



Możliwości wykorzystania komórek NK w immunoterapii nowotworów

Possibilities of using NK cells in cancer immunotherapy

Paulina Kwaśnik^{1,B-D,F}, Marta Kinga Lemieszek^{2,A,E-F}, Wojciech Rzeski^{3,A,F}

¹ Zakład Hematoonkologii Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny, Lublin, Polska

² Zakład Biologii Medycznej, Instytut Medycyny Wsi, Lublin, Polska

³ Zakład Biologii Medycznej, Instytut Medycyny Wsi, Lublin, Polska; Katedra Anatomii Funkcjonalnej i Cytobiologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin, Polska

A – Koncepcja i projekt badania, B – Gromadzenie i/lub zestawianie danych, C – Analiza i interpretacja danych,

D – Napisanie artykułu, E – Krytyczne zrecenzowanie artykułu, F – Zatwierdzenie ostatecznej wersji artykułu

Kwaśnik P, Lemieszek M.K, Rzeski W. Możliwości wykorzystania komórek NK w immunoterapii nowotworów. Med Og Nauk Zdr. 2020; 26(1): 8–16. DOI: 10.26444/monz/116591

■ Streszczenie

Pomimo postępu, jaki w ostatnich latach dokonał się w onkologii, wciąż wzrasta liczba zachorowań na nowotwory, co wymusza poszukiwanie nowych, skuteczniejszych, a przede wszystkim bezpieczniejszych strategii terapeutycznych. W trend ten doskonale wpisuje się immunoterapia, u podłoża której leży mobilizacja i wzmacnianie własnych mechanizmów obronnych organizmu. Jest to istotne, gdyż komórki nowotworowe często „wymykają się” spod nadzoru immunologicznego i w ten sposób zdobywają możliwość niekontrolowanego wzrostu i rozprzestrzeniania się po organizmie. Wzmocnienie i usprawnienie odpowiedzi immunologicznej w kierunku rozpoznawania/wykrywania a jednocześnie niszczenia komórek nowotworowych w dużej mierze bazuje na modyfikacjach komórek immunokompetentnych bezpośrednio zaangażowanych w odpowiedź przeciwnowotworową. Z uwagi na fakt, że pierwszą linię obrony organizmu przed nowotworami stanowią komórki NK (ang. *natural killer* – naturalni zabójcy), to w nich pokładane są nadzieje na przełom w leczeniu nowotworów. Badania nad biologią komórek NK pozwoliły lepiej zrozumieć ich ogromny potencjał terapeutyczny, a zdobycze współczesnej medycyny umożliwiły ich efektywne wykorzystanie w immunoterapii nowotworów. W niniejszej pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat możliwości wykorzystania komórek NK w immunoterapii nowotworowej, przede wszystkim zaś omówiono terapię adoptowaną z wykorzystaniem komórek NK, cytotoksyczność komórkową zależną od przeciwciał oraz strategię opierającą się na stymulacji komórek NK cytokinami lub blokowaniu ich receptorów hamujących.

Słowa kluczowe

komórki NK, immunoterapia, nowotwory

■ Abstract

Despite the progress that has been made in oncology in recent years, the increasing number of cases of cancer forces the search for new, more effective, and above all, safer therapeutic strategies. Immunotherapy, which is based on the mobilization and strengthening of the body's own defence mechanisms, perfectly fits this trend. This is important because cancer cells often 'sneak out' of immune surveillance and thus gain the possibility of uncontrolled growth and spread throughout the body. Strengthening and improving the immune response towards recognition/detection, and at the same time, destroying cancer cells is largely based on the modification of immunocompetent cells directly involved in the anti-cancer response. Because of the fact that lymphocytes NK (natural killer cells) are the first line of the body's defence against cancer-transformed cells, hope is placed in them for a breakthrough in cancer treatment. Research on NK cells biology has allowed a better understanding of their huge therapeutic potential, and the achievements of modern medicine have enabled their effective use in cancer immunotherapy. This paper presents the current state of knowledge about the possibilities of using NK cells in cancer immunotherapy, in particular, adopted therapy using NK cells, antibody-dependent cellular cytotoxicity, strategies based on NK cell stimulation with cytokines, or blocking their inhibitory receptors.

Key words

NK cells, immunotherapy, cancer

WPROWADZENIE

W ostatnich latach odnotowuje się wzrastającą liczbę zachorowań na nowotwory. W Polsce nowotwory złośliwe są drugą, po chorobach układu krążenia, przyczyną zgonów. Według

zapisów z Krajowego Rejestru Nowotworów częstość zgonów na nowotwory w Polsce w 2016 roku wyniosła wśród kobiet 24%, a wśród mężczyzn aż 27% [1]. Postępujące szerzenie się chorób nowotworowych zmusza badaczy do poszukiwania coraz to nowszych i bardziej efektywnych metod leczenia. Do takich metod zaliczamy immunoterapię onkologiczną, której istotą jest stymulacja układu odpornościowego pacjenta celem usprawnienia oraz wzmocnienia jego naturalnych mechanizmów obronny przeciwnowotworowej. Z uwagi na

Adres do korespondencji: Marta Kinga Lemieszek, Zakład Biologii Medycznej, Instytut Medycyny Wsi, Lublin, Polska
E-mail: marta.lemieszek@gmail.com

Nadesłano: 05.09.2019; Zaakceptowano: 14.01.2020; Publikacja on line: 12.02.2020

kluczową rolę limfocytów NK (ang. *natural killer* – naturalni zabójcy) w zwalczaniu złośliwie transformowanych komórek bardzo często są one wykorzystywane w immunoterapii nowotworów.

1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA KOMÓREK NK

Komórki NK są limfocytami efektorowymi odporności wrodzonej, zaangażowanymi przede wszystkim w nadzór immunologiczny odpowiedzialny za eliminację komórek złośliwie transformowanych czy zainfekowanych wirusami lub bakteriami. Co istotne, by uruchomić reakcję immunologiczną skierowaną przeciwko zmienionym komórkom, limfocyty NK nie potrzebują wcześniejszej immunizacji, co stanowi o szybkości i skuteczności ich działania [2, 3]. Komórki NK stanowią blisko 10% wszystkich limfocytów krwi człowieka. Identyfikowane są na podstawie ekspresji antygenu powierzchniowego CD56 przy jednoczesnym braku ekspresji antygenu CD3 [4]. Dodatkowo charakteryzują się ekspresją receptorów: CD16, CD56 oraz CD57. Na podstawie ilości wyrażonego na ich powierzchni receptora CD56 wyodrębniono dwie główne subpopulacje tych komórek, co z kolei ma odzwierciedlenie w ich aktywności [5]. Pierwsza subpopulacja to komórki NK CD56^{bright}CD16⁻ (o dużej ekspresji receptora CD56 i braku ekspresji CD16), wytwarzające znaczne ilości cytokin. Druga subpopulacja to komórki NK CD56^{dim}CD16⁺ (o umiarkowanej ilości CD56, ale znacznej ekspresji CD16), wykazujące wyższą cytotoxycytność [6]. We krwi obwodowej najliczniejszą grupą są komórki o fenotypie

Tabela 1. Porównanie subpopulacji komórek NK CD56^{bright}CD16⁻ i CD56^{dim}CD16⁺

Cechy charakterystyczne	SUBPOPULACJA KOMÓREK NK	
	CD56 ^{bright} CD16 ⁻	CD56 ^{dim} CD16 ⁺
Ekspresja CD56	wysoka	umiarkowana
Ekspresja CD16	brak	znaczna
Działanie	wydzielanie dużych ilości cytokin	wysoka cytotoxycytność
Występowanie	krew obwodowa	tkanki i węzły chłonne

Przygotowano na podstawie danych z Cooper i wsp. 2001 [4] oraz Klingemann 2014 [5]

CD56^{dim}CD16⁺, ponieważ stanowią ok. 90% wszystkich komórek NK, natomiast pozostałe 10% to komórki CD56^{bright}CD16⁻, których siedliskiem są przede wszystkim tkanki zmienione chorobowo i węzły chłonne [4, 5]. Porównanie najistotniejszych cech i właściwości opisanych subpopulacji komórek NK zamieszczono w tab. 1.

Na powierzchni komórek NK obecne są zarówno receptory hamujące, jak i stymulujące ich odpowiedź immunologiczną. Do takich receptorów należą receptory KIR (ang. *killer cell immunoglobulin-like receptor*), które specyficznie rozpoznają allele MHC klasy I, w tym grupy HLA-A [7], HLA-B [8] i HLA-C [9]. Dobrze poznanymi receptorami z tej rodziny są KIR2D i KIR3D, które różnią się strukturalnie, odpowiednio dwiema lub trzema zewnątrzkomórkowymi domenami immunoglobulinopodobnymi. Ponadto zaopatrzone są w region transbłonowy oraz w region cytoplazmatyczny: długi – wtedy określane są mianem KIR2DL i KIR3DL – bądź krótki – wówczas nazywa się je KIR2DS i KIR3DS. Długie ogony generują sygnał hamujący, podczas gdy krótkie generują sygnał aktywujący [10].

Innymi receptorami znajdującymi się na powierzchni komórek NK są tzw. receptory naturalnej cytotoxycytności – NCR (ang. *natural cytotoxicity receptor*). Pełnią one funkcje aktywujące, pośrednicząc w mechanizmach cytotoxycytnych skierowanych przeciwko komórkom z niedoborem MHC klasy I lub całkowitym ich brakiem.

Istotną grupą receptorów obecnych na komórkach NK są receptory lektynowe CD94/NKG2. Z punktu widzenia medycyny interesujący jest fakt, iż receptory CD94/NKG2 wykrywają nieklasyczne cząsteczki HLA-E klasy I, które zazwyczaj występują na komórkach nowotworowych. Z uwagi na fakt, iż HLA-E wiąże peptydy liderowe pochodzące z HLA-A, HLA-B, HLA-C i HLA-G, receptor CD94/NKG2 posiada zdolność wykrywania wszystkich cząsteczek HLA klasy I występujących na powierzchni komórek [11].

Istnieją także inne receptory odpowiedzialne za aktywację komórek NK zarówno w sposób bezpośredni, jak i pośredni na drodze kostymulacji. Takimi cząsteczkami wyrażanymi w komórkach NK są m.in. LFA-1, dla których ligandem jest ICAM-1, CD2, łączący się z CD48 czy też CD16, który wiąże fragment Fc przeciwciał klasy IgG [12].

2. WŁAŚCIWOŚCI KOMÓREK NK O KLUCZOWYM ZNACZENIU W TERAPII NOWOTWORÓW

Limfocyty NK unicestwiają zmienione nowotworowo własne komórki organizmu w sposób bezpośredni bądź pośredni dzięki zaangażowaniu innych komórek immunokompetentnych. W bezpośrednie mechanizmy zabijania wpisuje się proces naturalnej cytotoxycytności, cytotoxycytności zależnej od przeciwciał oraz cytotoxycytności indukowanej, np. przez cząsteczki FasL czy TRAIL za pośrednictwem tzw. receptorów śmierci. Komórki NK wykrywają transformowane komórki głównie dzięki występującym na ich powierzchni zmienionym lub obcym antygenom, których rozpoznanie przez specyficzne receptory komórek NK uruchamia kaskadę zmian prowadzących do pobudzenia podziałów i/lub aktywności tychże komórek. Ten sam efekt bardzo często jest indukowany brakiem konkretnych antygenów w komórkach nowotworowych. Pobudzone NK lizują komórki nowotworowe poprzez perforację ich błon bądź też indukują ich programowaną śmierć, tj. apoptozę. Kluczowe znaczenie w pośrednich mechanizmach nadzoru immunologicznego guza odgrywają dwukierunkowe interakcje NK z komórkami dendrytycznymi, limfocytami T i B, a także makrofagami, w następstwie których uwalniane są cytokiny, które z jednej strony mobilizują ww. komórki, a z drugiej pobudzają je do efektywnego niszczenia komórek nowotworowych [2].

3. DEFINICJA ORAZ PODSTAWY IMMUNOTERAPII NOWOTWORÓW

Proces nowotworzenia jest zjawiskiem niezwykle skomplikowanym i wieloetapowym. U podłoża rozwoju nowotworu leżą pojedyncze, własne komórki organizmu, które w wyniku modyfikacji genetycznych o różnym podłożu zaczynają dzielić się w niekontrolowany sposób, zyskując nieśmiertelność oraz uzyskując zdolność do naciekania okolicznych tkanek i w efekcie do rozprzestrzeniania się po organizmie. Termin „nowotwór” odnosi się do wielu chorób charakteryzujących się rozwojem nieprawidłowych komórek, które dzielą się

w niekontrolowany sposób i mają zdolność infiltracji i niszczenia prawidłowych tkanek. Komórki nowotworowe często mają zdolność rozprzestrzeniania się po całym ciele, tworząc przerzuty. Ponadto na ich powierzchni zaczynają pojawiać się zmienione lub obce antygeny, jak również zanikają cząsteczki charakterystyczne dla własnych komórek organizmu. Wspomniane zmiany z reguły rozpoznawane są przez układ odpornościowy, pozwalając mu na skuteczną walkę ze zmienionymi, a tym samym obcymi, komórkami. Jednakże rozwijający się nowotwór, stosując różne mechanizmy masywne, dąży do ucieczki przed układem immunologicznym, co warunkuje nierozpoznawalność komórek złośliwie transformowanych. Na niniejszej „nierozpoznawalności” skupia się, zyskująca coraz większe znaczenie w dzisiejszej onkologii, immunoterapia nowotworów. Głównym celem immunoterapii jest usprawnienie, a czasami wręcz przywrócenie, sprawnego funkcjonowania naturalnych mechanizmów obronnych organizmu. Komórki NK dzięki specyficznym właściwościom, a mianowicie umiejętności wiązania niespecyficznych antygenów, zdolności rozpoznawania i lizowania transformowanych komórek bez wcześniejszego uczulenia, ograniczonej długości życia zapobiegającej ich transformacji mogącej prowadzić do atakowania własnych komórek organizmu, a także łatwości izolowania oraz możliwości ekspansji *ex vivo*, tzn. namnażania i aktywacji za pomocą kombinacji odpowiednich cytokin i warstw komórek wspomagających, w ostatnich latach stały się niezastąpionym i bardzo skutecznym narzędziem wspomnianej immunoterapii [3, 13, 14]. W rozdziale poniżej przedstawiono najpopularniejsze możliwości wykorzystania komórek NK w terapii nowotworów.

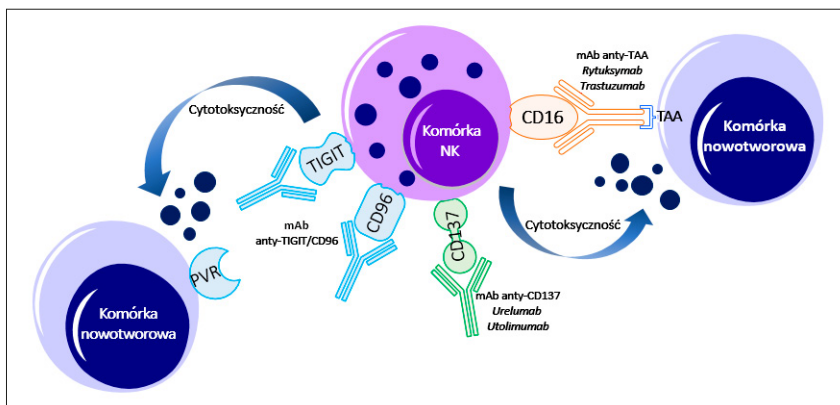
4. IMMUNOTERAPIA NOWOTWORÓW Z WYKORZYSTANIEM KOMÓREK NK

4.1. Cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał (ADCC – *antibody dependent cellular cytotoxicity*)

Cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał (ADCC) jest mechanizmem immunologicznym, za pomocą którego komórki efektorowe z receptorem Fc mogą rozpoznawać

i zabijać opłaszczone przeciwciałami komórki docelowe, które wyrażają na swojej powierzchni antygeny obcego pochodzenia, m.in. białka patogenów lub białka charakterystyczne dla komórek nowotworowych [15]. Kluczowe znaczenie w mechanizmie cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał ma obecność receptora CD16 (FcγR IIIA), wyrażonego głównie w komórkach NK o fenotypie CD56^{dim}. CD16 stanowi jedyny receptor umożliwiający samoczynną aktywację komórek NK [16]. ADCC jest wyzwalana po związaniu przez CD16 przeciwciał pokrywających komórki docelowe. Wykazano, że komórki NK traktowane monoklonalnymi przeciwciałami terapeutycznymi, takimi jak *Rytuksymab* lub *Trastuzumab*, rozpoznającymi antygeny związane z nowotworem (TAA – *tumor-associated antigens*), przyczyniają się do powstania odpowiedzi immunologicznej [17, 18]. Szczególnie skuteczną reakcję układu immunologicznego zaobserwowano u pacjentów z genotypem CD16A158V/V, który dyktuje wyższe powinowactwo CD16 dla IgG [19–21].

Należy zauważyć, że aktywacja receptora CD16 indukuje ekspresję koreceptorów na powierzchni komórek NK. Pojawiające się koreceptory są odpowiedzialne za aktywację lub hamowanie cytotoksyczności komórek NK, np. CD137 należący do nadrodziny receptorów czynnika martwicy nowotworów ma charakter stymulujący, natomiast receptor programowanej śmierci (PD-1) i immunoreceptor komórek T z domenami Ig i ITIM (TIGIT) mają charakter hamujący. W konsekwencji ekspresja wspomnianych koreceptorów stanowi kolejny regulacyjny punkt kontrolny dla reakcji ADCC z udziałem komórek NK. Zarówno agonistyczne przeciwciała CD137, jak i przeciwciała TIGIT/CD96 blokujące rozpoznawanie ligandu na komórkach nowotworowych wykazują aktywność synergistyczną do przeciwciał anti-TAA, który to efekt zaobserwowano w badaniach przedklinicznych raka piersi [22], raka głowy i szyi oraz raka jelita grubego [23], chłoniaka [24]. *Urelumab* i *Utolimumab* są przeciwciałami współdziałającymi z CD137, testowanymi w I fazie prób klinicznych w leczeniu guzów litych i nowotworów hematologicznych w połączeniu z różnymi przeciwciałami monoklonalnymi anti-TAA [25]. Mechanizm cytotoksyczności komórek NK zależnej od przeciwciał zaprezentowano na ryc. 1.



Rycina 1. Mechanizm cytotoksyczności komórek NK zależnej od przeciwciał

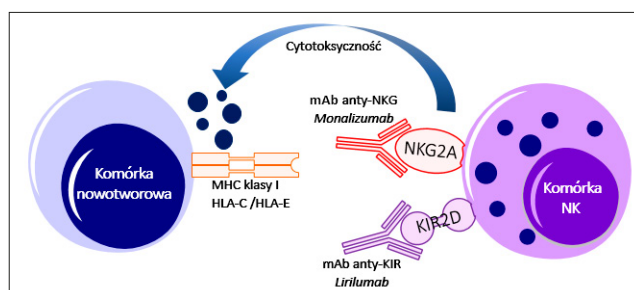
Aktywacja komórek NK przez receptor CD16 indukuje ekspresję koreceptorów aktywujących (CD137) i hamujących (TIGIT). Zarówno przeciwciała agonistyczne CD137 (*Urelumab* i *Utolimumab*), jak i przeciwciała TIGIT/CD96 blokujące rozpoznawanie ligandów (PVR) na komórkach nowotworowych wykazują działanie synergistyczne z działaniem przeciwciał anti-TAA (*Rytuksymab*, *Trastuzumab*), rozpoznającym antygeny związane z nowotworem. Blokowanie wymienionych receptorów stymuluje cytotoksyczność komórek NK. mAb – przeciwciało monoklonalne.

Przygotowano na podstawie informacji zawartych w: Awasthi i wsp. 2015 [17], Arnould i wsp. 2006 [19] oraz Muntasell i wsp. 2017 [25].

4.2. Blokowanie receptorów hamujących

Przeciwciała terapeutyczne o zdolności do blokowania receptorów hamujących, specyficznych dla HLA-I stymulują cytotoksyczność komórek NK w stosunku do komórek, którym brakuje markerów „własnych” MHC klasy I. Niniejszy mechanizm pełni istotną rolę w odpowiedzi przeciwnowotworowej organizmu, gdyż komórki NK wykorzystują go do niszczenia komórek transformowanych z ekspresją MHC klasy I, których limfocyty T nie są zdolne rozpoznawać i wyeliminować [26]. Co istotne, blokada receptorów hamujących, pomimo silnej reaktywności wobec nowotworów wykazujących ekspresję MHC klasy I, nie powoduje ataku na normalne komórki, co zbadali Vahlne i wsp. na komórkach linii chłoniaka [27]. *Lirilumab* (IPH2102) i *Monalizumab* (IPH2201) są przeciwciałami monoklonalnymi, które odpowiednio hamują KIR2D (w tym KIR2DL1–3/S1–2) oraz funkcję receptora NKG2A. Ich powstanie miało na celu powstrzymanie hamowania komórek NK za pośrednictwem HLA-C lub HLA-E, przy jednoczesnym zwiększeniu dostępności liganda do aktywacji receptorów o wspólnej specyficzności, w tym receptora NKG2C i promowaniu indukcji innych receptorów aktywujących NKR (tj. NCR i NKG2D). W badaniach przedklinicznych wykazano, że zarówno *Lirilumab*, jak i *Monalizumab* zwiększają odpowiedź komórek NK przeciwko HLA-I komórek nowotworowych [28]. Przeciwciała *Lirilumab* anty-KIR drugiej generacji zostało przebadane w badaniach klinicznych I fazy pod kątem bezpieczeństwa u pacjentów z nowotworami hematologicznymi, takimi jak ostra białaczka szpikowa (AML), przewlekła białaczka limfocytowa (CLL), chłoniak nieziarniczy (NHL), oraz pacjentów z guzami litymi, w tym rakiem piersi, jajników, trzustki i endometrium [29]. Pomimo ograniczonej skuteczności tych przeciwciał w monoterapiach we wczesnych fazach badań klinicznych, przeciwciała anty-KIR mogą być stosowane z innymi środkami w terapiach skojarzonych. Łączne użycie mAb anty-KIR z przeciwciałami *Lenalidomid*, *Rytuksymab* lub *Daratumumab* przyniosło obiecujące wyniki u pacjentów ze szpiczakiem mnogim i chłoniakiem [30]. Blokujące przeciwciała monoklonalne *Monalizumab* rozpoznające NKG2A jest obecnie testowane w kilku badaniach klinicznych I/II fazy pod kątem bezpieczeństwa i aktywności przeciwnowotworowej w różnych nowotworach, w tym w przewlekłej białaczce limfocytowej, płaskonabłonkowym raku rejonu głowy i szyi, nowotworach ginekologicznych i zaawansowanych stadiach raka okrężnicy [31]. Wstępny wynik badań klinicznych II fazy, obejmujących określenie efektów leczenia skojarzonego *Monalizumabem* z *Cetuxymabem* u pacjentów cierpiących na płaskonabłonkowego raka rejonu głowy i szyi, wykazały pozytywną odpowiedź na terapię u 31% pacjentów [30]. Mechanizm cytotoksyczności komórek NK indukowany blokowaniem receptorów hamujących, specyficznych dla HLA-I zaprezentowano na ryc. 2.

Istotnym mechanizmem immunoterapii nowotworów z wykorzystaniem komórek NK jest zakłócanie działania obecnych na ich powierzchni indukowanych receptorów hamujących, m.in. receptora CD96 i TIGIT. Są to receptory koinhibujące, preferencyjnie wyrażane w ludzkich komórkach NK i T, które rozpoznają nektynę i ligandy podobne do nekty, występujące na powierzchni różnych typów komórek nowotworowych [32]. TIGIT odpowiedzialny jest również za spadek liczby limfocytów T pomocniczych oraz limfocytów T regulatorowych w tkankach dotkniętych nowotworem. Na komórkach NK, TIGIT jest wyrażany po aktywacji,

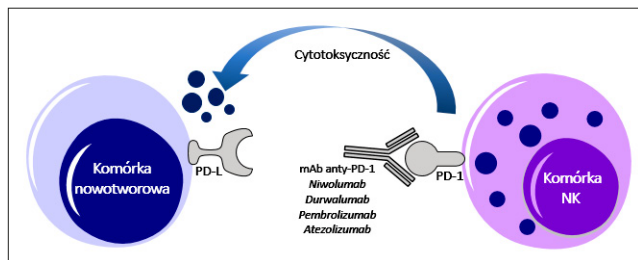


Rycina 2. Mechanizm cytotoksyczności komórek NK indukowany blokowaniem receptorów hamujących, specyficznych dla HLA-I. Przeciwciała *Monalizumab* i *Lirilumab* blokując obecne na powierzchni komórek NK, odpowiednio receptory NKG2A i KIR2D, uniemożliwiają im rozpoznawanie i wiązanie występujących na powierzchni komórek nowotworowych cząsteczek MHC klasy I (HLA-C lub HLA-E). W konsekwencji dochodzi do zablockowania sygnału hamującego cytotoksyczność komórek NK względem komórek nowotworowych z ekspresją MHC klasy I. mAb – przeciwciała monoklonalne. Przygotowano na podstawie informacji zawartych w: Vey i wsp. 2018 [29] oraz Zaghi i wsp. 2019 [31].

podczas gdy ekspresja CD96 ma charakter konstytutywny [33]. Obie cząsteczki wykazują wysokie powinowactwo do PVR (CD155), aczkolwiek z różnymi konsekwencjami dla funkcji komórek NK. Wiązanie TIGIT z PVR obniża cytotoksyczność komórek NK poprzez aktywację DNAM-1 (CD226), natomiast CD96 zmniejsza wytwarzanie IFN-γ przez komórki NK [34, 35]. Co ciekawe, w trzech badaniach przedklinicznych z wykorzystaniem linii komórek czerniaka, raka płuc i raka prostaty wykazano, że podanie przeciwciał rozpoznających CD96 zwiększa zdolność komórek NK do przeciwdziałania przerzutom dzięki hamowaniu interakcji CD96-CD155. Blokowanie CD96 u myszy, których komórki NK pozbawione były receptora TIGIT, zwiększało ich zdolność do przeciwdziałania przerzutom w porównaniu z myszami typu dzikiego. Wykazano również, iż jednocześnie blokowanie CD96 i PD-1 silnie hamowało przerzuty poprzez promowanie napływu komórek NK oraz zwiększoną miejscową produkcję IFN-γ [36]. Niedawno wykazano, że hamowanie aktywności cytotoksycznej komórek NK przez mieloidalne komórki supresorowe również było następstwem wiązania TIGIT/PVR, aczkolwiek ten niepożądany efekt został pomyślnie zniesiony po zablockowaniu TIGIT [37].

Innym interesującym celem immunoterapii nowotworów jest blokowanie przekazywania sygnałów za pośrednictwem receptora programowanej śmierci (PD-1). Ekspresję PD-1 odnotowano w subpopulacji dojrzałych komórek NK CD56^{dim} z fenotypem NKG2A^{neg}KIR⁺. Komórki NK PD-1⁺ wykazywały słabą aktywność przeciwnowotworową i niską proliferację indukowaną cytokinami. Zakłócanie interakcji PD-1/PD-L nasilało aktywność cytotoksyczną komórek NK, zwiększając ich użyteczność terapeutyczną [38]. Badania Benosna i wsp. wykazały, że blokowanie receptora PD-1 powodowało zwiększenie liczby komórek NK PD-1⁺ krążących we krwi obwodowej u pacjentów ze szpiczakiem mnogim [39]. Pierwszym środkiem zakłócającym PD-1/PD-L, zatwierdzonym do leczenia guzów litych był *Niwolumab* – przeciwciała skierowane przeciwko PD-1 [40]. Następnie wprowadzono do praktyki klinicznej kilka blokerów ścieżki PD-1/PD-Ls, takich jak *Durwalumabem*, *Pembrolizumabem* czy *Atezolizumabem*, natomiast wiele innych jest obecnie testowanych w leczeniu nowotworów litych i hematologicznych, w tym niedrobnego komórkowego raka płuc (NSCLC), czerniaka, raka głowy i szyi, raka nerki oraz chłoniaka [41, 42]. Ponadto przedmiotem badań klinicznych były również

terapię skojarzoną wykorzystującą kombinację *Niwolumabu* lub chemioterapia na bazie przeciwciał anti-PD-1 *Pembrolizumabem* w połączeniu z platyną lub chemioterapia oparta na wykorzystaniu platyny w połączeniu z przeciwciałem anti-PD-L1 *Atezolizumabem* i przeciwciałem *Bewacyzumabem* o właściwościach antyangiogennych. Możliwe że to właśnie one mogą zyskać znaczącą rolę w praktyce klinicznej w nadchodzących latach [40, 42]. Mechanizm cytotoxyczności komórek NK indukowany blokowaniem interakcji PD-1/PD-L zaprezentowano na ryc. 3.



Rycina 3. Mechanizm cytotoxyczności komórek NK indukowany blokowaniem interakcji PD-1/PD-L

Przeciwciała *Niwolumab*, *Durvalumab*, *Pembrolizumab* i *Atezolizumab* blokują receptor PD-1 (receptor programowanej śmierci komórek), uniemożliwiając mu rozpoznanie i związanie z ligandem PD-L, obecnym na powierzchni komórek nowotworowych. Zaburzenie interakcji PD-1-PD-L uniemożliwia wygenerowanie sygnałów hamujących proliferację, aktywację oraz cytotoxyczność komórek NK skierowaną przeciwko komórkom nowotworowym z ekspresją PD-L. mAb – przeciwciała monoklonalne.

Przygotowano na podstawie informacji zawartych w: Pesce i wsp. 2019 [40], Antonia i wsp. 2018 [41], oraz Simsek i wsp. 2019 [42].

Kolejnym wartym przywołania celem immunoterapii nowotworów jest cząsteczka CD137, wyrażana w aktywowanych komórkach T, NKT i NK [43]. Badania komórek pobranych ze szpiku osób z ostrą białaczką szpikową (AML) wykazały, że podanie przeciwciał monoklonalnych anti-CD137 zwiększało aktywację i przeżycie limfocytów T, jak również pobudzało funkcje komórek NK. Blokada interakcji CD137-CD137L indukowała uwalnianie cytokin immunomodulacyjnych IL-10 i TNF przez komórki AML i zmniejszała cytotoxyczność komórek NK oraz ich zdolność do wytwarzania INF- γ . Wskutek uwalniania ww. czynników immunosupresyjnych hamowane były również funkcje komórek dendrytycznych, co zostało pomyślnie zniesione po zablokowaniu CD137 [44]. Co ciekawe, przeciwciała anti-CD137 stymulowały odpowiedź ADCC z udziałem komórek NK, zwiększając skuteczność przeciwciał monoklonalnych rozpoznających TAA w modelach przedklinicznych [22]. W badaniach klinicznych z udziałem pacjentów cierpiących na raka piersi oraz raka głowy i szyi leczonych przeciwciałami monoklonalnymi anti-TAA zaobserwowano wzrost ekspresji CD137 na komórkach NK *ex vivo* oraz będącą jego następstwem indukcję ADCC [22].

4.3. Stymulacja cytokinami

Do najlepiej poznanych i udokumentowanych naturalnych stymulatorów komórek NK należą IL-2 oraz IL-15. Obie cytokiny wzmacniają aktywność efektorową komórek NK oraz pobudzają ich proliferację. IL-2 jednocześnie stymuluje limfocyty T – zarówno regulatorowe, jak i pomocnicze. IL-15 natomiast wspiera rozwój limfocytów T pamięci i jest niezbędna dla utrzymania homeostazy ludzkich komórek NK [45]. Indukowana obecnością IL-2 oraz IL-15 proliferacja, przeżycie i cytotoxyczność komórek NK odbywa się

głównie dzięki przekazywaniu sygnałów w szlaku JAK/STAT, którego kluczowym elementem jest STAT5, zwany transduktorem sygnału i aktywatorem transkrypcji 5 [46]. Aktywację STAT5 poprzedza jego fosforylacja przez kinazy Janus (JAK1 i JAK3), co inicjuje wiązanie IL-2 i IL-15 z ich wspólną podjednostką receptora (IL-2/IL-15R β) [47]. Wiązanie o wysokim powinowactwie wymaga specyficznych łańcuchów α (IL-2/IL-15R α), których zróżnicowanie wśród leukocytów częściowo odpowiada za udział IL-2 i IL-15 w różnorodnych funkcjach biologicznych [48].

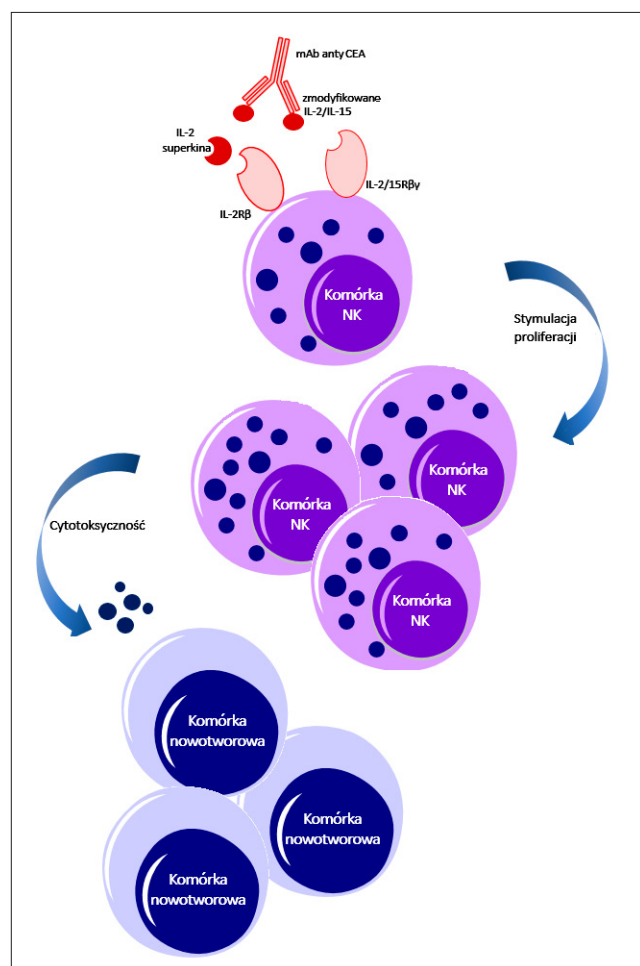
Uzyskano zgodę FDA (Food and Drug Administration – Agencja Żywności i Leków) na zastosowanie leczenia IL-2 w terapii raka nerki, a także czerniaka już w 1992 roku, osiągając obiecujące wyniki kliniczne, choć często pojawia się ryzyko ciężkiej, zagrażającej życiu toksyczności [49]. Poza toksycznością, IL-2 wykazuje krótki okres półtrwania *in vivo* i – co groźniejsze – może stymulować wzrost i rozwój nowotworu przez utrzymywanie regulatorowych komórek T pomocniczych i promowanie śmierci indukowanej aktywacją (AICD – ang. *activation-induced cell death*) w efektorowych komórkach T. Aby przeciwdziałać wspomnianym niepożądanym efektom, zaprojektowano IL-2 – „superkinę” o zwiększonym powinowactwie do IL-2R β . Leczenie superkiną promowało proliferację komórek T cytotoxycznych bez znaczącego wpływu na pulę limfocytów T regulatorowych i przezwyściżyło anergię komórek NK, wzmacniając odpowiedź przeciwnowotworową w modelach przedklinicznych [50, 51]. Ponadto chimeryczna postać zmodyfikowanej IL-2, poddana fuzji z przeciwciałami swoistymi dla antygenu karcinoembrionalnego (CEA – *carcino-embryonic antigen*) lub z białkiem aktywującym fibroblasty (FAP – *fibroblast activation protein*) weszła w I fazę badań klinicznych. Obecnie w licznych badaniach klinicznych testowane są: niska dawka IL-2 zarówno w formie monoterapii, jak i w połączeniu z w formie monoterapii lub w połączeniu z adoptywnym transferem komórek NK i T jako szczepionki [52].

Obserwacje przedkliniczne potwierdziły aktywność przeciwnowotworową IL-15. Pierwsze badania kliniczne z IL-15 podawaną dożylnie pacjentom w zaawansowanych stadiach (z przerzutami) raka nerki i czerniaka złośliwego wykazały ekspansję komórek NK i limfocytów T cytotoxycznych [53]. Obecnie IL-15 jest testowana w wielu próbach klinicznych jako adiuwant w terapiach adoptywnych bazujących na komórkach T i NK, jak również w połączeniu z przeciwciałami anti-TAA w zaawansowanych nowotworach litych i hematologicznych [25].

Mechanizm aktywacji komórek NK zmodyfikowanymi cytokinami zaprezentowano na ryc. 4.

4.4. Modyfikacje genetyczne komórek NK

Ogromny potencjał ma również wykorzystanie w immunoterapii nowotworów genetycznie zmodyfikowanych komórek NK. Niektóre nowotwory są odporne na lizę za pośrednictwem komórek NK, pomimo braku MHC klasy I na ich powierzchni. Dlatego modyfikacja genetyczna komórek NK może wzmacnić ich cytotoxyczność wobec komórek docelowych opornych na ich działanie, przez przezwyciężenie sygnałów hamujących. Stosowane modyfikacje genetyczne ukierunkowane są na: 1) indukcję proliferacji lub przeżycia komórek NK poprzez transfer genu dla cytokin; 2) nadekspresję receptorów aktywujących; 3) wyciszenie receptorów hamujących; 4) zwiększenie zdolności komórek



Rycina 4. Mechanizm aktywacji komórek NK zmodyfikowanymi cytokinami IL-2 oraz IL-15 promują proliferację komórek NK, ich przeżycie i cytotoksyczność. Szczególnie skutecznie aktywność komórek NK w rozpoznawaniu i eliminacji komórek nowotworowych pobudzają: superkina – zmodyfikowana IL-2 o zwiększonym powinowactwie do receptora IL-2Rβ oraz zmodyfikowane IL-2/IL-15, poddane fuzji z przeciwciałami swoistymi dla antygenu karcynembrionalnego (CEA). mAb – przeciwciało monoklonalne. Przygotowano na podstawie informacji zawartych w: Muntasell i wsp. 2017 [25], Tonn i wsp. 2013 [48], oraz García-Martínez i wsp. 2018 [52].

NK do rozpoznawania jako obce komórek nowotworowych, poprzez ekspresję chimericznych receptorów specyficznych dla antygenów nowotworowych [54–56].

Jak wspomniano wcześniej, komórki NK są zależne od cytokin, takich jak IL-2, IL-12 i IL-15, które są istotne dla ich przeżycia, proliferacji i cytotoksyczności. Suplementacja egzogennymi cytokinami jest zatem potrzebna do podtrzymania ich aktywności. Aczkolwiek ogólnoustrojowe podawanie np. cytokiny IL-2 związane jest z niepożądaną ekspansją limfocytów T regulatorowych. Dlatego poszukuje się alternatywnych metod dostarczania cytokin stymulujących aktywność NK [56]. Efekt ten uzyskano przez dostarczanie do komórek NK linii NK-92 genu dla IL-2 na drodze transdukcji z wykorzystaniem retrowirusów oraz transfekcji za pośrednictwem cząstek cDNA, co umożliwiło badanym limfocytom wydzielanie IL-2 w sposób autokryny [57]. Dodatkowo ww. procedura spowodowała zwiększoną aktywność cytotoksyczną komórek NK-92 *in vitro* i *in vivo*. W podobny sposób postąpiono z genem dla IL-15, w rezultacie komórki NK wykazywały zwiększone tempo proliferacji i silniejszą aktywność cytotoksyczną [58]. Z wyżej opisanych badań wynika, iż transfer genów dla cytokin indukuje proliferację

komórek NK i zwiększa ich zdolność przeżycia, tym samym nasilając ich aktywację.

Inne metody modyfikacji koncentrują się na wzmocnieniu zdolności komórek NK do rozpoznawania zmienionych komórek, w tym komórek nowotworowych, poprzez konstruowanie chimericznych receptorów antygenowych, tzw. CARs (ang. *chimeric antigen receptor*). Efektem tych zabiegów jest powstanie komórek oznaczanych jako CAR-NK. Modyfikacje CAR limfocytów T (CAR-T) były już wcześniej z powodzeniem stosowane u pacjentów z zaawansowaną białaczką [59]. Konstruowanie CAR polega na fuzji receptora zmiennego jednołańcuchowego fragmentu, specyficznego dla określonego antygenu, związanego z nowotworem z częścią wewnątrzkomórkową cząsteczki sygnalizacyjnej CD3ζ. Wykazano, że receptory chimeryczne rozpoznające antygen karcynembrionalny (CEA) [60] i CD33 [61], wprowadzone do komórek NK, zwiększają ich swoistą cytotoksyczność zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Ponadto, linia komórkowa NK-92, transdukowana chimerycznym receptorem dla CD20 [62] oraz CD19, także wykazywała zwiększoną cytotoksyczność [63]. Dodatkowo ludzkie komórki NK zmodyfikowane w celu ekspresji chimericznego receptora dla Her2/neu, również wykazały zwiększoną cytotoksyczność wobec komórek raka piersi linii Her2+ zarówno w badaniach *in vitro*, jak i w modelach heteroprzeszczepu [64, 65]. Podobne wyniki obserwowano w przypadku zmodyfikowanych mysich komórek NK [66]. Powyższe badania wskazują, iż adoptywny transfer chimericznych komórek NK specyficznych dla antygenów nowotworowych może być skutecznym narzędziem w immunoterapii nowotworów. Należy zauważyć, iż komórki NK – ze względu na ograniczoną długość życia oraz wysoką specyficzność działania – niszczą jedynie komórki zmienione nowotworowo lub zainfekowane, będą znacznie lepszym niż limfocyty T materiałem wyjściowym do tworzenia komórek CAR-pozytywnych. Ponadto, w odróżnieniu od limfocytów T, komórki NK nie powodują hipercytokinemii, tzw. burzy cytokin, która często prowadzi do ciężkich powikłań po wprowadzeniu komórek CAR-T [67].

4.5. Wykorzystanie egzogennych komórek NK

U osób chorujących na nowotwór często stwierdza się obniżoną liczbę, a tym samym aktywność komórek NK. Stąd też podawanie tym pacjentom komórek NK wydaje się być atrakcyjną strategią leczniczą. Terapia adoptywna może być traktowana jako strategia przy zastępowaniu, naprawianiu bądź ulepszaniu funkcji biologicznej układu odpornościowego za pomocą komórek autologicznych lub allogenicznych. Terapia obejmuje usunięcie lub wzmocnienie poszczególnych populacji komórek, ekspansję komórek krwiotwórczych, aktywację komórek NK za pośrednictwem immunoterapii i modyfikacji genetycznej [14]. Początkowe badania nad komórkami NK miały na celu poprawę aktywności przeciwnowotworowej endogennych komórek NK i promowanie ich proliferacji poprzez podawanie cytokin ogólnoustrojowo, w celu wytworzenia komórek LAK (ang. *large activated killers*), będących subpopulacją komórek NK aktywowanych limfokinami. W innych, późniejszych badaniach LAK były traktowane wysokimi i niskimi dawkami IL-2. Duże ilości IL-2 prowadziły do znacznej toksyczności, w tym zespołu przecieku naczyniowego i niekorzystnego wpływu na serce, a ponadto indukowały śmierć komórek NK [14]. Natomiast niewielkie dawki IL-2 selektywnie zwiększały liczbę komórek NK CD56^{bright} o niższej cytotoksyczności [68]. W obu

badaniach doszło do wytworzenia reakcji immunologicznej, niemniej jednak znacznie bardziej pożądane efekty uzyskano podczas podawania egzogennych komórek NK aktywowanych IL-2 niż w sytuacji systematycznego podawania IL-2 bezpośrednio do ustroju. W ostatniej dekadzie, na skutek lepszego zrozumienia biologii i rozwoju komórek NK, opracowano efektywne procedury izolacji i ekspansji komórek NK, które pozwoliły na otrzymanie zmodyfikowanych komórek o satysfakcjonującej jakości klinicznej. Niniejsze strategie obejmują wytwarzanie komórek NK z hematopoezycznych komórek macierzystych pochodzących ze szpiku kostnego lub krwi pępowinowej. W hodowlach stosuje się kombinację cytokin i linii komórek wspomagających (tzw. *feeder cells*, stanowiących warstwę odżywczą) w celu różnicowania komórek macierzystych krwi pępowinowej (UCBCs), zmobilizowanych komórek macierzystych krwi obwodowej (PBSCs), embrionalnych komórek macierzystych (ESCs) oraz indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSCs) w populację komórek NK [55]. Komórki NK, izolowane od dawców autologicznych lub allogenicznych przez aferezę, poddawane są ekspansji lub modyfikacji genetycznej w celu zwiększenia ich zdolności do efektywnego rozpoznawania i niszczenia komórek nowotworowych. Terapia wykorzystująca autologiczne komórki NK obejmuje izolację od chorego jego własnych komórek, natomiast pozyskiwane w terapiach allogenicznych komórki NK pozyskiwane są od zdrowego dawcy. Opisane zabiegi określa się mianem transferu adoptywnego.

Dotychczasowe badania nad możliwością wykorzystania terapii adoptywnej w leczeniu nowotworów wykazały, że uzyskane komórki NK znacznie poprawiają odpowiedź immunologiczną na różnego typu nowotwory, m.in. raka nerki, glejaka, raka sutki, a przy tym nie powodują niepożądanych skutków ubocznych [54]. Jednakże zaobserwowano, że w niektórych terapiach autologicznych zmodyfikowane komórki NK miały upośledzoną aktywność cytotoksyczną i w konsekwencji nie były skuteczne po podaniu pacjentom cierpiącym na nowotwory [69]. Zjawisko to częściowo wynika z obniżonej zdolności do zabijania przez autologiczne komórki NK, w wyniku rozpoznania własnych cząsteczek MHC klasy I na komórkach nowotworowych przez obecne na komórkach NK hamujące receptory KIR, co prowadzi do zahamowania aktywności cytotoksycznej tych limfocytów i przeżycia rozpoznanej komórki nowotworowej [70]. W związku z powyższym allogeniczne komórki NK są bardziej skuteczne, gdyż są one podawane z pewną niezgodnością w kontekście MHC klasy I, występujących na komórkach nowotworowych i w konsekwencji receptory hamujące KIR komórek NK, nie mogąc rozpoznać ww. cząsteczek, nie wytwarzają sygnałów hamujących i zabijają rozpoznane komórki nowotworowe. Wynika z tego, iż niedopasowanie: ligand KIR/receptor KIR jest warunkiem koniecznym do uzyskania allorektywnej populacji komórek NK i w konsekwencji do wywołania pożądanej odpowiedzi ze strony układu odpornościowego. Niniejsza alloreaktywność jest zatem warunkowana brakiem u biorcy jednego lub więcej ligandów KIR obecnych u dawcy [55]. Pionierska praca Ruggeriego i wsp. pokazała, że niedopasowanie KIR wiązało się z lepszymi wynikami w leczeniu białaczki. U wszystkich pacjentów, którzy otrzymali szpik z częściową niezgodnością MHC klasy I, przez pięć lat nie nastąpiła progresja choroby, taki sam efekt uzyskano jedynie u 25% pacjentów, którzy otrzymali szpik zgodny w układzie cząsteczek MHC klasy I [71].

Inną atrakcyjną strategią pozyskiwania komórek NK, stwarzającą możliwość ich wykorzystania w transferze adoptywnym, jest zastosowanie linii komórkowych np.: NK-92, YT, NKL, HANK-1, KHYG-1, NK-YS i NKG [72]. Jedną z najlepiej opisanych pod względem aktywności przeciwnowotworowej jest linia komórek NK-92 [72]. Komórki tej linii wyprowadzono z krwi obwodowej mężczyzny rasy kaukaskiej, chorującego na złośliwego chłoniaka nieziarniczego. Komórki linii NK-92 posiadają zarówno cechy komórek NK, tj. cytotoksyczność i zdolność wytwarzania cytokin, jak i komórek złośliwych, tj. nieograniczony potencjał replikacyjny. Linia NK-92 wykazuje fenotyp populacji $CD56^{bright}CD16^{-}KIR^{-}$ zależny od IL-2, jak również charakterystyczny dla fenotypu $CD56^{dim}CD16^{+}$ wysoką cytotoksyczność wobec różnych typów nowotworów [73]. Te nietypowe właściwości komórek linii NK-092 tłumaczy brak wspólnych receptorów KIR, przy zachowaniu pełnej ekspresji receptorów aktywujących. Ponadto komórki tej linii wytwarzają duże ilości perforyny i granzymów, jak również cytotoksycznych cząsteczek efektorowych, np. TNF α , FasL, TRAIL [74]. Ponadto komórki NK-92 można łatwo oraz z wysoką wydajnością transfekować i w efekcie tworzyć opisane wcześniej komórki CAR-NK [75]. Komórki NK-92 jak na razie są jedyną linią komórek NK w badaniach klinicznych i w konsekwencji największe nadzieje wiąże się z wykorzystaniem właśnie ich w immunoterapii nowotworów o różnym pochodzeniu [76].

PODSUMOWANIE

Najnowsze doniesienia wskazują, że w najbliższych latach immunoterapia zdominuje leczenie nowotworów i będzie wykorzystywana w połowie diagnozowanych przypadków. Z uwagi na właściwości biologiczne oraz możliwości skutecznej i w miarę bezpiecznej modyfikacji komórki NK zajmą ważne miejsce w immunoterapii nowotworów. Niemniej jednak zanim to nastąpi, konieczne jest obniżenie kosztów takiej terapii oraz przeprowadzenie analizy potencjalnych reakcji krzyżowych z innymi strategiami leczniczymi, w tym z chemioterapią.

PIŚMIENICTWO

1. Wojciechowska U, Czderny K, Ciuba A, Olasek P, Didkowska J. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2016 roku. Krajowy Rejestr Nowotworów; 2018.
2. Bodduluru LN, Kasala ER, Madhana RM, Sriram CS. Natural killer cells: The journey from puzzles in biology to treatment of cancer. *Cancer Lett.* 2015; 357(2): 454–67. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.12.020>.
3. Geller MA, Miller JS. Use of allogeneic NK cells for cancer immunotherapy. *Immunotherapy.* 2011; 2(12): 1445–59. <https://doi.org/10.2217/imt.11.131>
4. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. Biology of human natural killer cell subsets. *Trends Immunol.* 2001; 22(11): 633–40.
5. Klingemann H. Are NK cells superior CAR drivers? *Oncoimmunology.* 2014; 3:e28147. <https://doi.org/10.4161/onci.28147>
6. Gołab J, Jakóbsiak M, Lasek W, Stokłosa T. Immunologia. Jakóbsiak M, Lasek W. Populacje i subpopulacje limfocytów. Immunologia nowotworów, wyd. 6, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2014: 137–173, 450–467.
7. Dohring C, Scheidegger D, Samaridis J, Cella M, Colonna M. A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J Immunol.* 1996; 156(9): 3098–101.
8. Litwin V, Gumperz J, Parham P, Phillips JH, Lanier LL. NKBI: a natural killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules. *J Exp Med.* 1994; 180(2): 537–43. <https://doi.org/10.1084/jem.180.2.537>

9. Moretta A, Bottino C, Pende D et al. Identification of four subsets of human CD3–CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J Exp Med.* 1990; 172(6): 1589–98. <https://doi.org/10.1084/jem.172.6.1589>
10. Vales-Gomez M, Reyburn HT, Mandelboim M, Strominger JL. Kinetics of interaction of HLA-C ligands with natural killer cell inhibitory receptors. *Immunity.* 1998; 9(3): 337–44.
11. Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE, Brooks AG. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J Exp Med.* 1998; 187(5): 813–8. <https://doi.org/10.1084/jem.187.5.813>
12. Lanier LL, Rutenbergs JJ, Phillips JH. Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. *J Immunol.* 1988; 141(10): 3478–85.
13. Ames E, Murphy WJ. Advantages and clinical applications of natural killer cells in cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2014; 63(1): 21–8. <https://doi.org/10.1007/s00262-013-1469-8>
14. Levy EM, Roberti MP, Mordoh J. Natural killer cells in human cancer: from biological functions to clinical applications. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 676198. <https://doi.org/10.1155/2011/676198>
15. Gómez VR, Murray RJC, Weiner LM. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC). *AntibodyFc. Linking Adaptive and Innate Immunity.* 2014; 1–27.
16. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev.* 2006; 214: 73–91. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00457.x>
17. Awasthi A, Ayello J, Van de Ven C, Elmacken M, Sabulski A, Barth MJ et al. Obinutuzumab (GA101) compared to rituximab significantly enhances cell death and antibody-dependent cytotoxicity and improves overall survival against CD20(+) rituximab-sensitive/-resistant Burkitt lymphoma (BL) and precursor B-acute lymphoblastic leukaemia (pre-B-ALL): potential targeted therapy in patients with poor risk CD20(+) BL and pre-B-ALL. *Br J Haematol.* 2015; 171(5): 763–75. <https://doi.org/10.1111/bjh.13764>
18. Trivedi S, Srivastava RM, Concha-Benavente F, Ferrone S, Garcia-Bates TM, Li J et al. Anti-EGFR targeted monoclonal antibody isotype influences antitumor cellular immunity in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2016; 22(21): 5229–37. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2971>
19. Arnould L, Gelly M, Penault-Llorca F, Benoit L, Bonnetain F, Migeon C et al. Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br J Cancer.* 2006; 94(2): 259–67. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602930>
20. Romee R, Foley B, Lenvik T, Wang Y, Zhang B, Ankarlo D, et al. NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood.* 2013; 121(18): 3599–608. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-425397>
21. Varchetta S, Gibelli N, Oliviero B, Nardini E, Gennari R, Gatti G et al. Elements related to heterogeneity of antibody-dependent cell cytotoxicity in patients under trastuzumab therapy for primary operable breast cancer overexpressing Her2. *Cancer Res.* 2007; 67(24): 11991–9. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2068>
22. Kohrt HE, Houot R, Weiskopf K, Goldstein MJ, Scheeren F, Czerwinski D et al. Stimulation of natural killer cells with a CD137-specific antibody enhances trastuzumab efficacy in xenotransplant models of breast cancer. *J Clin Invest.* 2012; 122(3): 1066–75. <https://doi.org/10.1172/JCI61226>
23. Kohrt HE, Colevas AD, Houot R, Weiskopf K, Goldstein MJ, Lund P et al. Targeting CD137 enhances the efficacy of cetuximab. *J Clin Invest.* 2014; 124(6): 2668–82. <https://doi.org/10.1172/JCI73014>
24. Kohrt HE, Houot R, Goldstein MJ, Weiskopf K, Alizadeh AA, Brody J, et al. CD137 stimulation enhances the antilymphoma activity of anti-CD20 antibodies. *Blood.* 2011; 117(8): 2423–32. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-301945>
25. Muntasell A, Ochoa MC, Cordeiro L, Berraondo P, López-Díaz de Cerio A, Cabo M et al. Targeting NK-cell checkpoints for cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 2017; 45: 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.01.003>
26. Shifrin N, Raulet DH, Ardolino M. NK cell self tolerance, responsiveness and missing self recognition. *Semin Immunol.* 2014; 26(2): 138–44. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.02.007>
27. Vahlne G, Lindholm K, Meier A, Wickström S, Lakshmikanth T, Brennan F et al. In vivo tumor cell rejection induced by NK cell inhibitory receptor blockade: maintained tolerance to normal cells even in the presence of IL-2. *Eur J Immunol.* 2010; 40(3): 813–23. <https://doi.org/10.1002/eji.200939755>
28. Romagne F, Andre P, Spee P, Zahn S, Anfossi N, Gauthier L et al. Preclinical characterization of 1–7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells. *Blood.* 2009; 114(13): 2667–77. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-206532>
29. Vey N, Karlin L, Sadot-Lebouvier S, Broussais F, Berton-Rigaud D, Rey J et al. A phase 1 study of lirilumab (antibody against killer immunoglobulin-like receptor antibody KIR2D; IPH2102) in patients with solid tumors and hematologic malignancies. *Oncotarget.* 2018; 9(25): 17675–88. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24832>
30. Chen Z, Yang Y, Liu LL, Lundqvist A. Strategies to Augment Natural Killer (NK) Cell Activity against Solid Tumors. *Cancers (Basel).* 2019; 11(7). pii: E1040. <https://doi.org/10.3390/cancers11071040>
31. Zaghi E, Calvi M, Marcenaro E, Mavilio D, Di Vito C. Targeting NK-G2A to elucidate natural killer cell ontogenesis and to develop novel immune-therapeutic strategies in cancer therapy. *J Leukoc Biol.* 2019; 105(6): 1243–51. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0718-300R>
32. Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B et al. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med.* 2003; 198(4): 557–67. <https://doi.org/10.1084/jem.20030788>
33. Martinet L, Smyth MJ. Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15(4): 243–54. <https://doi.org/10.1038/nri3799>
34. Bernhardt G. TACTILE becomes tangible: CD96 discloses its inhibitory peculiarities. *Nat Immunol.* 2014; 15(5): 406–8. <https://doi.org/10.1038/ni.2855>
35. Chan CJ, Martinet L, Gilfillan S, Souza-Fonseca-Guimaraes F, Chow MT, Town L et al. The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nat Immunol.* 2014; 15(5): 431–8. <https://doi.org/10.1038/ni.2850>
36. Blake SJ, Stannard K, Liu J, Allen S, Yong MC, Mittal D et al. Suppression of metastases using a new lymphocyte checkpoint target for cancer immunotherapy. *Cancer Discov.* 2016; 6(4): 446–59. <https://doi.org/10.1158/2159-8290>
37. Sarhan D, Cichocki F, Zhang B, Yingst A, Spellman SR, Cooley S et al. Adaptive NK cells with low TIGIT expression are inherently resistant to myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 2016; 76(19): 5696–706. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0839>
38. Pesce S, Greppi M, Tabellini G, Rampinelli F, Parolini S, Olive D et al. Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: a phenotypic and functional characterization. *J Allergy Clin Immunol.* 2017; 139(1): 335–346.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.04.025>
39. Benson DM Jr, Bakan CE, Mishra A, Hofmeister CC, Efebera Y, Becknell B et al. The PD-1/ PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood.* 2010; 116(13): 2286–94. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-271874>
40. Pesce S, Greppi M, Grossi F, Zotto GD, Moretta L, Sivori S et al. PD-1–PD-Ls Checkpoint: Insight on the Potential Role of NK Cells. *Front Immunol.* 2019; 10: 1242. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01242>
41. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R et al. Overall survival with durvalumab after chemoradiotherapy in stage III NSCLC. *N Engl J Med.* 2018; 379(24): 2342–50. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809697>
42. Simsek M, Tekin SB, Bilici M. Immunological agents used in cancer treatment. *Eurasian J Med.* 2019; 51(1): 90–4. <https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2018.18194>
43. Melero I, Johnston JV, Shufford WW, Mittler RS, Chen L. NK1.1 cells express 4-1BB (CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1BB monoclonal antibodies. *Cell Immunol.* 1998; 190(2): 167–72. <https://doi.org/10.1006/cimm.1998.1396>
44. Baessler T, Charton JE, Schmiedel BJ, Grunebach F, Krusch M, Wacker A, et al. CD137 ligand mediates opposite effects in human and mouse NK cells and impairs NK-cell reactivity against human acute myeloid leukemia cells. *Blood.* 2010; 115(15): 3058–69. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-06-227934>
45. Waldmann TA. The shared and contrasting roles of IL2 and IL15 in the life and death of normal and neoplastic lymphocytes: implications for cancer therapy. *Cancer Immunol Res.* 2015; 3(3): 219–27. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0009>
46. Able AA, Burrell JA, Stephens JM. STAT5-Interacting Proteins: A Synopsis of Proteins that Regulate STAT5 Activity. *Biology (Basel).* 2017; 6(1): 20. <https://doi.org/10.3390/biology6010020>

47. Delconte RB, Kolesnik TB, Dagley LF, Rautela J, Shi W, Putz EM, et al. CIS is a potent checkpoint in NK cell-mediated tumor immunity. *Nat Immunol.* 2016; 17(7): 816–24. <https://doi.org/10.1038/ni.3470>
48. Tonn T, Schwabe D, Klingemann HG, Becker S, Esser R, Koehl U et al. Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. *Cytotherapy.* 2013; 15(12): 1563–70. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.06.017>
49. Atkins MB, Regan M, McDermott D. Update on the role of interleukin 2 and other cytokines in the treatment of patients with stage IV renal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(18 Pt 2): 6342S–6S. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-040029>
50. Ardolino M, Azimi CS, Iannello A, Trevino TN, Horan L, Zhang L et al. Cytokine therapy reverses NK cell anergy in MHC-deficient tumors. *J Clin Invest.* 2014; 124(11): 4781–94. <https://doi.org/10.1172/JCI74337>
51. Sim GC, Liu C, Wang E, Liu H, Creasy C, Dai Z, et al. IL-2 variant circumvents ICOS+ regulatory T cell expansion and promotes NK cell activation. *Cancer Immunol Res.* 2016; 4(11): 983–94. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0195>
52. Garcia-Martínez E, Smith M, Buqué A, Aranda F, de la Peña FA, Ivars A et al. Trial Watch: Immunostimulation with recombinant cytokines for cancer therapy. *Oncoimmunology.* 2018; 7(6): e1433982. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1433982>
53. Conlon KC, Lugli E, Welles HC, Rosenberg SA, Fojo AT, Morris JC et al. Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer. *J Clin Oncol.* 2015; 33(1): 74–82. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.3329>
54. Cheng M, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tian Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol.* 2013; 10(3): 230–52. <https://doi.org/10.1038/cmi.2013.10>
55. Luevano M, Madrigal A, Saudemont A. Generation of natural killer cells from hematopoietic stem cells in vitro for immunotherapy. *Cell Mol Immunol.* 2012; 9(4): 310–20. <https://doi.org/10.1038/cmi.2012.17>
56. Sutlu T, Alici E. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *J Intern Med.* 2009; 266(2): 154–81. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2009.02121.x>
57. Tam YK, Maki G, Miyagawa B, Hennemann B, Tonn T, Klingemann HG. Characterization of genetically altered, interleukin 2-independent natural killer cell lines suitable for adoptive cellular immunotherapy. *Hum Gene Ther.* 1999; 10(8): 1359–73. <https://doi.org/10.1089/10430349950018030>
58. Zhang J, Sun R, Wei H, Tian Z. Characterization of interleukin-15 gene-modified human natural killer cells: implications for adoptive cellular immunotherapy. *Haematologica.* 2004; 89(3): 338–47.
59. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 2011; 365(8): 755–63. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103849>
60. Schirrmann T, Pecher G. Human natural killer cell line modified with a chimeric immunoglobulin T-cell receptor gene leads to tumor growth inhibition in vivo. *Cancer Gene Ther.* 2002; 9(4): 390–8. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700453>
61. Schirrmann T, Pecher G. Specific targeting of CD33+ leukemia cells by a natural killer cell line modified with a chimeric receptor. *Leuk Res.* 2005; 29(3): 301–6. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2004.07.005>
62. Muller T, Uhrek C, Maki G, Chow KU, Schimpf A, Klingemann HG et al. Expression of a CD20-specific chimeric antigen receptor enhances cytotoxic activity of NK cells and overcomes NK-resistance of lymphoma and leukemia cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2008; 57(3): 411–23. <https://doi.org/10.1007/s00262-007-0383-3>
63. Imai C, Iwamoto S, Campana D. Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood.* 2005; 106(1): 376–83. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-12-4797>
64. Kruschinski A, Moosmann A, Poschke I, Norell H, Chmielewski M, Seliger B, et al. Engineering antigen-specific primary human NK cells against HER-2 positive carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2008; 105(45): 17481–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804788105>
65. Meier R, Pierr M, Piontek G, Rudelius M, Oostendorp RA, Senekowitsch-Schmidtke R, et al. Tracking of [18F] FDG-labeled natural killer cells to HER2/neu-positive tumors. *Nucl Med Biol.* 2008; 35(5): 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2008.02.006>
66. Pegram HJ, Jackson JT, Smyth MJ, Kershaw MH, Darcy PK. Adoptive transfer of gene-modified primary NK cells can specifically inhibit tumor progression in vivo. *J Immunol.* 2008; 181(5): 3449–55. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.5.3449>
67. Klingemann H. Are NK cells superior CAR drivers? *Oncoimmunology.* 2014; 3:e28147. <https://doi.org/10.4161/onci.28147>
68. Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N et al. CD4+ CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med.* 2005; 202(8): 1075–85. <https://doi.org/10.1084/jem.20051511>
69. Caligiuri MA, Murray C, Robertson MJ, Wang E, Cochran K, Cameron C et al. Selective modulation of human natural killer cells in vivo after prolonged infusion of low dose recombinant interleukin 2. *J Clin Invest.* 1993; 91(1): 123–32. <https://doi.org/10.1172/JCI116161>
70. Raulet DH, Held W. Natural killer cell receptors: the offs and ons of NK cell recognition. *Cell.* 1995; 82(5): 697–700. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90466-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90466-2)
71. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science.* 2002; 295(5562): 2097–100. <https://doi.org/10.1126/science.1068440>
72. Cheng M, Zhang J, Jiang W, Chen Y, Tian Z. Natural killer cell lines in tumor immunotherapy. *Front Med.* 2012; 6(1): 56–66. <https://doi.org/10.1007/s11684-012-0177-7>
73. Tonn T, Becker S, Esser R, Schwabe D, Seifried E. Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92. *J Hematother Stem Cell Res.* 2001; 10(4): 535–44. <https://doi.org/10.1089/15258160152509145>
74. Maki G, Klingemann HG, Martinson JA, Tam YK. Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92. *J Hematother Stem Cell Res.* 2001; 10(3): 369–83. <https://doi.org/10.1089/152581601750288975>
75. Boissel L, Betancur M, Lu W, Wels WS, Marino T, Van Etten RA et al. Comparison of mRNA and lentiviral based transfection of natural killer cells with chimeric antigen receptors recognizing lymphoid antigens. *Leuk Lymphoma.* 2012; 53(5): 958–65. <https://doi.org/10.3109/10428194.2011.634048>
76. Arai S, Meagher R, Swearingen M, Myint H, Rich E, Martinson J et al. Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial. *Cytotherapy.* 2008; 10(6): 625–32. <https://doi.org/10.1080/14653240802301872>