

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Gergely Bence

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

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2026.

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Gergely Bence

Témavezető: Dr. Szöör Árpád



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2026.

Tárgyszavak

HER2-pozitív tumorok, kiméra antigén receptor (CAR), immunterápia, sejttérápia, CAR NK sejtek, NK sejt expanszió, NK sejt perzisztencia

Keywords

HER2-positive tumors, chimeric antigen receptor (CAR), immunotherapy, cell therapy, CAR NK cells, NK cell expansion, NK cell persistence

Tartalom

1.	Rövidítések jegyzéke	7
2.	Bevezetés	10
3.	Irodalmi áttekintés	12
3.1.	Bevezetés az immunterápiákba	12
3.2.	Adoptív immunterápiák	16
3.2.1.	Tumor infiltráló limfocita (TIL) terápia	16
3.2.2.	Génmódosított immunsejt terápia	17
3.3.	A kiméra antigén receptorokon alapuló T-sejt terápia	20
3.3.1.	A CAR T-sejt terápia biológiai háttere	20
3.3.2.	A CAR T-sejt terápia klinikuma és perspektívái	24
3.3.3.	A CAR T-sejt terápia korlátai	26
3.4.	A természetes ölüsejteken alapuló immunsejt-terápia	30
3.4.1.	Biológiai háttér	30
3.4.2.	Az NK-sejtek klinikai felhasználásának perspektívái	34
3.4.3.	A CAR NK-sejtes immunterápia	36
4.	Célkitűzések	43
5.	Anyagok és módszerek	44
5.1.	Anyagok, törzsoldatok	44
5.1.1.	Általános törzsoldatok, többfunkciós reagensek	44
5.1.2.	CAR NK sejt előállítás	45
5.1.3.	Áramlási citometria, immunfluoreszcenciás jelölés, mikroszkópia	45
5.1.4.	Gyártó által összeállított pufferek és reagensek	45
5.1.5.	In vivo xenograft kísérletek	46
5.2.	A kísérletekhez használt sejtvonalak	46
5.3.	A retrovírusok előállítása, és a CAR-NK-92 sejtvonalak transzdukciója	47
5.4.	Az alkalmazott HER2-CAR konstrukciók	48
5.5.	Áramlási citometria	49
5.6.	A CAR NK sejtek citokin szekréciójának mérése	49
5.7.	A CAR NK sejtek <i>in vitro</i> citotoxicitásának meghatározása	49
5.8.	A CAR NK sejtek proliferációs képességének meghatározása	50

5.9.	A CAR NK sejtek tumorellenes hatásának vizsgálata három-dimenziós sejt kultúrákban	50
5.10.	<i>In vivo</i> xenograft tumorok kezelése HER2-CAR NK sejtekkel	51
5.11.	A HER2-CAR NK sejtek tumorpenetrációjának vizsgálata immunhisztokémiával .	52
5.12.	Statisztikai analízis	53
6.	Eredmények	54
6.1.	A T sejt eredetű kostimulációs doméneket tartalmazó HER2-specifikus CAR NK-92 sejtek átmeneti, célzott tumorellenes aktivitást fejtenek ki <i>in vivo</i> xenograft modellekben	54
6.1.1.	HER2-specifikus kiméra antigén receptort kifejező NK-92 sejt vonalak előállítása	54
6.1.2.	A HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtek hatékonyan felismerik és elpusztítják a trastuzumab-rezisztens HER2-pozitív daganatsejteket egyrétegű <i>in vitro</i> kultúrákban	57
6.1.3.	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	59
6.1.4.	A HER2-CAR NK sejtek nem képesek a CD44 ⁺ , trastuzumab-rezisztens JIMT-1 xenograftok <i>in vivo</i> eliminálására	61
6.1.5.	A HER2-CAR NK-sejtek jelentős <i>in vivo</i> tumorellenes hatást fejtenek ki a CD44 ⁺ , trastuzumab-érzékeny N87 xenograftokkal szemben	63
6.2.	A 2B4 és 4-1BB kostimulációs domének kombinációja fokozott tumorellenes aktivitást biztosít HER2-specifikus CAR-NK sejtek számára CD44-pozitív JIMT-1 xenograftokban	64
6.2.1.	A 2B4 és 4-1BB jelátviteli doméneket tartalmazó HER2-specifikus CAR-NK-92 sejt vonalak előállítása retrovirális transzdukcióval	64
6.2.2.	A különböző HER2-specifikus CAR-NK-92 sejt vonalak hatékonyan felismerik és elpusztítják a HER2-pozitív célsejteket egyrétegű <i>in vitro</i> kokultúrában	66
6.2.3.	A 2B4.41BB.z CAR-NK-92 sejtek tartós proliferációs előnyt mutatnak HER2-pozitív célsejtekkel végzett ismételt stimuláció során	68
6.2.4.	A harmadik generációs 2B4.41BB.z CAR NK-92 sejtek hatékonyan penetrálják mind a CD44-pozitív, mind a CD44-negatív tumorszferoidokat háromdimenziós kokultúrákban	69
6.2.5.	A 2B4.41BB.z jelátviteli domént tartalmazó HER2-CAR-NK-92 sejtek fokozott <i>in vivo</i> tumorellenes hatékonyságot és mély intratumorális penetrációt mutatnak CD44-pozitív és CD44-negatív xenograft modellekben	71
7.	Megbeszélés	77

7.1.	A T-sejt-specifikus rekombináns CAR molekulákkal módosított NK sejtek átmeneti tumorellenes hatást fejtenek ki <i>in vivo</i> xenograft modellekben.	79
7.2.	A 2B4.41BB szignalizációs útvonal jelentősen növeli a HER2-CAR NK sejtek tumor ellenes hatékonyságát a CD44 ⁺ , trastuzumab rezisztens JIMT-1 xenograft modellben.	82
8.	Összefoglalás	87
9.	Summary	88
10.	Irodalomjegyzék	89
10.1.	Hivatkozott közlemények jegyzéke	89
10.2.	Közlemények DEENK által hitelesített jegyzéke	106
11.	Köszönetnyilvánítás	110
12.	Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai	112

1. Rövidítések jegyzéke

A647	Alexa Fluor 647
ACT	Adoptív sejterápia (<i>Adoptive cell therapy</i>)
ADCC	Ellenanyagfüggő sejtes citotoxicitás (<i>Antibody dependent cellular cytotoxicity</i>)
ALL	Akut lymphoblasztos leukémia (<i>Acute lymphoblastic leukaemia</i>)
AML	Akut mieloid leukémia (<i>Acute myeloid leukemia</i>)
BCMA	B-sejt érési antigén (<i>B-cell maturation antigen</i>)
BiKE	Bispecifikus killer engager
BiTE	Bispecifikus T-sejt aktiváló molekula (<i>Bispecific T-cell Engagers</i>)
CAR	Kiméra antigén receptor (<i>Chimeric antigen receptor</i>)
CAF	Tumor-asszociált fibroblaszt (<i>Cancer-associated fibroblast</i>)
Cas9	CRISPR-asszociált fehérje 9 (<i>CRISPR-associated protein 9</i>)
CB-NK	Köldökszínór-eredetű NK-sejtek (<i>Cord blood-derived NK-cells</i>)
CCL5	C-C motívumú kemokin ligandum 5 (<i>C-C motif chemokine ligand 5</i>)
CD3ζ	Natív T sejt receptor komplex CD3ζ alegysége
CDC	Komplement mediált citotoxicitás (<i>Complement dependent cytotoxicity</i>)
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CRS	Citokinfelszabadulási szindróma / „citokin vihar” (<i>Cytokine release syndrome</i>)
CTLA-4	Citotoxikus T limfocita antigén 4 (<i>Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4</i>)
DAPI	4',6-Diamidin-2'-fenilindol dihidroklorid
DLBCL	Diffúz nagy B-sejtes limfóma (<i>Diffuse large B-cell lymphoma</i>)
DNAM1	DNAX kiegészítő molekula-1 (<i>DNAX Accessory Molecule-1</i>)
ECM	Extracelluláris mátrix (<i>Extracellular matrix</i>)
EGFR	Epidermális növekedési factor receptor (<i>Epidermal growth factor receptor</i>)
Fas	Fas sejtfelszíni halál receptor (<i>Fas cell surface death receptor</i>)
FDA	Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatal (<i>Food and Drug Administration</i>)

FLT-3L	Fms-kapcsolt receptor tirozin-kináz 3 ligandum (<i>Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 3 Ligand</i>)
GD2	Disialoganglioside
GM-CSF	Granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor (<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
GvHD	Graft-versus-host betegséghez (<i>Graft-versus host disease</i>)
GzmB	Granzim B (<i>Granzyme B</i>)
HER2	Humán epidermális növekedési faktor receptor 2-es típusa (<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>)
HLA	Humán leukocita antigén (<i>Human leukocyte antigen</i>)
IFNγ	Interferon gamma
IL	Interleukin
iPSC	Indukált pluripotens őssejt (<i>Induced pluripotent stem cell</i>)
ITAM	Immunreceptor tirozin-alapú aktiváló motívum (<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>)
ITIM	Immunreceptor tirozin-alapú gátló motívum (<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>)
JAK1/3	Janusz-kináz 1 és 3 (<i>Janus kinase 1 and 3</i>)
KIR	Killer-cell immunoglobulin-like receptor
LAG3	Limfocita aktiváló gén 3 fehérje (<i>Lymphocyte activation gene 3 protein</i>)
MAGE-A3	Melanoma asszociált antigén A3 (<i>Melanoma-associated antigen A3</i>)
MICA/B	Fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) I. lánchoz kapcsolódó fehérje A/B (<i>Major histocompatibility complex (MHC) class I chain-related protein A/B</i>)
MDSC	Mieloid eredetű szuppresszor sejtek (<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>)
MHC	Fő hisztokompatibilitási komplex (<i>Major histocompatibility complex</i>)
MSLN	Mesothelin
NK sejt	Természetes ölősejt (<i>Natural killer cell</i>)
NKG2D	Természetes ölősejt csoport 2D (<i>Natural Killer Group 2D</i>)
NSG	NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1 Wjl/SzJ
NT sejt	Nem transzdukált NK sejt (<i>Non-transduced NK cell</i>)
NY-ESO-1	New York-i nyelőcső pikkelyes sejt karcinóma 1

	<i>(New York esophageal squamous cell carcinoma 1)</i>
ORR	Objektív válaszarány (<i>Objective response rate</i>)
PB-NK	Perifériás vér NK sejtei (<i>Peripheral blood NK cells</i>)
PD-1	Programozott sejthalál fehérje 1 (<i>Programmed Cell Death Protein 1</i>)
PD-L1	Programozott sejthalál ligand 1 (<i>Programmed Cell Death Ligand 1</i>)
PFA	Paraformaldehid (<i>Paraformaldehyde</i>)
PFS	Progressziómentes túlélés (<i>Progression-free survival</i>)
PRF	Perforin (<i>Perforin</i>)
scFv	Egyszálú variábilis fragment (<i>Single-chain variable fragment</i>)
SLAM	Jelző limfocita aktivációs molekula (<i>signalling lymphocyte activation molecule</i>)
STAT5	Jelátvivő és transzkripció aktivátor 5 (<i>Signal transducer and activator of transcription 5</i>)
TAA	Tumor asszociált antigén (<i>Tumor-associated antigen</i>)
TCR	T sejt receptor (<i>T-cell receptor</i>)
TGF-β	Transzformáló növekedési faktor béta (<i>Transforming growth factor beta</i>)
TIGIT	T-sejt immunreceptor Ig és ITIM doménekkal (<i>T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i>)
TIL	Tumor infiltráló limfocita (<i>Tumor infiltrating lymphocyte</i>)
TME	Tumor mikroköznyezet (<i>Tumor microenvironment</i>)
TNF-α	Tumor nekrozis faktor alfa (<i>Tumor necrosis factor alpha</i>)
TRAIL	TNF-hez kapcsolódó sejthalált indukáló ligandum (<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>)
TriKE	Trispecifikus killer engager
T_{reg}	Szabályozó T-sejtek (<i>Regulatory T-cells</i>)
TRUCK	T cells redirected for universal cytokine-mediated killing
TSA	Tumorspecifikus antigén (<i>Tumor-specific antigen</i>)
T-VEC	Talimogene laherparepvec
ULBP	UL16-kötő fehérje 1 (<i>UL16 binding protein 1</i>)
XCL1	XC motívumú kemokin ligandum 1 (<i>XC motif chemokine ligand 1</i>)

2. 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 hosszú távú 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 immunterápiás megközelítések – beleértve a checkpoint-gátlókat, a monoklonális antitesteket, az onkolitikus vírusokat és az adoptív sejtherápiákat – alapvetően új szemléletet hoztak a daganatkezelésben. Ezek közül az adoptív sejtherápia különösen ígéretes stratégiának bizonyult, mivel lehetővé teszi az immunsejtek ex vivo módosítását és funkcionális optimalizálását, majd visszajuttatását a beteg szervezetébe. A kiméra antigén receptorral (CAR) módosított T-sejtek klinikai alkalmazása forradalmi áttörést eredményezett bizonyos hematológiai malignitásokban, ahol tartós és mély remissziókat sikerült elérni. Ugyanakkor a szolid tumorok kezelése továbbra is jelentős kihívást jelent, részben az antigénheterogenitás, részben a tumor mikrokörnyezet immunszuppresszív hatásai miatt, amelyek gátolják az effektor sejtek tartós aktivitását és perzisztenciáját.

A HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) túlzott expressziója számos daganattípusban – többek között emlő-, gyomor- és egyéb szolid tumorokban – meghatározó onkogén hajtóerő. Bár a HER2-célzott antitestterápiák, például a trastuzumab, jelentős klinikai előrelépést hoztak, a primer és szerzett rezisztencia kialakulása gyakori, ami új terápiás stratégiák kidolgozását teszi szükségessé. Ebben a kontextusban a HER2-specifikus CAR-alapú sejtherápiák ígéretes lehetőséget kínálnak, mivel képesek MHC-független módon felismerni és elpusztítani a tumorsejteket.

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 antigénprezentációtól függetlenül eliminálni a transzformált sejteket. CAR-módosításuk lehetőséget teremt arra, hogy az veleszületett és az adaptív immunválasz előnyeit kombinálva biztonságosabb

és potenciálisan szélesebb körben alkalmazható terápiás platform jöjjön létre. Különösen fontos szempont az allogen 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 hatékonyságában. 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.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. 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 epitelsejtek, a fagociták és a természetes ölősejtek (NK-sejtek), amelyek széles spektrumú, gyors és örökölt válaszmechanismusaik révén képesek felismerni és eliminálni a potenciálisan veszélyes sejteket, köztük a daganatsejteket is (1). 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 (2). A B-sejtek által termelt ellenanyagok hozzájárulhatnak a tumorsejtek opsonizációjához 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 (T_{reg}) vagy a mieloid eredetű szuppresszor sejtek (MDSC) toborzása a tumor mikrokörnyezetébe (3). Ezek a mechanizmusok károsítják az effektor immunsejtek funkcióját, lehetővé téve a tumor számára a túlélést és proliferációt, amely az „immunoediting” folyamatának három fázisában (elimináció, egyensúly, immunelkerülés) manifesztálódik (4).

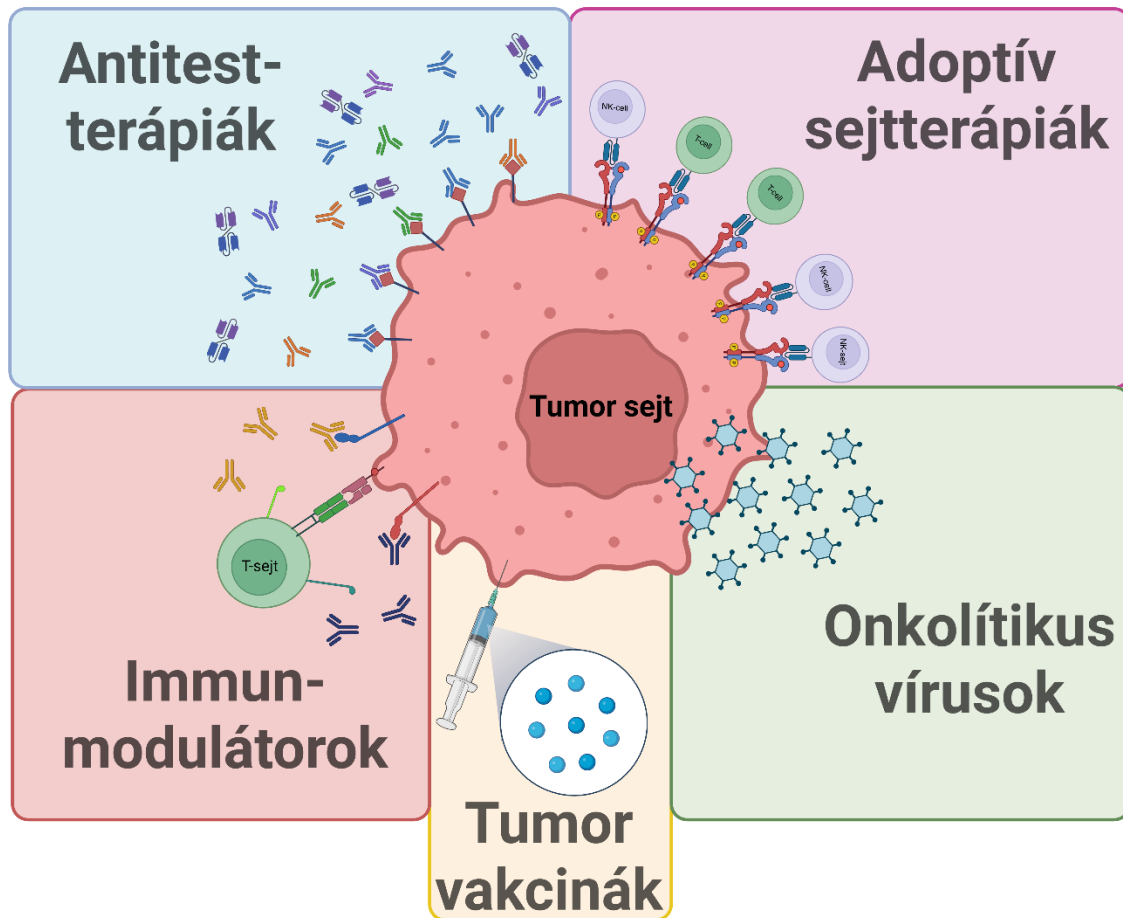
A fent említett jelenségek egyre pontosabb megértése teremtette meg a modern tumorimmunterápia alapjait, amely a konvencionális terápiákkal ellentétben nem közvetlenül a

daganatot célozza, hanem az immunrendszer tumorelles aktivitasát állítja helyre, illetve fokozza. A daganatellenes immunterápia célja tehát nem más, mint az immunrendszert elkerülő mechanizmusok gátlása, az immunválasz újraaktiválása, és a tumor mikrokoznyezetének immunstimulálónvá alakítása.

Az immunterápia fő formái a következő öt kategóriába sorolhatók **(1. ábra)**:

- Célzott antitestek: Ezek közé tartoznak a monoklonális antitestek, amelyek daganatspecifikus antigéneket céloznak (pl. HER2, EGFR, CD20). Az antitestek tumorsejtekhez való kötődése olyan effektor funkciókat indít el, mint az antitestfüggő sejtközvetített citotoxicitás, a komplementfüggő citotoxicitás (CDC), valamint a receptor gátlás vagy internalizáció (Paul et al., 2024). Emellett megjelentek az új generációs bispecifikus antitestek, például a BiTE-ok (bispecific T-cell engagers), melyek képesek a T-sejteket közvetlenül a tumorsejtekhez irányítani (6)
- Immunmodulátorok (checkpoint-gátlók): Az adaptív immunválasz kulcsfontosságú szabályozói a checkpoint molekulák, mint a CTLA-4, PD-1 és PD-L1, amelyek gátolják az aktivált T-sejtek túlzott reakcióját. Ezek gátlása monoklonális antitestekkel (pl. ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab) lehetővé teszi az effektor sejtek újraaktiválását, különösen olyan daganatokban, ahol az immunmikrokoznyezet „hideg” típusú. Ezek a checkpoint-gátlók több daganattípusban javították a túlélést, és ma már a klinikai gyakorlat részét képezik (7)(8)
- Onkolitikus vírusok: Genetikailag módosított vírusok, amelyek szelektíven fertőzik és lizálják a daganatsejteket, miközben tumorelles immunválaszt indukálnak. Kettős hatásuk – közvetlen tumorlízis és immunstimuláció – előnyt jelent más terápiás módszerekhez képest (9). Klinikai szempontból legismertebb példája a talimogene laherparepvec (T-VEC), amely herpes simplex vírus alapú, és melanomában engedélyezték (10)
- Tumorvakcinák: A daganatsejtekről származó tumor-asszociált antigének (TAA) vagy neoantigének segítségével stimulálják a tumorspecifikus immunválaszt. A személyre szabott vakcinák, különösen mRNS-alapú platformokon, új lehetőségeket kínálnak a szolid tumorok immunterápiájában (11)

- Adoptív sejterápiák (ACT): Az ACT az immunterápia egyik korszerű megközelítése, amelynek lényege, hogy a betegből vagy donorból származó immunsejteket laboratóriumi körülmények között izolálják, aktiválják, esetenként genetikailag módosítják, majd visszajuttatják a szervezetbe a daganatsejtek célzott elpusztítása érdekében. Ezen terápiás stratégia célja az immunválasz megerősítése olyan esetekben, amikor a szervezet természetes immunműködése nem elegendő a tumorelles hatáshoz (12)(13).



1. ábra: Az immunonkológiai terápiás megközelítések fő típusai és hatásmechanizmusai.

- (1) Antitest-alapú terápiák – beleértve a monoklonális antitesteket és bispecifikus ellenanyagokat, amelyek közvetlenül célozzák a daganatsejteket vagy közvetítik az immunsejtek tumorsejtekhez való irányítását (pl. ADCC, CDC aktiváció).
- (2) CAR-T és CAR-NK sejtterápiák – genetikai úton módosított T- vagy NK-sejtek alkalmazása, amelyek kiméra antigénreceptor (CAR) révén ismerik fel és pusztítják el a tumorspecifikus célfehérjéket kifejező hematológiai daganatokat.
- (3) Onkolitikus vírusok – szelektíven daganatsejteket fertőző és lízist okozó vírusok, amelyek egyúttal serkentik a daganatspecifikus immunválaszt is, így kettős terápiás hatást fejtenek ki.
- (4) Tumor vakcinák – célzott immunizációs stratégiák, amelyek tumor-asszociált vagy neoantigéneket tartalmaznak, elősegítve a tumorspecifikus T-sejt immunválasz kialakulását.

(5) Immunellenőrzőpont-gátlók (checkpoint inhibitorok) – például PD-1/PD-L1 vagy CTLA-4 blokkoló antitestek, amelyek feloldják a tumor mikrokörnyezet által kiváltott T-sejt inaktivációt, lehetővé téve a hatékonyabb adaptív immunválaszt.

Az immunterápiás stratégiák sokfélesége jól mutatja, hogy a daganatok elleni küzdelemben számos, egymástól eltérő biológiai mechanizmus kiaknázására van lehetőség. Egyes megközelítések elsősorban a daganatsejtek közvetlen felismerésére és eliminációjára építenek, míg mások a tumor mikrokörnyezetének átformálásán keresztül igyekeznek kedvező feltételeket teremteni az immunrendszer számára. A közös cél minden esetben a szervezet saját védekezőrendszerének mozgósítása és a tartós antitumor immunitás kialakítása, amely nemcsak a primer daganat visszaszorítását, hanem a relapszus és a mikrometasztázisok kialakulásának kivédését is lehetővé teszi.

A célzott antitestek és a checkpoint-gátlók kiemelkedően hatékonyan képesek fokozni az endogén immunválaszt azáltal, hogy blokkolják a tumorsejtek által működtetett immunszuppresszív mechanizmusokat vagy közvetlenül irányítják az effektor sejteket a daganat ellen (14). Ezzel szemben az onkolitikus vírusok kettős hatásuk révén – tumorlízis és immunstimuláció – képesek átalakítani a tumor környezetét (15), míg a tumorvakcinák a tumorspecifikus antigének bemutatásával hozzájárulnak a T-sejt- és B-sejt-válasz újraindításához (16).

Ugyanakkor ezen megközelítések többsége nagyrészt a beteg meglévő immunfunkcióinak megerősítésére épít. Ez azt jelenti, hogy hatékonyságuk erősen függ a páciens immunrendszerének alapállapotától (úgynevezett „immun-fitness”), az immunsejtek mennyiségétől és funkcionális épségétől, valamint attól, hogy a tumor „immunológiailag forró” (magas immuninfiltrációt mutató) vagy „immunológiailag hideg” (alacsony immunogenitású, erősen immunszuppresszív) fenotípust képvisel. A „forró” tumorokban az immunterápiás beavatkozások gyakrabban hatékonyak, míg a „hideg” tumorokban a válaszarány jóval alacsonyabb. Utóbbi esetben az immunsejtek nem képesek megfelelően infiltrálni a tumorstrómát, illetve nem tudnak aktiválódni a daganat mikrokörnyezetében (TME) (17). Ebben a kontextusban különösen nagy jelentőségűek az adoptív sejtherápiák (ACT), amelyek nem pusztán az endogén immunválaszt erősítik, hanem *ex vivo* manipulált és célzottan módosított immunsejtek bevitelével képesek új funkciókat és tartós tumorelles aktivitást biztosítani. Az ACT tehát egy olyan innovatív platform, amely közvetlenül beavatkozik az immunrendszer működésébe, és új lehetőséget nyit a rezisztens vagy nehezen kezelhető daganatok terápiájában (18).

3.2. Adoptív immunterápiák

Az adoptív sejtherápiák területe a modern onkológiai immunterápia legígéretesebb ágát jelentik, amelynek lényege, hogy autológ vagy allogén immunsejteket izolálnak, *in vitro* aktiválnak és/vagy genetikailag módosítanak, majd visszajuttatnak a beteg szervezetébe a daganatsejtek célzott elpusztítása érdekében (19). Fontos hangsúlyozni, hogy a módszer nem csupán a meglévő immunválasz erősítését célozza, hanem olyan funkcionális tulajdonságokkal is felruházhatja az immunsejteket, amelyek természetes állapotukban hiányoznak, például fokozott tumor-specifikus felismerés vagy jobb túlélési és proliferációs képesség.

Az ACT koncepciója az 1980-as évek végén született meg, amikor Rosenberg és munkatársai először alkalmaztak tumor infiltráló limfocitákat (TIL) melanoma kezelésében (20). Azóta a terület folyamatosan bővült, és napjainkra az ACT számos formája vált klinikai vizsgálatok tárgyává. A legfontosabb megközelítések közé tartoznak a TIL-terápia, a rekombináns T-sejt receptor (TCR) terápia, valamint a kiméra antigén receptorral ellátott T- és NK-sejt alapú terápiák (CAR-T és CAR-NK-sejtek).

3.2.1. Tumor infiltráló limfocita (TIL) terápia

A tumor infiltráló limfocita (TIL) terápia alapja, hogy a tumorok mikro környezetében természetes módon jelen vannak olyan T-sejtek, amelyek képesek felismerni a tumor-asszociált antigéneket vagy a daganatokban megjelenő neoantigéneket. Ezek a T-sejtek az immunrendszer természetes tumorelles válaszána részeként penetrálják a daganatot, azonban a tumor mikro környezetének immunszuppresszív hatásai gyakran gátolják működésüket és proliferációjukat (21). A TIL-terápia célja ezen sejtpopulációk izolálása a daganat gátló mikro környezetéből, majd *in vitro* expanzióval és aktivációval olyan mennyiségű és funkcionálisan aktív T-sejt előállítása, amely klinikai hatást képes kiváltani a kezelt beteg szervezetében.

A sejtherápiás készítmény előállítását tekintve, a TIL-eket a műtéti mintából izolálják, majd laboratóriumi körülmények között nagy mennyiségben felszaporítják, jellemzően citokinek – például IL-2 – szupplementációjával (21). Ez az *ex vivo* környezet lehetővé teszi, hogy a T-sejtek újraaktiválódjanak és proliferáljanak, felszabadulva a tumorban jelenlévő immunszuppresszív hatások gátlása alól. A visszajuttatott TIL-ek így képesek közvetlen citotoxikus támadást indítani a tumorsejtek ellen, valamint elősegítik a tumorelles immunválasz újbóli kialakulását a

szervezetben (22). Számos vizsgálat rámutatott arra is, hogy a TIL-terápia során kialakulhat immunológiai memória, amely hosszú távú tumorelles védelmet biztosít a betegek számára (23). A terápia egyik legnagyobb előnye, hogy a neoantigének széles spektrumát képes felismerni, így a tumor jelentős genetikai és fenotípusos heterogenitása ellenére is hatékony lehet (24). Ez különösen fontos, mivel sok daganatban a mutációs terhelés magas, és a heterogén antigén-expresszió gyakran a terápiás rezisztencia egyik fő oka.

A TIL-terápia eddigi legnagyobb sikereit a metasztatikus melanoma kezelésében érte el, ahol olyan betegeknél is tartós, akár több évig fennmaradó betegségmentes túlélést dokumentáltak, akiknél más kezelések kudarcot vallottak (25). A klinikai vizsgálatokban a válaszarány 20–40% között mozgott, komplett remissziók mellett, amelyek egy része több, mint öt évig fennmaradt (26). Ez különösen figyelemre méltó, mivel a melanoma korábban rendkívül rossz prognózisú daganatnak számított. A TIL-terápia hatékonyságát melanómákban részben azok magas mutációs rátája magyarázza, amely számos neoantigén megjelenését eredményezi. Jelenleg több klinikai vizsgálat zajlik más daganattípusokban is (pl. méhnyak-, tüdő- és vesedaganat), amelyek célja a módszer szélesebb körű alkalmazhatóságának igazolása (27).

Ugyanakkor a TIL-terápia számos kihívással küzd. Az egyik fő nehézség a sejtek előállítása: a daganatszövetből megfelelő mennyiségű és minőségű TIL kinyerése és expanzója időigényes és költséges folyamat, amely speciális laboratóriumi infrastruktúrát igényel. Emellett a kezeléshez szükséges tumorminta nem minden esetben áll rendelkezésre, és nem minden daganattípusban mutatható ki kellő mennyiségben TIL (28). A hatékonyság erősen függ a daganat immunológiai profiljától is: az ún. „immunológiailag forró” tumorokban, ahol magas az immuninfiltráció, a TIL-terápia jobban alkalmazható, míg a „hideg” tumorokban, alacsony immunogenitás mellett a siker esélye kisebb (29).

A TIL-terápiák jövőbeni fejlesztésének egyik fontos iránya az izolált effektor sejtek genetikai módosítása (pl. checkpoint receptorok kiütése, citokintermelés fokozása), amelyek célja a perzisztencia és a tumorelles aktivitás növelése, valamint a tumormikrokörnyezet gátló hatásainak leküzdése.

3.2.2. Génmódosított immunsejt terápiák

A TIL-eken alapuló adoptív sejterápia sikerei rávilágítottak arra, hogy a tumor-specifikus T-sejtek hatékonyan alkalmazhatók tartós daganatellenes immunválasz kiváltására. Ugyanakkor a

TIL-terápia klinikai alkalmazását jelentősen korlátozza, hogy a megfelelő mennyiségű és minőségű TIL-ek kinyerése és expanziója csak bizonyos daganattípusokban lehetséges, a folyamat időigényes és költséges, valamint a tumor mikrokörnyezet immunszuppresszív tényezői gyakran gátolják a terápiás hatást (30). Mindez arra ösztönözte a kutatókat, hogy olyan alternatív megoldásokat fejlesszenek, amelyek specifikusabbak, univerzálisabban alkalmazhatók és kevésbé függenek a beteg kiindulási immunstátuszától. Így született meg a génmódosított immunsejtterápiák koncepciója, amely lehetővé teszi az effektor sejtek funkcióinak átalakítását, új specificitások bevezetését, valamint a tumormikrokörnyezet gátló hatásainak részleges leküzdését (31).

A génmódosított immunsejt-terápiák közül az egyik legfontosabb megközelítés a szintetikus T-sejt receptorokon (TCR) alapú terápia. Ennek során a T-sejteket olyan transzgénnel módosítják, amely egy meghatározott tumorspecifikus antigént felismerő T-sejt receptort (TCR) kódol. Az így létrejött TCR-módosított T-sejtek képesek felismerni az adott antigént bemutató peptid-MHC komplexeket, és célzott immunválaszt indítani ellene (32). A TCR-alapú terápia legnagyobb előnye, hogy intracelluláris antigéneket is képes célba venni, amelyek antitestekkel (vagy a később bemutatásra kerülő kiméra antigén receptorokkal) nem hozzáférhetőek. Ez a tulajdonság különösen értékes olyan tumorok esetében, ahol az egyedi, tumorspecifikus felszíni célpontok száma és megjelenése korlátozott, ugyanakkor jól definiált intracelluláris fehérjék állnak rendelkezésre (33).

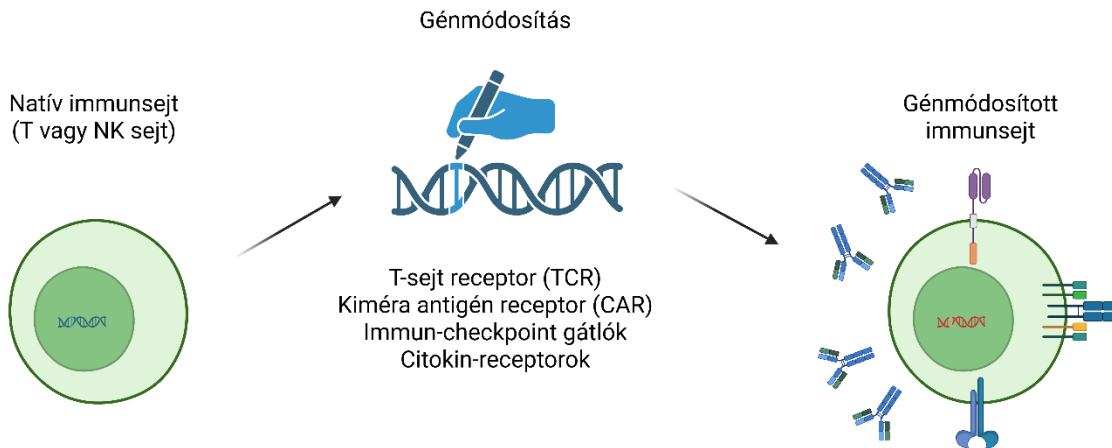
Klinikai vizsgálatok igazolták a megközelítés működőképességét: például a NY-ESO-1 és MAGE-A3 antigének ellen irányított TCR-T sejtek bizonyos szarkómákban és melanómában ígéretes eredményeket mutattak, több betegnél dokumentáltak részleges vagy teljes remissziót (34) (35). Ezek az eredmények fontos mérföldkövet jelentettek az adoptív immunterápia fejlődésében, hiszen bebizonyították, hogy a T-sejtek genetikai módosításával kiterjeszthető az antigénfelismerő repertoár és specifikusabb tumorelles immunválasz érhető el.

Mindazonáltal a TCR-alapú terápiáknak több jelentős korlátja van. Az egyik legnagyobb kihívást a HLA-restrikció jelenti, hiszen a TCR csak meghatározott HLA-allél által prezentált peptidet képes felismerni. Mivel a daganatok gyakran csökkentik az MHC expressziójukat vagy más módon manipulálják az antigén-prezentációs útvonalait, gyakran elkerülik a TCR-módosított sejtek támadását (36). Súlyos problémát jelenthet az off-target toxicitás is: ha a módosított TCR alacsony affinitással felismer egy egészséges szövetben expresszáldó peptidet,

az potenciálisan életveszélyes mellékhatásokhoz vezethet (37). Végül a tumor mikrokörnyezet immunszuppresszív hatásai – például a PD-L1 expresszió, a TGF- β jelenléte vagy az immunszuppresszív sejtek (T_{reg} , MDSC) felhalmozódása – szintén erősen csökkenthetik a TCR-módosított sejtek proliferációját és tartós aktivitását (38).

E kihívások leküzdésére számos innovatív génmódosítási stratégia született, amelyek célja az immunsejtek tumorelles hatékonyságának fokozása. Az egyik irány a checkpoint-molekulák genetikai kiütése (pl. PD-1, CTLA-4, LAG3), amellyel megakadályozható a sejtek kimerülése, és azok így ellenállóbbá válnak a daganatok által közvetített gátló jelekkel szemben (39). Más fejlesztések a citokintermelés fokozását célozzák, például IL-2, IL-12 vagy IL-15 beépítésével, amelyek serkentik a sejtek proliferációját és elősegítik az immunrendszer további komponenseinek aktiválását (40). Szintén ígéretes megközelítés a domináns-negatív receptorok alkalmazása, amelyek blokkolják a tumorsejtek által kibocsátott immunszuppresszív jeleket (41) (**2. ábra**).

Ezek a fejlesztések jól mutatják, hogy a génmódosított immunsejtterápiák dinamikus fejlődő területet képviselnek, ahol a cél nem csupán a sejtek tumorelles specificitásának növelése, hanem azok perzisztenciájának és funkcionális aktivitásának tartós biztosítása is.



2. ábra: Génmódosított immunsejt terápiák

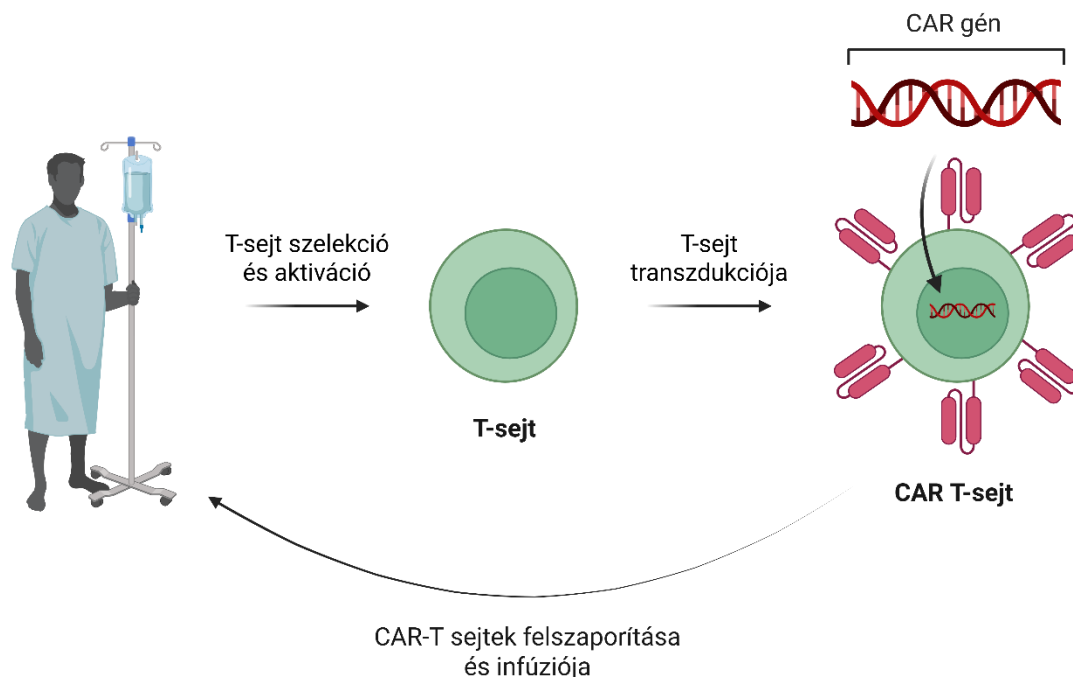
A klinikumban alkalmazott génmódosított immunsejt-terápiák új lehetőséget kínálnak a daganatos betegségek hatékony kezelésére. A folyamat során a páciens immunsejtjeit (leggyakrabban T- vagy NK-sejteket) molekuláris biológiai technikákkal genetikailag módosítják. Az így létrehozott sejtek képesek új felszíni receptorok, jelátviteli fehérjék és szolubilis molekulák — gyakran antitestek — expressziójára. Ezek a módosított elemek elősegítik a tumorsejtek célzott felismerését, valamint hozzájárulnak a daganat mikrokörnyezetében jelen lévő immunszuppresszív folyamatok leküzdéséhez.

Mindezek a fejlesztések jól szemléltetik, hogy a génmódosított immunsejtterápiák a daganatellenes immunonkológia egyik legdinamikusabban fejlődő irányát képviselik, ahol a kutatások fókusza nem csupán az antigénfelismerés pontosságának növelésére, hanem a sejtek tartós fennmaradásának, funkcionális aktivitásának és biztonságosságának biztosítására irányul. Ebbe a széles körű kutatási spektrumba illeszkedik a kiméra antigén receptorral (CAR) módosított T-sejtek terápiája is, amely az elmúlt évtizedekben kiemelt figyelmet kapott, és mára az immunonkológia egyik legismertebb és legígéretesebb megközelítésévé vált.

3.3.A kiméra antigén receptorokon alapuló T-sejt terápia

3.3.1. A CAR T-sejt terápiák biológiai háttere

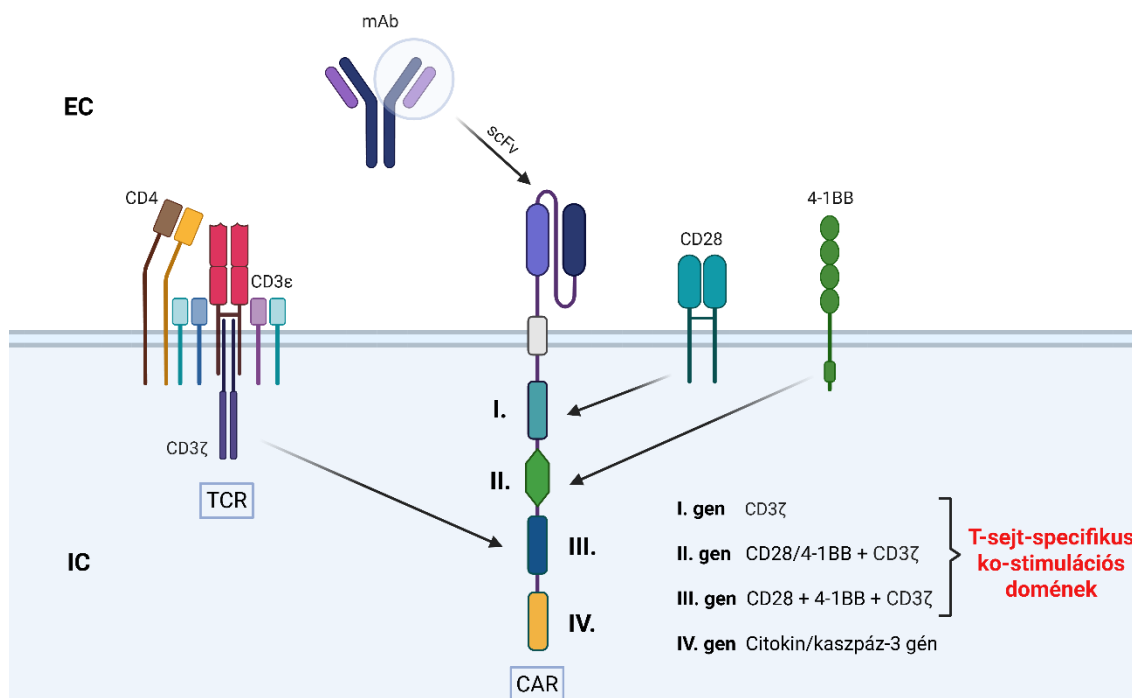
A CAR T terápia alapvető újdonsága abban rejlik, hogy a páciens saját T-limfocitáit genetikai úton ruházzák fel egy mesterséges receptorral, amely egyesíti a monoklonális antitestek antigénfelismerő specificitását a T-sejtek jelátviteli és effektor funkcióival, így egyedülállóan célzott és erőteljes tumorellenes választ tesz lehetővé (42). A terápiás 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 terápiás hatékonyságot rendszerint limfoablatív előkezelés fokozza, amely a kompetitív endogén limfocitapopulációk kiiktatásával elősegíti a transzferált sejtek proliferációját és perzisztenciáját (43). **(3. ábra)**



3. ábra: A CAR T sejt terápia sémája

A kiméra antigénreceptor (CAR)-alapú immunterápia biológiai alapelve, hogy a beteg saját T-sejtjeit genetikailag módosítják a tumorspecifikus felismerés és elpusztítás érdekében. A kezelés során a páciens perifériás véréből izolált T-sejteket laboratóriumi körülmények között aktiválják és felszaporítják, majd bejuttatják a CAR-fehérjét kódoló gént virális (pl. retro- vagy lentivírus) vagy nem virális (pl. transzpozíciós, elektroporációs) módszerekkel. Az így létrehozott CAR-T sejtek stabilan expresszálják a kiméra antigén receptort, amely lehetővé teszi a daganatsejtek célzott felismerését és azok elpusztítását. A sejtek ex vivo felszaporítása után a terápiás dózisban előállított CAR-T sejteket visszainfundálják a beteg szervezetébe, ahol képesek a tumorspecifikus immunválasz kiváltására és a daganatos sejtek elpusztítására.

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. CD3ζ elsődleges aktivációs motívumként, kiegészítve kostimulációs doménekkel, mint a CD28 vagy a 4-1BB) (44).



4. ábra: A kiméra antigén receptorok alapvető szerkezete és generációi.

A kiméra antigénreceptor (CAR) egy mesterséges, T-sejtek felszínén expresszálandó receptor, amely lehetővé teszi a tumorsejtek antigén-specifikus felismerését és eliminálását MHC-független módon. A receptor szerkezete moduláris: az extracelluláris egyláncú variábilis fragmentum (scFv) felel az antigén felismeréséért, míg a hinge- és transzmembrán régiók a receptor rugalmasságát és stabil membránhorgonyzását biztosítják. Az intracelluláris domének a T-sejt aktivációját és jelátviteli folyamatait irányítják.

Az első generációs CAR-ok kizárólag a CD3ζ jelátviteli láncot tartalmazzák. A második generációs konstrukciók egy további kostimulációs doménnel (pl. CD28 vagy 4-1BB) bővülnek, ami fokozza a T-sejtek aktivitását és élettartamát. A harmadik generációs CAR-ok több kostimulációs domént kombinálnak (pl. CD28 és 4-1BB), ezzel tovább növelve az immunválasz hatékonyságát. A negyedik generációs CAR-ok, más néven TRUCK-ok, további géneket hordoznak, például citokinek (pl. IL-12) vagy apoptózis-indukáló fehérjék kódját, lehetővé téve a tumorkörnyezet célzott immunmodulációját és az immunosuppresszív folyamatok elleni hatékony fellépést.

A CAR molekulák moduláris felépítésének rugalmassága nem csupán a célantigén felismerésének és a T-sejt aktivációjának lehetőségét teremtette meg, hanem alapot adott a különböző generációs konstrukciók kifejlesztéséhez is. A kezdeti, úgynevezett első generációs CAR-ok csupán a CD3-zéta (CD3ζ) jelátvivő domént tartalmazták, így bár képesek voltak az antigénspecifikus aktivációra, proliferációs kapacitásuk és *in vivo* perzisztenciájuk korlátozott maradt (45). A második generációs konstrukciókban egyetlen kostimulációs domén (pl. CD28 vagy 4-1BB) hozzáadásával jelentősen fokozódott a sejtek túlélése és funkcionális aktivitása, amely a klinikai alkalmazások első nagy áttörését hozta (46). A harmadik és negyedik generációs CAR-ok további fejlesztései – több kostimulációs motívum integrálása, illetve citokintermelést

serkentő vagy biztonsági kontrollokat biztosító gének beépítése – új szintre emelték a terápiás potenciált (47). **(4. ábra)**

A CAR-ok molekuláris szerkezetéből levezethetőek a terápia legfontosabb biológiai előnyei is. Mindenekelőtt képesek alacsony szintű tumorantigén-expresszió mellett is hatékony immunválaszt fenntartani, ami jelentősen mérsékli az antigénvesztés vagy downreguláció útján kialakuló terápiás rezisztencia veszélyét (48). Ez különösen lényeges olyan hematológiai malignitásokban, ahol a célantigén (például CD19) expressziója heterogén lehet, és a klasszikus antitestterápiák (pl. rituximab) esetén gyakran megfigyelhető relapsushoz vezet (49). A CAR T sejtek ezen képessége hozzájárul a tartósabb klinikai válaszokhoz még olyan betegekben is, akik korábban refrakternek bizonyultak többvonalas kezeléssel szemben.

Egy másik kulcsfontosságú előnyük, hogy a T-limfociták endogén kemokin- és adhézíós receptor hálózatauk révén képesek aktívan extravazálódni és belépni a tumorszövetekbe, lehetővé téve számukra, hogy közvetlenül kapcsolatba lépjenek a daganatsejtekkel. Ezzel szemben a monoklonális antitestek biodisztribúcióját erősen korlátozza a daganat mikro környezetének szerkezete, különösen a sűrű extracelluláris mátrix és az abnormális érrellátás, amelyek gátolják a gyógyszer-molekulák penetrációját (50). A CAR T sejtek tehát nem pusztán keringő effektoroknak tekinthetőek, hanem olyan dinamikusan működő ölüsejteknek, amelyek képesek bejutni a neoplasztikus szövetekbe. Ez a tulajdonságuk különösen előnyössé teszi őket a szolid tumorok elleni terápiában is, bár ezen a területen a gyakorlati, klinikai alkalmazás még mindig számos nehézségbe ütközik.

A CAR T sejtek harmadik kiemelkedő sajátossága a hosszú távú perzisztencia, amely lehetővé teszi a daganatellenes immunitás fenntartását a kezdeti terápiás beavatkozást követően. Klinikai vizsgálatok és hosszú távú utánkövetések egyaránt igazolták, hogy az infundált CAR T sejtek a páciens szervezetében akár évekig, sőt egyes esetekben több, mint egy évtizeden át detektálhatók maradtak, miközben funkcionálisan aktív állapotban biztosították a daganatmentes túlélést (51). Ez a jelenség éles kontrasztban áll a monoklonális antitestek viszonylag rövid felezési idejével és a kezelés szükségszerű ismétlésével.

Ezen egyedülálló tulajdonságok összessége – az antigénvesztéssel szembeni csökkent érzékenység, a tumorszövetekbe történő aktív migráció képessége, valamint a hosszú távú perzisztencia – teszi a CAR T sejteket a jelenlegi immunterápiás repertoár egyik legígéretesebb eszközévé. Ennek eredményeképpen a CAR T sejtek képesek lettek nemcsak erőteljesebb és

tartósabb tumorellenes válasz kiváltására, hanem adaptálhatók különböző klinikai környezetekhez is, ami a modern immunonkológia egyik legjelentősebb és legdinamikusabban fejlődő terápiás platformjává tette őket.

3.3.2. A CAR T-sejt terapia klinikuma és perspektívái

Az elmúlt évtizedben a CAR T sejtés terápiaát áttörést hoztak a hematológiai malignitások kezelésében. A „klasszikus” CD19-ellenes CAR T konstrukciók – mint például a tisagenlecleucel (52) és az axicabtagene ciloleucel (53) – relapszált/refrakter B-sejtés akut limfoblasztos leukémiában (ALL) és diffúz nagy B-sejtés limfómában (DLBCL) igen magas válaszarányokat értek el (54). A klinikai vizsgálatok eredményeit összegző nagy kohortokban 70–90 % közötti objektív válaszarány (ORR) és 40–60 % körüli teljes remissziós arányról (CRR) referálnak (55)(56).

A hosszú távú eredmények is biztatóak: egy szisztematikus áttekintés és metaanalízis különösen a CD19-alapú CAR T kezelések hosszú távú kimenetelét vizsgálta, beleértve a tartós válaszokat és a mellékhatások előfordulását is (57). A közlemény megállapította, hogy sok beteg esetében a CAR T-sejtek évekig fennmaradnak, és tartós immunológiai kontrollt biztosítanak.

A hematológiai daganatokban elért eredmények jól mutatják a CAR T terápia jelentőségét, ugyanakkor fontos hangsúlyozni, hogy nem minden hematológiai malignitás reagál egyformán kedvezően. Például relapszált/refrakter akut mieloid leukémiában (AML) eddig csupán mérsékelt hatékonyságot láthatunk, amit részben a megfelelő, egyértelműen specifikus célantigének hiánya, részben pedig az infundált T-sejtek funkcionális kimerülése magyaráz (58). 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 célantigének heterogén és gyakran alacsony szintű expressziója jelenti, amely hozzájárul a daganatsejtek immunológiai meneküléséhez (59). 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 (60). Továbbá a T-sejtek kimerülése és apoptózisra való

hajlama hosszabb távon korlátozza az immunválasz fenntarthatóságát, ami különösen szolid tumorokban okoz terápiás kudarcot (61).

A közelmúltban azonban számos új klinikai vizsgálat indult, amelyek célja ezen akadályok leküzdése. Egy 2023-ben publikált fázis I-es vizsgálatban a GD2-CAR T sejtek neuroblastomás és egyéb GD2-pozitív szolid tumoros betegek kezelésében ígéretes eredményeket mutattak: a 27 kezelt betegből 9-nél mérték klinikai javulást, köztük parciális remissziót és stabil betegséget (62). Hasonlóan, a HER2-ellenes CAR T konstrukciók különböző indikációkban – glioblastoma, emlődaganat, gyomorrák és colorectalis karcinóma – is vizsgálat alatt állnak (63) (64). A legfrissebb adatok szerint ezek a terápiák biztonságosnak bizonyultak alacsonyabb dózisban, és bizonyos betegeknél objektív tumorválaszt is eredményeztek, bár széles körű klinikai hatékonyságuk még nem bizonyított. A mesothelin (MSLN) célpontú sejtes immunterápiák ígéretes eredményeket mutatnak szolid tumorokban. A gavo-cel (TC-210) nevű MSLN-specifikus TRuC-T sejterápia fázis I/II vizsgálatában a 6 hónapos teljes túlélési arány 70,2% volt, míg a medián progressziómentes túlélés 5,6 hónapnak bizonyult mesotheliomában és 5,8 hónapnak petefészekrákban (65).

A klinikai és preklinikai tapasztalatok világosan rávilágítottak arra, hogy a CAR T sejtek terápiás potenciáljának maximális kiaknázása és biztonságos alkalmazása mind hematológiai, mind szolid tumorok esetében folyamatos konstrukciófejlesztést tesz szükségessé. Bár a CD19-ellenes CAR T sejtek áttörést hoztak a B-sejtes malignitások kezelésében, a relapszusok, az antigénvesztés, valamint a mellékhatások kezelése továbbra is komoly kihívást jelent (66). E problémákra reflektálva számos innovatív kutatási irány alakult ki, amelyek célja a sejtek tartósságának, proliferációjának és tumorelleses specificitásának fokozása.

Az egyik ígéretes stratégia a bi- és multispecifikus CAR konstrukciók fejlesztése. Ezek a receptorok többféle tumorantigén felismerésére képesek, így jelentősen csökkenthetik az antigénvesztésből eredő rezisztencia kialakulását (67). Míg szolid tumorokban az antigénheterogenitás miatt különösen előnyösek, hematológiai betegségekben – például kiújuló/refrakter ALL vagy DLBCL esetében – is csökkenthetik a CD19-negatív kiújulások arányát (68).

Hasonló jelentőséggel bír a kostimulációs domének optimalizálása, amely a CAR jelátvitel és sejtfunkció egyik kulcsfontosságú modulátora. A második generációs konstrukciókba beépített CD28 vagy 4-1BB domének már önmagukban is jelentősen javították a CAR T sejtek

perzisztenciáját és proliferációját. Az utóbbi években azonban megjelentek új kostimulátor domének (2B4, OX40) és kombinált megközelítések, amelyek a gyors effektor-aktivációt a hosszan fennmaradó memóriasejt-válasszal ötvözik, így különösen előnyösek lehetnek agresszív hematológiai malignitásokban és a gyorsan progresszáló szolid tumorokban (69).

Az újabb fejlesztések közé tartoznak az úgynevezett „armored” CAR T sejtek, amelyek nem pusztán citotoxikus effektor sejtek, hanem a tumormikrokörnyezet aktív modulátorai is. Ezek a sejtek képesek immunstimuláló citokinek (pl. IL-12, IL-18, IL-15), vagy akár checkpoint-gátló molekulák (pl. PD-1 blokkoló antitestek) szekréciójára. Ezáltal képesek ellensúlyozni a tumor által közvetített immunszuppresszív hatásokat, javítva a lokális immunválaszt és fokozva a tumorlizist (70). Az „armored” CAR-ok különösen ígéretesnek bizonyulhatnak olyan szolid tumorokban, ahol a T-sejt-infiltráció és aktivitás jelenleg korlátozott.

A fejlesztések másik hangsúlyos iránya a precíziós genetikai módosítások alkalmazása. A CRISPR/Cas9-technológia lehetővé teszi olyan negatív regulátorok – például a PD-1, LAG-3 vagy CTLA-4 – kiütését, amelyek krónikus antigénexpozíció mellett T-sejt-kimerüléshez vezetnek. A checkpoint-molekulák genetikai inaktiválása elősegítheti a CAR T sejtek tartós aktivitását, perzisztenciáját és ellenállását a tumormikrokörnyezet immunszuppresszív hatásaival szemben (71). Emellett a metabolikus útvonalak módosítása – például a mitokondriális biogenezis fokozása vagy az oxidatív stressz elleni védelem erősítése – szintén hozzájárulhat a CAR T sejtek túlélésének és hatékonyságának növeléséhez (72).

Napjainkban a CAR T sejtekkel kapcsolatos klinikai eredmények egyszerre világítanak rá a koncepció forradalmi potenciáljára és a további fejlesztések szükségességére. A multispecifikus CAR-ok, a kostimulációs domének optimalizálása, az „armored” konstrukciók és a precíziós genetikai módosítások együttesen olyan új generációs stratégiák alapját képezik, amelyek képesek lehetnek áthidalni a hematológiai és szolid daganatok közötti terápiás különbségeket, és kiterjeszteni a CAR-alapú immunterápiák klinikai hasznát egyre szélesebb betegpopulációkra.

3.3.3. A CAR T-sejt terápia korlátai

Az elmúlt évek során egyértelművé vált, hogy a CAR-T sejtek bár rendkívül hatékony immunterápiás eszközök, működésük számos olyan kockázattal jár, amely mind a betegek túlélését, mind az egészségügyi rendszerek számára való hozzáférhetőséget komolyan érinti.

Egyrészt a terápiához kapcsolódó mellékhatások, például a citokin-mediált toxicitás, közvetlenül veszélyeztetik a betegek életét, és intenzív kórházi ellátást igényelhetnek. Másrészt a terápia célzott jellege miatt a daganatok képesek alkalmazkodni, ami hosszú távon a hatékonyság csökkenéséhez és relapsushoz vezethet. Végül, de nem utolsósorban, a kezelés technológiai és logisztikai háttere is számos nehézséget hordoz: a személyre szabott gyártási folyamat rendkívül költséges, időigényes és sok esetben kivitelezhetetlen, miközben az allogén alkalmazás kísérleteit súlyos immunológiai komplikációk korlátozzák.

3.3.3.1. Citokinmediált toxicitás

A CAR-T sejtek terápiájának egyik legsúlyosabb és leggyakoribb mellékhatása a citokin felszabadulási szindróma (cytokine release syndrome, CRS). Ez a folyamat nem pusztán a CAR-T sejtek saját citokintermelésének következménye, hanem egy összetett immunláncreakció eredménye. Amikor a CAR-T sejtek felismerik és megtámadják a célsejteket, aktiválódásuk során számos citokint - például interferon- γ -t (IFN- γ) és tumor nekrosis faktor- α -t (TNF- α) - szabadítanak fel. Ezek a mediátorok más immunsejteket, különösen a monocitákat és makrofágokat is aktiválják, amelyek ezután nagymennyiségű interleukin-6-ot (IL-6) és más gyulladásos citokineket termelnek. A monociták és makrofágok túlzott aktivitása így a CRS fő mozgatórugói (73).

A CRS klinikai tünetei széles skálán mozognak: az enyhe láztól és fáradtságtól kezdve a súlyos hipotenzió és hypoxián át egészen a többszervi elégtelenségig és életveszélyes sokállapotig. A súlyos esetek intenzív osztályos ellátást igényelhetnek, és komoly mortalitási kockázattal járnak (74). A terápiás menedzsmentben az IL-6 jelátvitel gátlása vált kulcslépéssé: a tocilizumab (IL-6 receptor blokkoló) hatékonyan csökkenti a CRS súlyosságát, de alkalmazása felveti a kérdést, hogy ezzel párhuzamosan mennyiben csökken a CAR-T sejtek daganatellenes aktivitása (75).

A CRS-hez gyakran társul az immun-effektor sejtekhez kapcsolódó neurotoxicitási szindróma (ICANS), amely a citokintermelés következményeként jelentkezhet zavartsággal, beszédzavarral, görcsrohamokkal és súlyos esetben agyödémával. Ez a komplikáció tovább növeli a terápia komplexitását és kockázatait (73) **(5. ábra)**.

3.3.3.2. Antigén-specifikusság és tumor-evolúció

A CAR-T sejtek terápiás hatékonyságának alapja, hogy a daganatsejteken expresszálandó specifikus antigéneket célozzák meg. Ez a nagyfokú célzottság egyfelől a kezelés sikerének kulcsa, másfelől azonban a gyengesége is. A klinikai tapasztalatok azt mutatják, hogy a szolid tumorokban szenvedő betegek egy jelentős részénél a hatás kialakulásának egyik fontos mechanizmusa az antigénmenekülés (76). Ez alatt azt értjük, hogy a tumorsejtek elvesztik, lecsökkentik vagy megváltoztatják a CAR-T sejtek által célzott felszíni antigén kifejeződését, és így kikerülnek az immunfelismerés alól.

A legújabb kutatások többféle antigénvesztési mechanizmust azonosítottak. Ezek közé tartozik a célzott antigént nem hordozó klónok szelektív felszaporodása (77), a génmutációk és alternatív splicing következtében bekövetkező fehérjestruktúra-változások (78), az antigén redisztribúciója a sejtfelszínről az intracelluláris kompartmentekbe, valamint az úgynevezett trogocitózis (79), amely során a CAR-T sejtek részben „lecsupaszítják” a tumorsejteket azok antigénjeitől.

A tumor heterogenitása és plaszticitása tehát meghatározó akadály. Mivel a daganatsejtek genetikai és fenotípusos szinten rendkívül változékonyak, egyetlen antigénre épülő terápia hosszú távon ritkán bizonyul fenntarthatónak (**5. ábra**).

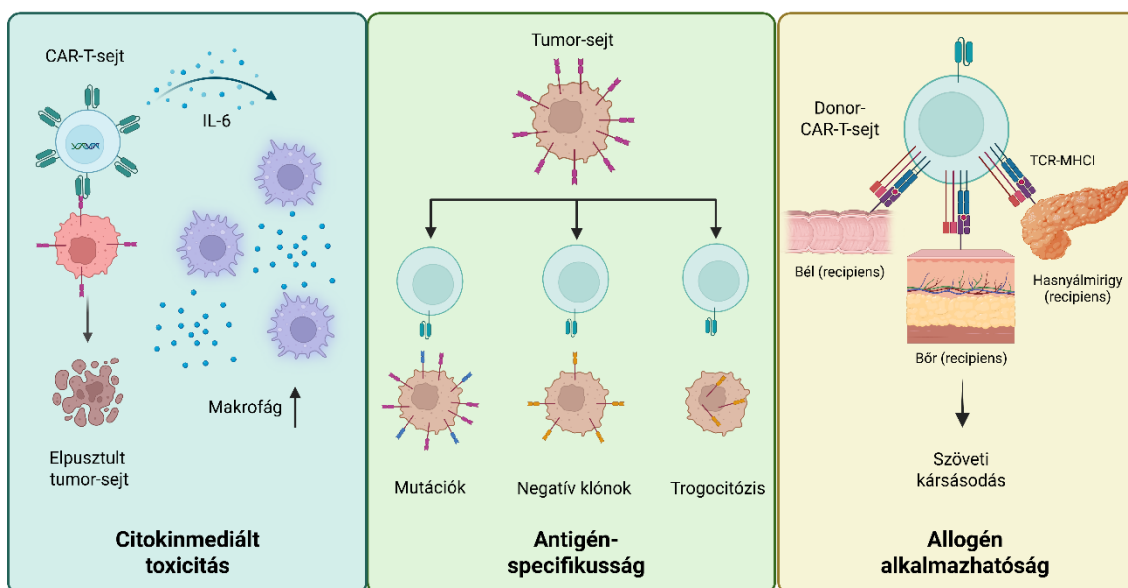
3.3.3.3. Allogén alkalmazás

A jelenlegi gyakorlatban a CAR-T terápia jellemzően autológ sejtek felhasználásával történik, vagyis a beteg saját T-sejtjeiből készül a génmódosított sejt készítmény. Ez a megközelítés biztonságosabb immunológiai szempontból, azonban számos gyakorlati és klinikai korláttal bír: a gyártás rendkívül költséges, több hetet vesz igénybe, és előfordul, hogy a súlyosan előkezelt betegek immunrendszere nem biztosít elegendő mennyiségű vagy megfelelő minőségű T-sejtet. Ezek a nehézségek különösen kritikusak agresszíven progrediáló daganatok esetén, ahol az idővesztés a terápia hatékonyságát alapvetően befolyásolhatja (80).

Az allogén, úgynevezett „off-the-shelf” CAR-T sejtek koncepciója ezt a problémát igyekszik megoldani. Ilyenkor egészséges donoroktól származó T-sejteket használnak fel, amelyeket előre legyártanak, tárolnak és szükség esetén azonnal rendelkezésre bocsátanak. Az ilyen univerzális sejt készítmények előnye, hogy gyorsabban elérhetők, standardizált minőséget képviselnek, és a beteg immunstátuszától függetlenül alkalmazhatók lennének (81).

Az allogén alkalmazás fő korlátját azonban az immunológiai inkompatibilitás jelenti. A donor T-sejtek saját T-sejt receptoruk (TCR) révén idegenként ismerhetik fel a recipiens szöveteit, amely graft-versus-host betegséghez (GvHD) vezethet. Bár egyes metaanalízisek szerint a klinikai vizsgálatokban a GvHD előfordulása viszonylag alacsony volt (off-the-shelf CAR-T terápiánál ~0%, donor-eredetű eseteknél ~4%) (82), a kockázat fennállása továbbra is komoly akadály.

Mindemellett az allogén CAR-T sejtek hatékonyságát az is korlátozza, hogy a recipiens immunrendszere idegenként felismerheti és eliminálhatja ezeket a sejteket („host-versus-graft” reakció). E probléma kezelésére különböző stratégiák léteznek, például HLA-molekulák szerkesztése vagy immunszuppresszív kezelések alkalmazása a befogadóban (83). Bár ezek a módszerek ígéretesek, hosszú távú adatokra van szükség a biztonság és a tartósság megítéléséhez (5. ábra).



5. ábra: A CAR T sejt terápia korlátai

A kiméra antigénreceptorral (CAR) módosított T-sejtek forradalmi áttörést hoztak a hematológiai daganatok kezelésében, ugyanakkor hatékonyságukat és biztonságosságukat több tényező korlátozza. A terápia legjelentősebb mellékhatásai közé tartozik a citokin felszabadulási szindróma (CRS) és a neurotoxicitás, amelyek a túlzott immunaktiváció következményei. A tumorantigén-specifikusság korlátozottsága és az antigénmenekülés, például az antigén elvesztése vagy módosulása révén, gyakran vezet a betegség kiújulásához. Az allogén CAR-T sejtek alkalmazását pedig a graft-versus-host betegség (GvHD) kockázata nehezíti, amely a donor T-sejtek recipiens szövetek elleni reakciójából ered. Ezek a korlátok rávilágítanak a CAR-T terápia további fejlesztésének és a precízebb, biztonságosabb kezelési stratégiák kidolgozásának szükségességére.

3.4.A természetes ölösejteken alapuló immunsejt-terápiák

A CAR-T sejtek alkalmazásával kapcsolatos klinikai tapasztalatok egyértelművé tették, hogy bár ez a terápia forradalmasította a hematológiai daganatok kezelését, jelenlegi formájában számos komoly korláttal bír. A citokinmediált toxicitás, az antigénmenekülésből fakadó relapszusok, valamint az allogén alkalmazást gátló immunológiai komplikációk mind olyan problémák, amelyek rámutatnak: a kizárólag T-sejt-alapú stratégiák nem biztosítanak mindenre kiterjedő megoldást. Ezek a kihívások ösztönözték a kutatókat arra, hogy új effektor sejttypusokat vonjanak be a CAR-alapú terápiák fejlesztésébe. A lehetséges alternatívák közül kiemelkednek a természetes ölösejtek (NK-sejtek), amelyek biológiai sajátosságaik révén képesek lehetnek áthidalni a T-sejtek strukturális és működésbeli hiányosságait.

3.4.1. Biológiai háttér

Az NK-sejtek a veleszületett immunrendszer citotoxikus limfocitái, amelyek az immunvédelem első vonalában játszanak kulcsszerepet a vírusfertőzött és daganatsejtek felismerésében és eliminálásában. A csontvelői CD34⁺ progenitor sejtekből származnak, és a perifériás vér limfocita-populációjának körülbelül 10-15%-át teszik ki. Az emberi szervezetben mintegy 2×10^{10} NK sejt található, ami az összes immunsejt körülbelül 1%-ának felel meg. A sejtek hagyományosan CD3⁻, CD56⁺ fenotípussal jellemezhetők, és érett állapotukban döntő többségük erőteljes citotoxikus aktivitással rendelkezik (84).

Az NK-sejtek aktivációs hálózata egy rendkívül precíz, több szinten szabályozott rendszer, amely egyszerre integrálja a sejtfelszíni receptorok, a citokin-jelek és a sejtben belüli foszforilációs útvonalak aktivitását. Ennek köszönhetően az NK-sejtek gyors, antigénfüggetlen választ képesek adni, ami különösen értékes a tumorimmunológiában. E komplex és rugalmas aktivációs mechanizmus teszi lehetővé, hogy az NK-sejtek hatékonyan pótolják a T-sejtek funkcionális korlátait - különösen olyan tumorok esetében, amelyek elkerülik a klasszikus MHC-függő immunfelismerést.

Az NK-sejtek egyedülálló tulajdonsága, hogy működésük alapját nem a klasszikus T-sejt receptor (TCR)-mediált, MHC-függő felismerés adja, hanem az aktiváló és gátló receptorok közötti dinamikus egyensúly (85). Míg a CD8⁺ T-limfociták az antigén-prezentáló sejtek által bemutatott peptid-MHC komplex felismerésére támaszkodnak, addig az NK-sejtek „missing-self” és „induced-self” elven működnek (86). Ez azt jelenti, hogy a normál sejtek felszínén kifejeződő

MHC-I molekulák gátló jeleket közvetítenek, míg a stresszhelyzetben lévő vagy transzformált sejtek, amelyek csökkentett MHC-I expresszióval bírnak, egyidejűleg fokozott aktiváló jeleket mutatnak. A két jelcsoport közötti finom egyensúly dönti el, hogy az NK sejt támadást indít-e a célsejt ellen.

Az egészséges sejtek által kifejezett MHC-I molekulák jelentette gátló jelet elsősorban a Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR) család, valamint a CD94/NKG2A heterodimer ismer fel. E receptorok intracelluláris ITIM (immunreceptor tirozin-alapú gátló motívum) doménjeik révén foszfatázokat toboroznak, amelyek leállítják az NK sejt aktivációs jelátviteli útvonalaikat, ezáltal megakadályozva az egészséges sejtek elleni támadást (87). Vírusfertőzött vagy tumorsejtekben azonban gyakran lecsökken, vagy eltűnik az MHC-I expresszió, így az NK-sejtek gátló receptorai nem lesznek képesek aktiválódni („missing-self” jelenség). Ezzel párhuzamosan a stressz indukálta aktiváló ligandumok expressziója és szerkeziója felszabályozódik, mint például a MICA/B és ULBP család NKG2D ligandjai, a Fas és a TRAIL receptorok, vagy a nectin-szerű molekulák, amelyek a DNAM-1/CD226 aktiváló receptorhoz kötődnek (88). Ez a jelátviteli átrendeződés az NK-sejtek aktiválódását váltja ki, amely során citotoxikus mechanizmusok lépnek működésbe.

Az NK-sejtek aktiválódásához vezető dinamikus egyensúly eltolódás számos, egymással párhuzamosan működő stimuláló jelátviteli útvonallal összehangolt aktivitásán alapul. Ennek köszönhetően az NK-sejtek képesek gyorsan és hatékonyan reagálni az előbbieken felsorolt sejtfelszíni stresszjelek megjelenésére, valamint a tumorok által alkalmazott immunelkerülő stratégiákra. A fő aktiváló mechanizmusok elsősorban specifikus receptorokon és citokin közvetített szignálokon keresztül indukálják az intracelluláris jelátviteli folyamatokat.

Az NK-sejtek felszínén számos aktiváló receptor található, amelyek közül a legfontosabbak a NKG2D, a DNAM-1 (CD226), az NKp30, NKp44 és NKp46 természetes citotoxikus receptorok (NCR-k), valamint az NKG2C/CD94 heterodimer és a CD16 (FcγRIIIa), amely az antitest-függő sejtközvetített citotoxicitás központi eleme (89). Ezek a receptorok különböző sejtfelszíni ligandumokat ismernek fel, amelyek stressz, fertőzés vagy tumorgenezis hatására fokozottan megjelennek a célsejtek felszínén.

A NKG2D receptor például olyan „stressz-indukált” ligandumokat köt meg, mint a MICA/B és ULBP család fehérjéi, amelyek expressziója gyakran nő a transzformált vagy vírusfertőzött sejtekben (90). A DNAM-1 (CD226) receptor az Nectin-2 (CD112) és PVR (CD155)

molekulákat ismeri fel, amelyek sok tumor típusban túlzottan expresszálódnak, és az NK-sejt-mediált citotoxicitás egyik fő aktivációs útvonalát biztosítják (91). Az NCR-családba tartozó receptorok, mint az NKp30, NKp44 és NKp46, a vírusfertőzött és daganatos sejtek különféle felszíni fehérjéit kötik, ezzel közvetlenül is hozzájárulnak a lítikus szinapszis kialakításához. Ezek a receptorok ITAM (immunreceptor tirozin-alapú aktiváló motívum) doménekkel rendelkező adapterfehérjéken – például DAP10, DAP12, CD3 ζ és Fc ϵ RI γ – keresztül továbbítják az aktiváló jeleket, amelyek a sejt belsejében Ca²⁺-függő jelátviteli kaszkádokat indítanak el, végül pedig granzim- és perforin-granulumok exocitózist váltják ki (92).

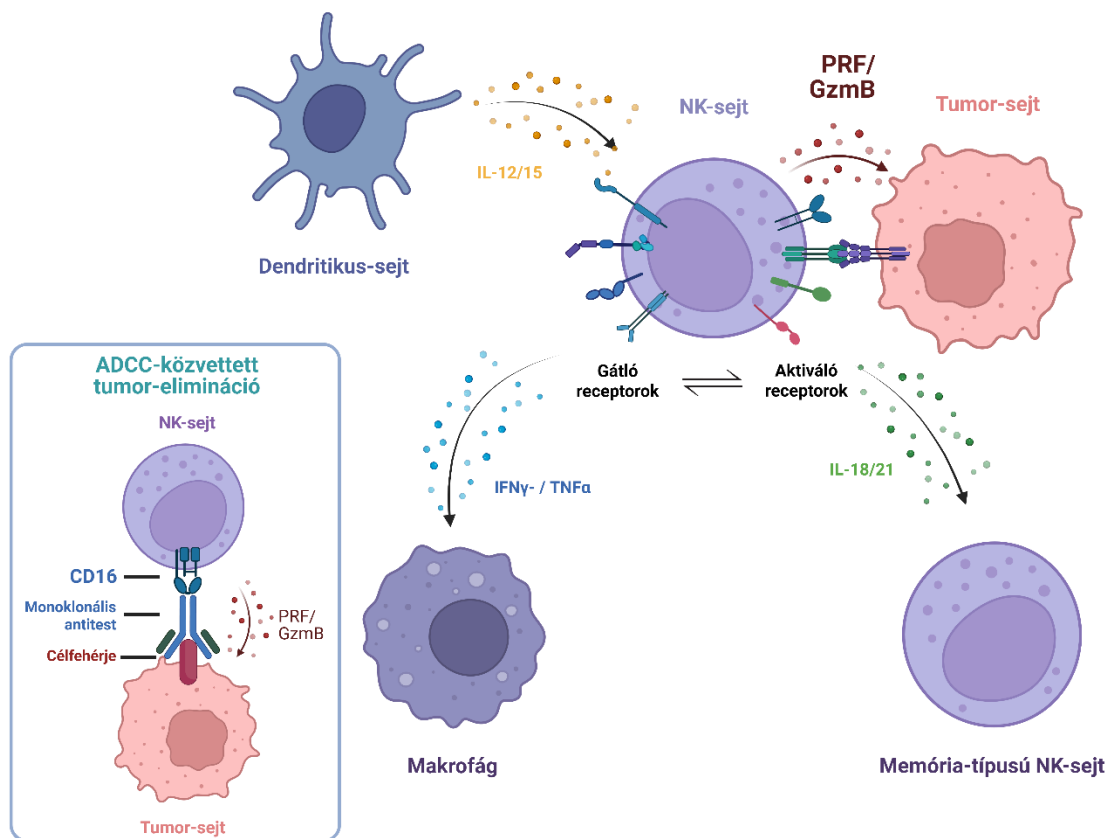
Az ADCC mechanizmusa különösen jelentős klinikai szempontból. Az NK-sejtek CD16 receptoruk révén képesek felismerni a célsejtek felszínéhez kötődött antitestek Fc régióját, és ezen keresztül aktiválódnak. Ez az útvonal képezi több monoklonális antitest-alapú terápia hatásmechanizmusának egyik legfontosabb komponensét (93).

A receptorok mellett az aktiváló citokinek is központi szerepet játszanak az NK-sejtek működésének szabályozásában. Az IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 és IL-21 különböző kombinációi fokozzák az NK-sejtek proliferációját, citotoxikus aktivitását és citokintermelését (94). Különösen az IL-15 számít kulcsfontosságúnak az NK-sejtek differenciációjában és perzisztenciájában. Ez a citokin a JAK1/3–STAT5 jelátviteli útvonalon keresztül szabályozza a sejtek túlélését és a citotoxikus fegyverzet (perforin, granzim B) fenntartását (95). Az IL-12 és IL-18 szinergikusan serkentik az IFN- γ termelést, ezzel fokozva a daganatellenes immunválaszt, míg az IL-21 elősegíti a hosszabb életű, memóriaszerű NK-sejtek kialakulását (96)(97).

Az NK-sejtek citotoxikus aktivitása elsősorban a perforin-granzim rendszer közvetítésével valósul meg. Aktivációjukat követően az effektor NK-sejtek citotoxikus granulátumokat bocsátanak ki az immunológiai szinapszisba, amelyek fő komponensei a perforin és a granzim B (98). A perforin pórusokat képez a célsejt membránján, amelyeken keresztül a granzimek bejutnak, apoptózist és sejtpusztulást indukálva (99). Emellett az NK-sejtek halálreceptor-mediált mechanizmusokat is aktiválhatnak, például a FasL–Fas vagy TRAIL–TRAILR útvonalakat (84).

A közvetlen sejtpusztítás mellett az NK-sejtek immunmoduláló szerepe is meghatározó. Aktivációjuk után számos proinflammatorikus citokint termelnek, például IFN- γ -t, TNF- α -t és IL-10-et, amelyek gátolják a tumorsejtek proliferációját, valamint elősegítik az adaptív immunválasz kialakítását és erősítését. Ezen kívül olyan növekedési faktorokat is szekretálnak, mint a GM-CSF

és FLT-3L, amelyek támogatják a mieloid sejtek fejlődését, valamint kemokineket, például XCL1-et és CCL5-öt, amelyek további immunsejtek toboroznak a tumor mikrokörnyezetébe (100). Az aktiváló és gátló receptorok közötti komplex egyensúly biztosítja, hogy az NK-sejtek képesek szelektíven elpusztítani a potenciálisan veszélyes célsejteket, miközben az ép szövetek épségben maradnak. Ez az egyensúly azonban nem merev, hanem adaptív módon változik a tumor mikrokörnyezet, a citokin-jelek és az immunrendszer más komponenseinek hatására. Friss kutatások rámutattak arra is, hogy az NK-sejtek bizonyos körülmények között immunmemóriához hasonló tulajdonságokat képesek felvenni („trained immunity”), ami tovább növeli potenciáljukat daganatellenes immunterápiákban (101) (6. ábra).



6. ábra: Az NK-sejtek biológiája

A természetes ölősejtek (NK-sejtek) az immunrendszer veleszületett részének kulcsszereplői, amelyek képesek felismerni és elpusztítani a vírusfertőzött vagy daganatos sejteket antigén-prezentáció nélkül. Aktivációjukat különböző citokinek, például az IL-12 és IL-15 (dendritikus sejtekből) segítik elő, amelyek fokozzák citotoxikus aktivitásukat és perforin (PRF), illetve granzim B (GzmB) felszabadítását. Az NK-sejtek hatásukat közvetlen citotoxicitás útján, valamint antitest-függő celluláris citotoxicitás (ADCC) révén is kifejthetik, utóbbit a CD16 (FcγRIII) receptor közvetíti, amely a monoklonális antitesttel fedett tumorsejtek felismerését és eliminálását teszi lehetővé.

A tumorsejtekkel és más immunsejtekkel (például makrofágokkal) folytatott kölcsönhatások során az NK-sejtek IFN- γ és TNF- α termelésével serkentik a gyulladásos válaszokat és elősegítik az adaptív immunitás aktiválását. Bizonyos citokinek (pl. IL-18 és IL-21) hatására az NK-sejtek memória-szerű fenotípust is kialakíthatnak, amely fokozott és tartósabb immunválaszt biztosít ismételt antigén-expozíció esetén.

Ez a komplex intercelluláris hálózat lehetővé teszi az NK-sejtek számára, hogy központi szerepet töltsenek be a daganatellenes immunitás kialakításában és fenntartásában.

3.4.2. Az NK-sejtek klinikai felhasználásának perspektívái

Az utóbbi évtizedben az NK-sejtek a daganatellenes immunterápia egyik ígéretes pillérévé váltak. Számos klinikumban alkalmazott monoklonális antitest - például a rituximab (anti-CD20), a trastuzumab (anti-HER2), a cetuximab (anti-EGFR) és az elotuzumab (anti-SLAMF7) - részben az NK-sejtek ADCC-aktivitásán keresztül fejti ki hatását (102). Klinikai vizsgálatok kimutatták, hogy az effektorválasz hatékonysága gyakran összefügg az Fc γ RIIIa allélpolimorfizmusával - például a V158F variáns befolyásolja az NK-sejtek affinitását az antitest Fc-régiójához, így meghatározza a betegek terápiás válaszát (103). Ezen felismeréseknek köszönhetően az antitest-alapú terápiák és az NK-sejt-mediált immunválasz szoros kölcsönhatása új irányokat nyitott a kombinált daganatellenes kezelésekben. Az újabb generációs antitestek (például az afukozilált Fc-módosítású obinutuzumab) az ADCC-aktiváció fokozásával fejtenek ki erősebb tumorellenes hatást (104).

Az antitest-alapú terápiák klinikai sikerei nemcsak a humorális immunválasz szerepét erősítették meg a daganatellenes védekezésben, hanem rávilágítottak arra is, hogy az NK-sejtek önmagukban is hatékony terápiás eszközzé válhatnak. Az a tény, hogy ezek a sejtek képesek antitest-közvetítés nélkül, közvetlenül felismerni és eliminálni a stresszjelzéseket mutató vagy MHC-I-hiányos tumorsejteket, új távlatokat nyitott az adoptív NK-sejtterápiák fejlesztésében. Ez különösen nagy jelentőséggel bír azokban az esetekben, ahol a T-sejtes vagy antitest-alapú kezelések hatékonysága korlátozott a tumor immunelkerülő mechanizmusai miatt. A klinikai érdeklődés ezért az elmúlt években az NK-sejtek *ex vivo* előállítására, aktiválására és terápiás visszajuttatására irányult, megalapozva a természetes ölösejtekre épülő modern immunsejt-terápiák korszakát.

Az NK-sejtek klinikai alkalmazása több forrásból kiindulva valósítható meg. A leggyakrabban használt forrás a perifériás vér NK-sejtjei (PB-NK), amelyeket donorból nyernek és *ex vivo* körülmények között citokinekkal — jellemzően IL-2-vel, IL-15-tel, IL-18-cal, vagy IL-21-gyel - aktiválnak és proliferációra serkentenek. Ezek a citokinek fokozzák az aktiváló

receptorok (pl. NKG2D, DNAM-1, NKp30, NKp46) expresszióját és a sejtek citotoxikus funkcióját (105). A köldökszinórvér-eredetű NK-sejtek (CB-NK) nagy proliferációs potenciállal, de kezdetben alacsonyabb érettséggel rendelkeznek, így intenzív *ex vivo* expansziót igényelnek (106). A NK-92 sejtvonal stabil forrásként lehetőséget kínál egységes sejtkészítmények előállítására, de a klinikai alkalmazás előtt a proliferáció megakadályozása érdekében a sejtek besugárzására van szükség, ami rövidíti azok élettartamát (107). A legújabb megközelítés az indukált pluripotens őssejtekből (iPSC) származó NK-sejtek előállítása, amelyek standardizálható, genetikai szempontból szerkeszthető és tömeggyártásra alkalmas „off-the-shelf” forrást biztosítanak (108).

Az NK-sejtes terápiák egyik legfontosabb előnye a kedvező biztonsági profil: a kezelések során ritkán fordul elő citokin-felszabadulási szindróma (CRS) vagy neurotoxicitás, amelyek a CAR-T-sejtes terápiák fő korlátai. A legfőbb kihívás továbbra is az *in vivo* perzisztencia hiánya és a tumormikrokörnyezethez való adaptáció korlátozottsága. Ennek megoldására fejlesztették ki a citokin-modulált (IL-15-alapú) és genetikailag módosított NK-sejt-platformokat, amelyek célja a sejtek túlélésének, aktivitásának és tumor-infiltrációjának javítása (109).

További előrelépést jelentenek a bispecifikus és trispecifikus „killer engerek” (BiKE, TriKE), amelyek egyidejűleg kötik meg az NK-sejtek CD16 receptorát és a tumorsejt antigénjét, közvetlen citotoxikus kapcsolatot hozva létre. A TriKE-k harmadik komponenseként beépített IL-15 domén serkenti az NK-sejtek proliferációját és túlélését, ami jelentősen növeli a terápiás hatékonyságot (110). E stratégiák célja, hogy a természetes NK-sejtek rövid élettartamát és limitált aktivitását tartósabb, célzott válasszá alakítsák.

Az előzőek alapján kijelenthetjük, hogy az NK-sejtek klinikai alkalmazásainak kutatása az elmúlt években jelentős lendületet vett, mivel e sejtek egyedülálló tulajdonságaik révén ígéretes alternatívát kínálnak a hagyományos T-sejtalapú immunterápiákkal szemben. Ugyanakkor a klinikai vizsgálatok eredményéből az is kiolvasható, hogy hatékonyságukat jelenleg számos tényező korlátozza, többek között a tumor mikrokörnyezet immunszuppresszív hatása, az *in vivo* perzisztencia és proliferáció alacsony szintje, valamint a célsejtek által kialakított immunelkerülő mechanizmusok (111). Ezen akadályok leküzdésére a modern sejtbiológiai és génmódosítási technológiák – különösen a kiméra antigénreceptorok alkalmazása – új irányt jelöltek ki az NK-sejtterápiák fejlesztésében.

3.4.3. 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 tumorellenes aktivitásával és kedvező biztonsági profiljával (112). 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 (113). Ez a kettős felismerési mechanizmus növeli a tumorellenes 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 fiziológiai 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 a univerzális, úgynevezett „off-the-shelf” CAR NK-sejtek létrehozását, amelyek előre gyártott, tárolható és klinikai szinten gyorsan hozzáférhető sejt készítmények formájában használhatók (114). 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.

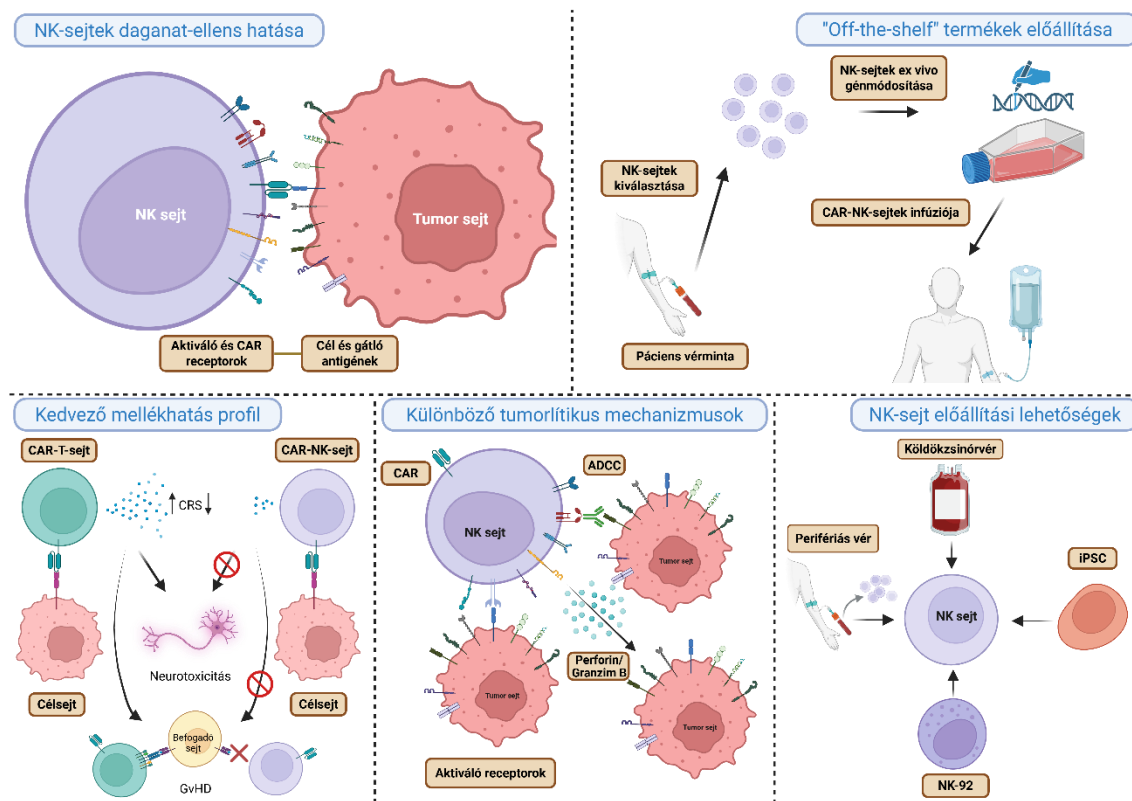
Az NK-sejtek természetes citotoxicitása és citokinprofilja is kedvezőbb a klinikai tolerálhatóság szempontjából. Klinikai vizsgálatokban a CAR-NK-sejtes terápiákkal összefüggő CRS előfordulása ritka és enyhébb lefolyású volt. Az MD Anderson Cancer Center kulcsfontosságú fázis I/II. klinikai vizsgálata (NCT03056339) például kimutatta, hogy a köldökzsinórvérből származó CD19-specifikus CAR NK-sejtek nem okoztak sem CRS-t, sem neurotoxicitást, miközben jelentős antitumor hatást mutattak refrakter hematológiai malignitásokban (112). 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-sejtek funkcionális flexibilitása és immunológiai redundanciája további előnyöket kínál. Az NK-sejtek többféle mechanizmuson keresztül képesek tumorsejt-lízist indukálni – ideértve a perforin/granzim-mediált citotoxicitást, az antitestfüggő sejtes citotoxicitást,

valamint a halálreceptor-ligand rendszereken (FasL, TRAIL) keresztül történő apoptózist. E komplex fegyvertár a CAR-mediált felismeréssel kombinálva többrétegű védelmet biztosít a tumor immunmenekülési mechanizmusaival szemben (115).

Az NK-sejt-alapú terápiák immunológiai stabilitását fokozza az is, hogy ezek a sejtek nem mennek át klonális kimerülésen vagy túlaktivációs apoptózison olyan mértékben, mint a T-sejtek. Bár rövidebb élettartamúak, aktivitásuk kontrolláltabb és kiszámíthatóbb, ami biztonságosabb klinikai kinetikát eredményez (116). Ez különösen fontos olyan esetekben, amikor a CAR-expresszió hosszabb ideig fennmarad, hiszen a konstitutív T-sejt-aktivációval ellentétben az NK-sejtek természetes szabályozó mechanizmusai gátolják a túlzott jelátvitelt. Ennek eredményeként a CAR NK-sejtterápiák esetében ritkább az autoimmun-szerű mellékhatások és a „on-target, off-tumor” toxicitás előfordulása (117).

Egy másik fontos szempont, hogy az NK-sejtek forrása sokkal diverzifikáltabb, mint a T-sejteké. CAR NK-sejtek előállíthatók perifériás vérből, köldökzsinórvérből, indukált pluripotens őssejtekből (iPSC), vagy akár stabil, tumormentesített NK-sejtvonalakból, mint az NK-92. Ez a forrásdiverzitás a gyártás rugalmasságát növeli (118). (7. ábra).



7. ábra: CAR NK vs CAR T sejtek

A természetes ölüsejtek (NK-sejtek) daganatellenes hatásukat két fő úton fejtik ki: egyrészt természetes aktivációs receptoraik révén képesek felismerni és elpusztítani a tumorsejteket, másrészt kiméra antigén receptorral (CAR) módosítva célzott tumorelles válasra tehetők képe. Az NK-sejtek többféle citotoxikus mechanizmust alkalmaznak, beleértve a CAR-mediált sejtpusztítást, a természetes receptorok által közvetített lízist, az antitestfüggő celluláris citotoxicitást (ADCC), valamint a perforin-granzim rendszer aktiválását.

A CAR-NK-sejtterápiák fejlesztése új lehetőséget kínál az „off-the-shelf” (előre legyártott, allogén) sejtkeztímenyek klinikai alkalmazására, amelyek gyorsan, standardizált módon és költséghatékonyan bevetethők, ellentétben az egyénre szabott autológ CAR-T-sejtterápiákkal. Ezen túlmenően a CAR NK-sejtek kedvezőbb biztonsági profillal rendelkeznek, mivel kisebb a citokinfelszabadulási szindróma (CRS) és a graft-versus-host betegség (GvHD) kockázata.

Az NK-sejtek több forrásból is előállíthatók, például indukált pluripotens össejtekből (iPSC), perifériás vérből, köldököszinórvérből vagy NK-sejt vonalakból, mint az NK-92, amely széles körben alkalmazott modellrendszer preklinikai és klinikai fejlesztésekben.

3.4.3.1. 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 (119). Ez a fázis I/II. klinikai vizsgálat (NCT03056339) köldököszinórvérből 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.

Az első sikeres klinikai vizsgálatot követően több kutatócsoport indított hasonló klinikai programokat. A Fate Therapeutics például iPSC-eredetű, FT596 jelű CD19/IL-15/hnCD16 CAR

NK-sejt-terméket fejlesztett, amely 2021-ben lépett fázis I. vizsgálatba (NCT04245722). Ez a sejtvonal több módosítást is tartalmazott: az NK sejtek mindenekelőtt CD19-specifikus CAR-t fejeztek ki a célzott felismerésért, IL-15 citokint szekretáltak az autokrin proliferáció fenntartásáért, valamint hnCD16 (F158V) mutációt hordozó receptort is expresszáltak az ADCC fokozása érdekében (120). Az első eredmények szerint az FT596 sejtkelesztmény jól tolerálható volt, CRS-t vagy ICANS-t nem okozott, ugyanakkor klinikailag releváns tumorregressziót eredményezett több, relabált B-sejtes limfómában szenvedő beteg esetében. Hasonlóan ígéretes eredményeket mutattak az FT576 és FT522 termékek is, amelyek a BCMA-t, illetve a CD19/CD20 kombinációt célozták (121)(122).

A BCMA (B-cell maturation antigen) elleni CAR NK-sejtek fejlesztése a multiplex myeloma terápiájában mutatott különös potenciált. Preklinikai vizsgálatok kimutatták, hogy a BCMA-CAR NK-sejtek képesek voltak a plazmasejtek hatékony eliminálására (123). A Chimeric Therapeutics és a Kiadis Pharma hasonló fejlesztései megerősítették, hogy az NK-sejtek rövidebb élettartama klinikai szinten előnyt is jelenthet, mivel a mellékhatások gyorsan lecsengenek, a sejtek nem perzisztálnak kórosan, és nem alakul ki autoimmun citotoxicitás (124) (125).

Fontos ugyanakkor megjegyezni, hogy a CAR NK-terápiák alkalmazása során az eddigi vizsgálatokban nem figyeltek meg hosszú távú sejtperezisztenciát, mint a CAR T-sejteknél, azonban az IL-15- vagy IL-21-expresszióval módosított konstrukciók hetekig, sőt akár hónapokig is kimutathatók voltak. Ezekben a hematológiai kórképekben NK-sejtek rövidebb életciklusa tehát nem, mint hátrány, hanem bizonyos indikációkban – például akut leukémiákban – mint előny jelenik meg, hiszen lehetővé teszi a pontosan adagolható, tranzienst, kontrollálható immunválaszt. Jelenleg aktív kutatások folynak abban az irányban, hogy a CAR NK-sejteket monoklonális antitestekkel kombinációkban alkalmazzák. Az ilyen kombinációk – például a rituximabbal vagy immunellenőrzőpont gátlókkal együtt adott CAR NK-sejtek – szinergikus tumorelles hatást mutattak preklinikai modellekben (126).

3.4.3.2. 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 (127).

A perzisztencia-probléma a CAR NK-terápiák Achilles-sarka. Ellentétben a T-sejtekkel, amelyek megfelelő kostimuláció mellett memóriasejt-formációra és hosszan fennmaradó klonális expanzióra képesek, az NK-sejtek biológiailag rövid életű effektorsejtek, amelyek nem rendelkeznek klasszikus memóriafunkcióval. A perifériás vérből izolált NK-sejtek élettartama általában néhány napra, legfeljebb egy-két hétre korlátozódik *in vivo*, ami drasztikusan lerövidíti a terápiás időablakot (128). 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 (129).

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 (130) (131). 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 ITSM motívumok 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 (132).

E problémák kiküszöbölésére a legújabb kutatások az NK-sejt-specifikus jelátviteli domének (pl. 2B4, DAP10, DAP12, NKG2D) integrálására fókuszálnak. A 2B4 (CD244) például az NK-sejtekben pozitív kostimulációs útvonalat közvetít az Fyn tirozin kináz által közvetítetten keresztül, elősegítve a citotoxikus granulumok felszabadulását, az IFN γ -termelést és a sejttúlélését (133). Az ilyen NK-specifikus szignáldomének beépítése szinergikus hatást eredményezhet, különösen akkor, ha azokat T-sejt eredetű doménekkel – például a 4-1BB-vel – kombinálják. Ez a „hibrid” megközelítés egyesítheti a korai aktivációs jelet és a hosszú távú fennmaradást biztosító metabolikus támogatást, ami kulcsfontosságú lehet a szolid tumor mikrokörnyezetben.

A tumor mikrokörnyezet (TME) ugyanakkor továbbra is komoly akadályt jelent a CAR NK-sejtek számára. A szolid tumorokban az alacsony oxigénszint, a magas tejsav-koncentráció és

az acidikus pH olyan metabolikus környezetet teremt, amely gátolja az NK-sejtek glikolízisét és ATP-termelését. Ezzel párhuzamosan a tumor által termelt TGF- β , IL-10, valamint a PD-L1-expresszió az NK-sejtek aktiváló receptorait downregulálja, különösen az NKG2D-t és a DNAM-1-et (134). Ez a kettős gátlás – metabolikus és immunológiai – a CAR-független NK-aktivitást drámaian csökkenti, és még a CAR-mediált jelátvitelt is hipofunkcionális állapotba terelheti.

A TME szerkezeti elemei is komoly fizikai akadályt képeznek. A tumor-asszociált fibroblasztok (CAF) által termelt extracelluláris mátrix (ECM) sűrű kollagén- és proteoglikánhálózata korlátozza az immunsejtek bejutását a tumor belsejébe. Az olyan daganatok, amelyekben a hialuronsav-gazdag ECM különösen fejlett, ellenállóbbak az immuninfiltrációval szemben (50).

Az NK-sejtek sejtmigrációs és kemotaktikus kapacitása szintén korlátozottabb, mint a T-sejteké. A T-sejtek hatékonyan használják a CXCR3–CXCL9/10 és CCR7–CCL19/21 tengelyeket, amelyek lehetővé teszik a daganatba való aktív toborzást. Az NK-sejtek ezzel szemben gyakran alacsony szinten expresszálják a szükséges kemokin receptorokat (pl. CXCR4, CX3CR1), ami csökkenti a tumorinfiltráció hatékonyságát (135). Ezt a hiányosságot egyes kutatócsoportok genetikai módosításokkal próbálják korrigálni, például CXCR4-transzdukcióval vagy kemokin receptor-kódoló gének integrálásával, ami fokozza a sejtek homing-képességét a hipoxiás tumorzónákba (136).

A CAR NK-sejtek limitált perzisztenciáját tovább súlyosbítja a kimerülés (exhaustion) és a funkcionális adaptáció jelensége. Hosszabb antigénexpozíció során az NK-sejtek fokozatosan elveszítik az effektor funkcióikat, csökken az IFN γ -termelésük és granzim-B expressziójuk, miközben növekszik a gátló receptorok (pl. NKG2A, TIGIT, TIM-3) kifejeződése (137). E folyamatot fokozhatja a folyamatos CAR-jelátvitel is, ha a konstitutív aktiváció nincs megfelelően szabályozva. Az NK-sejtek kimerülésének reverzibilitása jelenleg aktív kutatási terület, és felveti a „transient CAR expression” stratégiák – például mRNS-transzfekció – jelentőségét, amelyek lehetővé teszik az átmeneti, de kontrollált CAR-expressziót tartós genommodifikáció nélkül.

A fentebb ismertetett korlátok ellenére a CAR NK-technológia fejlesztése gyors ütemben halad. Az egyik legígéretesebb irány a kostimulációs domének kombinálása és az NK-specifikus szignálútvonalak integrálása. Az olyan konstrukciók, amelyek a T-sejt eredetű 4-1BB és az NK-sejt eredetű 2B4 jelátviteli modulokat egyaránt tartalmazzák, képesek lehetnek fokozni a proliferációt, javítani a metabolikus alkalmazkodást, és mérsékelni a kimerülést. Az ilyen kettős

vagy többdoménes CAR NK-sejtek tehát új szintet képviselnek a sejttervezésben: nem csupán a felismerést, hanem az effektor-funkciók fenntarthatóságát is genetikai szinten szabályozzák.

Ezzel párhuzamosan a CAR NK-sejtek perzisztenciájának növelésére autokrin citokintermelést kódoló konstrukciók (pl. IL-15-expresszázó CAR NK) is fejlesztés alatt állnak, amelyek célja az endogén túlélési szignálok biztosítása exogén citokin-pótlás nélkül (138). Az IL-15 nemcsak az NK-sejtek életképességét, hanem az emlékezet-szerű (memory-like) NK-fenotípus kialakulását is támogatja, amely fokozott IFN γ -termeléssel és tartósabb aktivitással jár.

Ezek a kutatási irányok alapozták meg azokat a jelen disszertáció keretei között bemutatott kísérletes megközelítéseket is, amelyek célja egy olyan NK-sejt-központú sejttérapiás platformok létrehozása volt, amelyek a természetes ölősejtek biológiai sajátosságaihoz jobban illeszkedő módon képesek szabályozni az aktivációt, proliferációt és perzisztenciát. A fejlesztési koncepció központi eleme az volt, hogy a T-sejt eredetű kostimulációs domének (mint a CD28 és a 4-1BB) mellett olyan NK-sejt-endogén szignálmolekulákat (pl.: 2B4) is kipróbáljunk, amelyek az NK sejtekre specifikusan képesek fokozni a citotoxikus válasz sebességét és az effektorsejtek túlélését.

Kutatásainkat HER2 tumorspecifikus antigént és CD44 extracelluláris mátrix komponens nagy fokban expresszázó tumormodelleken végeztük, mivel ezek a daganattípusok kiemelkedő példái azoknak az immunrezisztens szolid tumoroknak, ahol jelentősen gátolt az immunsejtek hozzáférése a malignus sejtekhez.

4. 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 recepttorral (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.

Kutatásunkkal szerettünk volna hozzájárulni a CAR-NK alapú immunterápiák fejlesztéséhez azáltal, hogy azonosítjuk azokat a szerkezeti és funkcionális paramétereket, amelyek meghatározzák ezeknek az effektor sejteknek a hatékonyságát, specifikusságát és alkalmazhatóságát a szolid tumorok kezelésében.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Anyagok, törzsoldatok

5.1.1. Általános törzsoldatok, többfunkciós reagensek

1. 1× PBS puffer: 10× PBS-ből (100 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl) hígítva.
2. DMEM tápoldat (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 4°C-on tárolva.
3. JIMT-1 tápoldat (1:1 F12 és DMEM; F12: Sigma-Aldrich, N6760), 4°C-on tárolva.
4. FBS (magzati borjúsérum, Foetal Bovine Serum; F9665, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), -20°C-on tárolva.
5. GlutaMAX (Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 4°C-on tárolva.
6. Insulin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 4°C-on tárolva.
7. Antibiotikumok: Penicillin-Streptomycin, 4°C-on tárolva.
8. Komplet NK-médium (α -MEM, 2-merkapotetanol, myo-inozitol, hő-inaktivált lószérum, hő-inaktivált Hyclone FBS, folsav, nem esszenciális aminosavak, nátrium-piruvát), 4°C-on tárolva.
9. α -MEM (M0644; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 4°C-on tárolva.
10. 2-merkaptoetanol törzsoldat (0,005M)
11. Myo-inozitol (20 mM; 1-5125; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),
12. Hő-inaktivált lószérum (16050-122; Thermo Fisher Scientific Kft., Budapest, Magyarország)
13. Hő-inaktivált Hyclone FBS (SH30070, Thermo Fisher Scientific Kft., Budapest, Magyarország)
14. Folsav (2mM; F-7876, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 4°C-on tárolva.
15. Nem esszenciális aminosavak (M7145 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 4°C-on tárolva.
16. Nátrium-piruvát (1mM, Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 4°C-on tárolva.
17. Formaldehid (Formaldehid Solution, MOLAR Chemicals Kft., forgalmazó: Hungaropharma Gyógyszerkereskedelmi Zrt., Budapest, Magyarország) 35%-os törzsoldata szobakörmérsékleten tárolva.
18. Triton X-100 (Thermo Fisher Scientific Kft., Budapest, Magyarország), 4°C-on tárolva.

19. Tween20 (Thermo Fisher Scientific Kft., Budapest, Magyarország), szobahőmérsékleten tárolva.
20. HER2-Fc fúziós fehérje: Humán IgG1 Fc régióval fuzionált (hFc tag) humán HER2 rekombináns fehérje extracelluláris domén (extracellular domain, ECD), Katalógusszám: 10004-H02H; Sino Biological, Eschborn, Németország) liofilizátum formájában -20°C-on tárolva.
21. D-luciferin (Katalógusszám: 122799; Revvity/Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), -20°C-on tárolva

5.1.2. CAR NK sejt előállítás

1. JetPRIME transzfekciós reagens (Polyplus, Ill-kirch, Franciaország), 4°C-on tárolva.
2. Interleukin-2 (IL-2): Proleukin 18×10^6 IE (PZN-167718), 4°C-on tárolva.
3. RetroNectin (Katalógusszám: T100B; Takara Bio, Kusatsu, Japán), -20°C-on tárolva.
4. Dimetil-szulfoxid (dimethyl sulfoxide, DMSO), szobahőn tárolva.

5.1.3. Áramlási citometria, immunfluoreszcenciás jelölés, mikroszkópia

1. A647 monomer HER2: humán HER2 rekombináns teljes fehérje (Katalógusszám: 10004-HCCH; Sino Biological, Eschborn, Németország): Alexa Fluor 647-el konjugálva, 4°C-on tárolva.
2. 27. A647 anti-IgG: Alexa Fluor 647 konjugált anti-humán IgG F(ab')₂ (Katalógusszám: 2042-31; SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) 4°C-on tárolva.
3. Paraformaldehid (Paraformaldehyde, PFA) por 4°C-on tárolva.
4. DAPI (4',6-Diamidin-2'-fenilindol dihidroklorid) 1 µg/ml törzsoldata metanolban.
5. Mowiol 4-88 (Hoechst Pharmaceuticals, Frankfurt, Németország) 10 w/v% 0,1 M Tris-HCl-ben oldva (pH 8,5), 25 w/v% glicerinnel, -20°C-on tárolva.

5.1.4. Gyártó által összeállított pufferek és reagensek

1. IL-2 ELISA készlet (Katalógusszám: D2050; Human IL-2 Quantikine ELISA Kit; R&D systems, Minneapolis, MN, USA) 4°C-on tárolva.

2. IFN γ ELISA készlet (Katalógusszám: DIF50; Human IFN-gamma Quantikine ELISA Kit; R&D systems, Minneapolis, MN, USA) 4°C-on tárolva.

5.1.5. In vivo xenograft kísérletek

1. Matrigel (Katalógusszám: 356234; BD Biosciences, San Jose, CA, USA), -20°C-on tárolva.
2. Izoflurán (Katalógusszám: 1001936040; Baxter, Deerfield, IL, United States), szobahőmérsékleten tárolva

5.2.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 (139), amelyet retrovirális transzdukciónal módosítottak annak érdekében, hogy a sejtek kifejezzék a nagy affinitású CD16 variánst (Fc γ RIIIA-176V)(140).

Az NK-92 sejteket komplett NK-sejtek tenyésztésére optimalizált médiumban kultiváltuk, amelynek alapját α -MEM alkotta. A médiumot 10% FCS-sel és 10% lószérummal egészítettük ki, továbbá glutamint, nem esszenciális aminosavakat, nátrium-piruvátot, antibiotikumokat, valamint 400 NE/mL IL-2-t (Proleukin S, Clinigen Ltd., Burton-on-Trent, UK) adtunk hozzá a sejtek életképességének fenntartása érdekében.

A HER2-specifikus CAR-t kódoló retrovirális vektorok előállításához HEK293T (ATCC, Manassas, VA, USA) víruscsomagoló sejtvonalat alkalmaztunk.

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 (MDA; ATCC, Manassas, VA, USA) sejtvonalból retrovirális transzdukciónal előállított, a HER2-t transzgén formájában stabilan kifejező, a továbbiakban MDA-HER2-ként hivatkozott sejtvonal (141), az N87 humán gyomorkarcinóma sejtvonal (ATCC, Manassas, VA, USA), valamint a JIMT-1 sejtvonal (142), 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 (143). HER2 negatív kontrollként a tripla-negatív MDA-MB-468 sejtvonalat (továbbiakban: MDA) alkalmaztuk.

A HEK293T, MDA, MDA-HER2, valamint N87 sejtvonalakat sejtvonalakat 10% magzati borjúsérummal (FBS), 2 mmol/L GlutaMAX-szal és antibiotikumokkal kiegészített Dulbecco Modified Eagle médiumban (DMEM) tenyésztettük. A JIMT-1 sejtvonal esetében 1:1 arányban kevert Ham's F12 és DMEM médiumot használtunk, amelyet 20% FBS-sel, 2 mmol/L GlutaMAX-szal, 300 U/L inzulinnal és antibiotikumokkal egészítettünk ki.

A CAR-NK-92 készítmények sejttölő képességét olyan sejtvonalakon vizsgáltuk, amelyeket egysejt-klónozást követően eGFP és luciferáz (ffLuc) markert expresszáló retrovirális vektorokkal transzdukáltunk (MDA.ffLuc, MDA-HER2.ffLuc, JIMT-1.ffLuc és N87.ffLuc). Valamennyi sejtvonalat 37 °C-on, 5% CO₂-t tartalmazó párasított inkubátorban tenyésztettük, standard sejtenyésztési körülmények között.

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

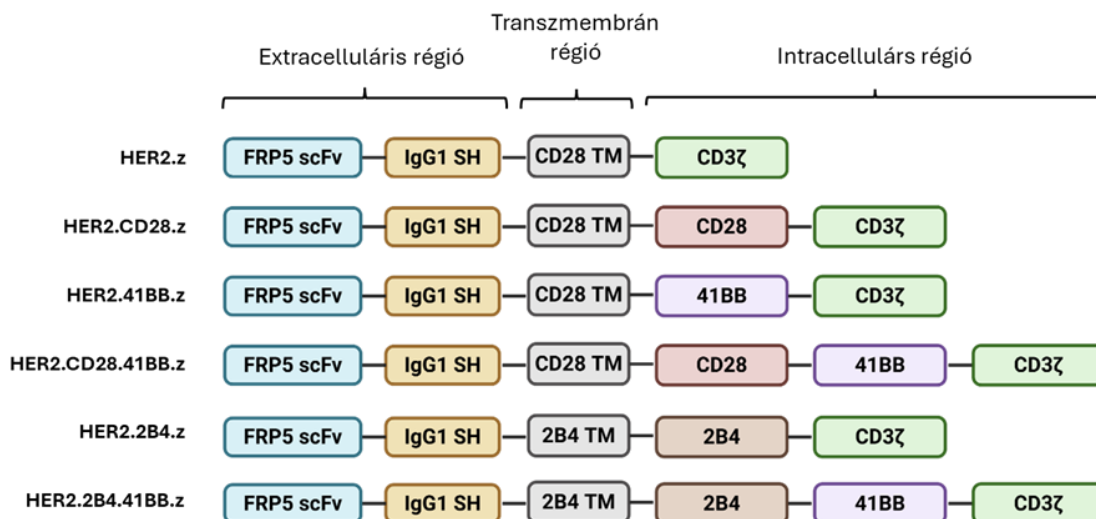
A retrovirális részecskéket HEK293T csomagolósejtek tranziens transzfekcióval bejuttatott HER2-CAR-t kódoló pSFG plazmid segítségével állítottuk elő. A transzfekció során a különböző HER2-CAR konstrukciók génjeit kódoló plazmidok mellett vírus partikulák RD114 kapszid felépítését biztosító pMax.RD114, és a virális replikációhoz szükséges enzimmészletet kódoló gag-pol MoMLV Peg-Pem plazmidokat juttattuk be a HEK293T sejtekbe jet-Prime transzfekciós reagens (Polyplus, Illkirch, France) segítségével 10 cm-es tenyésztőedényeken. Edényenként összesen 10 µg DNS-t alkalmaztunk, az alábbi plazmidarányoknak megfelelően: 3,75 µg CAR-expressziós plazmid : 3,75 µg Peg-Pam : 2,5 µg pMax.RD114. Három napos inkubációt követően a HEK293T sejtek felülszójában található pszeudovírus partikulákat 0,22 µm-es steril fecskendőszűrővel tisztítottuk, és felhasználásig -80°C-on tároltuk.

A HER2-specifikus CAR NK-92 sejtek előállításához 400 NE/ml IL-2-vel kezelt 5×10^5 /ml NK-92 sejtet tenyésztünk komplett NK-médiumban. Az NK sejtek pszeudovírus részecskékkal való transzdukcióját 20 µg/ml RetroNectin-nel (Takara Bio, Kusatsu, Japan) bevont sejtenyésztő 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.

5.4. Az alkalmazott HER2-CAR konstrukciók

Kutatómunkánk során összesen hat különböző HER2 specifikus CAR konstrukciót alkottunk meg (8. ábra).



8. ábra: A kísérleteinkben alkalmazott CAR molekulák sematikus szerkezete

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.

5.5.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 (HER2 ECD; Cat.#10004-HCCH, Sino Biological Europe GmbH, Eschborn, Németország) 10 percig jégen. Az áramlási citometriás elemzést NovoCyte RYB áramlási citométerrel végeztük és az adatokat a NovoExpress v1.2.1 szoftverrel értékeltük ki. (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) A vizsgálat során legalább 10 000 sejtet elemeztünk.

5.6.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 µg/ml trastuzumab jelenlétében) 1 µg/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 IFN γ -koncentrációját enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálattal (ELISA; Quantikine ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) határoztuk meg, a gyártó utasításai szerint. A mérésekhez Tecan Spark® mikroplate olvasót (Tecan Group Ltd., Männedorf, Svájc) használtunk. Negatív kontroll targetként az HER2-negatív MDA-MB-468, míg effektor kontrollként az NT NK-92 sejtvonalak szolgáltak.

5.7.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 szubsztát (Promega, Madison, WI, USA) segítségével határoztuk meg. A keletkező lumineszcens jelet azonnal mértük Tecan Spark® mikroplate olvasóval (Tecan Group Ltd., Männedorf, Svájc). A méréseket két technikai párhuzamosban, három független kísérletben végeztük.

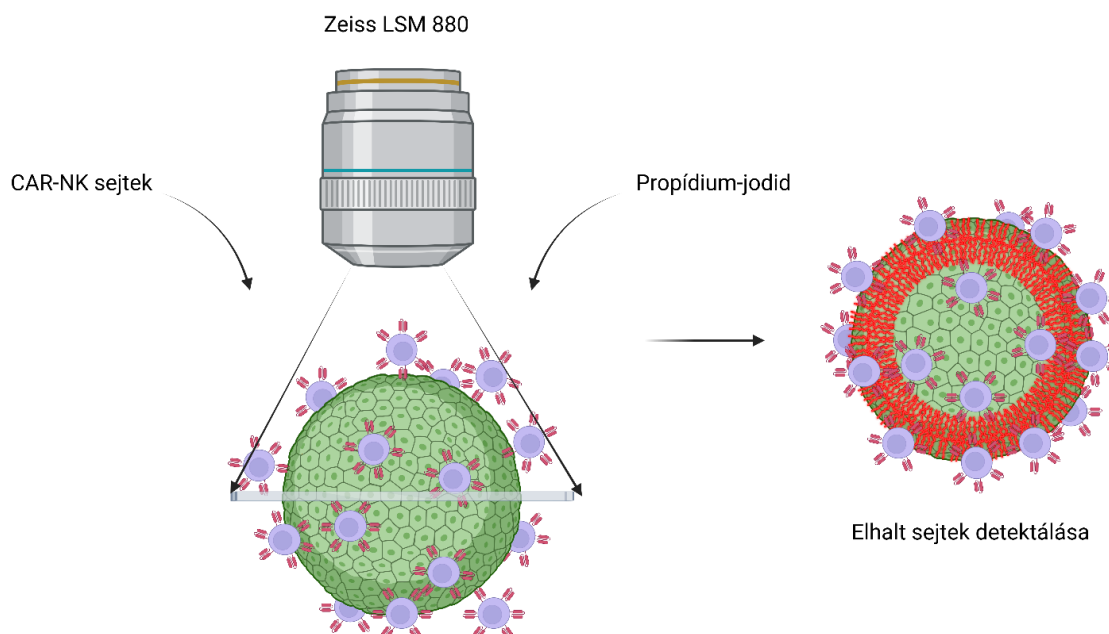
5.8.A CAR NK sejtek proliferációs képességének meghatározása

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.

5.9.A CAR NK sejtek tumorellenes hatásának vizsgálata három-dimenziós sejtkultúrákban

5×10^3 JIMT-1.ffLuc és N87.ffLuc sejtet 96 lyukú, U-aljú sejtenyésző edényben (174925 96U Bottom Plate, Thermo Scientific, Roskilde, Dánia) 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 µg/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 (9. ábra).



9. ábra: A CAR-NK sejtek tumor ellenes hatékonyságának ellenőrzése 3D-s szferoid modellben

A HER2-CAR NK-92 sejtek tumorelles hatáának vizsgálata háromdimenziós (3D) tumor szferoid modellekben. A JIMT-1.ffLuc és N87.ffLuc sejtekből képzett szferoidokat HER2-CAR NK-92 vagy nem transzdukált (NT) NK-92 sejtekkkel inkubáltuk, majd a sejtpusztulás mértékét propidium-jodid festéssel és konfokális mikroszkópiával (Zeiss LSM 880) határoztuk meg.

5.10. *In vivo* xenograft tumorok kezelése HER2-CAR NK sejtekkkel

A HER2-CAR NK-92 sejtek JIMT-1 és N87 eredetű xenograft daganatokra gyakorolt tumorelles hatását immundeficiens NSG egérmódelben (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.

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 hét hetes nőstény NSG egereket szubkután (s.c.) 3×10^6 JIMT-1.ffLuc vagy N87.ffLuc sejttel oltottuk be. A sejtek 100 μ L PBS-ben és azzal azonos térfogatú Matrigelben (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) kerültek szuszpendálásra, majd a keveréket a hátoldali bőrfelület alá injektáltuk. A tumorok növekedését biolumineszcens képalkotással követtük nyomon IVIS Spectrum CT

készülék (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) segítségével. Ehhez a képalkotás előtt az állatokat izofluránnal altattuk, majd intraperitoneálisan (i.p.) 150 mg/kg dózisú D-luciferint (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) adtunk be. A 10 perces inkubációt követően biolumineszcens felvételeket készítettünk, amelyeket a Living Image 4.0 szoftverrel (Caliper Life Sciences, Waltham, MA, USA) elemeztünk. A jel intenzitását foton/másodperc/négyzetcentiméter/szteradián (p/s/cm²/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 5×10⁶ 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 5×10⁶ NT NK-92 sejtet kaptak intravénásan, azonos időközönként. Az ADCC-kontrollcsoportban (NT + trastuzumab) az állatok kéthetente 5×10⁶ 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.

5.11. 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 (Cryomatrix, 6769006, Epredia, Kalamazoo, MI, USA) beágyazó anyagba helyeztük, végül lefagyasztottuk. A mintákból 7 µm vastagságú kriometszeteket készítettünk, amelyeket azonnal tárgylemezre helyeztünk és jégben tartottunk.

A metszeteket 200 µl PBS-sel mostuk, majd a CD16 sejtfelszíni receptor kimutatásához 10 µg/µl 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 µg/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.

5.12. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzés során a GraphPad Prism 5 szoftvert (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) 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 teszttel az eltérő mintaelemszámú csoportok kerültek összehasonlításra. A csoportok közötti eltéréseket szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$ volt.

6. Eredmények

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

6.1.1. HER2-specifikus kiméra antigén receptort kifejező NK-92 sejtvonalak előállítása

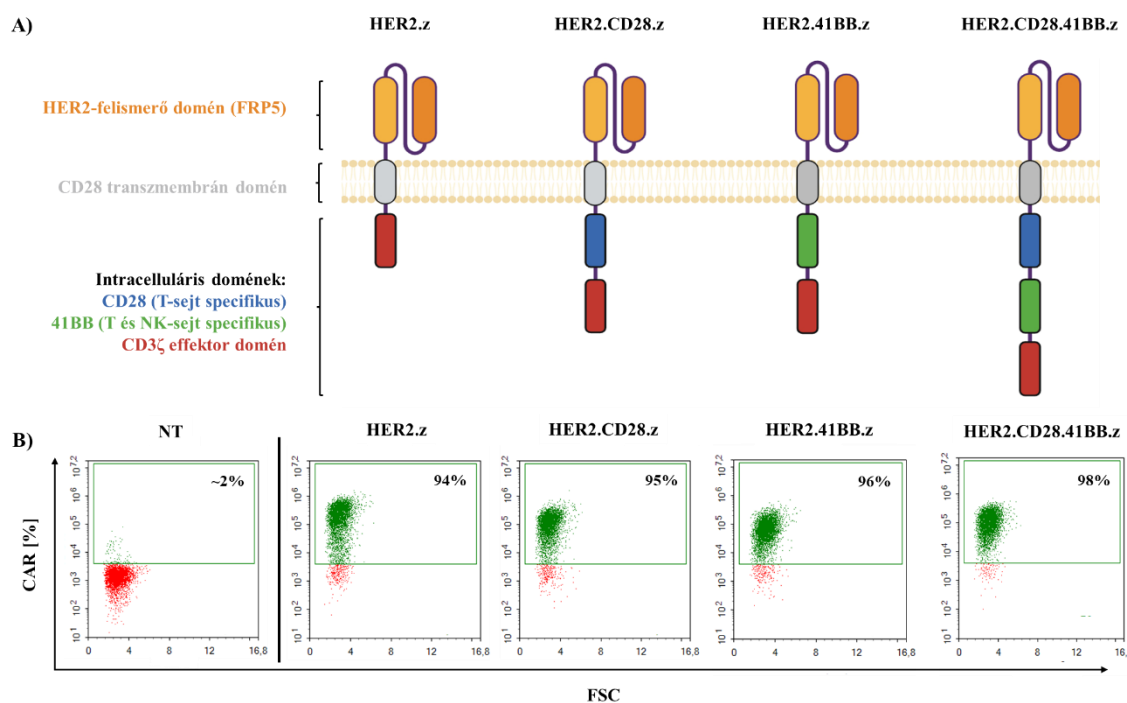
Hipotézisünk szerint a CAR-molekulákba épített kostimulációs intracelluláris domének minősége és kombinációja alapvetően meghatározza az NK-sejtek aktivációs küszöbét, proliferációs kapacitását és effektor funkcióinak fenntarthatóságát. Mivel a klasszikusan T-sejtekre optimalizált kostimulációs jelátviteli elemek NK-sejtekben betöltött szerepe csak részben ismert, célul tűztük ki olyan HER2-specifikus CAR-konstrukciók létrehozását, amelyek eltérő intracelluláris kostimulációs doméneket hordoznak. Ezeket a konstrukciókat az NK-92 sejtvonalban fejeztettük ki annak érdekében, hogy kísérletesen összehasonlítsuk a különböző jelátviteli konfigurációk hatását az NK-sejtek funkcionális tulajdonságaira. Az NK-92 sejtvonal alkalmazása lehetővé tette, hogy a megfigyelt funkcionális különbségeket kizárólag a CAR-konstrukciók jelátviteli sajátosságainak tulajdonítsuk, mivel ebben a rendszerben primer NK-sejtekkel ellentétben nem szükséges donorvariabilitással számolni.

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 módszertani részben részletezett protokoll szerint (**10. ábra, A panel**). A CAR-molekulák sejtfelszíni expresszióját a felismerő doménre

specifikus, fluoreszcensen jelölt rekombináns HER2 receptor extracelluláris domén segítségével, áramlási citometriás módszerrel ellenőriztük.

A sikeres CAR-expresszió igazolását követően fluoreszcencia-aktivált sejtválogatást (FACS) alkalmaztunk, amelynek eredményeként olyan HER2-CAR NK-92 sejtvonalakat hoztunk létre, amelyekben a receptort stabilan kifejező sejtek aránya közel 100% volt (**10. ábra, B panel**). Kontrollcsoportként – az expresszió ellenőrzése és a sejtválogatás során egyaránt – nem transzdukált NK-92 sejteket alkalmaztunk.



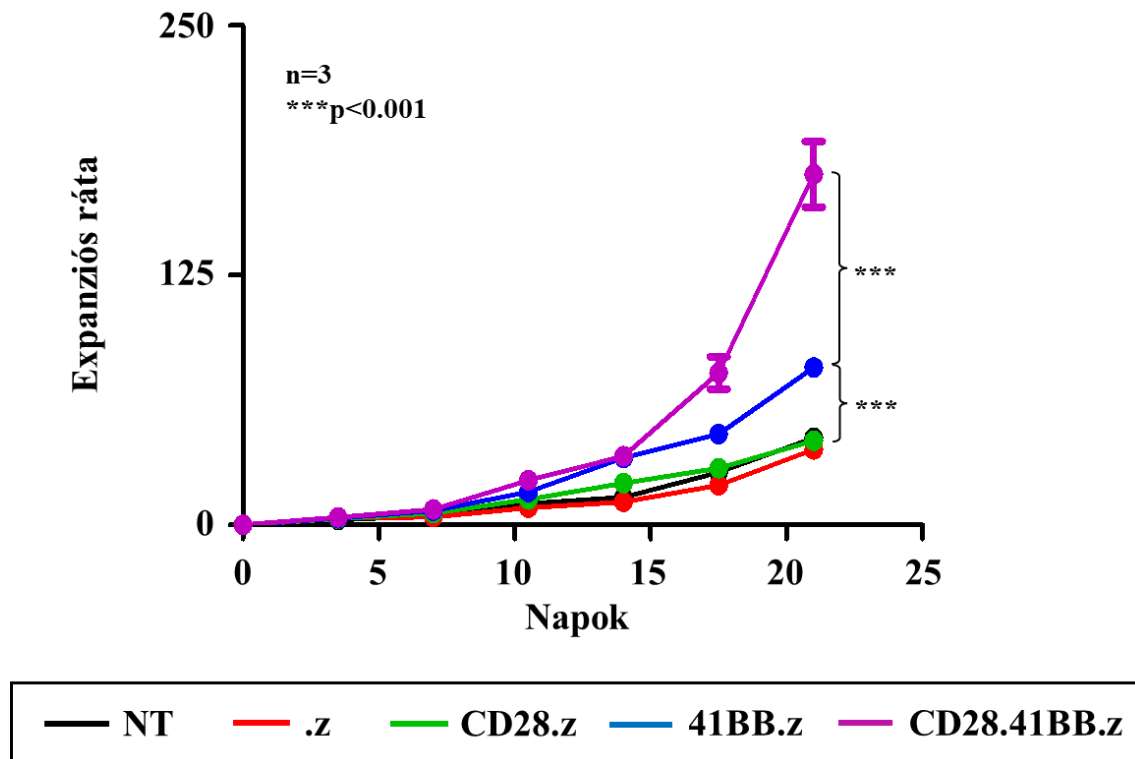
10. ábra: A különböző generációjú HER2-specifikus CAR-konstrukciók felépítése és expressziója NK-92 sejtekben

A) A HER2-specifikus kiméra antigén receptorok sematikus ábrázolása, feltüntetve az FRP5 eredetű antigénfelismerő domént, a CD28 transzmembrán régiót, valamint az eltérő intracelluláris jelátviteli és kostimulációs doméneket.

B) A HER2-CAR-NK-92 sejtpopulációk sejtfelszíni CAR-expressziója fluoreszcencia-aktivált sejtválogatást (FACS) követően. Az áramlási citometriás dot plotok a nem transzdukált (NT) kontroll, valamint az első-, második- és harmadik generációs HER2-CAR-konstrukciókat expresszáló NK-92 sejtvonalak CAR-pozitív frakcióit mutatják.

A különböző kostimulációs endodoméneket tartalmazó CAR-konstrukciók NK-92 sejtekre gyakorolt hatását első lépésben proliferációs assay segítségével értékeltük, 400 IU/ml interleukin-2 jelenlétében. Eredményeink alapján a 4-1BB intracelluláris domént hordozó CAR-konstrukciók szignifikánsan fokozott proliferációs választ indukáltak az endodomént nem tartalmazó (HER2.z),

illetve a kizárólag CD28 jelátvitelt biztosító CAR-molekulákhoz képest. Figyelemre méltó módon a CD28 és 4-1BB doméneket egyesítő, harmadik generációs HER2.CD28.41BB.z CAR-konstrukcióval módosított NK-92 sejtek proliferációs aktivitása nemcsak a CD28-at nem tartalmazó konstrukciókat haladta meg, hanem a kizárólag 4-1BB domént expresszáló CAR-NK-92 sejtekét is (**11. ábra**). Ez arra utalhat, hogy a harmadik generációs konstrukcióban a CD28 kostimulációs domén funkcionálisan aktív volt, és a 4-1BB által közvetített proliferációs jelátvitelhez additív módon járult hozzá.

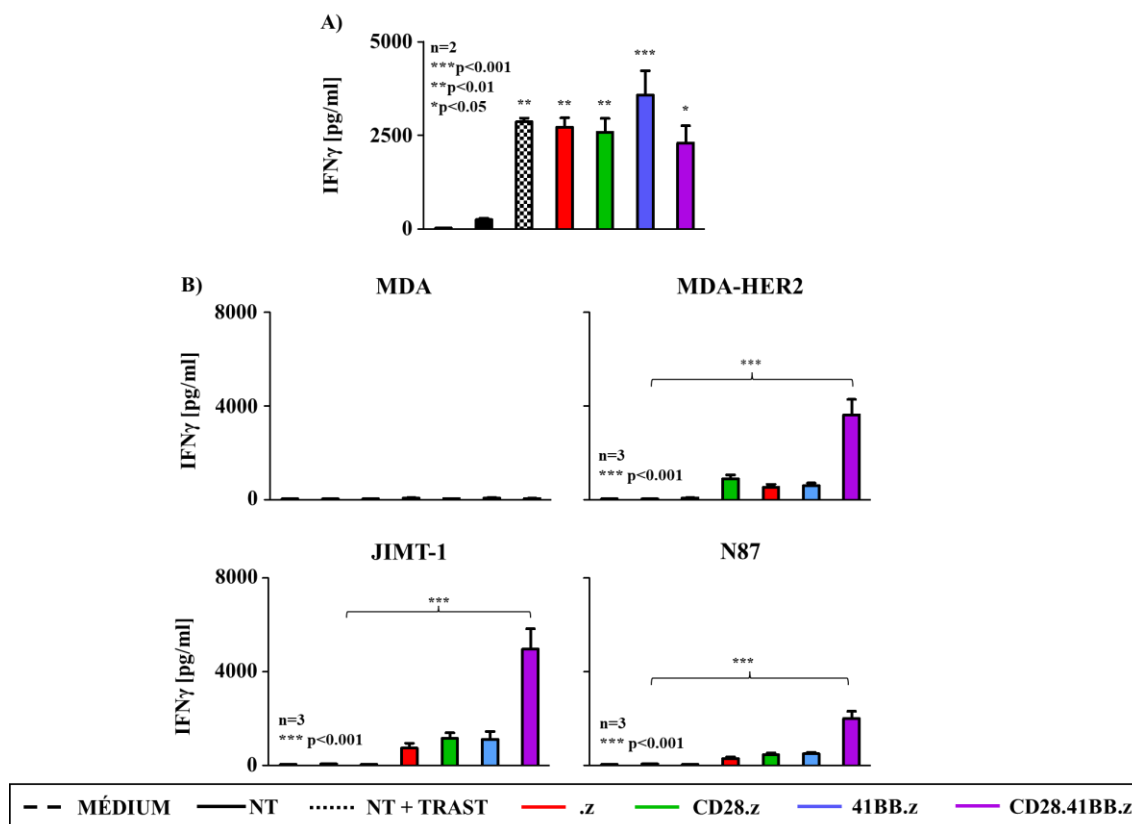


11. ábra: A harmadik generációs HER2.CAR-NK-92 sejtek kiemelkedő proliferációs kapacitást mutatnak rövid és hosszú távon

A HER2.z (piros), HER2.CD28.z (zöld), HER2.41BB.z (kék) és HER2.CD28.41BB.z (lila) CAR-konstrukciókat expresszáló és nem transzdukált (NT (fekete)) NK-92 sejtek proliferációs görbéi. Kiindulásként 1×10^5 HER2-CAR-NK-92, illetve nem transzdukált NK-92 sejtet tenyésztettünk 96-lyukú, U-aljú tenyésztőedényben, 400 IU/ml interleukin-2 jelenlétében, duplikátumokban. A sejtszámokat 3,5 napos időközönként áramlási citometriával határoztuk meg. Az ábrán az egyes időpontokhoz tartozó átlagértékeket ($\pm$ SEM) ábrázoltuk. (független kísérletek száma: $n=3$; belső technikai replikátumok száma: $n=2$; azaz minden adatpontot duplikátumokból nyertünk). HER2.41BB.z vs. NT, HER2.z és HER2.CD28.z, illetve HER2.CD28.41BB.z vs. összes konstrukt a 21. napon: $***p < 0,001$.

6.1.2. 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 (**12. ábra, A panel**), mind HER2-pozitív tumorsejtekkel (MDA-HER2, JIMT-1, N87) alkotott kokultúrákban szignifikáns aktivációs citokinfelszabadulást mutattak (**12. ábra, B panel**). 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 kísérletek során a HER2-CAR-NK-92 sejtek aktivitását nem transzdukált, 10 μ g/ml trastuzumabbal kezelt NK-92 sejtekkel is összehasonlítottuk az antitestfüggő sejt-citotoxicitás (ADCC) *in vitro* modellezése céljából. Az ADCC kontroll kokultúrákban NK-92 sejtek is képesek voltak felismerni az immobilizált rekombináns HER2 molekulákat, ami mérhető IFN γ -szekrécióhoz vezetett (**12. ábra, A panel, NT+TRAST**), ugyanakkor telítő dózisú trastuzumab jelenlétében a nem transzdukált NK-92 sejtek nem mutattak kimutatható IFN γ -termelést egyik HER2-pozitív célsejttel szemben sem (**12. ábra, B panel, NT+TRAST**). HER2 antigénnel nem fedett platefelszínen (**12. ábra, A panel, MÉDIUM**), targetet nem expresszáló kokultúrában (**12. ábra, B panel, MDA**), továbbá CAR expresszió, illetve telítő dózisú trastuzumab hiányában sem immobilizált, sem membránasszociált targeten nem volt mérhető szignifikáns citokin szekréció (**12. ábra, A és B panel, NT**).



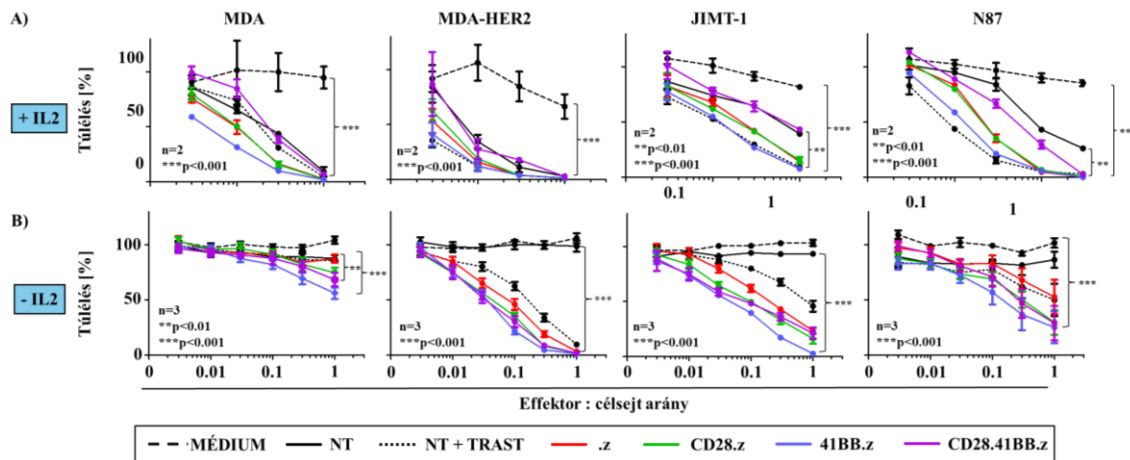
12. ábra: A HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtek sikeresen felismerték az immobilizált HER2 molekulákat, illetve a HER2-t kifejező célsejteket és jelentős IFN γ aktivációs citokin-szekrúciót mutattak

A) 1×10^5 HER2.CAR-NK-92 vagy NT.NK-92 sejtet $\pm 10 \mu\text{g/ml}$ trastuzumabbal inkubáltunk HER2-Fc rekombináns fehérjével bevont sejtenyészőedényben. 24 óra elteltével ELISA-val meghatároztuk az IFN γ -t a kokultúra felülúszójából ($n = 2$, a vizsgálatot duplikátumokban végeztük). A hisztogramok az átlagot $\pm$ SEM-et mutatják; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

B) HER2-pozitív célsejtekkel végzett kokultúrákat hoztunk létre különböző HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtek, illetve telítő dózisu trastuzumab és NK-92 sejtek jelenlétében, 1:1 effektor:célsejt arány alkalmazásával. Kontrollként nem transzdukált NK-92 sejteket, valamint HER2-negatív MDA sejtvonalat használtunk. A 24 órás inkubációt követően a kokultúrák felülúszójából az IFN- γ szintjét ELISA módszerrel határoztuk meg (független kísérletek száma: $n=3$; belső technikai replikátumok száma: $n=2$; azaz minden adatpontot duplikátumokból nyertünk). A hisztogramok az átlagértékeket $\pm$ SEM formájában ábrázolják; *** $p < 0.001$.

Ezt követően a HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtvonalak citotoxikus tulajdonságait vizsgáltuk IL-2 aktivációs citokin jelenlétében (**13. ábra, A panel**), illetve annak hiányában (**13. ábra, B panel**). 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 (**13. ábra, A panel, NT**). 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 (**13. ábra, B panel, NT**). 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 (13. ábra, B panel). Ugyanakkor figyelemre méltó megfigyelés volt, hogy HER2-negatív MDA célsejtek ellen a 4-1BB kostimulációs domént kifejező NK-92 sejtek mérhető citolitikus aktivitást mutattak, ami CAR-független, intrinsic NK-sejt effektor funkció jelenlétére utalhat (13. ábra, B panel, MDA).



13. ábra A HER2-specifikus CAR-NK sejtek képesek voltak felismerni és elpusztítani a HER2 pozitív célsejteket

A) HER2.CAR NK vagy NT NK sejtet 10 µg/ml trastuzumabbal vittünk kokultúrába MDA-HER2, JIMT-1 vagy N87 (HER2⁺) vagy MDA (HER2⁻) célsejtekkel, 1 - 0,3 - 0,1 - 0,03 effektor:célsejt arányban, 400 IU/ml interleukin-2 (IL-2) hozzáadásával, 24 órán keresztül (n=2; a kísérletet duplikátumokban végeztük). A biolumineszcencia intenzitást D-luciferin hozzáadását követően olvastuk le. Kontrollként nem transzdukált NK-92 sejteket, illetve HER2-negatív MDA sejt vonalat használtunk. A szaggatott vonal a sejtenyészítő médiumban inkubált targetsejteket jelzi, ami referenciaként szolgált. A diagramok átlagértéket (± SEM) mutatnak; **p<0,01; ***p<0,001.

B) A biolumineszcencia-alapú citotoxicitási assay-ben HER2.CAR NK-92 vagy NT NK sejteket 10 µg/ml trastuzumab kultiváltunk MDA-HER2, JIMT-1 vagy N87 (HER2⁺) célsejtekkel ellenében, 1 - 0,3 - 0,1 - 0,03 - 0,01 - 0,003:1 effektor:célsejt arányban 24 órán keresztül. A sejtenyészítő oldatba nem tettünk IL-2-t (független kísérletek száma: n=3; belső technikai replikátumok száma: n=2; azaz minden adatpontot duplikátumokból nyertünk). A nem transzdukált (NT) NK-92 sejteket, illetve az MDA (HER2⁻) sejt vonalat szolgált kontrollként. A hisztogramok a mintaátlag ± SEM értékeit mutatják; **p<0,01; ***p<0,001.

6.1.3. 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

Korábbi publikációinkban igazoltuk (144), hogy a trastuzumab-rezisztens daganatok, így a JIMT-1 sejt vonalból származó tumor xenograftok 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 (144).

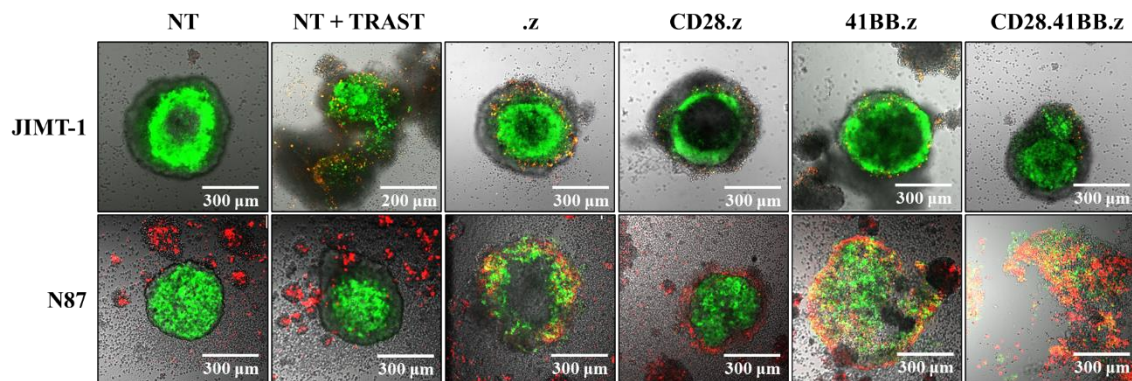
Ezen megfigyelések alapján vizsgáltuk a HER2-specifikus CAR NK-92 sejtek tumorelles hatékonyságát háromdimenziós tumorszferoid modellekben, trastuzumab-rezisztens (CD44-pozitív JIMT-1), illetve trastuzumab-érzékeny (CD44-negatív N87) sejtvonalak alkalmazásával **(14. ábra)**.

A kísérletek során JIMT-1 és N87 szferoidokat 24 órán keresztül tenyésztettünk együtt a különböző HER2-CAR NK-92 sejtekkel, valamint telítő dózisú trastuzumab jelenlétében nem transzdukált NK-92 sejtekkel. Kontrollként trastuzumabbal nem szupplementált NT NK-92 sejteket alkalmaztunk. A tumorsejtpusztulás mértékét propidium-jodid (PI) felvétel alapján határoztuk meg, a citotoxikus hatás térbeli eloszlását pedig konfokális mikroszkópos képalkotással vizsgáltuk a módszerekben leírtaknak megfelelően.

Eredményeink azt mutatták, hogy a CD44-pozitív, trastuzumab-rezisztens JIMT-1 szferoidok nagyrészt rezisztensek maradtak a HER2-CAR NK-92 sejt kezelésével 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 kezletlen kontroll NT NK-sejtekkel kezelt N87 szferoidok elhanyagolható tumorelles hatékonyságát mutattak. Ezek az eredmények aláhúzzák a 4-1BB kostimulációs domént tartalmazó CAR-konstrukciók fokozott hatékonyságát a szenzibilis daganatmodellben, ugyanakkor rámutatnak arra is, hogy a CD44-ben gazdag ECM

jelentős akadályt képez a CAR-NK sejtek háromdimenziós tumorpenetrációjával és citotoxikus aktivitásával szemben.



14. ábra: A 4-1BB kostimulációs domént tartalmazó HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtek szelektíven eliminálják a CD44-negatív N87 háromdimenziós tumorszferoidokat, míg a CD44-pozitív JIMT-1 szferoidok rezisztensek maradnak

Illusztratív konfokális mikroszkópos felvételek a HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtek, valamint a trastuzumab-közvetített nem transzdukált (NT) NK-92 sejtek citotoxikus aktivitásáról HER2⁺/CD44⁺, trastuzumab-rezisztens JIMT-1 szferoidokkal (bal oldali oszlop), illetve HER2⁺/CD44⁻, trastuzumab-érzékeny N87 szferoidokkal szemben (jobb oldali oszlop). A tumorsejtek zöld fluoreszcenciával jelöltek (GFP-expresszió), míg az elhalt sejtek propidium-jodid (PI) felvétele révén piros színnel jelennek meg. A képeken feltüntetett skálák 200 μm vagy 300 μm felelnek meg.

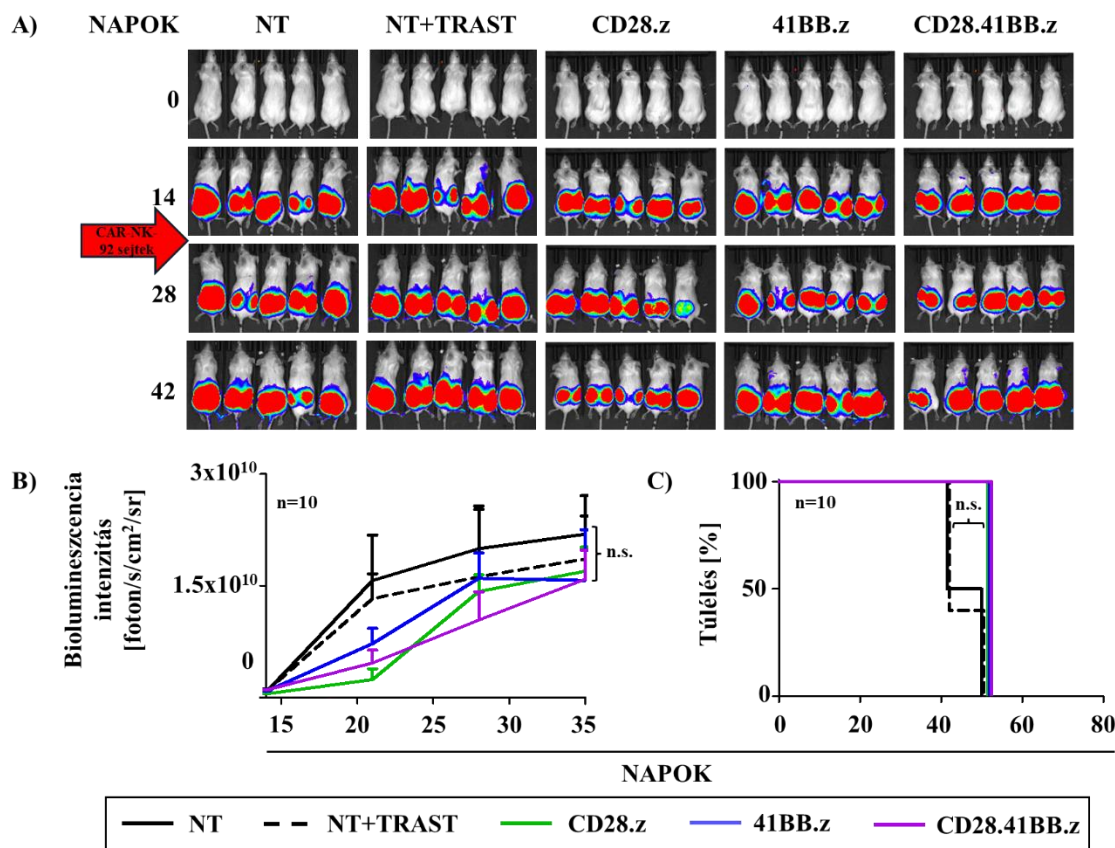
6.1.4. A HER2-CAR NK sejtek nem képesek a CD44⁺, trastuzumab-rezisztens JIMT-1 xenograftok *in vivo* eliminálására

Annak vizsgálatára, hogy a különböző penetrációs kapacitások miként befolyásolják a daganatok *in vivo* eliminációjának hatékonyságát, HER2-pozitív, CD44-pozitív, trastuzumab-rezisztens JIMT-1.flLuc 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 sejtkeléseket a daganatsejtek inokulálását követő 14. naptól kezdtük meg, és kéthetes időközönként ismételtük. Az antitestfüggő sejtes 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 sejtkelések, sem a trastuzumab és NK-92 sejtek kombinált alkalmazása nem eredményezett kimutatható tumorregressziót (**15. ábra, A és B panel**), illetve nem járt az általános túlélés szignifikáns javulásával a trastuzumab-rezisztens JIMT-1.flLuc xenograft modellben (**15. ábra, C panel**).



15. ábra: A HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtek nem indukálnak tumorregressziót a CD44-pozitív, trastuzumab-rezisztens JIMT-1 xenograft modellben *in vivo*

NSG egerekbe 3×10^6 JIMT-1.flLuc sejtet injektáltunk szubkután. A tumorinokulációt követő 14. napon (piros nyíl) az állatok egyszeri intravénás kezelést kaptak 5×10^6 nem transzdukált NK-92 sejtrel (NT; n = 10, fekete vonal), trastuzumabbal kezelt NT NK-92 sejtekkel (NT+TRAST; n = 10, szaggatott fekete vonal), vagy HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtekkel (CD28.z, n = 10, zöld; 41BB.z, n = 10, kék; CD28.41BB.z, n = 10, lila). A daganatnövekedést longitudinálisan biolumineszcens képalkotással követtük nyomon.

A) Reprezentatív biolumineszcens felvételek JIMT-1.flLuc xenograftot hordozó állatokról.

B) A JIMT-1.flLuc xenograftok kvantitatív biolumineszcens adatai (átlagos teljes sugárzás, foton/s/cm²/sr). **C)** Kaplan–Meier túlélési görbék. Az adatok az átlag $\pm$ SD értékeket ábrázolják.

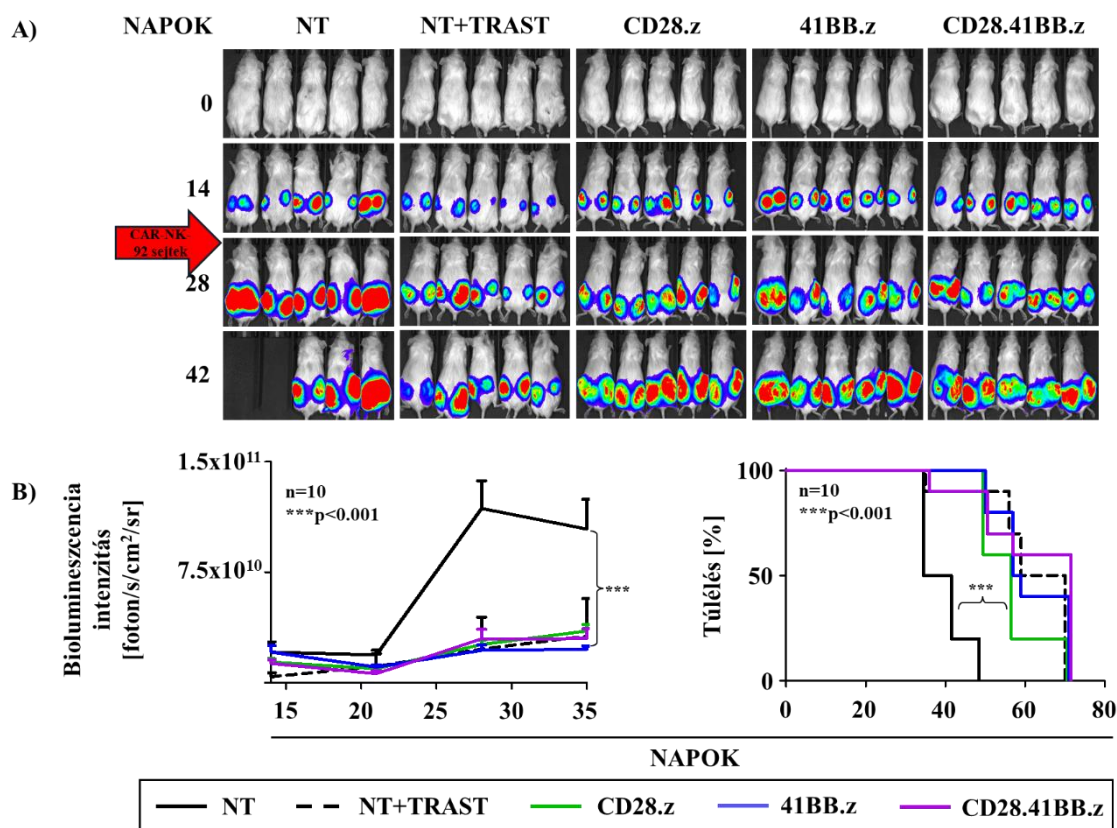
6.1.5. A HER2-CAR NK-sejtek jelentős *in vivo* tumorelles hatást fejtenek ki a CD44⁻, trastuzumab-érzékeny N87 xenograftokkal szemben

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.flLuc 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 (**16. ábra, A és B panel**; NT vs. összes kezelés: *** $p < 0,001$). Ugyanakkor a CAR NK-92 sejtek és a trastuzumab-irányított NK-sejtek tumornövekedést gátló hatékonysága között nem mutatkozott szignifikáns különbség (**16. ábra, B panel**; NT+TRAST vs. összes HER2-CAR-NK: n.s.), ami arra utal, hogy ebben a trastuzumab-érzékeny modellrendszerben az antitestközvetített és a CAR-alapú megközelítések összevethető tumorelles aktivitást fejtettek ki.

Mindkét kezelési stratégia szignifikánsan meghosszabbította az állatok túlélését a kezeletlen kontrollcsoporthoz képest (**16. ábra, C panel**; NT vs. összes kezelés: *** $p < 0,001$), 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.



16. ábra: A HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtek jelentős *in vivo* tumorelles hatást fejtenek ki a CD44-negatív, trastuzumab-érzékeny N87 xenograft modellben

NSG egerekbe 3×10^6 N87.ffLuc sejtet injektáltunk szubkután. A tumorinokulációt követő 14. napon (piros nyíl) az állatok egyszeri intravénás kezelést kaptak 5×10^6 nem transzdukált NK-92 sejtrel (NT; $n = 10$, fekete vonal), trastuzumabbal kezelt NT NK-92 sejtekkel (NT+TRAST; $n = 10$, szaggatott fekete vonal), vagy HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtekkel (CD28.z, $n = 10$, zöld; 41BB.z, $n = 10$, kék; CD28.41BB.z, $n = 10$, lila). A daganatnövekedést longitudinálisan biolumineszcens képalkotással követtük nyomon.

A) Reprezentatív biolumineszcens felvételek N87.ffLuc xenograftot hordozó állatokról.

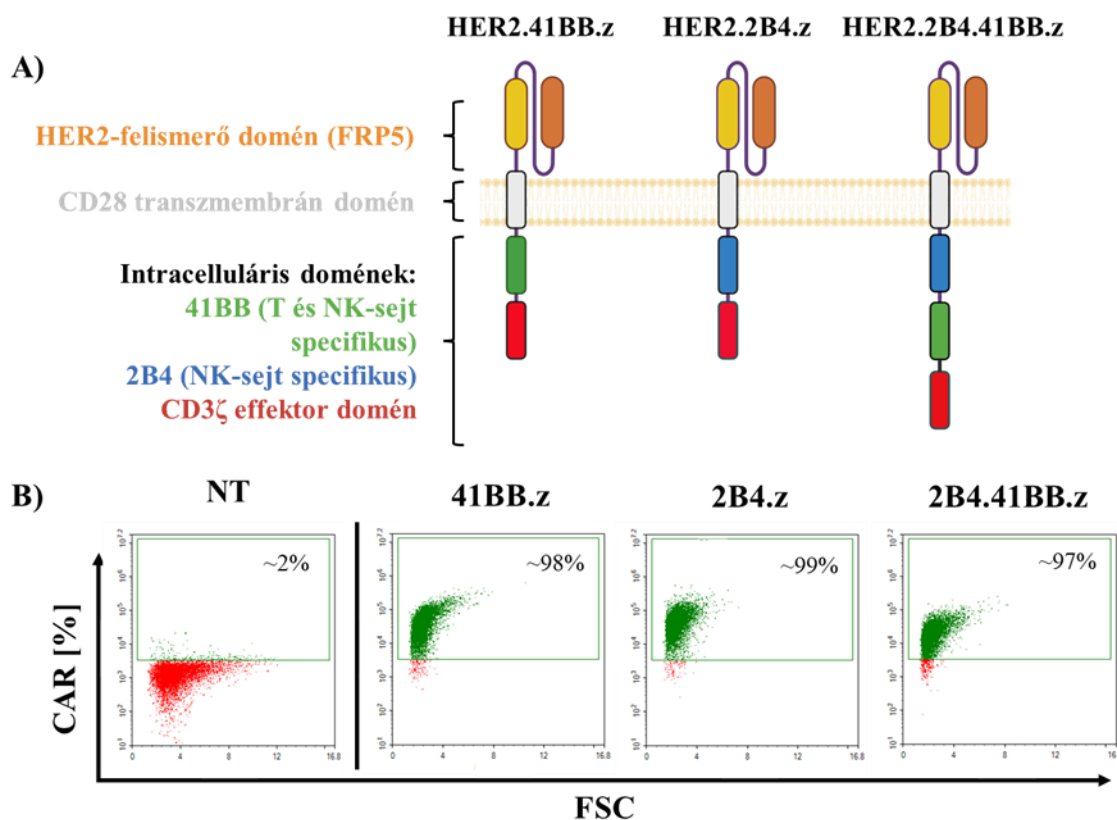
B) A N87.ffLuc xenograftok kvantitatív biolumineszcens adatai (átlagos teljes sugárzás, foton/s/cm²/sr). C) Kaplan–Meier túlélési görbék. Az adatok az átlag $\pm$ SD értékeket ábrázolják.

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

6.2.1. A 2B4 és 4-1BB jelátviteli doméneket tartalmazó HER2-specifikus CAR-NK-92 sejt vonalak előállítása retrovirális transzdukcióval

A genetikailag módosított természetes ölüsejtek citotoxikus hatékonyságának fokozása érdekében a korábban részletezett retrovirális transzdukciós technológia alkalmazásával különböző, HER2-specifikus, az NK-sejteket specifikusabban aktiváló 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 (**17. ábra, A panel**). A választott jelátviteli domének funkcionális relevanciáját korábbi vizsgálatok támasztják alá: a 2B4 receptor az NK-sejtek aktivációját a SAP/EAT-2 jelátviteli útvonalon keresztül fokozza, elősegíti a citotoxikus granulumok felszabadulását, hozzájárul az IFN γ -termeléshez, valamint szerepet játszik az NK-sejtek túlélésének fenntartásában (145). Ezzel szemben a 4-1BB (CD137) kostimulációs domén elsősorban az NK-sejtek perzisztenciáját és metabolikus aktivitását fokozza, ezáltal támogatva a tartós effektor funkciók kialakulását (146). A transzdukciót követően a módszerekben, illetve a korábban leírtak szerint fluoreszcencia-aktivált sejtválogatás segítségével közel homogén, csaknem 100%-ban CAR-pozitív HER2-CAR NK-92 sejtpopulációkat állítottunk elő (**17. ábra, B panel**).



17. ábra: NK-sejt-specifikus jelátviteli doméneket tartalmazó HER2-specifikus CAR-konstrukciók felépítése és expressziója NK-92 sejtekben

A) Az NK-sejt-specifikus intracelluláris szignáldoméneket (2B4, 4-1BB, illetve ezek kombinációja) tartalmazó HER2-specifikus CAR-molekulák sematikus ábrázolása.

B) A HER2-CAR-NK-92 sejtek sejtfelszíni CAR-expressziója fluoreszcencia-aktivált sejtválogatást (FACS) követően. A dot plotok a transzdukciót követően kialakított, homogén CAR-pozitív sejtpopulációkat szemléltetik.

6.2.2. 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 **(18. ábra, A panel)**, míg citotoxikus kapacitásukat rövidtávú, biolumineszcencia-alapú ölési assay segítségével határoztuk meg, különböző effektor:célsejt (E:T) arányok alkalmazása mellett **(18. ábra, B panel)**. Ez a kísérleti felépítés lehetővé tette a CAR-mediált felismerés és az NK-sejtek effektor válaszában kvantitatív összehasonlítását az eltérő intracelluláris jelátviteli konfigurációk esetében.

24 órás inkubációt követően a HER2-CAR NK-92 sejtek valamennyi vizsgált HER2-pozitív célsejtvonal (MDA-HER2, JIMT-1 és N87) ellen jelentős mértékű aktivációs citokinfelszabadulást mutattak, ami a CAR-mediált antigénfelismerés hatékonyságát tükrözi. 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 **(18. ábra, A panel)**. 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.

Ezzel szemben sem a nem génmódosított NK-92 sejtekkel, sem a HER2-negatív célsejtekkel (MDA) végzett kokultúrák esetében nem volt kimutatható IFN γ -termelés, ami megerősíti, hogy a megfigyelt citokinfelszabadulás HER2-specifikus, CAR-mediált aktiváció következménye, és nem az NK-92 sejtek CAR-független alapaktivitásából ered **(18. ábra, A panel, MDA és NT)**.

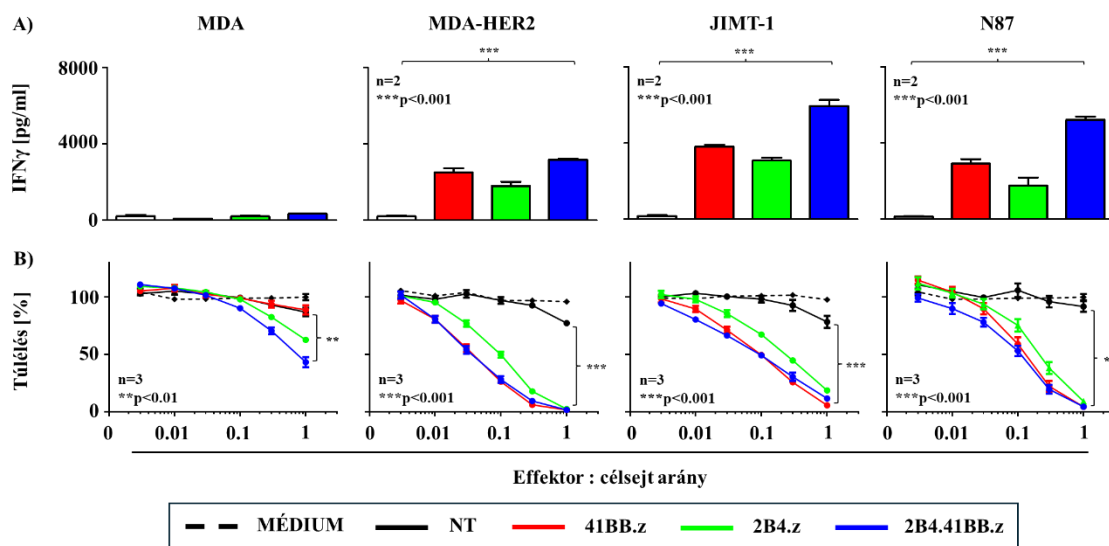
A HER2-CAR NK-92 sejtek tumorölő potenciálját a korábban már leírt biolumineszcencia-alapú citotoxicitási kokultúra rendszerben vizsgáltuk, 24 órás inkubációs idő alkalmazásával **(18. ábra, B panel)**. A kísérletek során különböző effektor:célsejt (E:T) arányokat használtunk annak érdekében, hogy feltárjuk a CAR-mediált citotoxikus válasz dózisfüggő jellegét és az egyes konstrukciók közötti funkcionális különbségeket.

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 **(18. ábra, B panel)**. 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 (**18. ábra, B panel, 41BB.z és 2B4.41BB.z**).

Ezen túlmenően HER2-negatív MDA célsejtek ellen is észleltünk tumorsejt-lízist magasabb E:T arányok alkalmazása esetén (**18. ábra, B panel, MDA**). Ez a hatás feltehetően az NK-92 sejtek természetes, CAR-független citotoxikus aktivitásának tulajdonítható, és összhangban áll az NK-sejtek veleszületett tumorelles funkcióival.



18. ábra: A HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtek HER2-pozitív célsejtekkel történő interakció során fokozott IFN γ -termelést és specifikus citotoxikus aktivitást mutatnak.

A) A HER2.41BB.z (piros), HER2.2B4.z (zöld) és 2B4.41BB.z (kék) CAR-NK-92 sejteket MDA-HER2, N87 és JIMT-1 tumor sejtekkel inkubáltuk 1:1 effektor:célsejt arány mellett. A 24 órás kokultúrát követően a felülúszók IFN γ -koncentrációját ELISA módszerrel határoztuk meg. Kontrollként nem transzdukált (NT; fekete) NK-92 sejteket, valamint HER2-negatív MDA sejtvonalat alkalmaztunk. A szaggatott vonal a sejtenyésző médiumban inkubált targetsejteket jelzi, ami referenciaként szolgált. A diagramokon a minták átlagértéke ($\pm$ SEM) van feltüntetve (független kísérletek száma: $n=2$; belső technikai replikátumok száma: $n=2$; azaz minden adatpontot duplikátumokból nyertünk). A statisztikai elemzés során párosítatlan t-tesztet alkalmaztunk (* $p<0,05$; *** $p<0,001$).

B) A HER2-CAR-NK-92 sejtek *in vitro* citotoxikus aktivitását luciferáz-expresszáló tumorsejtek lumineszcens jelének csökkenése alapján határoztuk meg. A HER2-pozitív MDA-HER2.flLuc, N87.flLuc és JIMT-1.flLuc sejtvonalakat 1:1 effektor:célsejt arányban inkubáltuk eltérő intracelluláris jelátviteli doménekkel rendelkező HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtekkel 24 órán keresztül. A luciferáz aktivitást D-luciferin szubsztát hozzáadását követően luminométerrel mértük. Negatív kontrollként HER2-negatív MDA.flLuc sejtvonalat és nem transzdukált (NT) NK-92 sejteket alkalmaztunk. Az oszlopdiagramokon a minták átlagértéke ($\pm$ SEM) van feltüntetve (független kísérletek száma: $n=3$; belső technikai replikátumok száma: $n=2$; azaz minden

adatpontot duplikátumokból nyertünk). A statisztikai elemzés során párosítatlan t tesztet alkalmaztunk (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

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

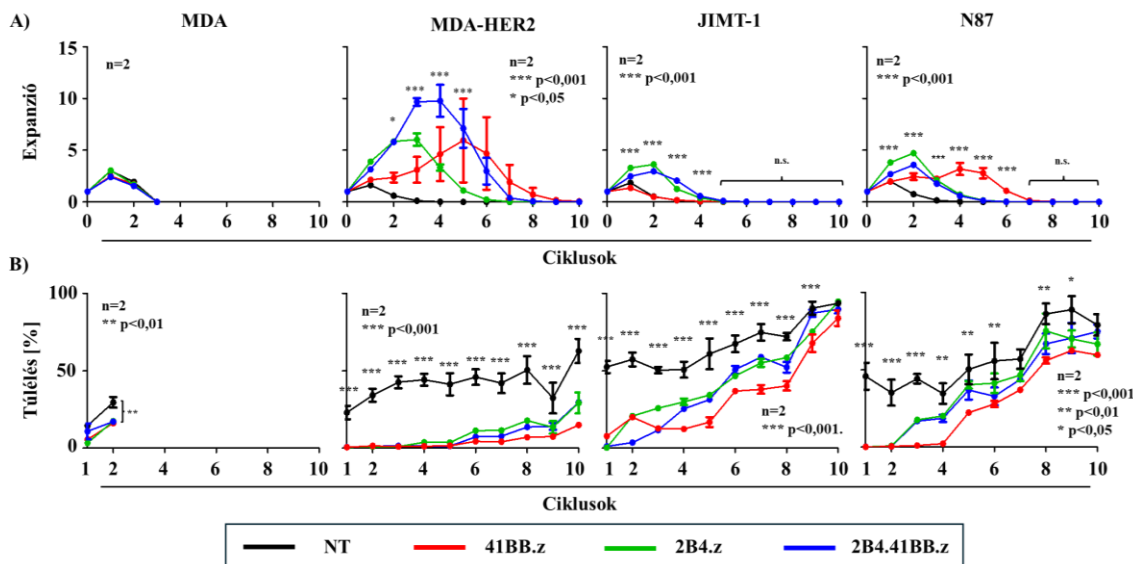
A különböző HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtek expanziós képességét ún. ismételt stimulációs, vagy másnéven „rechallenge” assay alkalmazásával vizsgáltuk, amely lehetővé tette az ismételt antigén-expozícióra adott proliferációs válasz értékelését. A kísérlet során a HER2-CAR-NK-92 sejteket HER2-pozitív célsejtekkel 3,5 napon keresztül inkubáltuk, majd az effektor sejtek számát áramlási citometriával határoztuk meg a módszerekben leírtaknak megfelelően. Ezt követően az adott ciklus végén mért sejtszámmal arányosan, a kiindulási sejtszámmal megegyező mennyiségű HER2-CAR NK-92 sejtet vittünk át a HER2-pozitív célsejtekkel frissen bevont tenyésztőedénybe, újabb stimulációs ciklus megkezdése céljából.

A proliferációs rátát minden ciklus végén az aktuálisan mért sejtszám és a kiindulási sejtszám hányadosaként számoltuk ki (**19. ábra, A panel**).

A proliferációs ráta meghatározásával párhuzamosan a korábban ismertetett biolumineszcenciás módszerrel értékeltük a sejtek citotoxikus potenciálját is (**19. ábra, B panel**).

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 (**19. ábra, A panel, 2B4.41BB.z**).

Ugyanakkor ez a fokozott proliferációs kapacitás nem járt együtt szignifikánsan erősebb citotoxikus aktivitással a HER2-pozitív célsejtekkel szemben (**19. ábra, B panel**). 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 (**19. ábra, B panel**), ami az effektor sejtpopuláció funkcionális kimerülésére utal.



19. ábra: A 2B4.41BB.z CAR-konstrukciót expresszáló NK-92 sejtek mutatták a legkifejezettebb proliferációs választ, ez azonban nem társult számottevő citotoxikus aktivitásnövekedéssel

„Rechallenge” kísérletben hasonlítottuk össze a különböző generációs és kostimulátor doménnel rendelkező HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtek proliferációs képességét, illetve citolitikus aktivitását. A HER2.41BB.z (piros), HER2.2B4.z (zöld), 2B4.41BB.z (kék) CAR-NK-92 sejteket HER2-pozitív célsejtekkel (MDA-HER2.flLuc, JIMT-1.flLuc, N87.flLuc) koinkubáltuk 96 lyukú lapos aljú tenyésztőedényben. A kísérlet minden 3,5. napján áramlási citometriával meghatároztuk az effektor-sejtszámot. Minden ciklus kezdetén, amennyiben rendelkezésre állt, a kiindulási sejtszámmal azonos mennyiségű sejtet a kiindulási körülményekkel azonos módon újra kokultúrába vittünk. Az expanziós rátát az adott mérési nap sejtszámát a kiindulási sejtszámmal elosztva számítottuk ki. Kontrollként nem transzdukált (NT - fekete) NK-92 sejteket, illetve HER2-negatív MDA.flLuc sejt vonalat alkalmaztunk.

A) A HER2-CAR-NK-92 sejtek *in vitro* proliferációs képességét ábrázoló diagrammok a különböző célsejtek ellenében. A diagramokon az átlag ($\pm$ SEM) van feltüntetve. A statisztikai összehasonlításokat párosítatlan t teszttel végeztük ((független kísérletek száma: $n=2$; belső technikai replikátumok száma: $n=2$; azaz minden adatpontot duplikátumokból nyertünk), * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

B) A különböző HER2-CAR-NK-92 sejtek proliferációs képességeivel párhuzamosan vizsgáltuk a citolitikus tulajdonságaikat a HER2^{+/−} célsejtekkel koinkubálva. A diagramokon az minta átlag ($\pm$ SEM) van feltüntetve. A statisztikai összehasonlításokat párosítatlan t teszttel végeztük ((független kísérletek száma: $n=2$; belső technikai replikátumok száma: $n=2$; azaz minden adatpontot duplikátumokból nyertünk), * $p<0,05$; ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

6.2.4. 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. Ez a megfigyelés arra utalt, hogy ezen sejtek effektor funkciói ismételt antigénexpozíció mellett is fennmaradnak, függetlenül a célsejtek CD44-expressziós státuszától. Ugyanakkor a proliferáció önmagában nem

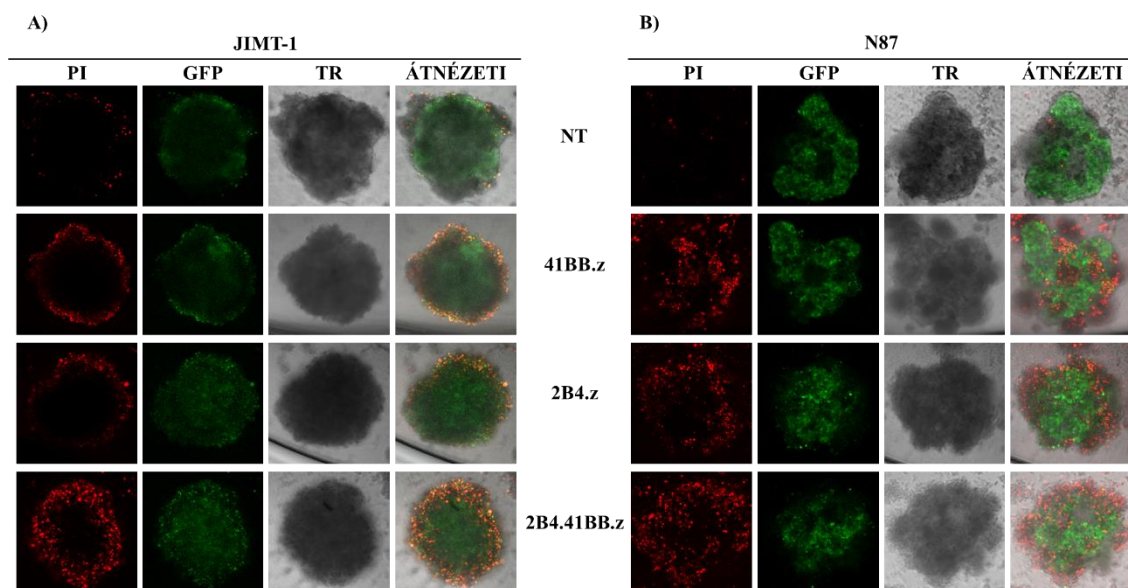
feltétlenül tükrözi a daganatellenes hatékonyságot komplex, háromdimenziós tumorszerkezetekben, ahol az extracelluláris mátrix fizikai és funkcionális gátat képezhet az effektor sejtek számára. Ennek megfelelően indokoltá vált annak vizsgálata, hogy a 2B4.41BB.z CAR NK-92 sejtek fokozott expanziós képessége 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. A különböző HER2-specifikus CAR NK-92 sejtek tumorszferoidokhoz való hozzáférését és effektor funkcióit 24 órás kokultúrákban vizsgáltuk, HER2.41BB.z, HER2.2B4.z és HER2.2B4.41BB.z konstrukciókkal módosított NK-92 sejtek alkalmazásával a korábban már leírtak szerint. A tumorsejtpusztulás térbeli eloszlását és mértékét propidium-jodid (PI) beépülés alapján, konfokális mikroszkópos képalkotással követtük nyomon **(20. ábra)**, amely lehetővé tette a szferoidok felszíni és belső régióinak elkülönített elemzését.

Eredményeink azt mutatták, hogy a magas CD44 expresszióval és trastuzumab-rezisztenciájával jellemzett JIMT-1 tumorszferoidok esetében a 2B4.4-1BB.z CAR NK-92 sejtek hatékonyan áthatoltak a szferoid kompakt szerkezetén, és elérték annak belső rétegeit is **(20. ábra A panel, JIMT-1, 2B4.41BB.z)**. 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 **(20. ábra, A panel, JIMT-1, NT)**, 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 periferiájára lokalizálódó PI-pozitivitást figyeltünk meg **(20. ábra, A panel, JIMT-1, 2B4.z és 41BB.z)**. 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 expresszálják 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 (**20. ábra, B panel, N87**). 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.



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

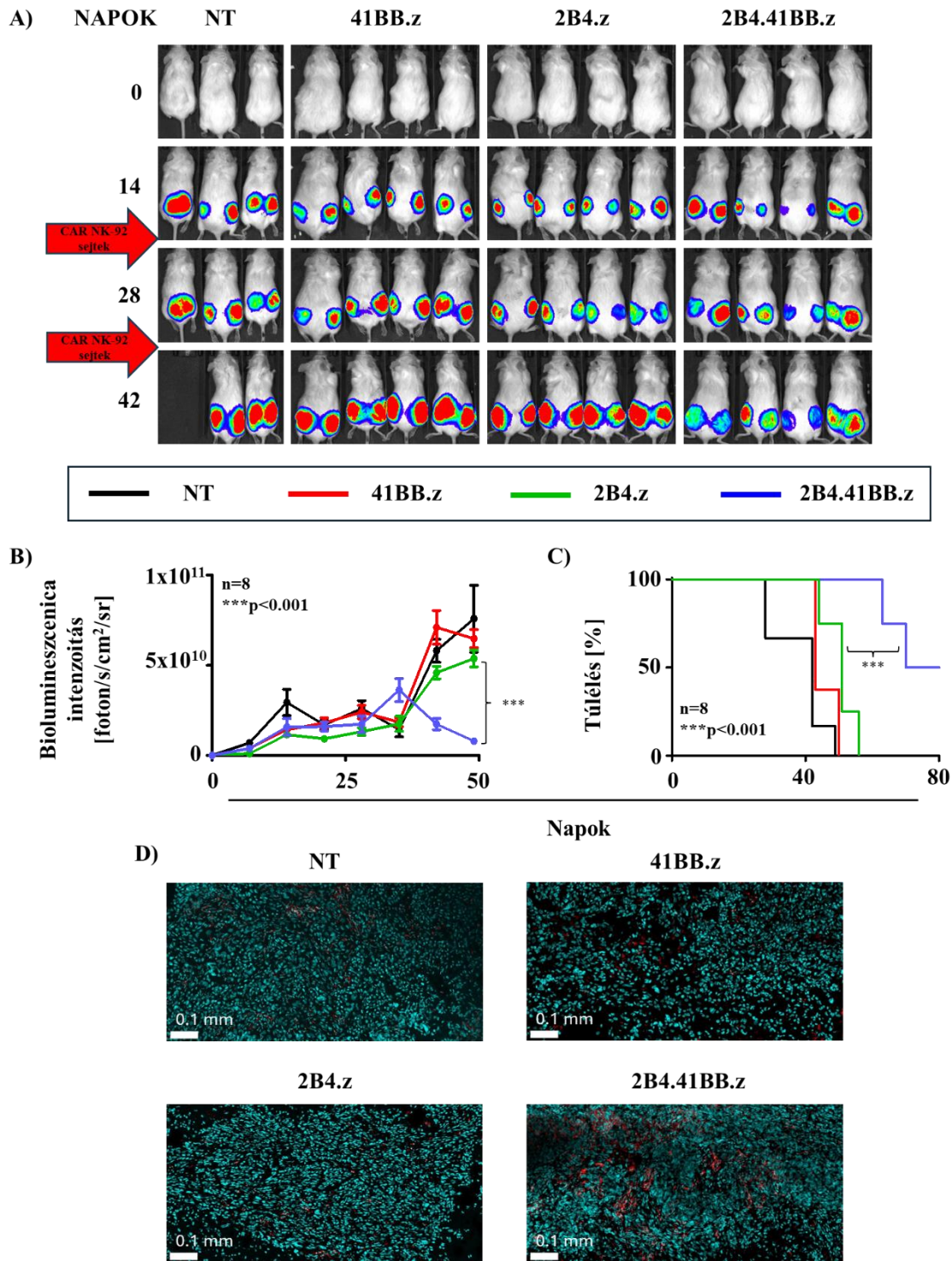
Reprezentatív képek a HER2-CAR NK-92 sejtek HER2⁺/CD44⁺, trastuzumab-rezisztens JIMT-1 szferoidokkal (A) és HER2⁺/CD44⁻, trastuzumab-érzékeny N87 szferoidokkal szembeni citolitikus aktivitásának bemutatására (B). A célsejtek zöld színűek (GFP-t expresszáló), az elhalt sejteket a PI felvétele (piros) teszi láthatóvá. A képen látható az aktuális skála, amelynek mérete 200 μ m.

6.2.5. A 2B4.41BB.z jelátviteli domént tartalmazó HER2-CAR-NK-92 sejtek fokozott *in vivo* tumorellenes 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 tumorellenes hatékonyságát HER2⁺/CD44⁺ JIMT-1, valamint HER2⁺/CD44⁻ N87 xenograft alapú *in vivo* rendszerekben. Az NSG egerekben – a módszertani részben ismertetett eljárás szerint – 3×10^6 JIMT-1.ffLuc vagy N87.ffLuc tumorsejt szubkután

beadásával hoztuk létre a daganatokat. Az állatok mindkét hátsó végtagjának dorzális felszínén párhuzamosan két tumorültetést alakítottunk ki.

A kezeléseket a tumorbeoltást követő 14. napon indítottuk, és az állatok kéthetente 5×10^6 HER2-CAR-NK-92 sejt intravénás injekciójában részesültek. Kontrollcsoportként 5×10^6 nem transzdukált (NT) NK-92 sejtet alkalmaztunk.



21. ábra: A 2B4.41BB.z kostimulációs szignáldomént tartalmazó CAR-NK-92 sejtek alkalmazása hosszú távon gátolta a CD44⁺ JIMT-1 xenograftok progresszióját

A) A JIMT-1.ffLuc xenograftokról készült reprezentatív biolumineszcens felvételek.

B) A JIMT-1.ffLuc xenograftok biolumineszcens felvételeinek kvantitatív elemzése. Az ábrán az átlag ($\pm$ SEM) van feltüntetve (átlagos totál radiancia = foton/s/cm²/sr; NT vs. 41BB.z/2B4.z/2B4.41BB.z.CAR-NK-92 sejtek; ***p<0,001; n = 8).

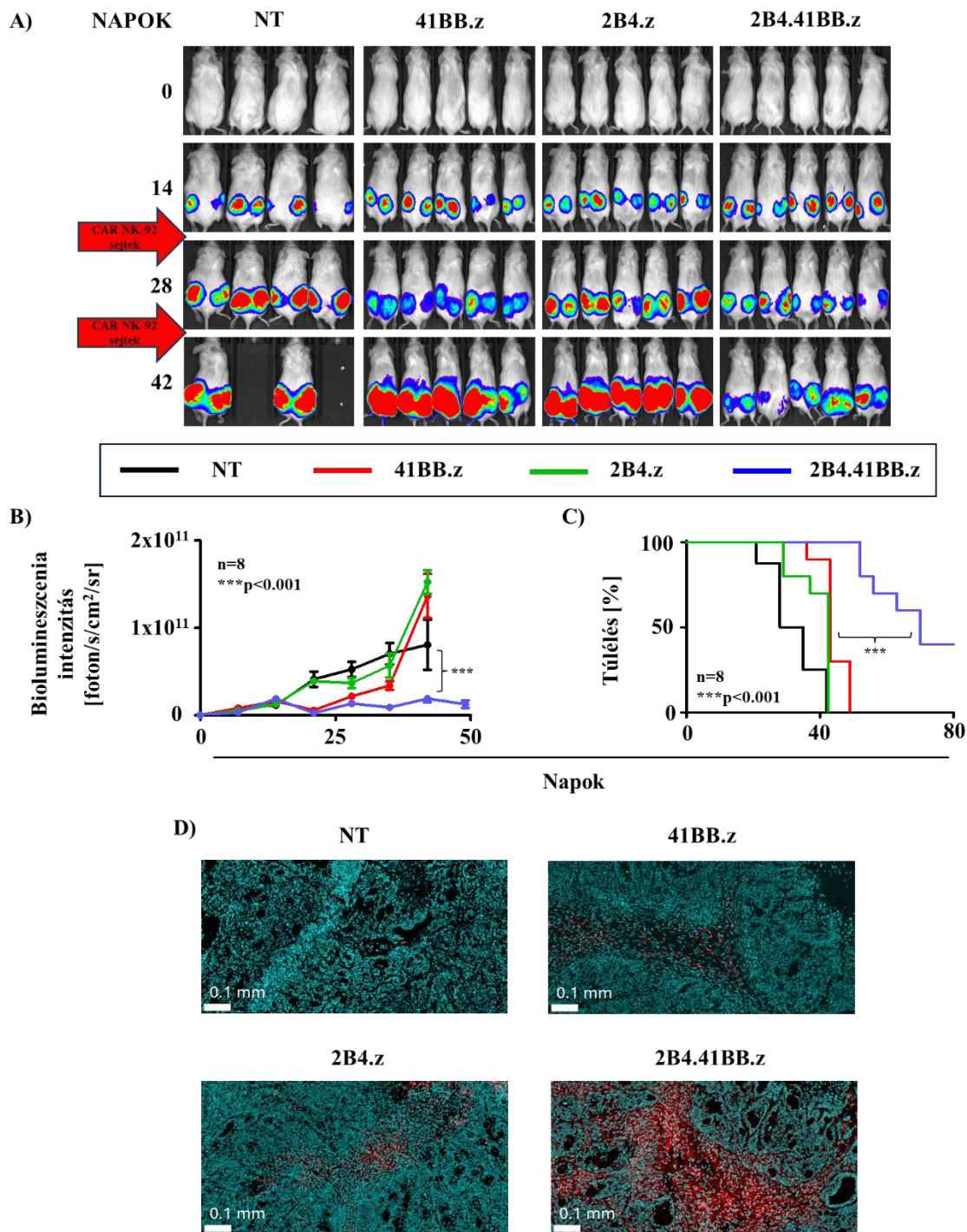
C) Kaplan-Meier módszerrel értékeltük az egyedek túlélését. (NT vs. 41BB.z/2B4.z/2B4.41BB.z.CAR-NK-92 sejtek, *** $p < 0,001$; $n = 8$).

D) A tumormetszeteket fluoreszcens festéssel jelöltük a természetes ölüsejtek (NK-sejtek, CD56; piros) a sejtmag (DAPI; kék) kimutatására. A JIMT-1 xenograftok nem transzdukált NK-92 sejtekkel (NT), illetve HER2.CAR-NK-92 sejtekkel kezelt reprezentatív képei láthatók.

A JIMT-1.ffLuc, illetve N87.ffLuc daganatok növekedésének alakulását hetente egyszer követtük nyomon *in vivo* biolumineszcens képalkotással, D-luciferin intraperitoneális beadását követően, IVIS Spectrum CT készülék alkalmazásával (**21. és 22. ábra, A és B panel**). A biolumineszcens jel intenzitását foton/másodperc/négyzetcentiméter/szteradián ($\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$) egységekben határoztuk meg.

Az *in vivo* vizsgálatok során a 2B4.41BB.z kostimulációs szignáldomént tartalmazó CAR-NK-92 sejtek mind az ADCC-rezisztens JIMT-1 (**21. ábra**), mind az ADCC-szenzitív N87 xenograft modellekben (**22. ábra**) kifejezett tumorelles aktivitást mutattak. A kezelés mindkét daganatmodell esetében jelentős tumorregressziót eredményezett (**21. és 22. ábra, A és B panel**), és szignifikánsan meghosszabbította az állatok túlélését a kizárólag 2B4.z vagy 4-1BB.z jelátviteli domént tartalmazó CAR-NK-92 sejtekkel kezelt csoportokhoz viszonyítva (**21. és 22. ábra, C panel**).

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



22. ábra: A 2B4.41BB.z kostimulációs szignáldomént tartalmazó CAR-NK-92 sejtek alkalmazása hosszú távon gátolta a CD44⁺ xenograftok progresszióját

A) Az N87.flLuc xenograftokról készült reprezentatív biolumineszcens felvételek.

B) Az N87.flLuc xenograftok biolumineszcens felvételeinek kvantitatív elemzése. Az ábrán az átlag ($\pm$ SEM) van feltüntetve (átlagos totál radiancia = foton/s/cm²/sr; NT vs. 41BB.z/2B4.z/2B4.41BB.z.CAR-NK-92 sejtek; ***p<0,001; n = 8).

C) Kaplan-Meier módszerrel értékeltük az egyedek túlélését. (NT vs. 41BB.z/2B4.z/2B4.41BB.z.CAR-NK-92 sejtek, ***p<0,001; n = 8).

D) A tumormetszeteket fluoreszcens festéssel jelöltük a természetes ölősejtek (NK-sejtek, CD56; piros) és a sejtmag (DAPI; kék) kimutatására. A N87 xenograftok nem transzdukált NK-92 sejtekkel (NT), illetve HER2.CAR-NK-92 sejtekkel kezelt reprezentatív képei láthatók.

Az *in vivo* kísérletek lezárását követően az egerekből kipreparált xenograftokból körülbelül 7 μ m vastagságú metszeteket készítettünk immunhisztokémiai (IHC) analízis céljából. A minták feldolgozását követően a metszeteket anti-humán CD16 ellenanyaggal, valamint DAPI-val festettük, amely lehetővé tette a HER2-specifikus CAR-NK-92 sejtek intratumorális jelenlétének és térbeli eloszlásának pontos meghatározását a tumorszöveten belül.

A kipreparált daganatok hisztológiai elemzése megerősítette, hogy a 2B4.41BB.z CAR NK-92 sejtek *in vivo* körülmények között mélyen infiltrálták a tumorparenchymát (**21. és 22. ábra, D panelek**). A trastuzumab-rezisztens JIMT-1 xenograftok esetében kizárólag a 2B4.4-1BB.z konstrukciót expresszáló NK-92 sejtek voltak kimutathatók a tumor teljes térfogatában (**21. ábra, D panel, 2B4.41BB.z, piros jelölés**), 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 (**22. ábra, D panel, 2B4.41BB.z, piros jelölés**).

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.

7. Megbeszélés

Az adoptív sejtherápiás stratégiák klinikai bevezetése alapvető szemléletváltást hozott a daganatellenes kezelések területén. Míg a hagyományos citotoxikus terápiák közvetlenül a gyorsan osztódó sejtek eliminációjára irányulnak, addig az immunterápiás megközelítések a szervezet saját immunrendszerének reaktiválására, funkcionális átprogramozására és célzott megerősítésére épülnek. E stratégia egyik legfontosabb előnye, hogy megfelelő indikáció esetén nagyobb specificitást, tartósabb immunológiai kontrollt és potenciálisan kedvezőbb toxicitási profilt biztosíthat (147).

E koncepcionális keretbe illeszkedik a kiméra antigénreceptorral módosított sejtes immunterápia, amely nem csupán a gátló jelátviteli utak feloldására törekszik, hanem mesterséges antigénfelismerő képességgel ruházza fel az effektor sejteket (148). A CAR egy moduláris, rekombináns sejtfelszíni receptor, amely extracelluláris antigénkötő doménből, transzmembrán régióból és intracelluláris jelátviteli egységből áll. Ez a felépítés lehetővé teszi az MHC-független antigénfelismerést, valamint az azonnali effektor aktivációt a célantigénnel való kötődést követően (149). Az intracelluláris domének összetétele meghatározza a sejtek proliferációs dinamikáját, citokintermelését, metabolikus programját és hosszú távú perzisztenciáját, ami különösen nagy jelentőséggel bír a szolid tumorok komplex és gyakran immunszuppresszív mikrokörnyezetében (150).

A CAR-T sejtek klinikai alkalmazása forradalmi áttörést eredményezett a B-sejtes hematológiai malignitások kezelésében. CD19- és BCMA-specifikus konstrukciók alkalmazása relapszáló vagy refrakter B-ALL-ben, diffúz nagy B-sejtes limfómában és mielóma multiplexben magas teljes remissziós arányt és tartós túlélési előnyt biztosított, egyértelműen igazolva, hogy a genetikailag módosított effektor sejtek képesek hosszú távú immunológiai kontroll fenntartására (46).

Ezzel szemben a hematológiai daganatokban tapasztalt sikerek nem jelentek meg a szolid tumorok esetében. Itt, a terápiás hatékonyságot több, egymással összefüggő tényező korlátozza. Ezek a célantigének heterogén vagy alacsony szintű expressziója (151), az antigénvesztés (152), valamint a tumor mikrokörnyezet strukturális és molekuláris immunszuppresszív jellemzői (153). A sűrű extracelluláris mátrix (154), a hialuronsavban gazdag stromális komponensek, az abnormális vaszkularizáció (155) és az immunszuppresszív sejttípusok jelenléte (156) együttesen fizikai és funkcionális akadályt képez az effektor sejtek tumorinfiltrációja és perzisztenciája előtt. Ez a

komplex környezet nem csupán a sejtek bejutását korlátozza, hanem aktivációjukat és hosszú távú fennmaradásukat is negatívan befolyásolja.

A szolid tumorokkal szembeni korlátozott hatékonyság ösztönözte a következő generációs CAR-konstrukciók fejlesztését, különös tekintettel a kostimulációs domének optimalizálására. A CD28 és 4-1BB domének eltérő jelátviteli és metabolikus programokat aktiválnak, amelyek különböző mértékben támogatják az effektor funkciót, a proliferációt és a memóriafenotípus kialakulását (157). Fontos azonban hangsúlyozni, hogy ezen domének eredetileg a T-sejtek fiziológiájára optimalizált jelátviteli elemek, így nem feltétlenül tükrözik a veleszületett immunrendszer sejteinek, különösen az NK-sejteknek a saját aktivációs mechanizmusait (115).

Az utóbbi években fokozott érdeklődés irányult a CAR-NK sejtes platformok felé. A természetes ölősejtek MHC-független ölömechanizmusa, természetes citotoxikus receptorainak jelenléte, valamint kedvezőbb biztonságossági profilja potenciális előnyt jelenthet a szolid tumorok kezelésében (158). A CAR-mediált célzott felismerés és a természetes NK-aktiváció kombinációja elméletileg szélesebb és rugalmasabb tumorelles választ biztosíthat, különösen heterogén antigénexpressziójú tumorok esetén.

Ugyanakkor fontos hangsúlyozni, hogy az NK-sejtek jelátviteli hálózata alapvetően eltér a T-sejtektől. Míg a legtöbb klinikumban alkalmazott CAR-konstrukció T-sejt eredetű kostimulációs doméneket – elsősorban CD28- és 4-1BB-motívumokat – tartalmaz, addig az NK-sejtek fiziológiás aktivációja eltérő receptorcsaládokra és adaptorfehérjékre épül (159). A SLAM-családba tartozó receptorok, köztük a 2B4 (CD244), meghatározó szerepet játszanak az NK-sejtek aktivációjában, citotoxikus funkciójában és hosszabb távú fennmaradásában (160).

Ez a különbség felveti annak lehetőségét, hogy a kizárólag T-sejt eredetű kostimulációs elemeket alkalmazó CAR-konstrukciók nem feltétlenül biztosítanak optimális jelátviteli környezetet NK-sejtekben. Ennek megfelelően indokoltá válik annak vizsgálata, hogy NK-specifikus jelátviteli komponensek integrálása, akár önmagukban, akár klasszikus T-sejt kostimulációs doménekkel kombinálva, képes-e javítani a CAR-NK sejtek funkcionális teljesítményét, különösen szolid tumorok komplex mikrokörnyezetében.

E kérdéskör különösen releváns olyan daganatok esetében, ahol a tumor mikrokörnyezet strukturális és molekuláris sajátosságai, például az adhézións molekulák és az extracelluláris mátrix komponenseinek expressziója, jelentősen befolyásolják az effektor sejtek infiltrációját és citotoxikus aktivitását. A szolid tumorokban gyakran megfigyelhető, hogy a sejtfelszíni

markerprofil és a stromális környezet együttesen funkcionális immunrezisztenciát alakít ki, amely nem pusztán az antigénfelismerést, hanem az effektor sejtek fizikai bejutását és tartós működését is korlátozza (161).

Ezen koncepcionális megfontolások vezették vizsgálatainkat, amelyekben egyrészt a különböző kostimulációs domének NK-sejtekben betöltött szerepét, másrészt a tumor mikrokörnyezet hatását elemeztük a HER2-specifikus CAR-NK sejtek tumorelles aktivására.

7.1.A T-sejt-specifikus rekombináns CAR molekulákkal módosított NK sejtek átmeneti tumorelles hatást fejtenek ki *in vivo* xenograft modellekben.

A klinikai gyakorlatban alkalmazott CAR-T konstrukciók túlnyomó többsége CD28 vagy 4-1BB kostimulációs domént tartalmaz (66). A CD28-mediált jelátvitel többek között a glikolitikus útvonalak beindításával gyors effektor aktivációt, fokozott citokintermelést és intenzív proliferációt indukál, míg a 4-1BB jelátviteli útvonal elsősorban a mitokondriális biogenezist, a metabolikus stabilitást és a hosszú távú perzisztenciát támogatja (162). E két domén kombinációja harmadik generációs konstrukciókban elméletileg szinergikus hatást eredményez, amely egyszerre biztosít erőteljes kezdeti aktivációt és tartós fennmaradást. Fontos azonban hangsúlyozni, hogy ezen jelátviteli modulok eredetileg a T-sejtek fizioiogiás aktivációs mechanizmusaira lettek optimalizálva. A T-sejt receptor (TCR) jelátvitel és a klasszikus kostimulációs tengelyek (CD28–CD80/86, 4-1BB–4-1BBL) adaptív immunológiai kontextusban működnek, ahol az antigén-prezentáció, a klonális expanzió és a memória-differenciáció jól definiált szabályozási mintázatot követ.

Ezzel szemben az NK-sejtek jelátviteli hálózata alapvetően eltérő szerveződésű. Aktivációjuk nem egyetlen domináns receptor–ligand tengelyen alapul, hanem aktiváló és gátló receptorok dinamikus egyensúlyán (163). Ebből következik az a koncepcionális kérdés, hogy vajon a kizárólag T-sejt eredetű kostimulációs elemeket alkalmazó CAR-konstrukciók optimálisan képesek-e aktiválni az NK-sejteket, különösen olyan környezetben, ahol a tumor mikrokörnyezet komplex gátló mechanizmusai dominálnak. A jelátviteli optimalizálás ugyanis nem csupán az aktiváció intenzitását, hanem a sejtek metabolikus programját, rezisztenciáját a kimerüléssel szemben, valamint ismételt antigénstimuláció melletti fennmaradását is meghatározza.

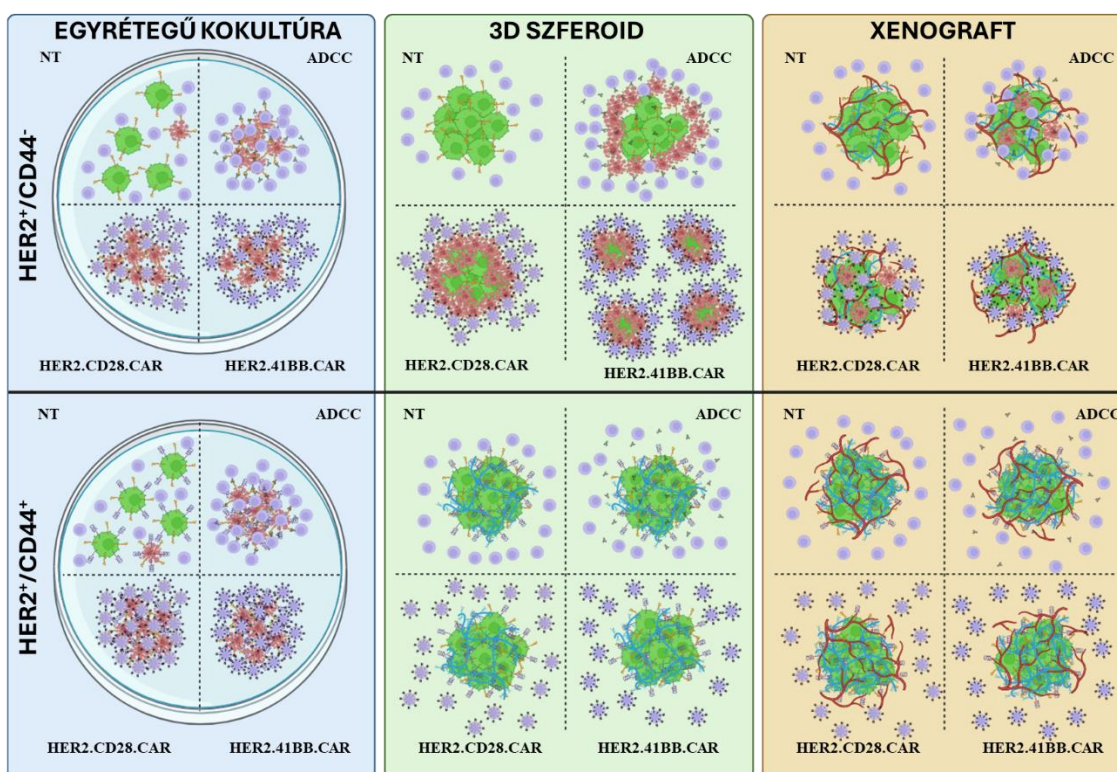
Vizsgálataink első fázisában ezért T-sejt eredetű kostimulációs doméneket tartalmazó HER2-specifikus CAR-konstrukciókat hoztunk létre NK-92 sejtekben, és összehasonlítottuk azok proliferációs, citokin-termelési és citotoxikus tulajdonságait. *In vitro* környezetben a CD28 és 4-1BB doméneket kombináló harmadik generációs konstrukció mutatta a legerőteljesebb proliferációs potenciált és IFN- γ termelést, ami azt jelzi, hogy a kettős kostimuláció NK-sejtekben is képes felerősített aktivációs állapotot indukálni.

Azonban az *in vivo* eredményeink árnyaltabb képet rajzoltak. CD44-pozitív xenograft modellben a fokozott *in vitro* proliferáció és citokin-termelés nem eredményezett mérhető tumorkontrollt. Ez arra utal, hogy az aktiváció intenzitása önmagában nem elegendő a szolid tumorokban fennálló strukturális és molekuláris gátló tényezők leküzdésére. Eredményeink alapján a T-sejt eredetű kostimulációs domének által kiváltott jelátviteli program erőteljes effektor választ generálhat, de nem feltétlenül biztosít optimális hatékonyságot a tumor mikrokörnyezetből eredő krónikus stimulációval, metabolikus stresszel és fizikai barrierrel szemben.

Ebben a kísérleti elrendezésben kulcsfontosságú megfigyelésünk volt, hogy a CD44-expresszió jelentős mértékben befolyásolta a CAR-NK sejtek *in vivo* hatékonyságát. A CD44 nem csupán adhéziós molekula, hanem a tumor-stemness, az epitheliális–mezenchimális átmenet (EMT) és az invazivitás markere (164). A CD44–hialuronsav interakció stabilizálja az extracelluláris mátrixot, növeli a stromális denzitást és hozzájárul a tumor mechanikai merevségéhez (165). A hialuronsavban gazdag tumor mikrokörnyezet csökkenti az immunsejtek infiltrációját, részben fizikai barrierként, részben pedig a lokális citokin- és kemokinprofil módosításán keresztül (144). CAR-T modellekben kimutatták, hogy az extracelluláris mátrix célzott lebontása, például hialuronidáz expresszióval, javítja a tumorpenetrációt és fokozza a terápiás hatékonyságot (166). Jelen megfigyeléseink összhangban állnak ezekkel az adatokkal. A CD44-pozitív JIMT-1 modellben a HER2-CAR NK sejtek sem 3D szferoid rendszerben, sem xenograft egérmodellben nem voltak képesek mély infiltrációra, míg a CD44-negatív N87 tumorok esetében szignifikánsabb növekedésgátlás volt kimutatható (**23. ábra**). Ez arra utal, hogy a CD44-expresszió nem pusztán fenotípusos marker, hanem aktív résztvevője egy olyan mátrix-alapú immunrezisztencia-mechanizmusnak, amely korlátozza az effektor sejtek fizikai hozzáférését és funkcionális fennmaradását.

Ezen eredmények mechanisztikus értelemben arra mutatnak rá, hogy a szolid tumorok elleni CAR-NK terápia hatékonyságát nem csupán az antigénfelismerés és a jelátviteli erősség, hanem a sejtek

mikrokörnyezeti adaptációs képessége is meghatározza. Ennek alapján olyan jelátviteli konstrukciókra lehet szükség, amelyek nemcsak intenzív kezdeti aktivációt, hanem fokozott metabolikus stabilitást, illetve ismételt stimuláció mellett is az expanszió fennmaradását biztosítják, ami összességében a krónikus tumorstimulációval szembeni rugalmas ellenállóképességhez vezet. E koncepcionális keretben válnak különösen relevánssá az NK-sejtek jelátvitelét specifikusan befolyásoló szignalizációs elemek, például a 2B4 kostimulációs domén, CAR konstruktba történő integrálásának vizsgálata, amely potenciálisan jobban illeszkedhet az NK-sejtek természetes aktivációs hálózatához és funkcionális programjához.



23. ábra: A CD44 expresszió befolyásolja CAR NK sejtek citolitikus hatását

A célsejteken kifejeződő CD44 sejtfelszíni adhéziós molekula csökkenti a HER2-specifikus CAR-NK sejtek citotoxikus aktivitását, ezáltal elősegíti a tumorsejtek migrációját és invazivitását. A hialuronsavhoz történő kötődés révén a CD44 hozzájárul a tumor mikrokörnyezet stabilizálásához, valamint a metasztatikus gócok kialakulásához.

7.2.A 2B4.41BB szignalizációs útvonal jelentősen növeli a HER2-CAR NK sejtek tumor ellenes hatékonyságát a CD44⁺, trastuzumab rezisztens JIMT-1 xenograft modellben.

Ebben az összefüggésben különös jelentőséggel bír annak vizsgálata, hogy az NK-sejtekre jellemző jelátviteli elemek – mindenekelőtt a 2B4 kostimulációs domén – CAR-konstrukcióba történő integrálása képes-e valódi funkcionális előnyt biztosítani szolid tumor környezetben. A hangsúly tehát nem pusztán az aktiváció intenzitásán, hanem annak minőségén és az NK-specifikus jelátviteli hálózathoz való illeszkedésén van.

A 2B4 sajátossága, hogy az NK-sejtek természetes receptorhálózatának szerves részeként működik, így intracelluláris doménjének beépítése a CAR-struktúrába nem egy mesterségesen ráerőltetett aktivációs jel bevezetését jelenti, hanem egy endogén jelátviteli tengely célzott megerősítését. Ez mechanisztikusan előnyös lehet olyan környezetben, ahol az effektor sejteknek nem csupán erőteljes, hanem finoman szabályozott, adaptív aktivációra van szükségük.

Ezzel párhuzamosan a 4-1BB (CD137) kostimulációs domén elsősorban túlélési és metabolikus útvonalakat aktivál. A 4-1BB jelátvitel fokozza a mitokondriális biogenezist, támogatja az oxidatív foszforiláció fenntartását és hozzájárul a hosszabb távú perzisztenciához. Szolid tumor környezetben, ahol a hipoxia és a tápanyaglimitáció meghatározó, az oxidatív metabolikus kapacitás megőrzése kulcsfontosságú lehet az effektor funkció tartós fenntartásához.

A 2B4 és 4-1BB domének kombinációja tehát mechanisztikusan két egymást kiegészítő funkcionális tengelyt egyesít: az egyik az NK-specifikus citotoxikus válasz és immunológiai szinapszis stabilizáció erősítése (167), a másik a túlélési és metabolikus reziliencia fokozása (168). E szinergia lehetőséget teremt arra, hogy az NK-sejtek ne csupán intenzív kezdeti aktivációt mutassanak, hanem fenntartsák működésüket krónikus antigénstimuláció és metabolikus stressz mellett is.

Az *in vitro* aktivációs vizsgálatok során a 2B4-et és 4-1BB-t egyaránt tartalmazó HER2.CAR-NK-92 sejtek produkálták a legmagasabb IFN- γ szintet. Ez a fokozott citokin-termelés arra utal, hogy a kombinált jelátvitel szinergikusan aktiválja az NK-sejtek effektor programját. Ugyanakkor a rövidtávú citotoxicitási tesztekben nem minden esetben mutatkozott jelentős különbség az egyes konstrukciók között, ami arra enged következtetni, hogy a 2B4.41BB konstrukció előnye elsősorban nem az azonnali ölési kapacitásban, hanem a funkcionális fenntarthatóságban jelentkezhet.

Ez a különbség különösen hangsúlyossá vált ismételt antigénstimuláció mellett. A 2B4.41BB konstrukcióval módosított sejtek hosszabb ideig képesek voltak fenntartani citotoxikus aktivitásukat, ami a krónikus stimulációval szembeni fokozott ellenállóképességre utal. Ez mechanisztikusan értelmezhető a túlélési jelutak aktivációjával, a metabolikus stabilitás fenntartásával és az NK-specifikus jelátviteli integráció harmonikusabb működésével. A funkcionális kimerülés lassabb kialakulása arra utal, hogy a kombinált jelátvitel képes részben kompenzálni a tartós antigénexpozíció negatív hatásait.

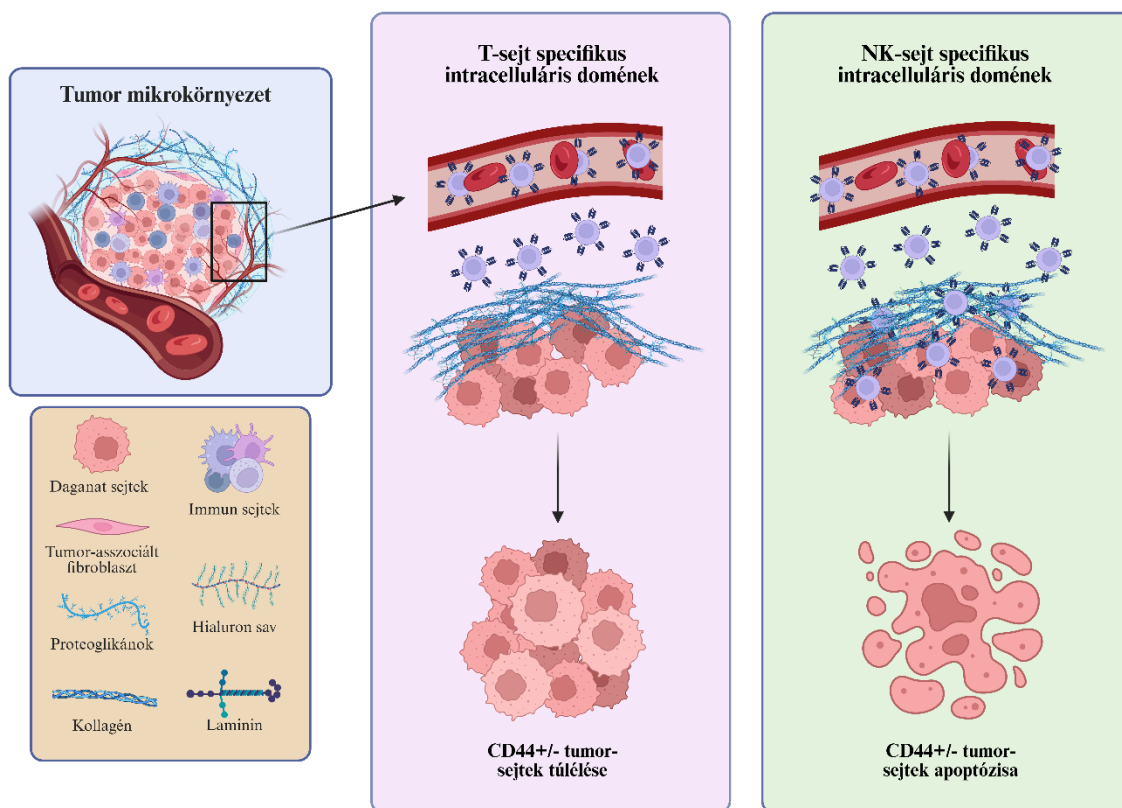
A háromdimenziós tumorszferoid modellben kapott eredmények egyértelműen rávilágítottak a strukturális korlátok jelentőségére, ugyanakkor finom különbségeket is feltártak az egyes konstrukciók között. Bár mindhárom vizsgált HER2.CAR-NK-92 sejt-készítmény képes volt felismerni és kötődni a HER2-expresszáló tumorstruktúrákhoz, a mély infiltráció mértéke konstrukciófüggőnek bizonyult. CD44-negatív modellekben valamennyi variáns hatékonyan penetrálta a szferoid belsejét, míg CD44-pozitív szferoidok esetében a második generációs konstrukciók jellemzően perifériás lokalizációt mutattak. Ezzel szemben a 2B4.41BB doméneket tartalmazó harmadik generációs HER2.CAR-NK-92 sejtek képesek voltak a CD44-pozitív struktúrákba történő mélyebb infiltrációra is.

Ez a megfigyelés arra utal, hogy a kombinált jelátviteli architektúra nem csupán az effektor funkció fenntartását támogatja, hanem hozzájárulhat a strukturálisan szervezett tumorarchitektúrában történő hatékonyabb migrációhoz és perzisztenciához is. A CD44–hialuronsav tengely által szervezett extracelluláris mátrix fokozza a szöveti denzitást és merevséget, mechanikai akadályt képezve az immunsejtek számára (169). Emellett a mátrix szerveződése módosítja a lokális citokin- és kemokin-gradienseket, ami befolyásolhatja az effektor sejtek aktivációs és migrációs programját (170). A 2B4 és 4-1BB kombinációja feltehetően olyan jelátviteli és metabolikus stabilitást biztosít, amely lehetővé teszi az NK-sejtek számára a gátló környezet részleges leküzdését és a CD44-pozitív tumorstruktúrák mélyebb rétegeinek elérését.

Az *in vivo* NSG xenograft modellekben a 2B4.41BB konstrukcióval módosított HER2.CAR-NK-92 sejtek tartós tumornövekedés-gátlást biztosítottak CD44-negatív tumorokban. A biolumineszcens jel csökkenése és az immunhisztokémiai vizsgálatok által igazolt tumorinfiltráció arra utal, hogy a kombinált jelátvitel javítja a lokális perzisztenciát és funkcionális fenntarthatóságot. Bár teljes tumoreradikáció nem valósult meg, a tartós tumorkontroll klinikai szempontból releváns előrelépést jelenthet.

CD44-pozitív tumorok esetében a tumorelles hatás mérsékeltebb volt, ami megerősíti, hogy a strukturálisan szervezett mikrokörnyezet jelentős korlátozó tényező marad. Ugyanakkor még ebben a gátló kontextusban is a 2B4.41BB konstrukció bizonyult a legpotensebbnek, ami arra utal, hogy a jelátviteli architektúra optimalizálása képes részben kompenzálni a mikrokörnyezeti hátrányokat.

Összességében eredményeink arra utalnak, hogy a 2B4 és 4-1BB jelátviteli domének kombinációja egy többszintű, szinergikus intracelluláris programot hoz létre NK-sejtekben, amely támogatja az akut effektor funkciót, a metabolikus stabilitást, valamint a krónikus antigénstimuláció melletti perzisztenciát. Bár a CD44-pozitív tumor mikrokörnyezet jelentős strukturális és funkcionális gátat képez, a több NK-specifikus jelátviteli modult integráló HER2.CAR-NK-92 sejtek ebben a kontextusban is kimutatható tumorelles potenciált mutattak. E megfigyelések alátámasztják, hogy a jelátviteli architektúra tudatos, NK-biológiai alapokon nyugvó optimalizálása kulcsfontosságú stratégiai irány a szolid tumorok elleni CAR-NK terápia fejlesztésében (24. ábra).



24. ábra: AZ NK sejtek jelátvitelére specifikus intracelluláris domének fokozzák a CAR NK sejtek citolitikus hatékonyságát

Az NK-sejt specifikus intracelluláris kostimulációs doménal felszerelt HER-specifikus CAR-NK-92 sejtek képesek a komplex TME-n keresztül a tumor core-régiójába hatolni és tartós tumorellenes hatást kiváltani in vivo xenograft modellben.

Eredményeink transzlációs szempontból több, egymással összefüggő stratégiai irányt jelölnek ki a szolid tumorok elleni CAR-NK terápiák fejlesztésében. A CD44-pozitív tumorok esetében egyértelműen igazolódott, hogy a strukturált, hialuronsavban gazdag extracelluláris mátrix nem csupán fizikai akadályt képez, hanem funkcionális immunrezisztencia-faktorként is működik. A CD44–hialuronsav tengely a tumor összejszerű fenotípusával, az epithel–mesenchymalis tranzícióval és a fokozott invazivitással is összefüggésben áll (171). Emellett a hialuronsavban gazdag mikrokörnyezet csökkentheti az immunsejtek infiltrációját és elősegítheti az immunszuppresszív citokinprofil fenntartását (172). Ezek az adatok összhangban állnak saját megfigyeléseinkkel, amelyek szerint a CD44-pozitív modellekben a tumorinfiltráció korlátozottabb volt, és a funkcionális perzisztencia gyorsabban csökkent.

Preklinikai modellekben kimutatták, hogy az extracelluláris mátrix enzimatis bontása, például heparanáz vagy hialuronidáz expresszió révén, jelentősen javíthatja a CAR-T sejtek tumorpenetrációját és tumorellenes aktivitását (173). E megközelítés adaptálása CAR-NK platformra logikus következő lépés lehet, különösen CD44+ tumorok esetében. Hasonlóképpen, a tumor mikrokörnyezet immunológiai gátló tengelyeinek – különösen a PD-1/PD-L1 útvonalnak – a célzott blokkolása fokozhatja az adoptív sejterápiák hatékonyságát szolid tumorokban (174). Mindez arra utal, hogy CD44+ tumorok esetén a jelátviteli optimalizálás és a mikrokörnyezet-célzott beavatkozások kombinációja lehet a leghatékonyabb stratégia.

Eredményeink másik fontos üzenete, hogy az NK-specifikus kostimulációs domének (pl. 2B4) integrálása mechanisztikus és funkcionális előnyt biztosíthat szolid tumor környezetben. Klinikai szinten a CAR-NK platform már bizonyította biztonságosságát és terápiás potenciálját hematológiai malignitásokban (175). A következő generációs CAR-NK konstrukciók fejlesztése során egyre nagyobb hangsúlyt kap az NK-specifikus jelátviteli architektúra alkalmazása, amely javíthatja a funkcionális perzisztenciát és a tumorellenes válasz tartósságát (176). A 2B4.41BB kombinációval kapcsolatos eredményeink ezt a koncepciót támasztják alá, mivel a konstrukció nemcsak fokozott IFN- γ termelést, hanem javult funkcionális fenntarthatóságot és tumorinfiltrációt is mutatott.

A jövőbeni fejlesztések több irányban is továbbvihetik a jelen eredményekből levonható következtetéseket. Az egyik ígéretes megközelítés a hialuronidázt expresszáló CAR-NK sejtek

létrehozása, amelyek aktívan bontják a tumor extracelluláris mátrixát, ezáltal elősegítve a mélyebb infiltrációt és a hatékonyabb tumorkontrollt. Emellett a PD-1 knockout vagy checkpoint-rezisztens CAR-NK rendszerek fejlesztése tovább mérsékelheti a tumor mikrokörnyezetből származó gátló jeleket, növelve az effektor sejtek tartósságát és funkcionális potenciálját. Végül az „off-the-shelf” allogén NK platformok alkalmazása lehetővé teszi standardizált, gyorsan hozzáférhető és potenciálisan alacsonyabb toxicitású sejtkelesztmények klinikai alkalmazását.

Összességében eredményeink azt sugallják, hogy a szolid tumorok elleni hatékony CAR-NK terápia három pilléren nyugodhat: az NK-biológiai alapokon optimalizált jelátviteli architektúrán, a tumor mikrokörnyezet strukturális és immunológiai gátló tényezőinek célzott modulálásán, valamint a klinikailag alkalmazható, allogén platformok fejlesztésén. A 2B4.41BB konstrukcióval kapcsolatos megfigyeléseink e stratégiai irányok mechanisztikus megalapozását jelentik, és hozzájárulnak a szolid tumorok elleni következő generációs CAR-NK terápiák racionális tervezéséhez.

8. 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 receptorral (CAR) módosított immunsejtek alkalmazása új lehetőségeket teremt a célzott tumorelles immunválasz fokozására. Míg a CAR-T sejtek hematológiai malignitásokban kiemelkedő eredményeket értek el, szolid tumorok esetében hatékonyságuk korlátozott. A természetes ölósejtek (NK-sejtek) CAR-módosítása ígéretes alternatívát jelenthet, különösen biztonságossági és allogén alkalmazhatósági szempontból.

Kísérleteink során HER2-specifikus CAR-t expresszáló NK-92 sejt vonalakat 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 tumorelles 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 esetén. In vivo vizsgálatokban a kombinált kostimulációs jelátvitelt hordozó CAR-NK sejtek szignifikánsan erősebb tumorelles 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.

9. Summary

The treatment of HER2-positive tumors remains a significant clinical challenge, particularly due to therapeutic resistance and the immunosuppressive effects of the tumor microenvironment. Adoptive cell therapies, including the use of chimeric antigen receptor (CAR)-engineered immune cells, offer new opportunities to enhance targeted antitumor immune responses. While CAR-T cells have achieved remarkable success in hematological malignancies, their efficacy in solid tumors remains limited. CAR modification of natural killer (NK) cells represents a promising alternative, particularly in terms of safety and feasibility of allogeneic application.

In our experiments, HER2-specific CAR-expressing NK-92 cell lines were generated and functionally characterized. Constructs incorporating T-cell-derived costimulatory domains demonstrated efficient cytotoxic activity against HER2-positive tumor cells in vitro, including trastuzumab-resistant cell lines. However, in vivo xenograft models revealed only limited and transient antitumor effects, especially in CD44-positive resistant tumors.

To improve efficacy, we developed a third-generation CAR construct containing NK cell-specific signaling domains. The 2B4.41BB.z CAR-NK-92 cells, incorporating the combined 2B4 and 4-1BB costimulatory domains, exhibited enhanced proliferative capacity, sustained activation, and preserved effector function upon repeated antigen stimulation. In three-dimensional tumor spheroid models, these cells demonstrated more efficient tumor penetration in both CD44-negative and CD44-positive settings. In vivo studies confirmed significantly stronger antitumor activity and deeper intratumoral infiltration by CAR-NK cells carrying the combined costimulatory signaling domains, even in previously resistant xenograft models.

Our findings demonstrate that the rational selection of costimulatory domains plays a decisive role in optimizing the functional performance of CAR-NK cells. The combined activation of the 2B4 and 4-1BB signaling pathways synergistically enhanced NK cell proliferation, cytotoxicity, and tumor infiltration capacity.

The presented preclinical data support NK cell-specific signaling optimization as a promising strategy for the treatment of therapy-resistant solid tumors and provide a solid foundation for further translational and clinical investigations.

10. Irodalomjegyzék

10.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Paludan SR, Pradeu T, Masters SL, Mogensen TH. Constitutive immune mechanisms: mediators of host defence and immune regulation. *Nat Rev Immunol.* 2021 Mar 11;21(3):137–50. doi:10.1038/s41577-020-0391-5
2. Chi H, Pepper M, Thomas PG. Principles and therapeutic applications of adaptive immunity. *Cell.* 2024 Apr;187(9):2052–78. doi:10.1016/j.cell.2024.03.037
3. de Visser KE, Joyce JA. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell.* 2023 Mar;41(3):374–403. doi:10.1016/j.ccell.2023.02.016
4. Shrestha P, Ghoreyshi ZS, George JT. How modulation of the tumor microenvironment drives cancer immune escape dynamics. *Sci Rep.* 2025 Mar 1;15(1):7308. doi:10.1038/s41598-025-91396-z
5. Paul S, Konig MF, Pardoll DM, Bettegowda C, Papadopoulos N, Wright KM, et al. Cancer therapy with antibodies. *Nat Rev Cancer.* 2024 Jun 13;24(6):399–426. doi:10.1038/s41568-024-00690-x
6. Humbert O, Llewellyn MJ, Laszlo GS, Walter RB, Kiem HP. CRISPR/Cas9-Mediated Protection of Normal Hematopoiesis Combined with the CD33/CD3 Bispecific T-Cell Engager (BiTE) Antibody AMG330 for Improved AML Therapy. *Blood.* 2019 Nov 13;134(Supplement_1):4427–4427. doi:10.1182/blood-2019-129399
7. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *New England Journal of Medicine.* 2012 Jun 28;366(26):2443–54. doi:10.1056/NEJMoa1200690
8. Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science.* 2018 Mar 23;359(6382):1350–5. doi:10.1126/science.aar4060 PubMed PMID: 29567705.
9. Ylösmäki E, Cerullo V. Design and application of oncolytic viruses for cancer immunotherapy. *Curr Opin Biotechnol.* 2020 Oct;65:25–36. doi:10.1016/j.copbio.2019.11.016
10. Pol J, Kroemer G, Galluzzi L. First oncolytic virus approved for melanoma immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2016 Jan 2;5(1):e1115641. doi:10.1080/2162402X.2015.1115641
11. Ott PA, Hu-Lieskovan S, Chmielowski B, Govindan R, Naing A, Bhardwaj N, et al. A Phase Ib Trial of Personalized Neoantigen Therapy Plus Anti-PD-1 in Patients with

- Advanced Melanoma, Non-small Cell Lung Cancer, or Bladder Cancer. *Cell*. 2020 Oct;183(2):347-362.e24. doi:10.1016/j.cell.2020.08.053
12. Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol*. 2012 Apr 22;12(4):269–81. doi:10.1038/nri3191
 13. Brudno JN, Kochenderfer JN. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. *Blood*. 2016 Jun 30;127(26):3321–30. doi:10.1182/blood-2016-04-703751
 14. Cillo AR, Cardello C, Shan F, Karapetyan L, Kunning S, Sander C, et al. Blockade of LAG-3 and PD-1 leads to co-expression of cytotoxic and exhaustion gene modules in CD8+ T cells to promote antitumor immunity. *Cell*. 2024 Aug;187(16):4373-4388.e15. doi:10.1016/j.cell.2024.06.036
 15. Bhatt DK, Janzen T, Daemen T, Weissing FJ. Effects of virus-induced immunogenic cues on oncolytic virotherapy. *Sci Rep*. 2024 Nov 21;14(1):28861. doi:10.1038/s41598-024-80542-8
 16. Duperret EK, Perales-Puchalt A, Stoltz R, G.H. H, Mandloi N, Barlow J, et al. A Synthetic DNA, Multi-Neoantigen Vaccine Drives Predominately MHC Class I CD8+ T-cell Responses, Impacting Tumor Challenge. *Cancer Immunol Res*. 2019 Feb 1;7(2):174–82. doi:10.1158/2326-6066.CIR-18-0283
 17. Goenka A, Khan F, Verma B, Sinha P, Dmello CC, Jogalekar MP, et al. Tumor microenvironment signaling and therapeutics in cancer progression. *Cancer Commun (Lond)*. 2023 May;43(5):525–61. doi:10.1002/cac2.12416 PubMed PMID: 37005490.
 18. Jazaeri AA, Zsiros E, Amaria RN, Artz AS, Edwards RP, Wenham RM, et al. Safety and efficacy of adoptive cell transfer using autologous tumor infiltrating lymphocytes (LN-145) for treatment of recurrent, metastatic, or persistent cervical carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2019 May 20;37(15_suppl):2538–2538. doi:10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.2538
 19. Eckman N, Nejatfard A, Cavet R, Grosskopf AK, Appel EA. Biomaterials to enhance adoptive cell therapy. *Nature Reviews Bioengineering*. 2024 Jan 26;2(5):408–24. doi:10.1038/s44222-023-00148-z
 20. Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, et al. Use of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Interleukin-2 in the Immunotherapy of Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 1988 Dec 22;319(25):1676–80. doi:10.1056/NEJM198812223192527
 21. Sarnaik AA, Hwu P, Mulé JJ, Pilon-Thomas S. Tumor-infiltrating lymphocytes: A new hope. *Cancer Cell*. 2024 Aug;42(8):1315–8. doi:10.1016/j.ccell.2024.06.015

22. Schlabach MR, Lin S, Colleser ZR, Wrocklage C, Shenker S, Calnan C, et al. Rational design of a SOCS1-edited tumor-infiltrating lymphocyte therapy using CRISPR/Cas9 screens. *Journal of Clinical Investigation*. 2023 Dec 15;133(24). doi:10.1172/JCI163096
23. Ganesan AP, Clarke J, Wood O, Garrido-Martin EM, Chee SJ, Mellows T, et al. Tissue-resident memory features are linked to the magnitude of cytotoxic T cell responses in human lung cancer. *Nat Immunol*. 2017 Aug;18(8):940–50. doi:10.1038/ni.3775 PubMed PMID: 28628092.
24. Chatani PD, Lowery FJ, Parikh NB, Hitscherich KJ, Yossef R, Hill V, et al. Cell surface marker-based capture of neoantigen-reactive CD8+ T-cell receptors from metastatic tumor digests. *J Immunother Cancer*. 2023 May;11(5). doi:10.1136/jitc-2022-006264 PubMed PMID: 37258038.
25. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2011 Jul 1;17(13):4550–7. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0116 PubMed PMID: 21498393.
26. Chesney J, Lewis KD, Kluger H, Hamid O, Whitman E, Thomas S, et al. Efficacy and safety of lifileucel, a one-time autologous tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) cell therapy, in patients with advanced melanoma after progression on immune checkpoint inhibitors and targeted therapies: pooled analysis of consecutive cohorts of the C-144-01 study. *J Immunother Cancer*. 2022 Dec;10(12):e005755. doi:10.1136/jitc-2022-005755
27. Creelan BC, Wang C, Teer JK, Toloza EM, Yao J, Kim S, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte treatment for anti-PD-1-resistant metastatic lung cancer: a phase 1 trial. *Nat Med*. 2021 Aug 12;27(8):1410–8. doi:10.1038/s41591-021-01462-y
28. Matsueda S, Chen L, Li H, Yao H, Yu F. Recent clinical researches and technological development in TIL therapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2024 Sep 12;73(11):232. doi:10.1007/s00262-024-03793-4 PubMed PMID: 39264449.
29. Kraja FP, Jurisic VB, Hromić-Jahjefendić A, Rossopoulou N, Katsila T, Mirjagic Martinovic K, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in cancer immunotherapy: from chemotactic recruitment to translational modeling. *Front Immunol*. 2025 May 22;16. doi:10.3389/fimmu.2025.1601773
30. Kirtane K, Elmariah H, Chung CH, Abate-Daga D. Adoptive cellular therapy in solid tumor malignancies: review of the literature and challenges ahead. *J Immunother Cancer*. 2021 Jul 23;9(7):e002723. doi:10.1136/jitc-2021-002723
31. Finck A V., Blanchard T, Roselle CP, Golinelli G, June CH. Engineered cellular immunotherapies in cancer and beyond. *Nat Med*. 2022 Apr 19;28(4):678–89. doi:10.1038/s41591-022-01765-8

32. Baulu E, Gardet C, Chuvain N, Depil S. TCR-engineered T cell therapy in solid tumors: State of the art and perspectives. *Sci Adv.* 2023 Feb 17;9(7). doi:10.1126/sciadv.adf3700
33. Chandran SS, Klebanoff CA. T cell receptor-based cancer immunotherapy: Emerging efficacy and pathways of resistance. *Immunol Rev.* 2019 Jul;290(1):127–47. doi:10.1111/imr.12772 PubMed PMID: 31355495.
34. Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, Dudley ME, et al. Tumor Regression in Patients With Metastatic Synovial Cell Sarcoma and Melanoma Using Genetically Engineered Lymphocytes Reactive With NY-ESO-1. *Journal of Clinical Oncology.* 2011 Mar 1;29(7):917–24. doi:10.1200/JCO.2010.32.2537
35. Lu YC, Parker LL, Lu T, Zheng Z, Toomey MA, White DE, et al. Treatment of Patients With Metastatic Cancer Using a Major Histocompatibility Complex Class II–Restricted T-Cell Receptor Targeting the Cancer Germline Antigen MAGE-A3. *Journal of Clinical Oncology.* 2017 Oct 10;35(29):3322–9. doi:10.1200/JCO.2017.74.5463
36. Mari L, Hoefnagel SJM, Zito D, van de Meent M, van Endert P, Calpe S, et al. microRNA 125a Regulates MHC-I Expression on Esophageal Adenocarcinoma Cells, Associated With Suppression of Antitumor Immune Response and Poor Outcomes of Patients. *Gastroenterology.* 2018 Sep;155(3):784–98. doi:10.1053/j.gastro.2018.06.030
37. Parker KR, Migliorini D, Perkey E, Yost KE, Bhaduri A, Bagga P, et al. Single-Cell Analyses Identify Brain Mural Cells Expressing CD19 as Potential Off-Tumor Targets for CAR-T Immunotherapies. *Cell.* 2020 Oct;183(1):126-142.e17. doi:10.1016/j.cell.2020.08.022
38. Tufail M, Jiang CH, Li N. Immune evasion in cancer: mechanisms and cutting-edge therapeutic approaches. *Signal Transduct Target Ther.* 2025 Jul 31;10(1):227. doi:10.1038/s41392-025-02280-1
39. Stadtmauer EA, Fraietta JA, Davis MM, Cohen AD, Weber KL, Lancaster E, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science (1979).* 2020 Feb 28;367(6481). doi:10.1126/science.aba7365
40. Batra SA, Rathi P, Guo L, Courtney AN, Fleurence J, Balzeau J, et al. Glypican-3–Specific CAR T Cells Coexpressing IL15 and IL21 Have Superior Expansion and Antitumor Activity against Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Immunol Res.* 2020 Mar 1;8(3):309–20. doi:10.1158/2326-6066.CIR-19-0293
41. Kloss CC, Lee J, Zhang A, Chen F, Melenhorst JJ, Lacey SF, et al. Dominant-Negative TGF- β Receptor Enhances PSMA-Targeted Human CAR T Cell Proliferation And Augments Prostate Cancer Eradication. *Molecular Therapy.* 2018 Jul;26(7):1855–66. doi:10.1016/j.ymthe.2018.05.003

42. Patel KK, Tariveranmoshabad M, Kadu S, Shobaki N, June C. From concept to cure: The evolution of CAR-T cell therapy. *Molecular Therapy*. 2025 May;33(5):2123–40. doi:10.1016/j.ymthe.2025.03.005
43. Amini L, Silbert SK, Maude SL, Nastoupil LJ, Ramos CA, Brentjens RJ, et al. Preparing for CAR T cell therapy: patient selection, bridging therapies and lymphodepletion. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022 May 22;19(5):342–55. doi:10.1038/s41571-022-00607-3
44. Lindner SE, Johnson SM, Brown CE, Wang LD. Chimeric antigen receptor signaling: Functional consequences and design implications. *Sci Adv*. 2020 May 22;6(21). doi:10.1126/sciadv.aaz3223
45. Lim WA, June CH. The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer. *Cell*. 2017 Feb;168(4):724–40. doi:10.1016/j.cell.2017.01.016
46. Cappell KM, Kochenderfer JN. Long-term outcomes following CAR T cell therapy: what we know so far. *Nat Rev Clin Oncol*. 2023 Jun 13;20(6):359–71. doi:10.1038/s41571-023-00754-1
47. Tokarew N, Ogonek J, Endres S, von Bergwelt-Baildon M, Kobold S. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells. *Br J Cancer*. 2019 Jan 9;120(1):26–37. doi:10.1038/s41416-018-0325-1
48. Shabaneh TB, Stevens AR, Stull SM, Shimp KR, Seaton BW, Gad EA, et al. Systemically administered low-affinity HER2 CAR T cells mediate antitumor efficacy without toxicity. *J Immunother Cancer*. 2024 Feb 7;12(2):e008566. doi:10.1136/jitc-2023-008566
49. Aparicio-Pérez C, Carmona Md, Benabdellah K, Herrera C. Failure of ALL recognition by CAR T cells: a review of CD 19-negative relapses after anti-CD 19 CAR-T treatment in B-ALL. *Front Immunol*. 2023 Apr 14;14. doi:10.3389/fimmu.2023.1165870
50. Szöör Á, Tóth G, Zsebik B, Szabó V, Eshhar Z, Abken H, et al. Trastuzumab derived HER2-specific CARs for the treatment of trastuzumab-resistant breast cancer: CAR T cells penetrate and eradicate tumors that are not accessible to antibodies. *Cancer Lett*. 2020 Aug;484:1–8. doi:10.1016/j.canlet.2020.04.008
51. Anderson ND, Birch J, Accogli T, Criado I, Khabirova E, Parks C, et al. Transcriptional signatures associated with persisting CD19 CAR-T cells in children with leukemia. *Nat Med*. 2023 Jul 6;29(7):1700–9. doi:10.1038/s41591-023-02415-3
52. Fowler NH, Dickinson M, Dreyling M, Martinez-Lopez J, Kolstad A, Butler J, et al. Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory follicular lymphoma: the phase 2 ELARA trial. *Nat Med*. 2022 Feb 17;28(2):325–32. doi:10.1038/s41591-021-01622-0
53. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma.

- New England Journal of Medicine. 2017 Dec 28;377(26):2531–44.
doi:10.1056/NEJMoal707447
54. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2018 Feb;378(5):439–48.
doi:10.1056/NEJMoal709866
 55. Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, Lunning MA, Wang M, Arnason J, et al. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *The Lancet*. 2020 Sep;396(10254):839–52. doi:10.1016/S0140-6736(20)31366-0
 56. St-Pierre F, Bhatta S, Doukas PG, Jenkin M, Annunzio K, Rojek AE, et al. Impact of extranodal involvement at CAR T-cell therapy on outcomes in patients with relapsed or refractory large B-cell lymphoma—Results from a multicenter cohort study. *Blood Cancer J*. 2025 Jun 21;15(1):110. doi:10.1038/s41408-025-01318-5
 57. Frey N V., Gill S, Hexner EO, Schuster S, Nasta S, Loren A, et al. Long-Term Outcomes From a Randomized Dose Optimization Study of Chimeric Antigen Receptor Modified T Cells in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2020 Sep 1;38(25):2862–71. doi:10.1200/JCO.19.03237
 58. Vanhooren J, Dobbelaere R, Derpoorter C, Deneweth L, Van Camp L, Uyttebroeck A, et al. CAR-T in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: Barriers and How to Overcome Them. *Hemasphere*. 2023 Sep;7(9):e937. doi:10.1097/HS9.0000000000000937 PubMed PMID: 37674860.
 59. Rosenthal J, Naqvi AS, Luo M, Wertheim G, Paessler M, Thomas-Tikhonenko A, et al. Heterogeneity of surface CD19 and CD22 expression in B lymphoblastic leukemia. *Am J Hematol*. 2018 Nov 9;93(11). doi:10.1002/ajh.25235
 60. Verma NK, Wong BHS, Poh ZS, Udayakumar A, Verma R, Goh RKJ, et al. Obstacles for T-lymphocytes in the tumour microenvironment: Therapeutic challenges, advances and opportunities beyond immune checkpoint. *EBioMedicine*. 2022 Sep;83:104216.
doi:10.1016/j.ebiom.2022.104216
 61. Beltra JC, Manne S, Abdel-Hakeem MS, Kurachi M, Giles JR, Chen Z, et al. Developmental Relationships of Four Exhausted CD8+ T Cell Subsets Reveals Underlying Transcriptional and Epigenetic Landscape Control Mechanisms. *Immunity*. 2020 May;52(5):825-841.e8. doi:10.1016/j.immuni.2020.04.014
 62. Del Bufalo F, De Angelis B, Caruana I, Del Baldo G, De Ioris MA, Serra A, et al. GD2-CART01 for Relapsed or Refractory High-Risk Neuroblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2023 Apr 6;388(14):1284–95. doi:10.1056/NEJMoal2210859

63. Xu J, Meng Q, Sun H, Zhang X, Yun J, Li B, et al. HER2-specific chimeric antigen receptor-T cells for targeted therapy of metastatic colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 2021 Nov 27;12(12):1109. doi:10.1038/s41419-021-04100-0
64. Bagley SJ, Binder ZA, Lamrani L, Marinari E, Desai AS, Nasrallah MP, et al. Repeated peripheral infusions of anti-EGFRvIII CAR T cells in combination with pembrolizumab show no efficacy in glioblastoma: a phase 1 trial. *Nat Cancer.* 2024 Jan 12;5(3):517–31. doi:10.1038/s43018-023-00709-6
65. Hassan R, Butler M, O’Cearbhaill RE, Oh DY, Johnson M, Zikaras K, et al. Mesothelin-targeting T cell receptor fusion construct cell therapy in refractory solid tumors: phase 1/2 trial interim results. *Nat Med.* 2023 Aug 27;29(8):2099–109. doi:10.1038/s41591-023-02452-y
66. Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J.* 2021 Apr 6;11(4):69. doi:10.1038/s41408-021-00459-7 PubMed PMID: 33824268.
67. Larson SM, Walthers CM, Ji B, Ghafouri SN, Naparstek J, Trent J, et al. CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptor (CAR) in Naive/Memory T Cells for the Treatment of Relapsed or Refractory Non-Hodgkin Lymphoma. *Cancer Discov.* 2023 Mar 1;13(3):580–97. doi:10.1158/2159-8290.CD-22-0964
68. Ghorashian S, Lucchini G, Richardson R, Nguyen K, Terris C, Guvenel A, et al. CD19/CD22 targeting with cotransduced CAR T cells to prevent antigen-negative relapse after CAR T-cell therapy for B-cell ALL. *Blood.* 2024 Jan 11;143(2):118–23. doi:10.1182/blood.2023020621
69. Hombach AA, Rappl G, Abken H. Arming Cytokine-induced Killer Cells With Chimeric Antigen Receptors: CD28 Outperforms Combined CD28–OX40 “Super-stimulation.” *Molecular Therapy.* 2013 Dec;21(12):2268–77. doi:10.1038/mt.2013.192
70. Thomas S, Abken H. CAR T cell therapy becomes CHIC: “cytokine help intensified CAR” T cells. *Front Immunol.* 2022;13:1090959. doi:10.3389/fimmu.2022.1090959 PubMed PMID: 36700225.
71. Agarwal S, Aznar MA, Rech AJ, Good CR, Kuramitsu S, Da T, et al. Deletion of the inhibitory co-receptor CTLA-4 enhances and invigorates chimeric antigen receptor T cells. *Immunity.* 2023 Oct;56(10):2388–2407.e9. doi:10.1016/j.immuni.2023.09.001
72. Funk CR, Wang S, Chen KZ, Waller A, Sharma A, Edgar CL, et al. PI3K δ/γ inhibition promotes human CART cell epigenetic and metabolic reprogramming to enhance antitumor cytotoxicity. *Blood.* 2022 Jan 27;139(4):523–37. doi:10.1182/blood.2021011597

73. Morris EC, Neelapu SS, Giavridis T, Sadelain M. Cytokine release syndrome and associated neurotoxicity in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2022 Feb 17;22(2):85–96. doi:10.1038/s41577-021-00547-6
74. Lichtenstein DA, Schischlik F, Shao L, Steinberg SM, Yates B, Wang HW, et al. Characterization of HLH-like manifestations as a CRS variant in patients receiving CD22 CAR T cells. *Blood*. 2021 Dec 16;138(24):2469–84. doi:10.1182/blood.2021011898 PubMed PMID: 34525183.
75. Reagan PM, Neelapu SS. How I Manage: Pathophysiology and Management of Toxicity of Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapies. *Journal of Clinical Oncology*. 2021 Feb 10;39(5):456–66. doi:10.1200/JCO.20.01616
76. Edeline J, Houot R, Marabelle A, Alcantara M. CAR-T cells and BiTEs in solid tumors: challenges and perspectives. *J Hematol Oncol*. 2021 Dec 19;14(1):65. doi:10.1186/s13045-021-01067-5
77. Lemoine J, Ruella M, Houot R. Born to survive: how cancer cells resist CAR T cell therapy. *J Hematol Oncol*. 2021 Dec 22;14(1):199. doi:10.1186/s13045-021-01209-9
78. Da Vià MC, Dietrich O, Truger M, Arampatzi P, Duell J, Heidemeier A, et al. Homozygous BCMA gene deletion in response to anti-BCMA CAR T cells in a patient with multiple myeloma. *Nat Med*. 2021 Apr 22;27(4):616–9. doi:10.1038/s41591-021-01245-5
79. Schoutrop E, Renken S, Micallef Nilsson I, Hahn P, Poiret T, Kiessling R, et al. Trogocytosis and fratricide killing impede MSLN-directed CAR T cell functionality. *Oncoimmunology*. 2022 Dec 31;11(1). doi:10.1080/2162402X.2022.2093426
80. Blache U, Popp G, Dünkel A, Koehl U, Fricke S. Potential solutions for manufacture of CAR T cells in cancer immunotherapy. *Nat Commun*. 2022 Sep 5;13(1):5225. doi:10.1038/s41467-022-32866-0
81. Diorio C, Teachey DT, Grupp SA. Allogeneic chimeric antigen receptor cell therapies for cancer: progress made and remaining roadblocks. *Nat Rev Clin Oncol*. 2025 Jan 15;22(1):10–27. doi:10.1038/s41571-024-00959-y
82. Depil S, Duchateau P, Grupp SA, Mufti G, Poirot L. ‘Off-the-shelf’ allogeneic CAR T cells: development and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2020 Mar 3;19(3):185–99. doi:10.1038/s41573-019-0051-2
83. Hammer Q, Perica K, Mbofung RM, van Ooijen H, Martin KE, Momayyezi P, et al. Genetic ablation of adhesion ligands mitigates rejection of allogeneic cellular immunotherapies. *Cell Stem Cell*. 2024 Sep;31(9):1376–1386.e8. doi:10.1016/j.stem.2024.06.011

84. Coënon L, Geindreau M, Ghiringhelli F, Villalba M, Bruchard M. Natural Killer cells at the frontline in the fight against cancer. *Cell Death Dis.* 2024 Aug 23;15(8):614. doi:10.1038/s41419-024-06976-0
85. Maskalenko NA, Zhigarev D, Campbell KS. Harnessing natural killer cells for cancer immunotherapy: dispatching the first responders. *Nat Rev Drug Discov.* 2022 Aug 21;21(8):559–77. doi:10.1038/s41573-022-00413-7
86. Myers JA, Miller JS. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021 Feb 15;18(2):85–100. doi:10.1038/s41571-020-0426-7
87. Viant C, Fenis A, Chicanne G, Payrastra B, Ugolini S, Vivier E. SHP-1-mediated inhibitory signals promote responsiveness and anti-tumour functions of natural killer cells. *Nat Commun.* 2014 Oct 30;5(1):5108. doi:10.1038/ncomms6108
88. Goulding J, Yeh WI, Hancock B, Blum R, Xu T, Yang BH, et al. A chimeric antigen receptor uniquely recognizing MICA/B stress proteins provides an effective approach to target solid tumors. *Med.* 2023 Jul;4(7):457-477.e8. doi:10.1016/j.medj.2023.04.004
89. Myers JA, Schirm D, Bendzick L, Hopps R, Selleck C, Hinderlie P, et al. Balanced engagement of activating and inhibitory receptors mitigates human NK cell exhaustion. *JCI Insight.* 2022 Aug 8;7(15). doi:10.1172/jci.insight.150079
90. 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 Mar 12;9. doi:10.3389/fimmu.2018.00476
91. Cifaldi L, Melaiu O, Giovannoni R, Benvenuto M, Focaccetti C, Nardozi D, et al. DNAM-1 chimeric receptor-engineered NK cells: a new frontier for CAR-NK cell-based immunotherapy. *Front Immunol.* 2023 Jun 8;14. doi:10.3389/fimmu.2023.1197053
92. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, et al. Activating Receptors and Coreceptors Involved in Human Natural Killer Cell-Mediated Cytolysis. *Annu Rev Immunol.* 2001 Apr;19(1):197–223. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.197
93. Rugo HS, Im SA, Cardoso F, Cortés J, Curigliano G, Musolino A, et al. Efficacy of Margetuximab vs Trastuzumab in Patients With Pretreated ERBB2-Positive Advanced Breast Cancer. *JAMA Oncol.* 2021 Apr 1;7(4):573. doi:10.1001/jamaoncol.2020.7932
94. Maia A, Tarannum M, Lérias JR, Piccinelli S, Borrego LM, Maeurer M, et al. Building a Better Defense: Expanding and Improving Natural Killer Cells for Adoptive Cell Therapy. *Cells.* 2024 Mar 5;13(5):451. doi:10.3390/cells13050451
95. Fallone L, Pouxvielh K, Arbez L, Rousseaux N, Picq L, Drouillard A, et al. Interleukins 15 and 18 synergistically prime the antitumor function of natural killer cells through

- noncanonical activation of mTORC1. *Sci Signal*. 2025 Sep 16;18(904). doi:10.1126/scisignal.adq8778
96. Shemesh A, Pickering H, Roybal KT, Lanier LL. Differential IL-12 signaling induces human natural killer cell activating receptor-mediated ligand-specific expansion. *J Exp Med*. 2022 Aug 1;219(8). doi:10.1084/jem.20212434 PubMed PMID: 35758909.
 97. Shanley M, Daher M, Dou J, Li S, Basar R, Rafei H, et al. Interleukin-21 engineering enhances NK cell activity against glioblastoma via CEBPD. *Cancer Cell*. 2024 Aug;42(8):1450-1466.e11. doi:10.1016/j.ccell.2024.07.007
 98. Ramírez-Labrada A, Pesini C, Santiago L, Hidalgo S, Calvo-Pérez A, Oñate C, et al. All About (NK Cell-Mediated) Death in Two Acts and an Unexpected Encore: Initiation, Execution and Activation of Adaptive Immunity. *Front Immunol*. 2022 May 16;13. doi:10.3389/fimmu.2022.896228
 99. Lopez JA, Susanto O, Jenkins MR, Lukoyanova N, Sutton VR, Law RHP, et al. Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood*. 2013 Apr 4;121(14):2659–68. doi:10.1182/blood-2012-07-446146
 100. Bald T, Krummel MF, Smyth MJ, Barry KC. The NK cell–cancer cycle: advances and new challenges in NK cell–based immunotherapies. *Nat Immunol*. 2020 Aug 20;21(8):835–47. doi:10.1038/s41590-020-0728-z
 101. Terrén I, Orrantia A, Astarloa-Pando G, Amarilla-Irusta A, Zenarruzabeitia O, Borrego F. Cytokine-Induced Memory-Like NK Cells: From the Basics to Clinical Applications. *Front Immunol*. 2022;13:884648. doi:10.3389/fimmu.2022.884648 PubMed PMID: 35603208.
 102. Paul S, König MF, Pardoll DM, Bettegowda C, Papadopoulos N, Wright KM, et al. Cancer therapy with antibodies. *Nat Rev Cancer*. 2024 Jun 13;24(6):399–426. doi:10.1038/s41568-024-00690-x
 103. Mahaweni NM, Olieslagers TI, Rivas IO, Molenbroeck SJJ, Groeneweg M, Bos GMJ, et al. A comprehensive overview of FCGR3A gene variability by full-length gene sequencing including the identification of V158F polymorphism. *Sci Rep*. 2018 Oct 29;8(1):15983. doi:10.1038/s41598-018-34258-1
 104. Pinto S, Pahl J, Schottelius A, Carter PJ, Koch J. Reimagining antibody-dependent cellular cytotoxicity in cancer: the potential of natural killer cell engagers. *Trends Immunol*. 2022 Nov;43(11):932–46. doi:10.1016/j.it.2022.09.007
 105. Wagner J, Pfannenstiel V, Waldmann A, Bergs JWJ, Brill B, Huenecke S, et al. A Two-Phase Expansion Protocol Combining Interleukin (IL)-15 and IL-21 Improves Natural

- Killer Cell Proliferation and Cytotoxicity against Rhabdomyosarcoma. *Front Immunol.* 2017 Jun 12;8. doi:10.3389/fimmu.2017.00676
106. Sarvaria A, Jawdat D, Madrigal JA, Saudemont A. Umbilical Cord Blood Natural Killer Cells, Their Characteristics, and Potential Clinical Applications. *Front Immunol.* 2017;8:329. doi:10.3389/fimmu.2017.00329 PubMed PMID: 28386260.
 107. Navarrete-Galvan L, Guglielmo M, Cruz Amaya J, Smith-Gagen J, Lombardi VC, Merica R, et al. Optimizing NK-92 serial killers: gamma irradiation, CD95/Fas-ligation, and NK or LAK attack limit cytotoxic efficacy. *J Transl Med.* 2022 Apr 2;20(1):151. doi:10.1186/s12967-022-03350-6
 108. Strati P, Bachanova V, Goodman A, Pagel JM, Castro JE, Griffis K, et al. Preliminary results of a phase I trial of FT516, an off-the-shelf natural killer (NK) cell therapy derived from a clonal master induced pluripotent stem cell (iPSC) line expressing high-affinity, non-cleavable CD16 (hnCD16), in patients (pts) with relapsed/refractory (R/R) B-cell lymphoma (BCL). *Journal of Clinical Oncology.* 2021 May 20;39(15_suppl):7541–7541. doi:10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.7541
 109. Van den Eynde A, Gehrcken L, Verhezen T, Lau HW, Hermans C, Lambrechts H, et al. IL-15-secreting CAR natural killer cells directed toward the pan-cancer target CD70 eliminate both cancer cells and cancer-associated fibroblasts. *J Hematol Oncol.* 2024 Feb 9;17(1):8. doi:10.1186/s13045-024-01525-w
 110. Arvindam US, van Hauten PMM, Schirm D, Schaap N, Hobo W, Blazar BR, et al. A trispecific killer engager molecule against CLEC12A effectively induces NK-cell mediated killing of AML cells. *Leukemia.* 2021 Jun 23;35(6):1586–96. doi:10.1038/s41375-020-01065-5
 111. Jørgensen LV, Christensen EB, Barnkob MB, Barington T. The clinical landscape of CAR NK cells. *Exp Hematol Oncol.* 2025 Mar 27;14(1):46. doi:10.1186/s40164-025-00633-8
 112. Marin D, Li Y, Basar R, Rafei H, Daher M, Dou J, et al. Safety, efficacy and determinants of response of allogeneic CD19-specific CAR-NK cells in CD19+ B cell tumors: a phase 1/2 trial. *Nat Med.* 2024 Mar 18;30(3):772–84. doi:10.1038/s41591-023-02785-8
 113. Dagher OK, Posey AD. Forks in the road for CAR T and CAR NK cell cancer therapies. *Nat Immunol.* 2023 Dec 27;24(12):1994–2007. doi:10.1038/s41590-023-01659-y
 114. Bachanova V, Ghobadi A, Patel K, Park JH, Flinn IW, Shah P, et al. Safety and Efficacy of FT596, a First-in-Class, Multi-Antigen Targeted, Off-the-Shelf, iPSC-Derived CD19 CAR NK Cell Therapy in Relapsed/Refractory B-Cell Lymphoma. *Blood.* 2021 Nov 5;138(Supplement 1):823–823. doi:10.1182/blood-2021-151185

115. Laskowski TJ, Biederstädt A, Rezvani K. Natural killer cells in antitumour adoptive cell immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*. Nature Research; 2022. p. 557–75. doi:10.1038/s41568-022-00491-0 PubMed PMID: 35879429.
116. Reindl LM, Albinger N, Bexte T, Müller S, Hartmann J, Ullrich E. Immunotherapy with NK cells: recent developments in gene modification open up new avenues. *Oncoimmunology*. 2020 Sep 2;9(1):1777651. doi:10.1080/2162402X.2020.1777651 PubMed PMID: 33457093.
117. Schindler-Wnek K, Stahringer A, Heimer N, Koehl U, Fricke S, Schmiedel D. Divergent on-target off-tumor effects by CAR T and CAR NK cells suggest different efficacy and safety of cell therapies. *Oncoimmunology*. 2025 Dec 31;14(1). doi:10.1080/2162402X.2025.2546443
118. Maddineni S, Silberstein JL, Sunwoo JB. Emerging NK cell therapies for cancer and the promise of next generation engineering of iPSC-derived NK cells. *J Immunother Cancer*. 2022 May;10(5):e004693. doi:10.1136/jitc-2022-004693
119. Liu E, Marin D, Banerjee P, Macapinlac HA, Thompson P, Basar R, et al. Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N Engl J Med*. 2020 Feb 6;382(6):545–53. doi:10.1056/NEJMoa1910607 PubMed PMID: 32023374.
120. Ghobadi A, Bachanova V, Patel K, Park JH, Flinn I, Riedell PA, et al. Induced pluripotent stem-cell-derived CD19-directed chimeric antigen receptor natural killer cells in B-cell lymphoma: a phase 1, first-in-human trial. *The Lancet*. 2025 Jan;405(10473):127–36. doi:10.1016/S0140-6736(24)02462-0
121. Cichocki F, Bjordahl R, Goodridge JP, Mahmood S, Gaidarova S, Abujarour R, et al. Quadruple gene-engineered natural killer cells enable multi-antigen targeting for durable antitumor activity against multiple myeloma. *Nat Commun*. 2022 Nov 29;13(1):7341. doi:10.1038/s41467-022-35127-2
122. Bachanova V, Deol A, Al-Juhaishi TMS, Lulla PD, Byrne MT, Wong C, et al. Safety and Efficacy of FT522, a First-in-Class, Multi-Antigen Targeted, Off-the-Shelf, iPSC-Derived CD19 CAR NK Cell Therapy with Alloimmune Defense Receptor (ADR) in Relapsed/Refractory B-Cell Lymphoma. *Blood*. 2024 Nov 5;144(Supplement 1):6543–6543. doi:10.1182/blood-2024-198684
123. Park E, Mun H jin, Seo E, Hwang S, Lee JH, Song S, et al. CAR NK92 Cells Targeting BCMA Can Effectively Kill Multiple Myeloma Cells Both In Vitro and In Vivo. *Biomedicines*. 2024 Jan 22;12(1):248. doi:10.3390/biomedicines12010248
124. Lamers-Kok N, Panella D, Georgoudaki AM, Liu H, Özkazanc D, Kučerová L, et al. Natural killer cells in clinical development as non-engineered, engineered, and

- combination therapies. *J Hematol Oncol*. 2022 Nov 8;15(1):164. doi:10.1186/s13045-022-01382-5 PubMed PMID: 36348457.
125. Maiti A, Muftuoglu M, Ignatz-Hoover JJ, DiNardo CD, Ravandi F, Andreeff M, et al. Azacitidine, Venetoclax and Allogeneic NK Cells in Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia (ADVENT-AML): An Investigator-Initiated Multicenter Phase Ib Trial. *Blood*. 2023 Nov 2;142(Supplement 1):4863–4863. doi:10.1182/blood-2023-182885
 126. Strassheimer F, Elleringmann P, Ludmirski G, Roller B, Macas J, Alekseeva T, et al. CAR-NK cell therapy combined with checkpoint inhibition induces an NKT cell response in glioblastoma. *Br J Cancer*. 2025 May 18;132(9):849–60. doi:10.1038/s41416-025-02977-8
 127. Balkhi S, Zuccolotto G, Di Spirito A, Rosato A, Mortara L. CAR-NK cell therapy: promise and challenges in solid tumors. *Front Immunol*. 2025 Apr 7;16. doi:10.3389/fimmu.2025.1574742
 128. Nayar S, Dasgupta P, Galustian C. Extending the lifespan and efficacies of immune cells used in adoptive transfer for cancer immunotherapies-A review. *Oncoimmunology*. 2015 Apr;4(4):e1002720. doi:10.1080/2162402X.2014.1002720 PubMed PMID: 26155387.
 129. Christodoulou I, Ho WJ, Marple A, Ravich JW, Tam A, Rahnema R, et al. Engineering CAR-NK cells to secrete IL-15 sustains their anti-AML functionality but is associated with systemic toxicities. *J Immunother Cancer*. 2021 Dec;9(12). doi:10.1136/jitc-2021-003894 PubMed PMID: 34896980.
 130. Tserunyan V, Finley SD. Computational analysis of 4-1BB-induced NFκB signaling suggests improvements to CAR cell design. *Cell Communication and Signaling*. 2022 Aug 26;20(1):129. doi:10.1186/s12964-022-00937-w
 131. Shahid S, Cai W, Burns ER, Um JS, Mathew S, Souness S, et al. Enhancing CAR T Cell Efficacy By Modulating PI3K Signaling Via a Synthetic CD28 Rheostat. *Blood*. 2024 Nov 5;144(Supplement 1):4802–4802. doi:10.1182/blood-2024-209964
 132. Ruppel KE, Fricke S, Köhl U, Schmiedel D. Taking Lessons from CAR-T Cells and Going Beyond: Tailoring Design and Signaling for CAR-NK Cells in Cancer Therapy. *Front Immunol*. 2022 Mar 18;13. doi:10.3389/fimmu.2022.822298
 133. Bloch-Queyrat C, Fondanèche MC, Chen R, Yin L, Relouzat F, Veillette A, et al. Regulation of natural cytotoxicity by the adaptor SAP and the Src-related kinase Fyn. *J Exp Med*. 2005 Jul 4;202(1):181–92. doi:10.1084/jem.20050449
 134. Domagala J, Lachota M, Klopotoska M, Graczyk-Jarzynka A, Domagala A, Zhylko A, et al. The Tumor Microenvironment—A Metabolic Obstacle to NK Cells' Activity. *Cancers (Basel)*. 2020 Nov 27;12(12):3542. doi:10.3390/cancers12123542

135. Bernardini G, Antonangeli F, Bonanni V, Santoni A. Dysregulation of Chemokine/Chemokine Receptor Axes and NK Cell Tissue Localization during Diseases. *Front Immunol.* 2016 Oct 6;7. doi:10.3389/fimmu.2016.00402
136. Jamali A, Hadjati J, Madjd Z, Mirzaei HR, Thalheimer FB, Agarwal S, et al. Highly Efficient Generation of Transgenically Augmented CAR NK Cells Overexpressing CXCR4. *Front Immunol.* 2020 Aug 28;11. doi:10.3389/fimmu.2020.02028
137. Barshidi A, Ardeshiri K, Ebrahimi F, Alian F, Shekarchi AA, Hojjat-Farsangi M, et al. The role of exhausted natural killer cells in the immunopathogenesis and treatment of leukemia. *Cell Communication and Signaling.* 2024 Jan 22;22(1):59. doi:10.1186/s12964-023-01428-2
138. Mansour AG, Teng KY, Li Z, Zhu Z, Chen H, Tian L, et al. Off-the-shelf CAR-engineered natural killer cells targeting FLT3 enhance killing of acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* 2023 Oct 24;7(20):6225–39. doi:10.1182/bloodadvances.2022007405 PubMed PMID: 37379267.
139. Freitas Monteiro M, Papaserafeim M, Andreani M, Réal A, Kouklas A, Reis Galvão D, et al. NK Cytotoxicity Mediated by NK-92 Cell Lines Expressing Combinations of Two Allelic Variants for FCGR3. *Antibodies (Basel).* 2024 Jul 12;13(3). doi:10.3390/antib13030055 PubMed PMID: 39051331.
140. Jochems C, Hodge JW, Fantini M, Fujii R, Morillon YM, Greiner JW, et al. An NK cell line (haNK) expressing high levels of granzyme and engineered to express the high affinity CD16 allele. *Oncotarget.* 2016 Dec 27;7(52):86359–73. doi:10.18632/oncotarget.13411 PubMed PMID: 27861156.
141. Mata M, Vera JF, Gerken C, Rooney CM, Miller T, Pfent C, et al. Toward Immunotherapy With Redirected T Cells in a Large Animal Model. *Journal of Immunotherapy.* 2014 Oct;37(8):407–15. doi:10.1097/CJI.0000000000000052
142. Barok M, Isola J, Pályi-Krekk Z, Nagy P, Juhász I, Vereb G, et al. Trastuzumab causes antibody-dependent cellular cytotoxicity–mediated growth inhibition of submacroscopic JIMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance. *Mol Cancer Ther.* 2007 Jul 1;6(7):2065–72. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0766
143. Nagy P, Friedländer E, Tanner M, Kapanen AI, Carraway KL, Isola J, et al. Decreased Accessibility and Lack of Activation of ErbB2 in JIMT-1, a Herceptin-Resistant, MUC4-Expressing Breast Cancer Cell Line. *Cancer Res.* 2005 Jan 15;65(2):473–82. doi:10.1158/0008-5472.473.65.2
144. Szöör Á, Tóth G, Zsebik B, Szabó V, Eshhar Z, Abken H, et al. Trastuzumab derived HER2-specific CARs for the treatment of trastuzumab-resistant breast cancer: CAR T

- cells penetrate and eradicate tumors that are not accessible to antibodies. *Cancer Lett.* 2020 Aug 1;484:1–8. doi:10.1016/j.canlet.2020.04.008 PubMed PMID: 32289441.
145. Meinke S, Watzl C. NK cell cytotoxicity mediated by 2B4 and NTB-A is dependent on SAP acting downstream of receptor phosphorylation. *Front Immunol.* 2013;4. doi:10.3389/fimmu.2013.00003
 146. Vinay DS, Kwon BS. 4-1BB signaling beyond T cells. *Cell Mol Immunol.* 2011 Jul 10;8(4):281–4. doi:10.1038/cmi.2010.82
 147. Wang Z, Wang M, Wang M, Zhou R, Deng X, Ouyang X, et al. From molecular design to clinical translation: dual-targeted CAR-T strategies in cancer immunotherapy. *Int J Biol Sci.* 2025;21(6):2676–91. doi:10.7150/ijbs.108036 PubMed PMID: 40303292.
 148. Brudno JN, Maus M V, Hinrichs CS. CAR T Cells and T-Cell Therapies for Cancer: A Translational Science Review. *JAMA.* 2024 Dec 10;332(22):1924–35. doi:10.1001/jama.2024.19462 PubMed PMID: 39495525.
 149. Jayaraman J, Mellody MP, Hou AJ, Desai RP, Fung AW, Pham AHT, et al. CAR-T design: Elements and their synergistic function. *EBioMedicine.* 2020 Aug;58:102931. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102931
 150. Harrer DC, Li SS, Kaljanac M, Barden M, Pan H, Abken H. Fine-tuning the antigen sensitivity of CAR T cells: emerging strategies and current challenges. *Front Immunol.* 2023 Nov 27;14. doi:10.3389/fimmu.2023.1321596
 151. Uslu U, June CH. Beyond the blood: expanding CAR T cell therapy to solid tumors. *Nat Biotechnol.* 2025 Apr 12;43(4):506–15. doi:10.1038/s41587-024-02446-2
 152. Zeng XL, Xie P, Fan J, Zhang B. Rapid CD19 Antigen Modulation Following Exposure to CD19 CAR T Is Associated with a Change in Leukemia Transcriptional Profile. *Blood.* 2024 Nov 5;144(Supplement 1):5773–5773. doi:10.1182/blood-2024-212420
 153. de Visser KE, Joyce JA. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell.* 2023 Mar;41(3):374–403. doi:10.1016/j.ccell.2023.02.016
 154. Lamplugh ZL, Wellhausen N, June CH, Fan Y. Microenvironmental regulation of solid tumour resistance to CAR T cell therapy. *Nat Rev Immunol.* 2025 Oct 14. doi:10.1038/s41577-025-01229-3
 155. Mhaidly R, Mechta-Grigoriou F. Fibroblast heterogeneity in tumor micro-environment: Role in immunosuppression and new therapies. *Semin Immunol.* 2020 Apr;48:101417. doi:10.1016/j.smim.2020.101417

156. Hou AJ, Chen LC, Chen YY. Navigating CAR-T cells through the solid-tumour microenvironment. *Nat Rev Drug Discov*. 2021 Jul 10;20(7):531–50. doi:10.1038/s41573-021-00189-2
157. Mezősi-Csaplár M, Szöör Á, Vereb G. CD28 and 41BB Costimulatory Domains Alone or in Combination Differentially Influence Cell Surface Dynamics and Organization of Chimeric Antigen Receptors and Early Activation of CAR T Cells. *Cancers (Basel)*. 2023 Jun 7;15(12):3081. doi:10.3390/cancers15123081
158. Habif G, Crinier A, André P, Vivier E, Narni-Mancinelli E. Targeting natural killer cells in solid tumors. *Cell Mol Immunol*. 2019 May 25;16(5):415–22. doi:10.1038/s41423-019-0224-2
159. Chen S, Zhu H, Jounaidi Y. Comprehensive snapshots of natural killer cells functions, signaling, molecular mechanisms and clinical utilization. *Signal Transduct Target Ther*. 2024 Nov 8;9(1):302. doi:10.1038/s41392-024-02005-w
160. Altwater B, Landmeier S, Pscherer S, Temme J, Schweer K, Kailayangiri S, et al. 2B4 (CD244) Signaling by Recombinant Antigen-specific Chimeric Receptors Costimulates Natural Killer Cell Activation to Leukemia and Neuroblastoma Cells. *Clinical Cancer Research*. 2009 Aug 1;15(15):4857–66. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2810
161. Gergely B, Vereb MA, Rebenku I, Vereb G, Szöör Á. Targeting HER2-Positive Solid Tumors with CAR NK Cells: CD44 Expression Is a Critical Modulator of HER2-Specific CAR NK Cell Efficacy. *Cancers (Basel)*. 2025 Feb 21;17(5):731. doi:10.3390/cancers17050731
162. Cook MS, King E, Flaherty KR, Siddika K, Papa S, Benjamin R, et al. CAR-T cells containing CD28 versus 4-1BB co-stimulatory domains show distinct metabolic profiles in patients. *Cell Rep*. 2025 Jul;44(7):115973. doi:10.1016/j.celrep.2025.115973
163. Imširović V, Wensveen FM, Polić B, Jelenčić V. Maintaining the Balance: Regulation of NK Cell Activity. *Cells*. 2024 Aug 31;13(17):1464. doi:10.3390/cells13171464
164. Ziranu P, Pretta A, Aimola V, Cau F, Mariani S, D'Agata AP, et al. CD44: A New Prognostic Marker in Colorectal Cancer? *Cancers (Basel)*. 2024 Apr 19;16(8):1569. doi:10.3390/cancers16081569
165. Cirillo N. The Hyaluronan/CD44 Axis: A Double-Edged Sword in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2023 Oct 31;24(21):15812. doi:10.3390/ijms242115812
166. Zhao Y, Dong Y, Yang S, Tu Y, Wang C, Li J, et al. Bioorthogonal Equipping CAR-T Cells with Hyaluronidase and Checkpoint Blocking Antibody for Enhanced Solid Tumor Immunotherapy. *ACS Cent Sci*. 2022 May 25;8(5):603–14. doi:10.1021/acscentsci.2c00163

167. dos Santos MH, de Azevedo JTC, da Silva Januário ME, Schmidt D de F, Tirapelle MC, Biggi AFB, et al. 2B4 co-stimulation and dasatinib modulation enhance anti-CD19 CAR-NK-92 cell cytotoxicity. *Front Immunol.* 2025 Dec 12;16. doi:10.3389/fimmu.2025.1675877
168. Kennedy PR, Arvindam US, Phung SK, Ettestad B, Feng X, Li Y, et al. Metabolic programs drive function of therapeutic NK cells in hypoxic tumor environments. *Sci Adv.* 2024 Nov;10(44). doi:10.1126/sciadv.adn1849
169. Gomez KE, Wu F, Keysar SB, Morton JJ, Miller B, Chimed TS, et al. Cancer Cell CD44 Mediates Macrophage/Monocyte-Driven Regulation of Head and Neck Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* 2020 Oct 1;80(19):4185–98. doi:10.1158/0008-5472.CAN-20-1079
170. Salmon H, Franciszkievicz K, Damotte D, Dieu-Nosjean MC, Validire P, Trautmann A, et al. Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *Journal of Clinical Investigation.* 2012 Mar 1;122(3):899–910. doi:10.1172/JCI45817
171. Hassn Mesrati M, Syafruddin SE, Mohtar MA, Syahir A. CD44: A Multifunctional Mediator of Cancer Progression. *Biomolecules.* 2021 Dec 9;11(12):1850. doi:10.3390/biom11121850
172. Donelan W, Dominguez-Gutierrez PR, Kusmartsev S. Deregulated hyaluronan metabolism in the tumor microenvironment drives cancer inflammation and tumor-associated immune suppression. *Front Immunol.* 2022;13:971278. doi:10.3389/fimmu.2022.971278 PubMed PMID: 36238286.
173. Caruana I, Savoldo B, Hoyos V, Weber G, Liu H, Kim ES, et al. Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirected T lymphocytes. *Nat Med.* 2015 May 13;21(5):524–9. doi:10.1038/nm.3833
174. Cichocki F, Bjordahl R, Gaidarova S, Mahmood S, Abujarour R, Wang H, et al. iPSC-derived NK cells maintain high cytotoxicity and enhance in vivo tumor control in concert with T cells and anti-PD-1 therapy. *Sci Transl Med.* 2020 Nov 4;12(568). doi:10.1126/scitranslmed.aaz5618
175. Marin D, Li Y, Basar R, Rafei H, Daher M, Dou J, et al. Safety, efficacy and determinants of response of allogeneic CD19-specific CAR-NK cells in CD19+ B cell tumors: a phase 1/2 trial. *Nat Med.* 2024 Mar 18;30(3):772–84. doi:10.1038/s41591-023-02785-8
176. Basar R, Daher MM, Uprety N, Ensley E, Nunez Cortes AK, Acharya S, et al. DAP10 Co-Stimulation Imparts Memory-like Features to CD5 Targeting Cord Blood Derived CAR-NK Cells. *Blood.* 2023 Nov 2;142(Supplement 1):2089–2089. doi:10.1182/blood-2023-187665

10.2. Közlemények DEENK által hitelesített jegyzéke



**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., Elsenbroich, 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.





Registry number: DEENK/240/2026.PL
Subject: PhD Publication List

Candidate: Bence Gergely
Doctoral School: Doctoral School of Molecular Medicine

List of publications related to the dissertation

1. **Gergely, B.**, Vereb, M. A., Rebenku, I., Szöör, 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., Szöör, 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)

List of other publications

3. Barden, M., Elsenbroich, P. R., Haas, V., Ertelt, M., Pervan, P., Velas, L., **Gergely, B.**, Szöör, 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





**UNIVERSITY of
DEBRECEN**

**UNIVERSITY AND NATIONAL LIBRARY
UNIVERSITY OF DEBRECEN**

H-4002 Egyetem tér 1, Debrecen

Phone: +3652/410-443, email: 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

Total IF of journals (all publications): 29,3

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 14,5

The Candidate's publication data submitted to the Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.

28 April, 2026



11. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretném megköszönni Dr. Szöőr Árpád témavezetőmnek, hogy végtelen türelemmel, és páratlan szakmai tudásával nap, mint nap segített a céljaim eléréséhez. Mindezt úgy, hogy megteremtve egy olyan munkahelyi légkört, melyben hamar önbizalomra és önállóságra szert téve tudtam dolgozni, és ami elengedhetetlen volt az eredményes közösmunkához. Kivételes mentorálásának hála nemcsak szakmailag, hanem emberileg is sokat fejlődtem az elmúlt időszakban. Személyiségének és a jó hangulatú, laboron kívüli összejöveteleknek is nagy szerepe volt abban, hogy a munkacsoportunk igazi közösséggé kovácsolódott.

Köszönetet szeretnék mondani Prof. Dr. Vereb Györgynek, a munkacsoportunk vezetőjének. Egyetemi szinten is páratlan, kiemelkedő tudása és széles látóköre folyamatos iránymutatást nyújtott számomra a munkám során, legyen szó a laborgyűléseken zajló megbeszélésekről, vagy a folyosói, kötetlen eszmecserékről, melyek alkalmával mindig nyitott volt a kérdéseimre és értékes szakmai tanácsokkal segítette a kutatásomat.

Hálámat szeretném kifejezni Vágóné Toldi Hajni asszisztensünknek, aki mértetetlen türelmével és amolyan anyai gondoskodásával kísért és segített végig az utamon.

Köszönöm Mezösi-Csaplár Mariannak a délutáni eszmefuttatásokat; minden beszélgetésünk után új inspirációval és tudással gazdagodva távoztam, melyeket sikerrel építettem be a munkámba. Köszönöm Rebenku István szobatársam őszinte és néha nyers stílusával megfogalmazott realisztikus és elgondolkodtató beszélgetéseit. Hálás vagyok Nagy Lőrinc kollégámnak a szakmai eszmecserékért, valamint a labormunkán kívüli felejthetetlen élményekért. Köszönöm az intézet „ármány” brigádjának – Katica, Gabica, Noémi és Máté -, közös történeketeket és összejöveteleket, szerencsére akad bőven, amire mindig mosolyogva fogok visszagondolni, és szívből remélem, hogy a társaság együtt marad a jövőben. Köszönöm az intézet valamennyi dolgozójának azt bizalmat és pozitív légkört, amellyel itt tartózkodásom alatt végig körülvettek, és amelyet a legjobb tudásomnak megfelelően igyekeztem meghálálni.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Panyi Györgynek, a Biofizika és Sejtbiológia Intézet vezetőjének, hogy biztosította a kutatómunkámhoz és a disszertációm elkészítéséhez szükséges infrastrukturális hátteret.

Köszönöm Dr. Beatriz Martin Antonionak és kutatócsoportjának, akik nagy szeretettel fogadtak madridi laborukban. A közös kísérletezésekre és az inspiráló szakmai megbeszélésekre

nagyon szívesen emlékszem vissza. Külön köszönöm Victor Salidonak a kint tartózkodásom alatti rengeteg és önzetlen segítséget.

Végül, de nem utolsó sorban a legnagyobb megköszönettel a családomnak tartozom. Szeretetük, támogatásuk és határtalan türelmük nélkül ez a disszertációt nem jöhetett volna létre. Köszönöm, hogy minden pillanatban hittetek bennem.

12. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai