalmazó HER2-CAR-NK-92 sejtek fokozott *in vivo* tumorelles hatékonyságot és mély intratumorális penetrációt mutatnak CD44-pozitív és CD44-negatív xenograft modellekben

Végül egy preklinikai állatkísérletes modellben vizsgáltuk a különböző HER2-specifikus CAR-NK-92 sejt-készítmények tumorelles hatékonyságát HER2⁺/CD44⁺ JIMT-1, valamint HER2⁺/CD44⁻ N87 xenograft alapú *in vivo* rendszerekben.

Az *in vivo* vizsgálatok során a 2B4.41BB.z kostimulációs szignáldomént tartalmazó CAR-NK-92 sejtek mind az ADCC-rezisztens JIMT-1, mind az ADCC-szenzitív N87 xenograft modellekben kifejezett tumorelles aktivitást mutattak. A kezelés mindkét daganatmodell esetében jelentős tumorregressziót eredményezett, és szignifikánsan meghosszabbította az állatok túlélését a

kizárólag 2B4.z vagy 4-1BB.z jelátviteli domént tartalmazó CAR-NK-92 sejtekkel kezelt csoportokhoz viszonyítva.

Ezek az eredmények alátámasztják a kettős kostimulációs doméneket alkalmazó CAR-konstrukciók fokozott terápiás potenciálját, különösen a szolid tumorokra jellemző immunológiai és strukturális rezisztenciamechanizmusok leküzdésében.

Az *in vivo* kísérletek lezárását követően az egerekből kiperparált xenograftokból körülbelül 7 µm vastagságú metszeteket készítettünk immunhisztokémiai (IHC) analízis céljából.

A kiperparált daganatok hisztológiai elemzése megerősítette, hogy a 2B4.41BB.z CAR NK-92 sejtek *in vivo* körülmények között mélyen infiltrálták a tumorparenchymát. A trastuzumab-rezisztens JIMT-1 xenograftok esetében kizárólag a 2B4.4-1BB.z konstrukciót expresszáló NK-92 sejtek voltak kimutathatók a tumor teljes térfogatában, míg más CAR-konstrukciók esetében intratumorális jelenlét nem volt megfigyelhető.

Az N87 xenograftokban ezzel szemben valamennyi vizsgált HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtpopuláció diffúz beszűrődést mutatott, azonban a 2B4.4-1BB.z CAR-NK-92 sejtek jelenléte ebben a modellben is a legkiterjedtebbnek bizonyult.

Ezek az eredmények alátámasztják, hogy a kettős kostimulációs jelátviteli domént tartalmazó CAR-konstrukció fokozott tumormigrációs és szöveti penetrációs képességgel rendelkezik, amely kulcsfontosságú tulajdonság lehet a sűrű, fibrózisos tumormikrokörnyezetben alkalmazott hatékony CAR NK-alapú terápiák szempontjából.

Összefoglalás

A HER2-pozitív daganatok kezelése továbbra is jelentős klinikai kihívást jelent, különösen a terápiás rezisztencia és a tumor mikrokörnyezet immunszuppresszív hatásai miatt. Az adoptív sejtherápiák, ezen belül a kiméra antigén recepttorral (CAR) módosított immunsejtek alkalmazása új lehetőségeket teremt a célzott tumorellenes immunválasz fokozására. Míg a CAR-T sejtek hematológiai malignitásokban kiemelkedő eredményeket értek el, szolid tumorok esetében hatékonyságuk korlátozott. A természetes ölősejtek (NK-sejtek) CAR-módosítása ígéretes alternatívát jelenthet, különösen biztonságossági és allogén alkalmazhatósági szempontból.

Kísérleteink során HER2-specifikus CAR-t expresszáló NK-92 sejtvonalakat hoztunk létre, amelyeket funkcionálisan jellemeztünk. A T-sejt eredetű kostimulációs doméneket tartalmazó konstrukciók *in vitro* körülmények között hatékony citotoxikus aktivitást mutattak HER2-pozitív, akár trastuzumab-rezisztens daganatsejtekkel szemben. *In vivo* xenograft modellekben azonban tumorellenes hatásuk korlátozott és átmeneti jellegű volt, különösen CD44-pozitív, rezisztens tumorok esetén.

A hatékonyság javítása érdekében NK-sejt-specifikus jelátviteli doméneket tartalmazó, harmadik generációs CAR-konstrukciót fejlesztettünk. A 2B4 és 4-1BB kostimulációs domének kombinációját hordozó 2B4.41BB.z CAR-NK-92 sejtek fokozott proliferációs kapacitást, tartósabb aktivációt és ismételt antigénstimuláció mellett is fennmaradó effektor funkciót mutattak. Háromdimenziós tumorszferoid modellekben ezek a sejtek hatékonyabb tumorpenetrációt biztosítottak mind CD44-negatív, mind CD44-pozitív daganatok esetében. *In vivo* vizsgálatokban a kombinált kostimulációs jelátvitelt hordozó CAR-NK sejtek szignifikánsan erősebb tumorellenes aktivitást és mélyebb intratumorális infiltrációt mutattak, még korábban rezisztens xenograft modellekben is.

Eredményeink igazolják, hogy a kostimulációs domének racionális megválasztása meghatározó szerepet játszik a CAR-NK sejtek funkcionális teljesítményének optimalizálásában. A 2B4 és 4-1BB szignálút vonal együttes aktiválása szinergikus módon javította az NK-sejtek proliferációját, citotoxicitását és tumorinfiltrációs képességét.

A bemutatott preklinikai adatok alátámasztják, hogy az NK-sejt-specifikus jelátviteli optimalizálás ígéretes stratégia lehet a terápiára rezisztens szolid tumorok kezelésében, és megfelelő alapot biztosítanak a további transzlációs és klinikai vizsgálatok számára.

Új megállapítások/ eredmények

A daganatos megbetegedések terápiás spektrumának szélesítése érdekében végzett kutatásaink során olyan fejlesztési stratégiát dolgoztunk ki, amely a genetikailag módosított természetes ölüsejtek alkalmazásával célozza a klinikai kimenetek javítását.

Az értekezés első szakaszában igazoltuk, hogy a konvencionális (T-sejt alapú) kiméra antigén receptorokkal (CAR) módosított természetes ölüsejtek (NK-92) *in vitro* körülmények között szignifikáns aktivációra és emelkedett IFN- γ szekrécióra képesek. Vizsgálataink ugyanakkor rávilágítottak a szolid tumorok komplexitásából adódó korlátokra: bár a HER2-CAR-NK-92 sejtek *in vivo* xenograft modellekben képesek voltak lassítani a daganatnövekedést, a tumor-mikrokörnyezet és az extracelluláris mátrix részét képező CD44 adhéziós molekula jelenléte mellett a teljes tumorradikáció elmaradt. Ezen eredmények alátámasztották, hogy a hagyományos konstrukciók nem elegendőek a fizikai és biológiai gátak áttöréséhez.

A kutatás második fázisában a CAR-molekulák NK-sejt-specifikus optimalizálására helyeztük a hangsúlyt. Kimutattuk, hogy a receptor intracelluláris doménjébe integrált 2B4 és 4-1BB kostimulációs egységek szinergiája alapvetően megváltoztatja az effektor sejtek funkcionális profilját. A háromdimenziós (3D) szferoid modellekben végzett kísérleteink igazolták, hogy ez a harmadik generációs konstrukció (HER2.2B4.41BB.z) rendelkezik a legkifejezettebb intratumorális penetrációs képességgel, még a CD44 expresszió szempontjából heterogén daganatszövetek esetén is. Preklinikai (NSG egér) modellekben a 2B4-4-1BB jelátviteli útvonal aktiválása minden korábbi változatnál robusztusabb és tartósabb antitumor választ váltott ki, szignifikánsan meghosszabbítva a kísérleti állatok túlélési idejét. Eredményeink így új irányt jelölnek ki a CAR-NK terápiák klinikai translációjában, bizonyítva, hogy a jelátviteli utak célzott finomhangolása képes áttörni a szolid daganatok rezisztencia-mechanizmusait.

Melléklet



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/240/2026.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Gergely Bence
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Gergely, B.**, Vereb, M. A., Rebenku, I., Szöőr, Á., Vereb, G.: Breaking the barrier: Synergistic 2B4.4-1BB signaling potentiates HER2-CAR NK cells to penetrate and destroy ADCC-resistant tumors.
Cancer Lett. 651, 1-9, 2026.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2026.218534>
IF: 10.1 (2024)
2. **Gergely, B.**, Vereb, M. A., Rebenku, I., Vereb, G., Szöőr, Á.: Targeting HER2-Positive Solid Tumors with CAR NK Cells: CD44 Expression Is a Critical Modulator of HER2-Specific CAR NK Cell Efficacy.
Cancers. 17 (5), 1-17, 2025.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers17050731>
IF: 4.4 (2024)

További közlemények

3. Barden, M., Eisenbroich, P. R., Haas, V., Ertelt, M., Pervan, P., Velas, L., **Gergely, B.**, Szöőr, Á., Harrer, D. C., Bezler, V., Holzinger, A., Friis, R. U. W., Vereb, G., Schütz, G., Schoeder, C. T., Hombach, A. A., Abken, H.: Integrating binding affinity and tonic signaling enables a rational CAR design for augmented T cell function.
J. Immunother. Cancer. 12 (12), 1-14, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/jitc-2024-010208>
IF: 10.6





**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

4. Kola, J. B., Turarova, B., Csige, D., Sipos, Á., Varga, L., **Gergely, B.**, Refai, F. A., Uray, I. P.,
Docsa, T., Uray, K.: Stretch-Induced Down-Regulation of HCN2 Suppresses Contractile
Activity.
Molecules. 28 (11), 1-14, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28114359>
IF: 4.2

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 29,3

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
14,5**

A DEENK a Jelölt által a Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2026.04.28.

