

Combination and integration to redirect NK cells for cancer immunotherapy

Citation for published version (APA):

Gong, Y. (2021). *Combination and integration to redirect NK cells for cancer immunotherapy*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20211130yg>

Document status and date:

Published: 01/01/2021

DOI:

[10.26481/dis.20211130yg](https://doi.org/10.26481/dis.20211130yg)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

In the present thesis, we continued our group's previous research on developing NK cell-based immunotherapy. In **Chapter 1**, we summarized the progress on tumor immunotherapy in general and introduced the NK cell-based immunotherapy.

In **Chapter 2**, we continued our group's previous work on the cancer-associated antigen MUC1. We hypothesized that defucosylation of a humanized murine anti-MUC1 antibody improved anti-cancer responses by enhancing NK cell responses. Therefore, we humanized the murine 5E5 anti-MUC1-Tn antibody and also generated an Fc-tail defucosylated antibody. We confirmed that the humanized 5E5 antibody recognizes MUC1-Tn epitopes and binds to the CD16 (FcγRIIIα) receptor on NK cells. The humanized 5E5 antibody could induce CD107a degranulation and triggered ADCC on NK cells when added to MUC1-Tn positive tumor cells. The Fc defucosylated antibody further boosted ADCC. However, we also found a dose-dependent reduction of CD16 expression levels on NK cells. MUC1-Tn antigens have been reported that could be dynamic internalized via endocytosis on cancer cells which could be an important mechanism for tumor escape and resistance. However, we found that adding endocytosis inhibitors during the cytotoxicity assays of NK cells against MUC1-Tn positive tumor cells, antibodies neither further augment CD107a degranulation nor improved ADCC of NK cells. In conclusion, the newly generated humanized anti-MUC1 antibodies improved anti-cancer responses using NK cells, especially after defucosylation of the Fc-tail.

Genetic editing aided by lentiviral transduction of human NK cells is still a major hurdle in NK cell-based immunotherapy. Therefore, in **Chapter 3**, we tried to increase the lentiviral transduction efficiency on human NK cells. We screened 5 statins and 5 non-statin compounds for their ability to increase VSV-G receptor—LDLR expression levels on NK cells. Only statins significantly upregulated LDLR levels, thereby increasing the transduction efficiency. We confirmed that the LDLR surface expression level correlated with the VSV-G lentivirus transduction efficiency. The statins-induced reduction of NK cell cytotoxicity could be completely restored using GGPP. Thus, we found that statins (especially rosuvastatin) plus GGPP can increase VSV-G lentivirus transduction efficiency on NK cells via upregulating LDLR. This is an important step in increasing the efficiency of genetic editing of NK cells for immunotherapy.

In **Chapter 4**, we provide a comprehensive review of the state-of-the-art of CAR-NK development with a focus on the NK cell-specific design of the CAR. We conducted statistical analysis of the various components that make up a CAR-NK from all published CAR-NK studies. From these statistics, we extracted best-practice and future ideas for the design of an optimal CAR for NK cells. In this chapter, we also detail our own progress on the generation of anti-MUC1-Tn-based CAR-NK cells (scFv from the 5E5

antibody tested in chapter 2). These preliminary data provide insights in the technical challenges posed by the generation of CAR-NK cells.

In **Chapter 5**, we explored if genetic deletion of the inhibitory NKG2A receptor from human NK cells can improve NK cell function. We successfully generated NKG2A-deficient NK cells by using Cas9 Ribonucleoprotein (RNP) electroporation on expanded NK cells. Then, we analyzed the transcriptome, phenotype and functional aspects of the NKG2A knockout NK cells. We observed neither substantial alterations in gene expression levels by using RNA-seq and RT-PCR analyses, nor phenotypic or functional differences at baseline. Interestingly, NKG2A-knockout NK cells can fully overcome the inhibitory signals provided by HLA-E+ tumor cells. Importantly, genetic deletion of NKG2A constantly outperformed anti-NKG2A antibody blockage. Thus, we confirm that Cas9-based deletion of NKG2A is a powerful and efficient way to enhance anti-tumor responses in NK cells. We envisage that NKG2A-deficient NK cells will persist and perform better in the suppressive tumor microenvironment.

In **Chapter 6**, we summarized the findings from the various chapters. We provide an in-depth discussion of how these findings can be applied to the tumor immunology field to enhance NK cell-based therapies. Performing this work, we expect that we have added small building blocks to make CAR-NK cells more functional in the challenge to cure cancer.

Samenvatting

In dit proefschrift zetten we het eerdere onderzoek van onze groep naar de ontwikkeling van NK-cel-immunotherapie voort. In hoofdstuk 1 hebben we de voortgang van tumorimmunotherapie samengevat en expliciet de op NK-cellen gebaseerde immunotherapie geïntroduceerd.

In **Hoofdstuk 2** gaan we door met onderzoek dat onze groep aan kanker geassocieerd antigeen MUC1 heeft uitgevoerd. We hebben het uit muis afkomstige 5E5 anti-MUC1-Tn antilichaam gehumaniseerd en dit antilichaam van een gedefucosyleerde Fc-staart voorzien. Het gehumaniseerde 5E5-antilichaam herkende de MUC1-Tn-epitopen en bond de CD16 (FcγRIIIα)-receptor op NK-cellen. Het gehumaniseerde 5E5-antilichaam induceerde degranulatie van NK-cellen en veroorzaakte ook een Antilichaam afhankelijke cellulaire cytotoxiciteit (ADCC in het Engels) van NK-cellen na het samenbrengen met MUC1-Tn-positieve tumorcellen. Het Fc-gedefucosyleerde antilichaam versterkte de ADCC verder. Er is melding gemaakt van MUC1-Tn-antigenen die dynamisch kunnen worden geïnternaliseerd op kankercellen via endocytose, wat een belangrijk mechanisme zou kunnen zijn voor het ontsnappen van tumoren en resistentie. We ontdekten echter dat het toevoegen van endocytoseremmers tijdens de cytotoxiciteitstesten van NK-cellen tegen MUC1-Tn-positieve tumorcellen, antilichamen de CD107a-degranulatie niet verder versterken, noch ADCC van NK-cellen verbeteren. Concluderend verbeterden de nieuw gegenereerde gehumaniseerde anti-MUC1-antilichamen de antikankerreacties met behulp van NK-cellen, vooral na defucosylering van de Fc-staart.

In **Hoofdstuk 3** hebben we geprobeerd de transductie-efficiëntie van menselijke NK-cellen met lentivirussen te verhogen. We hebben 5 statines en 5 niet-statine verbindingen gescreend om LDL Receptor op NK-cellen te verhogen omdat de lentivirale VSV-G envelope via de LDLR naar binnen gaat. Alleen de statines verhoogden de LDLR aanzienlijk, waardoor de transductie-efficiëntie werd verhoogd. We hebben waargenomen dat het LDLR-oppervlakte-expressieniveau correleerde met de VSV-G-lentivirus transductie-efficiëntie. Van statines is beschreven dat ze de functie van NK-cellen beperken, maar GGPP zou de onderdrukking volledig kunnen herstellen. We zijn dus van mening dat statines (vooral rosuvastatine) plus GGPP de transductie-efficiëntie van VSV-G-lentivirus op NK-cellen kunnen verhogen via het opreguleren van LDLR.

In **Hoofdstuk 4** hebben we een uitgebreid literatuuroverzicht gemaakt van de state-of-the-art van ontwerpen en maken van CAR-NK cellen. We hebben statistiek uitgevoerd over het ontwerp van elk element van het CAR-construct uit bijna alle gepubliceerde CAR-NK-onderzoeken. Op basis van deze statistieken hopen we het ontwerp van een optimale CAR voor NK-cellen te extrapoleren en begeleiden. Daarnaast hebben we onze eigen voortgang van het genereren van anti-MUC1-Tn CAR-NK beschreven in boxes. Deze voorlopige gegevens moeten leiden tot gedetailleerde procedures om CAR-NK in de praktijk te genereren.

In **Hoofdstuk 5** hebben we het transcriptoom, het fenotype en de functionele aspecten van NKG2A knock-out NK-cellen onderzocht. We hebben met succes een NKG2A knock-out gegenereerd met behulp van CRISPR guideRNA en Cas9 Ribonucleoproteïne (RNP) elektroporatie op menselijke geëxpandeerde NK-cellen. We hebben geen substantiële verandering in genexpressie waargenomen na RNA-Seq diep sequencing en qPCR, als ook niet in de fenotypemarkers en functionele moleculen. Deze cellen zijn dus nauwelijks veranderd. Interessant is dat de NKG2A knock-out NK-cel populatie de remming van tumorcellen met hoge HLA-E-expressie kunnen weerstaan, beter dan blokkade door een anti-NKG2A-antilichaam. We voorzien dat de NKG2A knock-out NK-cellen productie van NK-cellen voor klinische toepassing kan vergemakkelijken. Van deze cellen verwachten we dat ze persistenter zijn in de onderdrukkende tumormicro-omgeving.

In **Hoofdstuk 6** hebben we een samenvatting van elk hoofdstuk en daarover een diepgaande discussie gemaakt. We hebben de belangrijkste bevindingen, beperkingen en toepassingen van elk hoofdstuk op een rij gezet. We hopen dat deze ontdekkingen de theorie van NK-cellen voor tumorimmunotherapie zullen verrijken. Door het uitvoeren van dit werk verwachten we dat we kleine bouwstenen hebben toegevoegd aan het domein van de brede kennis om CAR-NK-cellen functioneler te maken in de ambitie om kanker te genezen.

论文总结

本论文中，继续本课题组前期有关人自然杀伤性（NK）细胞肿瘤免疫疗法的研究。在**第一章**中，我们总结了最新的肿瘤免疫疗法研究进展，并详细介绍了 NK 细胞相关肿瘤免疫治疗方法。

在**第二章**中，结合本研究团队之前对癌症相关抗原 MUC1-Tn 靶点的研究成果，我们假设将抗 MUC1-Tn 抗体的 Fc 段修饰，去除岩藻糖亚基，能够增强 NK 细胞的抗体依赖的细胞毒性杀伤（ADCC）。因此本章研究内容为将鼠来源的 5E5 靶向 MUC1-Tn 抗体序列人源化，同时构建 Fc 段去岩藻糖基化的抗体。结果证明了人源化 5E5 抗体能够特异性识别 MUC1-Tn 肿瘤抗原表位，并能够结合 NK 细胞上的 CD16(FcγRIIIa)分子。当加入 MUC1-Tn 抗原阳性的肿瘤细胞混合后，人源化 5E5 抗体可诱导 NK 细胞进行 CD107a 脱颗粒并介导 NK 细胞的 ADCC 杀伤肿瘤。有趣的是，人源化的 5E5 靶向 MUC1-Tn 抗体在 Fc 段去除岩藻糖基化后，更进一步诱导 NK 细胞的 CD107a 脱颗粒和诱导 ADCC。然而，当添加更多抗体剂量时，NK 细胞上表达的 CD16 分子表达会减少。相关研究已报道，MUC1-Tn 抗原可以通过癌细胞内吞作用动态内化，这可能是肿瘤逃逸和抵抗的重要机制。通过在 MUC1-Tn 阳性肿瘤细胞与 NK 细胞细胞毒性测定过程中，添加内吞抑制剂不会进一步增强 NK 细胞的 CD107a 脱颗粒和 ADCC。因此，本课题组研发的人源化抗 MUC1 抗体，促进 NK 细胞的抗肿瘤细胞毒性，抗体 Fc 段去岩藻糖基化更进一步促进其抗肿瘤效应。

对人 NK 细胞进行基因编辑仍然是 NK 细胞免疫疗法一个很大挑战。在**第三章**中，我们旨在如何提高人类 NK 细胞的慢病毒转导效率。我们筛选了 5 种他汀类药物和 5 种非他汀类化合物，用来诱导 NK 细胞上的慢病毒 VSV-G 衣壳蛋白受体——LDLR 分子。只有他汀类化合物显著上调 NK 细胞表面的 LDLR 分子，从而有助于 VSV-G 病毒颗粒结合 NK 细胞，提高慢病毒转导效率。我们发现在 NK 细胞中，LDLR 表达水平与 VSV-G 慢病毒转导效率正相关。但是前期有报道显示，他汀类药物会抑制 NK 细胞的功能，我们发现 GGPP 化合物可以完全恢复他汀类对 NK 细胞的抑制作用。因此，我们相信他汀类药物（尤其是瑞舒伐他汀）加 GGPP 可以通过上调 LDLR 病毒蛋白受体来提高 NK 细胞

上的 VSV-G 慢病毒转导效率。本章实验结果，将有助于改善人体原代 NK 细胞基因编辑效率，将促进 NK 细胞肿瘤免疫疗法。

在**第四章**中，我们详细介绍了 NK 细胞免疫疗法的最新技术——嵌合抗原受体 NK 细胞 (CAR-NK)。本章节回顾了 CAR-NK 肿瘤细胞治疗技术的最新进展。我们对已发表的 CAR-NK 技术进行了统计，分析了 CAR-NK 设计每个作用元素的效果，这些设计的细节能够预测和指导 CAR-NK 的效果。同时，本章节也详细展示了本课题组在建立针对 MUC1-Tn 抗原靶点的 CAR-NK 进展，这是在第二章人源化 5E5 抗体和**第三章** NK 细胞慢病毒转导的研究前期成果上进行的。这些初步数据，展示了构建 CAR-NK 细胞治疗技术过程的各种挑战和技术难点。

在**第五章**中，我们探讨了 NKG2A 抑制性受体在 CRISPR/Cas9 技术进行基因敲除后，是否能够促进 NK 细胞的杀伤肿瘤效应，同时 NKG2A 的敲除对人原代 NK 细胞的转录组、表型和功能方面的影响。对体外扩增的原代 NK 细胞，采用 Cas9 核糖核蛋白 (RNP)+gRNA 电穿孔的方式，成功敲除了 NKG2A 抑制性受体。我们通过 RNA-seq 转录组深度测序和定量 qPCR 监测基因表达水平的变化、以及流式细胞术进行细胞变性和功能分子表达检测。结果显示，通过与未敲除 NKG2A 的 NK 细胞相比较，NKG2A 敲除的 NK 细胞从基因表达转录组水平至细胞表型和杀伤功能分子的表达没有显著差异。有趣的是，NKG2A 敲除的 NK 细胞，可以克服来自高 HLA-E 表达肿瘤细胞的抑制作用，其阻断效率比抗 NKG2A 抗体更好。由此我们可以推测，NKG2A 受体敲除的 NK 细胞，可以促进 NK 细胞克服 HLA-E 分子高表达的抑制性肿瘤微环境的限制。

在**第六章**中，我们对每一章进行了总结和深入讨论。我们列出了每一章的主要发现并讨论了研究的局限性，并探讨了这些研究成果在临床肿瘤疾病治疗中的转化应用。我们希望这些发现将丰富 NK 细胞，尤其是 CAR-NK，用于肿瘤免疫治疗的理论。