

Université de Montréal

Exploitation du potentiel thérapeutique des cellules Natural Killer pour traiter les cancers

*Par*

William Lemieux

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Faculté de médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de doctorat

en microbiologie et immunologie

2 Décembre 2020

© William Lemieux, 2020



Université de Montréal

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Faculté de médecine

---

*Cette thèse intitulée*

**Exploitation du potentiel thérapeutique des cellules Natural Killer pour traiter les cancers**

*Présenté par*

**William Lemieux**

*A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes*

**Jean-Sébastien Delisle**

Président-rapporteur

**Elie Haddad**

Directeur de recherche

**Vincent-Philippe Lavallée**

Membre du jury

**Jonathan Bramson**

Examineur externe



## Résumé

Malgré le succès de l'utilisation des lymphocytes T modifiées par des récepteur antigéniques chimériques (CAR) contre les leucémies, celles-ci présentent des limites comme leur risque de CRS et leur inefficacité dans les tumeurs solides. Plusieurs autres immunothérapies cellulaires ont été proposées pour pallier à ces inconvénients. Les cellules *natural killer* (NK) ont plusieurs propriétés qui en font une alternative avantageuse aux cellules T dans les immunothérapies. Cependant, les cellules NK restent difficiles à modifier avec les outils actuels et leur efficacité reste limitée par les mécanismes immunosuppresseurs des tumeurs. Nous avons réussi à augmenter l'efficacité de transduction avec une nouvelle glycoprotéine, le BaEVRless. Nous avons aussi démontré que cette enveloppe ne provoque pas de modification du phénotype ou de l'activité intrinsèque des cellules NK. Dans un modèle de leucémie, nous avons déterminé que l'utilisation du BaEVRless permet la production de cellules CAR-NK fonctionnelles. Les cellules NK peuvent aussi être transduites efficacement par des constructions lentivirales portant les séquences codant pour deux constructions CAR simultanément. Nous avons aussi démontré que l'édition génomique des NK par la technologie *Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats* (CRISPR) est possible en utilisant une livraison non-virale. Avec cette méthode, nous avons pu réduire l'expression de NKG2A. Les cellules NK avec une expression réduite de NKG2A étaient résistantes à l'inhibition par HLA-E, exprimé sur des lignées de cancer du sein et du colon. Cet effet a été confirmé in vivo dans un modèle préclinique xenogénique. Ces résultats montrent deux stratégies qui pourraient permettre d'améliorer les immunothérapies à base de cellules NK.

**Mots-clés** : immunothérapie, cellules NK, Récepteurs antigéniques chimériques, transduction, HLA-E, NKG2A.



## Abstract

Despite the overwhelming success of chimeric antigen receptor (CAR)-modified T lymphocytes against leukemias, some limitations have been observed, such as the risk of developing CRS and the lack of efficiency in solid tumor settings. Many other cell-based immunotherapies have been explored to circumvent those caveats. Natural killer (NK) cells present many advantageous properties that could make them a very promising alternative to T cells in immunotherapies. However, NK cells have some caveats, mainly they are hard to modify using conventional tools and they are sensitive to many inhibitory signals expressed by cancer cells. We managed to greatly improve the efficiency of transduction using a novel viral glycoprotein, BaEVRless. In the process, we determined that this novel envelope glycoprotein did not modify the phenotype or intrinsic activity of the transduced NK cells. In a leukemia model, we also showed that the BaEVRless can be used to generate functional CAR-NK cells. Moreover, the NK cells can be transduced with larger lentiviral constructions bearing two simultaneous CAR-coding sequences. We also demonstrated that *Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats* (CRISPR) modification of NK cells using a non-viral approach was possible. Using this approach, we generated NK cells with lower NKG2A expression, that were resistant to the inhibitory effects of HLA-E. This affect was seen in a breast cancer model and a colon cancer model. The in vitro results were confirmed in an in vivo preclinical xenogeneic model. Together, those results represent two improvements applicable to NK cell-based immunotherapies.

**Keywords** : immunotherapy, NK cells, chimeric antigen receptors, transduction, HLA-E, NKG2A.



# Table des matières

Résumé	v
Abstract	vii
Table des matières	ix
Liste des tableaux	xiii
Liste des figures	xv
Liste des sigles et abréviations	xvii
Remerciements	xxi
Chapitre 1 – Introduction	1
1.1 Les cellules NK	1
1.1.1 Développement et ontogénèse	1
1.1.1.1 Cellules lymphoïdes innées	4
1.1.2 Fonctions des lymphocytes NK	5
1.1.3 Récepteurs et signalisation	8
1.1.3.1 Le <i>licensing</i> NK	10
1.1.3.2 Les KIR	11
1.1.3.3 Récepteurs inhibiteurs	14
1.1.3.4 Récepteurs activateurs	15
1.1.4 Épuisement des cellules NK	17
1.2 Immunothérapies à base de NK	18
1.2.1 Sources de NK	18
1.2.2 Stratégies pour améliorer l'efficacité des cellules NK	21
1.2.3 Récepteurs antigéniques chimériques	23

1.2.3.1 Composants d'un CAR	24
1.2.3.2 Signalisation des CARs	26
1.2.3.3 Améliorations des CARs	27
1.2.3.4 Transition aux tumeurs solides	28
1.2.4 CAR et cellules NK	29
1.3 Pseudotypage des lentivirus	32
1.4 Problématique de recherche	33
1.5 Objectif du projet	33
1.6 Hypothèses	33
Chapitre 2 – Premier article	35
2.1 Mise en contexte du premier article	35
2.2 Abstract	39
2.3 Introduction	40
2.4 Methods	41
2.5 Results and Discussion	44
2.6 Acknowledgements	47
2.7 References	48
2.8 Legends	51
2.9 Figures	54
Chapitre 3 – Second Article	57
3.1 Mise en contexte du second article	57
3.2 Abstract	59
3.3 Introduction	60
3.4 Methods	61

3.5 Results	65
3.6 Discussion	68
3.7 Disclosure	71
3.8 References	72
3.9 Legends	76
3.10 Figures	78
3.11 Tables	82
Chapitre 4 – Discussion	85
4.1 Transduction des cellules NK	86
4.2 Génération de NK-CAR	88
4.3 Édition génomique de NKG2A	89
4.4 Translation vers la clinique	91
Chapitre 5 – Conclusion	95
Références bibliographiques	97



## Liste des tableaux

Tableau 1.1 – Récepteurs de cellules NK	13
Tableau 3.1 – Regression parameters for MDA-MB-231	82
Tableau 3.2 – Regression parameters for HT-29	83



## Liste des figures

Figure 1.1 – Modèle de la hiérarchie hématopoïétique.	2
Figure 1.2 – Reconnaissance des cellules tumorales par les cellules NK.	3
Figure 1.3 – Scénarios pour l’interaction entre les cellules NK et les cellules immunes de l’environnement tumoral.	6
Figure 1.4 – Reconnaissance des cellules tumorales par les cellules NK.	9
Figure 1.5 – Modèles d’éducation des cellules NK.	10
Figure 1.6 – Signalisation générale des cellules NK.	14
Figure 1.7 – Sources et méthodes d’isolation, d’activation et de propagation des cellules NK primaires.	19
Figure 1.8 – Composition et blocs constituants des récepteurs d’antigène chimériques.	24
Figure 1.9 – Représentation de constructions de récepteurs chimériques.	31
Figure 1.10 – Pseudotypage des particules virales.	32
Figure 2.1 – BaEV-LV efficiently transduces expanded (NKAES) and freshly isolated NK-cells (FI-NK).	54
Figure 2.2 – BaEV-LV transduction does not alter the phenotype or function of NK cells.	55
Figure 2.3 – BaEV-LVs allow robust CAR-expression in NK-cells.	56
Figure 3.1 – Expression and editing of NKG2A on expanded NK cells.	78
Figure 3.2 – Impact of the expression of HLA-E at the surface of target cells on NKAES cells cytotoxicity.	79
Figure 3.3 – Population effect of NKG2A expression on HLA-E mediated cytotoxicity inhibition.	80
Figure 3.4 – Antitumor capacity of NKG2A-edited NKAES cells in immunodeficient mice.	81



## Liste des sigles et abréviations

ASCT	Transporteur d'acide aminés neutres
B2M	bêta-2 microglobuline
CAR	Récepteurs antigéniques chimériques
CLP	Progéniteurs lymphoïdes communs
CMV	Cytomégalovirus
CRS	Syndrome de relargage cytokinique
CRISPR	Clustered regularly interspersed short palindromic repeats
DISC	Complexe de signalisation induisant la mort
FASL	Apoptosis antigen 1 ligand
FDA	Food and drug association
FLT3	fms-like tyrosine kinase 3
HLA	Antigène leucocytaires humains
IFN	Interféron
IL	Interleukine
ILC	Cellules lymphoïdes innées
iNK	Cellules Natural Killer immatures
iPSC	Cellules souches pluripotentes induites
ITAM	Motif activateur d'immunorécepteurs à tyrosine
ITIM	Motifs inhibiteurs d'immunorécepteurs à tyrosine
KIR	Killer cell Immunoglobulin-like Receptors

LDLR récepteur de lipoprotéine de basse densité

LTi Cellules lymphoid tissue inducer

MDSC Myeloid-derived supressor cells

MHC Complexe majeur d'histocompatibilité

NCR Récepteurs naturels de cytotoxicité

NK Cellules Natural Killer

NKP Progéniteurs NK

SCF Stem Cell Factor

ScFv Fragment variable en simple chaine

TCR Récepteur des cellules T

TLR Toll-like receptor

TNF Tumor necrosis factor

TRAIL TNF-related apoptosis-inducing ligand

Treg Cellule T régulatrice

VSV-G Protéine G du virus de la stomatite vésiculaire

*Pour Hélène*



## Remerciements

Je tiens à remercier le Dr Haddad, qui a su me faire confiance et me soutenir. Merci de m'avoir accueilli dans le laboratoire, d'avoir écouté mes idées, et d'avoir été un mentor. J'ai énormément appris durant mon passage et ces connaissances ont su faire de moi un meilleur chercheur.

Je n'y serais bien sûr pas arrivé sans l'équipe du laboratoire. Simon, François, Chloé, Aurélien, Kathie, Hugo, Delphine, Yohann, Harika, Alice, Clara, Vincent, Renaud et Khampoun, lorsque ce n'est pas avec vos mains que vous avez aidés, c'est avec votre esprit. Vous avez fait du laboratoire un endroit accueillant.

Les relations se sont aussi étendues d'autres équipes. Cynthia, Gaël, Damien, Oanh, Dr Beauséjour nos laboratoires resteront probablement toujours liés. Blandine, Lorie, Dr Touzot vous faites partie de notre groupe. Mathieu tu es toujours de bon conseil. Et toi aussi Suzanne, merci pour tes encouragements et ton support.

Merci à toi Hélène. Tu m'as supporté pendant les années de Maîtrise et de Doctorat sans rien demander en retour. Finalement, merci à mes parents, qui m'ont encouragé à faire ce que j'aime et à donner toujours plus et à Maxime et Gabrielle.

# Chapitre 1 – Introduction

Le domaine des immunothérapies comme traitement pour le cancer est présentement en expansion avec les avancées subséquentes des inhibiteurs de point de contrôle («checkpoint inhibitors») et des récepteurs antigéniques chimériques (CAR) (1). Le champ de l'immunothérapie a été changé par le développement des cellules T arborant un CAR (CAR-T). Malgré cette avancée, les utilisations des CAR-T ont été limitées par leurs effets secondaires, qui peuvent être très sévères. De plus, l'inefficacité des CAR-T à infiltrer et contrôler les tumeurs solides limite leurs applications. Pour contourner ces limitations, l'utilisation de cellules *natural killer* (NK) en immunothérapie a été propulsé vers l'avant (2). De nombreux essais cliniques ont été initiés pour évaluer leur profil de sûreté et leur efficacité (2, 3). Les cellules NK ont un profil et des propriétés différentes des cellules T. Cette différence permet notamment un meilleur profil de sûreté que pour les cellules T. Malgré leurs avantages, les cellules NK présentent certaines problématiques qui doivent être adressées avant que leur utilisation soit optimale.

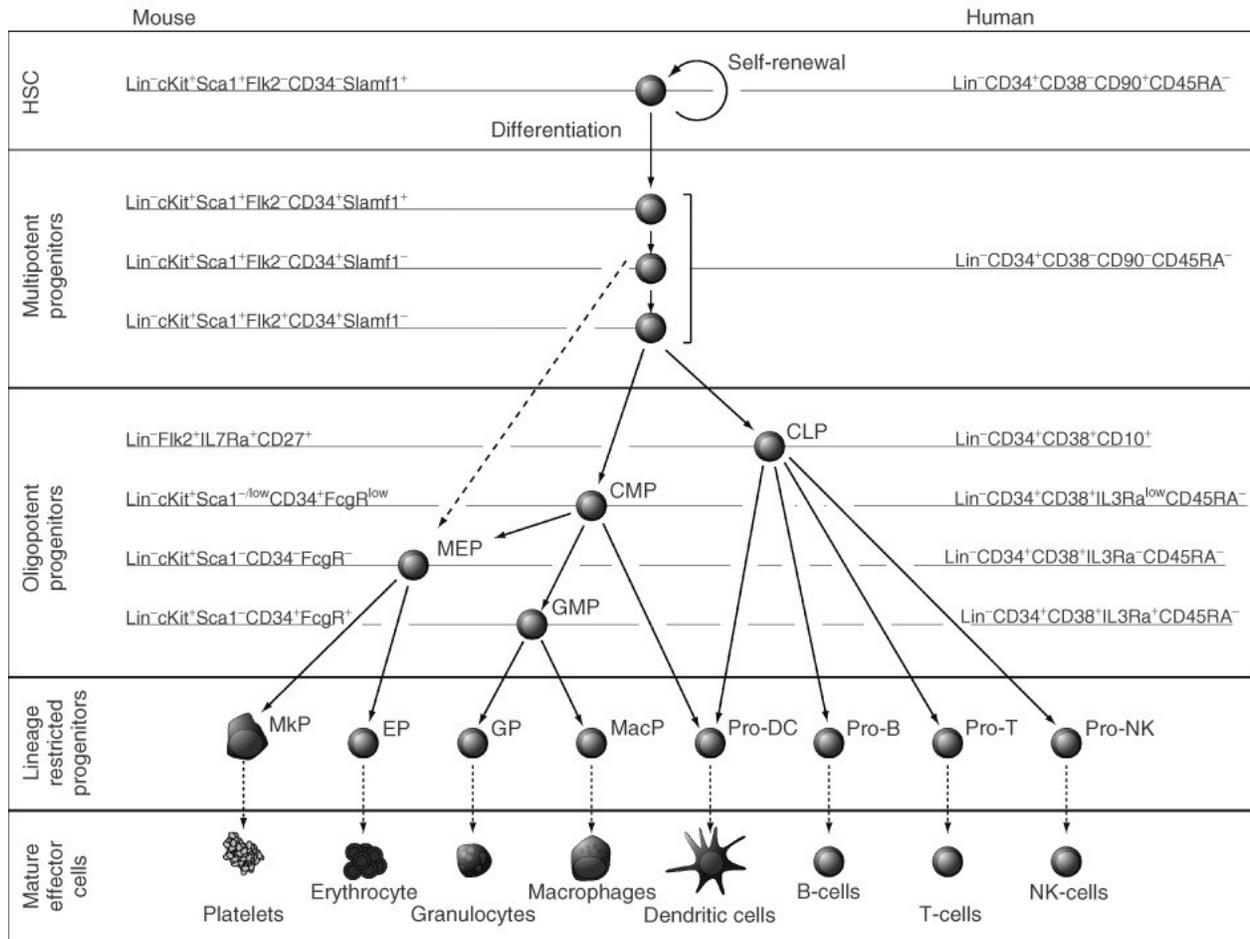
## 1.1 Les cellules NK

Les cellules NK font partie des cellules lymphoïdes, mais sont des cellules de type innées puisqu'elles ne réarrangent pas de récepteur comme le font les lymphocytes T et B. En effet, elles ont été identifiées par leur capacité à tuer des cellules tumorales sans avoir besoin d'activation préparatoire (4). Bien que leur phénotype ait été élucidé, leur ontogénèse et les étapes intermédiaires de leur développement ne font pas encore l'objet d'un consensus (4, 5).

### 1.1.1 Développement et ontogénèse

Les cellules NK sont issues de la moelle osseuse, et se développent à partir des cellules souches hématopoïétiques (6). Dans leur développement, elles partagent des étapes précoces communes avec les lymphocytes T et B (0.1). Le stroma de la moelle fournit les facteurs nécessaires au développement des cellules souches hématopoïétiques en progéniteurs lymphoïdes communs (CLP). Les cytokines, aux côtés des signaux de la famille Notch, jouent un rôle prédominant dans cette progression, dont l'interleukine (IL)-3 et IL-7 ainsi que le *fms-like tyrosine kinase 3* (FLT3)

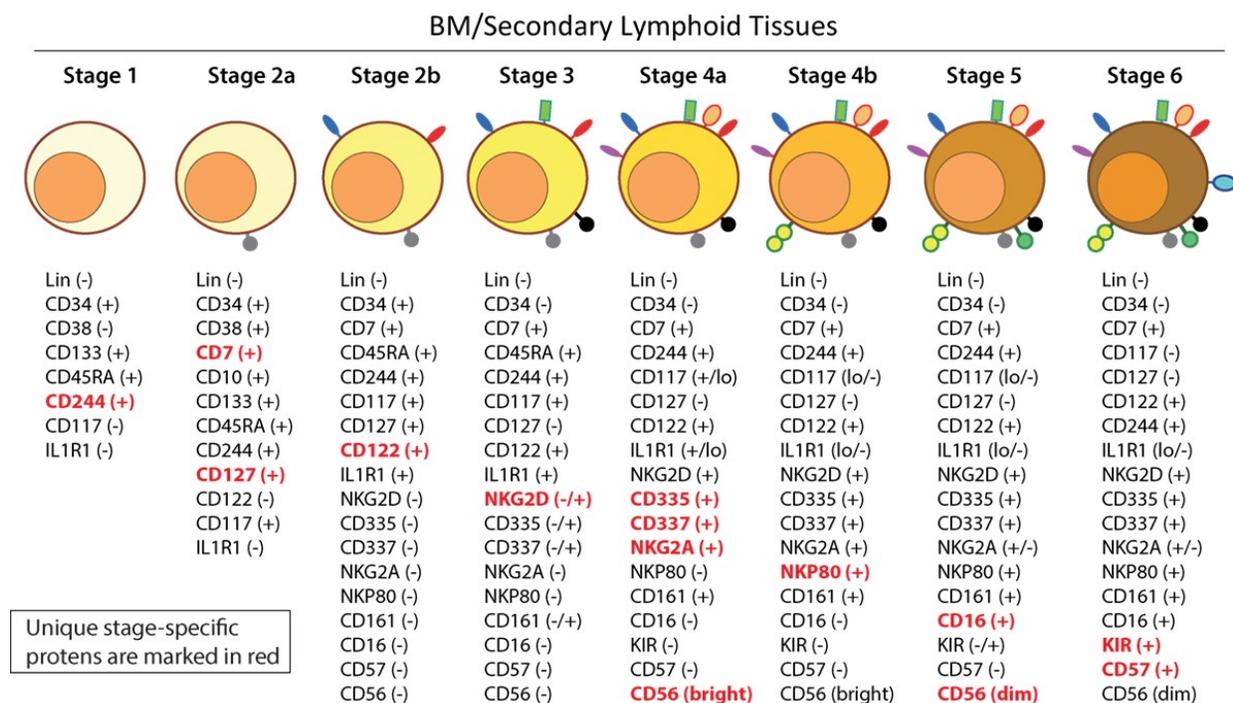
ligand et le *stem cell factor* (SCF) (7). Après l'étape CLP, les cellules deviennent engagées dans la différenciation NK en devenant des pré-progénéiteurs NK (NKP) (8).



**Figure 1.1 – Modèle de la hiérarchie hématopoïétique.** HSC : cellules souches hématopoïétiques, CLP : progéniteur lymphoïde commun, CMP : progéniteur myéloïde commun, MEP : progéniteur mégakaryocytaire/érythrocytaire, GMP : progéniteur granulocytaire/macrophage, Mkp : progéniteur mégakaryocytaire, EP : progéniteur érythrocytaire, GP : progéniteur granulocytaire, MacP : progéniteur macrophage, DC : cellules dendritiques, NK : cellules natural killer, Lin : marqueurs de lignée. Copyright 2010 Wiley. Used with permission from (Seita J, Weissman IL, Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation, Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med and John Wiley and Sons).

Les pré-NKP (Stade 2a) acquièrent ensuite le récepteur CD122 (Figure 1.2) (9). Avec la chaîne commune gamma (CD132), ce récepteur forme la base pour la signalisation des cytokines IL-2 et

IL-15, qui sont les signaux les plus importants dans le développement subséquent des cellules NK. Cet axe de signalisation est d'ailleurs tellement primordial pour le développement et la survie des cellules NK, que l'acquisition de CD122 a été suggéré comme le point d'engagement de la voie NK avant que le paradigme ne change (8). Les cellules passent ensuite par le stade des NK immatures (iNK) et acquièrent plusieurs marqueurs dont NKG2D et NKG2A, avant de devenir des cellules NK matures (Stade 4) (9). Parmi les cellules NK matures, trois stades sont reconnus et sont définis selon l'expression des récepteurs CD56, CD16 et CD57 distinguant chacun de ces stades. Le marqueur CD57 définit une sous population de cellules CD56<sup>DIM</sup>, caractérisée comme étant plus cytotoxique. Cette population est cependant moins proliférative, donc considérée comme plus mature ou plus ultimement différenciée (10).



**Figure 1.2 – Un schéma du développement des cellules NK chez l'homme.** Copyright 2018 Abel, Yang, Thakar and Malarkannan under CC BY-NC-ND 4.0. Reused from Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Frontiers in Immunology*. 2018;9(1869).

Le modèle de développement des NK matures demeure débattu à ce jour. Le modèle canonique est linéaire et infère une progression du stade CD56<sup>HI</sup>/CD16<sup>-</sup> vers le stade CD56<sup>DIM</sup>/CD16<sup>+</sup> avec un

stade terminal où le marqueur CD57 est acquis (9). Plusieurs preuves indirectes semblent suggérer que ce modèle est le plus représentatif du développement naturel des cellules NK. Entre autres, les cellules CD56<sup>HI</sup> ont des télomères plus longs, ce qui indique un état plus naïf (11). La reproduction de la transition des cellules CD56<sup>HI</sup> vers CD56<sup>DIM</sup> *ex vivo* est l'argument le plus convaincant et direct, mais un doute continue de persister en l'absence de démonstration directe (11). Quoiqu'il en soit, les deux populations CD56<sup>HI</sup> et CD56<sup>DIM</sup> diffèrent principalement dans leurs fonctions.

#### 1.1.1.1 Cellules lymphoïdes innées

Les cellules NK ont récemment été regroupées dans un nouveau groupe de cellules, les cellules lymphoïdes innées (ILC). Ce groupe de lymphocytes est défini par sa distinction des cellules myéloïdes sur le plan phénotypique et son absence de recombinaison de ses récepteurs (12). Les cellules NK ont été regroupées dans cette catégorie de cellules. Le second ILC décrit est la cellule *lymphoid tissue inducer* (LTI) en 1997 (13). Il a été observé que les cellules ILC requièrent l'activité du facteur Id2 et du récepteur CD132 pour leur développement (14). Parmi les ILC, seules les cellules NK sont capables d'avoir une activité lytique, les autres membres agissent par la sécrétion de cytokines. Les ILC peuvent être subdivisés selon leur profil de sécrétion de cytokines, qui fait un parallèle avec les subdivisions des lymphocytes T.

Le groupe 1 comprend les cellules NK et les ILC1. Ce groupe se distingue par la production prédominante d'interféron (IFN) $\gamma$  (15). L'IFN $\gamma$  est depuis longtemps connu comme un acteur important dans le contrôle des infections (16). Ce groupe est analogue aux groupe T<sub>H</sub>1 des lymphocytes T, qui produisent aussi majoritairement l'IFN $\gamma$ . Les deux groupes requièrent le facteur de transcription T-bet pour leur développement (15).

Le groupe 2 d'ILC est analogue aux cellules T<sub>H</sub>2 et produisent les cytokines IL-5, IL-13 et peuvent aussi produire l'IL-6 et l'IL-9 (17). Chez l'humain, un seul type de cellules constitue le groupe 2, les ILC2 (18). Leur développement requière le facteur GATA3, associé au développement des cellules T<sub>H</sub>2, et le facteur ROR $\alpha$  (19).

Le groupe 3 des ILC est comparable aux lymphocytes TH17 par leur profil de cytokines. Les IL-17 et IL22 sont prédominantes dans le profil sécrétoire de ce groupe (20-22). Le groupe 3 comprend

les cellules L<sub>Ti</sub> invariables et les ILC3. Les cellules L<sub>Ti</sub> sont responsables du développement des ganglions lymphatiques et autres organes lymphoïdes secondaires (20). Les ILC3 peuvent être subdivisées selon leur expression des récepteurs naturels de cytotoxicité (NCR), NKp30, NKp44 et NKp46 (21, 22). Le facteur de transcription ROR $\gamma$ t est central pour le développement des ILC du groupe 3 (22).

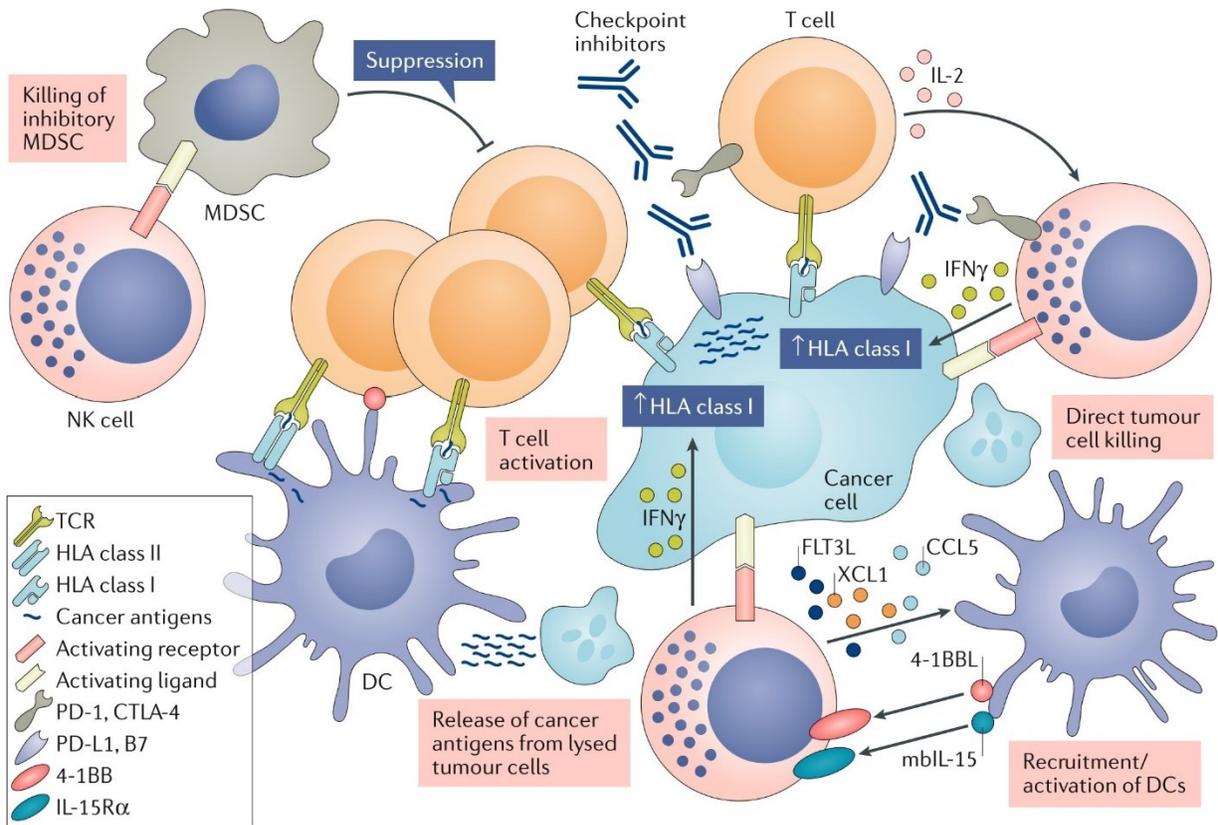
### 1.1.2 Fonctions des lymphocytes NK

À la différence des lymphocytes T, les cellules NK ne requièrent pas un contact prolongé avec un antigène pour exercer leurs fonctions. Néanmoins, elles demeurent sensibles aux interactions avec les autres cellules immunitaires. Les cytokines pro-inflammatoires tels les IFN de type I, l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18 peuvent être sécrétés par les macrophages et cellules dendritiques et permettent d'activer les fonctions des cellules NK (23). Les cellules T peuvent aussi sécréter de l'IL-2, qui est un signal puissant de survie et d'activation pour les NK. En se basant sur ces propriétés, il a été possible d'activer et même de faire proliférer les cellules NK. L'IL-21 constitue une addition plus récente à la liste des cytokines activatrices des cellules NK (24).

À l'inverse, certains facteurs peuvent aussi limiter l'activité des cellules NK. Le *transforming growth factor beta* (TGF $\beta$ ) est sécrété par les cellules T régulatrices (Treg) ou par certaines cellules associées à la tumeur (23). L'IL-6 et l'IL-10 sont deux autres cytokines qui inhibent généralement les fonctions des cellules NK, mais peuvent avoir certains aspects d'activation. L'IL-6 est une cytokine activatrice, mais dans les cas d'activation constante elle peut agir de façon négative sur les lymphocytes cytotoxiques (25). L'IL-10 aussi peut parfois avoir des effets activateurs dans des conditions très précises, en combinaison avec des cytokines activatrices comme l'IL-18 (23). L'IL-10 réprime aussi l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de classe I, ce qui est hautement activateur pour les cellules NK.

Les cellules NK ont deux rôles principaux : la lyse de cellules infectées ou transformées et la sécrétion de cytokines. Ces deux pôles peuvent avoir de nombreux effets dans l'environnement tumoral (Figure 1.3). En effet, les cellules NK peuvent directement éliminer les cellules tumorales, mais aussi éliminer les cellules associées à la tumeur, comme les *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) (2). En éliminant les cellules tumorales, elles permettent aussi le relargage d'antigènes

qui pourront agir au niveau des cellules présentatrices d'antigènes et des lymphocytes T. Par la sécrétion de cytokines, les NK peuvent recruter et activer d'autres cellules immunitaires et aussi modifier les profils de ces cellules pour augmenter la réaction anti-tumorale et diminuer les mécanismes qui protègent la tumeur de la surveillance immunitaire.



**Figure 1.3 – Scénarios pour l’interaction entre les cellules NK et les cellules immunes de l’environnement tumoral.** Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature, Nature Reviews Drug Discovery, NK cells for cancer immunotherapy, Shimasaki N, Jain A, Campana D. Copyright 2020

C’est grâce à leur effet cytotoxique que les cellules NK ont été identifiées (26-28). Leurs fonctions antivirales ont été mise en évidence particulièrement par l’étude des patients présentant diverse déficiences immunitaire primaires (29). Très peu de mutations affectent uniquement les cellules NK, mais ces patients ont une susceptibilité à certains virus, notamment les *Herpesvirus*. Bien que l’effet des cellules NK contre les cellules transformées ait été démontré, le nombre faible de

patients présentant un déficit primaire en NK rends la tâche difficile pour observer une sensibilité marquée aux cancers en absence de cellules NK (30). Une lien a cependant pu être établi entre certaines déficiences en NK et la susceptibilité à certains cancers (30).

Les cellules NK peuvent utiliser plusieurs voies pour effectuer la lyse des cellules altérées. La voie la plus connue est l'utilisation de granules lytiques ou dégranulation. Ces granules sont préformées dans les cellules et peuvent être enrichies avec l'activation des différents récepteurs activateurs (31). Lors de l'activation des NK, les granules sont polarisées vers la synapse immunologique et vont fusionner avec la membrane cellulaire et relâcher leur contenu dans la synapse, qui va alors entrer dans la cellule cible. Les granzymes et la perforine sont les composants actifs principaux de ces granules lytiques. Le rôle de la perforine a longtemps été pensé comme créant des pores dans la membrane de la cellule cible pour directement faire la lyse des cellules ou pour laisser entrer les granzymes (32). Cependant, des résultats contradictoires montraient une absence de perméabilité pour les molécules autres que les ions lors de la présence de perforine (33). Depuis, il a été démontré que les molécules de perforine s'organisent en petits pores qui permettent la diffusion, mais avec une dynamique différente des autres porines (34). L'importance de la perforine dans cette voie est soulignée par la susceptibilité des patients déficitaires en perforine au développement de cancers (29, 35).

Les granzymes sont une famille de protéines homologues et partiellement redondantes (36). Chez l'humain, les granzymes A, B, H, K et M peuvent être exprimées, mais les granzymes A et B sont les mieux caractérisées. Les granzymes A et B fragmentent l'ADN ou agissent sur les mitochondries et l'activation des caspases, respectivement (37). Le résultat est le déclenchement de la mort cellulaire chez la cellule cible (38). Les granzymes H, K et M peuvent être exprimées par les cellules NK et peuvent déclencher la mort cellulaire (39-41). Cependant, l'abrogation des granzymes A et B dans les souris cause une mort plus lente des cellules cibles, qui pourrait être due aux granzymes H, K ou M (31). La situation inverse n'est pas équivalente, ce qui laisse croire à une fonction partiellement redondante des granzymes H, K et M.

Une seconde voie empruntée par les cellules NK pour tuer les cellules anormales est par les récepteurs de mort. Les protéines *apoptosis antigen 1 ligand* (FasL), *tumor necrosis factor* (TNF)

et le *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) font partie de la superfamille du TNF et peuvent être exprimées par les cellules NK (42). Les mécanismes impliqués dans la signalisation de ces ligands ont été étudiés en détails (43). FASL est probablement le membre le mieux décrit de cette famille. L'engagement de FASL avec son récepteur FAS induit la formation d'un complexe de signalisation induisant la mort (DISC), composé de l'adaptateur FADD et de la Caspase 8 et qui déclenche le processus d'apoptose. L'engagement de DR4 et DR5, les récepteurs pour TRAIL, a un résultat très semblable à celui de FAS, mais TRADD et RIP sont aussi recrutés. Pour le TNF et son récepteur TNFR1 des résultats contradictoires ont été publiés. Il est possible que la réponse dépende du contexte ou de la cellule, mais l'hypothèse la plus solide implique les mêmes composants que pour les récepteurs DR4 et DR5.

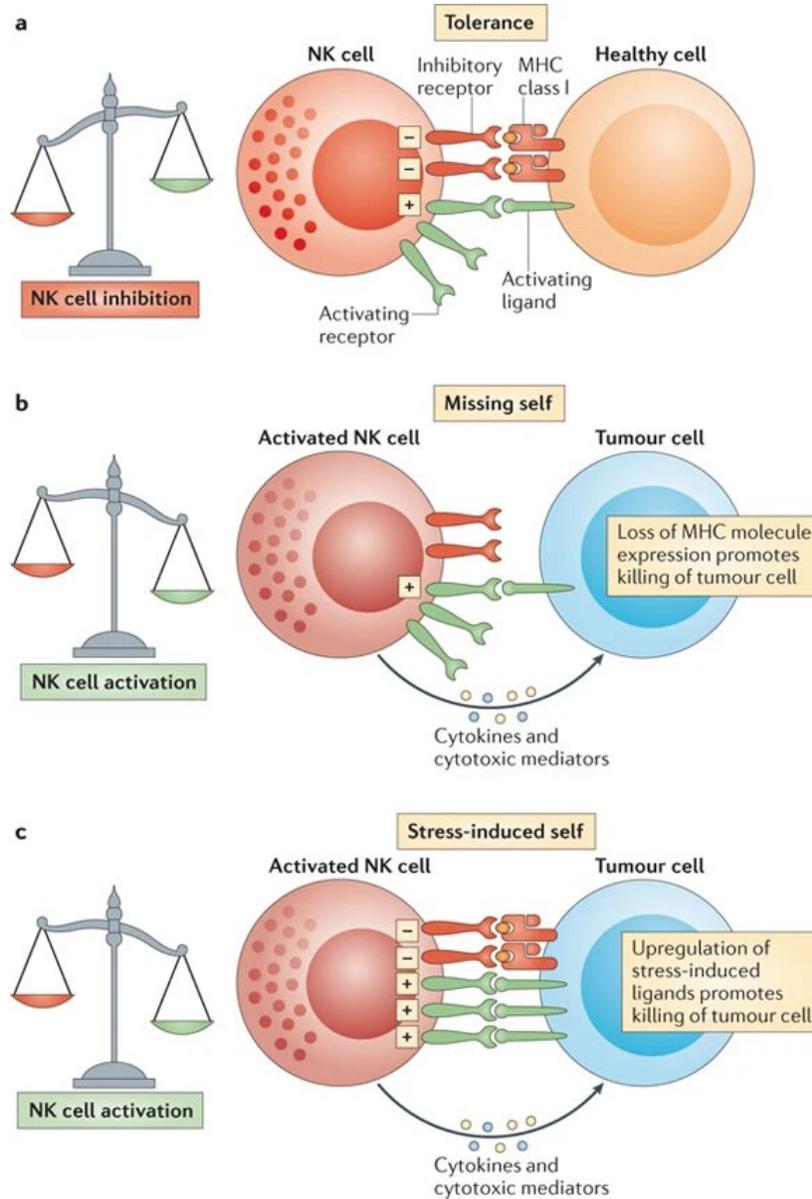
La deuxième fonction des NK est la production de cytokines. Des cytokines sécrétées, l'IFN $\gamma$  est l'une des plus cruciales. Il a des effets activateurs sur de nombreuses cellules immunitaires, dont les lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigènes. Parmi les autres cytokines produites on retrouve le TNF $\beta$ , l'IL-10, l'IL-13 et le GM-CSF (44). L'IL-10 et l'IL-13 sont des cytokines classées dans le type II et peuvent avoir des effets inhibiteurs sur les cellules NK. Les cellules NK activées peuvent aussi produire les chimiokines XCL1, CCL1, CCL3, CCL4, CCL5, CCL22 et CXCL8, qui peuvent recruter plus de cellules immunitaires (45).

Comme mentionné au chapitre précédent, ces deux fonctions sont différenciellement effectuées par les deux principales populations de cellules NK. Alors que les cellules CD56<sup>HI</sup> jouent un rôle plutôt sécrétoire et ont une activité cytotoxique faible, les cellules CD56<sup>DIM</sup> ont une forte capacité lytique et sécrètent nettement moins de cytokines (44).

### **1.1.3 Récepteurs et signalisation**

Contrairement aux lymphocytes T, qui utilisent un récepteur principal, le TCR, les NK déploient toute une panoplie de récepteurs activateurs et inhibiteurs. Leur réponse est donc liée à la balance des signaux activateurs et inhibiteurs (Figure 1.4) (46). Les récepteurs inhibiteurs reconnaissent principalement les molécules du MHC de classe I et permettent une tolérance des cellules du soi. Les récepteurs activateurs reconnaissent des marqueurs de stress qui sont exprimés par les cellules transformées ou infectées. À l'équilibre, les NK reçoivent moins de

signaux activateurs qu'inhibiteurs. Si la cellule cible perd les ligands associés au soi (situation du *missing self*) ou augmente l'expression des ligands de stress (situation du *stress-induced self*), les signaux activateurs priment sur les signaux inhibiteurs et la NK est activée.

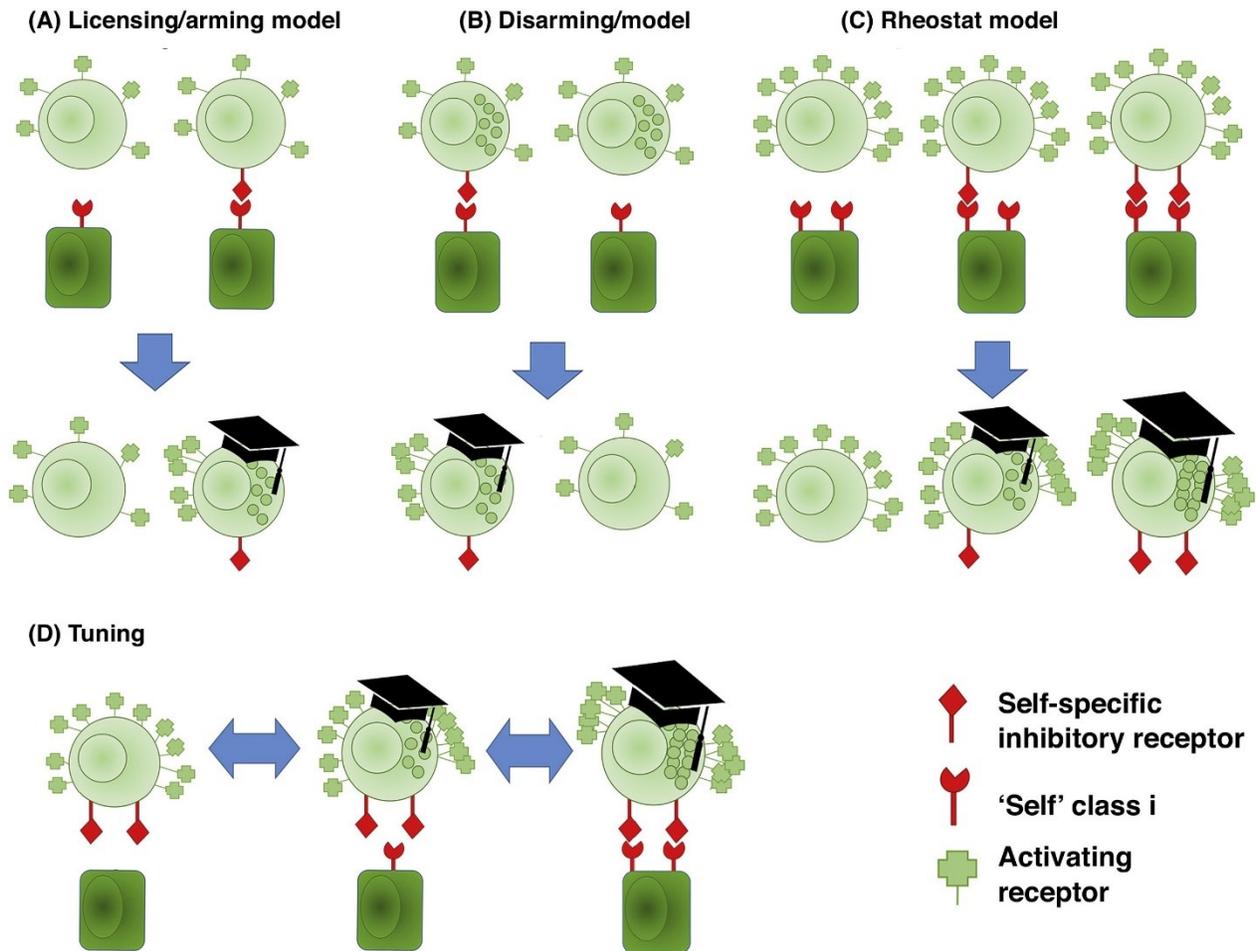


Nature Reviews | Immunology

**Figure 1.4 – Reconnaissance des cellules tumorales par les cellules NK.** Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature, Nature Reviews Immunology, Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer, Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Copyright 2012.

### 1.1.3.1 Le *licensing* NK

Les cellules NK subissent un processus d'éducation qui dicte leur réactivité. Un premier modèle a été proposé, le modèle du *licensing* (47). Selon ce modèle, les signaux provenant de la reconnaissance du soi par les récepteurs inhibiteurs permettent aux NK de devenir plus sensibles aux signaux activateurs (Figure 1.5). La délétion des protéines en aval des récepteurs inhibiteurs NK (SHP-1, SHIP ou SAP) freine l'éducation des cellules NK immatures dans certaines expériences (48). Le modèle du *arming* est équivalent au *licensing* (49, 50).



Trends in Immunology

**Figure 1.5 – Modèles d'éducation des cellules NK.** Réimprimé de Trends in Immunology, 39(3), Jeanette E. Boudreau et Katharine C. Hsu, Natural Killer Cell Education and the Response to Infection and Cancer Therapy: Stay Tuned, pp. 222-239, Copyright (2020), avec la permission de Elsevier.

Un second modèle, en opposition aux deux précédents, est le modèle du *disarming* (49, 51). Selon ce modèle, les NK sont toutes dans un état réactif et deviennent désactivées quand elles reçoivent des signaux activateurs persistants. Ce modèle est concordant avec l'observation que les cellules NK exprimant le récepteur activateur KIR2DS1, en présence de leur ligand HLA-C2, deviennent inactives (52).

Le modèle du rhéostat représente une précision qui peut s'appliquer aux précédents modèles. Selon ce modèle, le niveau d'éducation des cellules NK est dépendant de la dose de signal reçu par la cellule. L'éducation devient donc un spectre plutôt qu'un état binaire. Ce modèle a été développé conformément aux observations que la densité des récepteurs, le nombre de récepteurs différents et la disponibilité de leurs ligands sont corrélés à l'intensité de l'éducation (48).

Un autre postulat a été proposé, soit le modèle du *tuning*. Les modèles précédents considèrent une éducation statique, mais selon le *tuning*, l'éducation NK pourrait changer selon l'environnement des cellules NK. La perte ou le gain rapide de récepteurs est compensé par une modification de l'éducation des cellules NK. Ce modèle a été émis suite à la simulation de ces changements avec l'aide d'anticorps neutralisants ou de transferts adoptifs (53, 54).

Bien que le modèle du *licensing* soit le plus répandu, aucune preuve définitive ne permet de valider l'une de ces hypothèses (48). Cependant, tous les modèles s'entendent sur l'importance des récepteurs inhibiteurs et activateurs.

#### 1.1.3.2 Les KIR

Les NK expriment une grande variété de récepteurs, mais les récepteurs les plus caractéristiques sont les *Killer cell Immunoglobulin-like Receptors* (KIR). Les KIRs forment un locus distinct avec 13 gènes et 2 pseudogènes hautement similaires et situés sur le chromosome 19 (55). Les différents gènes ont probablement été créés par duplication durant l'évolution. Leur organisation est complexe en raison de la variabilité du nombre de gènes présents et de la variabilité de leur expression sur les cellules. Quatre gènes, KIR3DL3, KIR3DP1, KIR2DL4 et KIR3DL2, sont toujours présents chez les individus. Les autres gènes sont hérités en haplotypes. Les KIRs sont aussi polymorphiques, ce qui complique encore le système (56-58).

Certains KIRs sont inhibiteurs et présentent un long segment intracellulaire, tandis que les autres sont activateurs et ont une courte queue intracellulaire. Le type de KIR est indiqué dans sa nomenclature par l'avant-dernier caractère (L, S, ou P; segment long, court, ou pseudogène, respectivement). Les KIRs inhibiteurs signalent par des motifs inhibiteurs d'immunorécepteurs à tyrosine (ITIM), qui recrutent les phosphatases SHP-1, SHP-2 et SHIP (55). Les KIRs activateurs ne possèdent pas de domaine de signalisation, mais s'associent avec un intermédiaire, DAP12 (59). L'adaptateur DAP12 contient un motif activateur d'immunorécepteurs à tyrosine (ITAM). Les ITAMs, lorsqu'ils sont phosphorylés, agissent comme des plateformes d'attachement et d'activation des protéines. Le récepteur KIR2DL4 est une exception et agit comme un récepteur activateur par un adaptateur, FcεR1γ (60). Le KIR2DL4 semble impliqué dans le processus de vascularisation durant la grossesse plutôt que dans les réactions immunitaires (61).

Les ligands des KIRs sont les molécules des antigène leucocytaires humains (HLA) de classe I (Tableau 1). Parmi ces ligands, on retrouve les HLA-I classiques (HLA-A, B, C), mais aussi les HLA-F et HLA-G qui n'ont pas de rôle connu dans la présentation antigénique (55). Tous les HLA ne sont pas reconnus par les KIRs et certains épitopes (C1, C2 et Bw4) ont des récepteurs. Les peptides présentés par le HLA ont aussi une importance dans l'affinité de la liaison KIR-HLA ; par exemple le KIR2DS2 peut reconnaître un peptide du virus de l'hépatite C présenté sur le HLA-C\*01 :02 (62). Pour certains KIRs par contre, leur ligand reste encore à identifier.

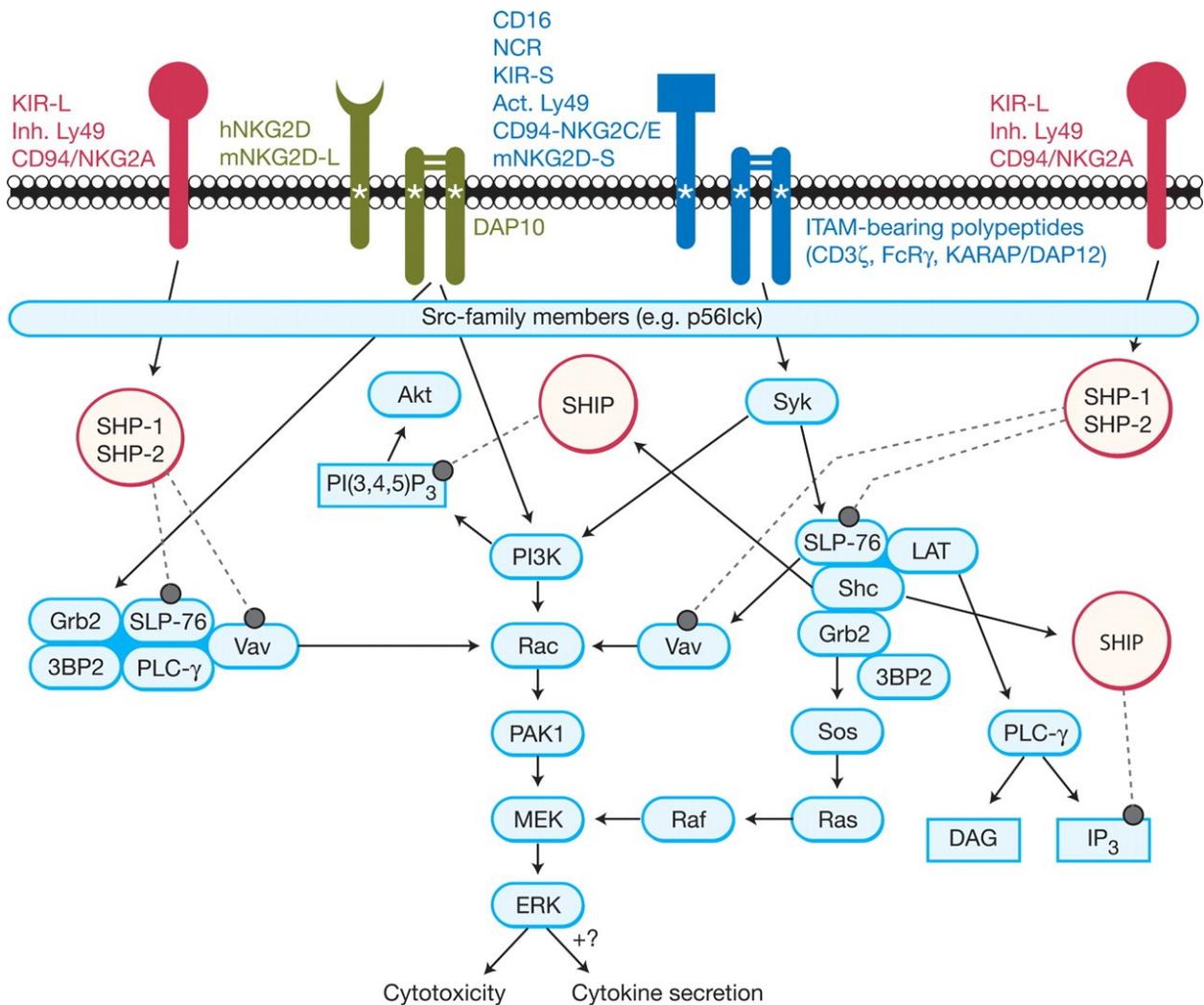
**Tableau 1.1 – Récepteurs de cellules NK**

<b>Famille</b>	<b>Récepteurs</b>	<b>Ligand</b>	<b>Effet</b>
<b>KIR</b>			
	KIR2DL1	HLA-C2	-
	KIR2DL2/3	HLA-C1	-
	KIR2DL4	HLA-G	+
	KIR2DL5		-
	KIR3DL1	HLA-Bw4	-
	KIR2DL2	HLA-A3/A11	-
	KIR2DS1	HLA-C2	+
	KIR2DS2	HLA-C1	+
	KIR2DS3		+
	KIR2DS4		+
	KIR2DS5		+
	KIR3DS1	HLA-Bw4	+
<b>NKG2</b>			
	NKG2A	HLA-E	-
	NKG2C	HLA-E	+
	NKG2D	MIC-A/B, ULBP1/2/3/4/5/6	+
	NKG2E	HLA-E	+
<b>NCR</b>			
	NKp30	HS, PSP, BAT3, B7-H6, Galectine-3	+
	NKp44	HS, PSP, NKp44L, PCNA, BAT3, PDGF-DD	+
	NKp46	HS, PSP	+
	NKp80	AICL	+
<b>Autres</b>			
	CD16	IgG	+
	LILRB1	HLA classe I, UL18	-
	2B4	CD48	+/-
	NTB-A	NTB-A	+/-
	KLRG1	Cadhérines-E/N/R	-
	DNAM-1	PVR, Nectin-2	+

HS : Sulfate d'héparan, PSP : Produits de Surface associés aux Pathogènes

### 1.1.3.3 Récepteurs inhibiteurs

Similairement aux KIR, NKG2A est un récepteur qui s'apparie avec CD94 et dont le ligand est le HLA non-classique HLA-E. HLA-E est particulier en raison du type de peptide présentés. Les séquences protéiques de localisation des HLA classiques se lient dans la cavité de HLA-E. Les différents peptides modifient l'affinité du NKG2A pour son ligand, créant un gradient de réponses au HLA-E (63). Comme la majorité des récepteurs inhibiteurs, NKG2A possède un domaine ITIM qui recrute les effecteurs SHP-1 et SHP-2 (Figure 1.6) (64).



**Figure 1.6 – Signalisation générale des cellules NK.** Republished with permission of American Association for the Advancement of Science, from Vivier E, Nunès JA, Vély F. Natural Killer Cell Signaling Pathways. Science. 2004;306(5701):1517-9; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.

Le récepteur LILRB1 a aussi été identifié comme un récepteur pour les HLA de classe I (65). Sa portion intracellulaire comporte 4 ITIMs pour effectuer la signalisation inhibitrice (66). Il reconnaît le HLA-G, les HLA-A/B/C et certaines protéines virales analogues au HLA, comme UL18 du CMV (67). Ce récepteur n'est pas entièrement redondant avec les KIRs, puisque des polymorphismes de LILRB1 sont associés avec le contrôle du virus du CMV chez les patients recevant une transplantation de cellules souches (68).

Le récepteur KLRG1 est aussi exprimé sur les cellules NK et utilise un domaine ITIM pour la transduction de sa signalisation (69). Il se lie aux cadhérines-E/N/R, et bloque l'activité des cellules NK (70). Son expression augmente avec l'activation ou la prolifération des cellules NK (71). En plus d'avoir des fonctions atténuées, les cellules NK qui expriment fortement le KLRG1 ont une survie diminuée, une prolifération limitée (72).

#### 1.1.3.4 Récepteurs activateurs

Bien que les NK expriment une grande variété de récepteurs inhibiteurs, elles ont une plus grande variété de récepteurs activateurs. Le récepteur CD16 (FcγRIII) n'est exprimé que sur la population de NK CD56<sup>Dim</sup> ayant une meilleure capacité cytotoxique. Il lie le fragment Fc des IgG et peut reconnaître les cellules opsonisées par ces anticorps (73). CD16 est associé aux récepteurs CD3ζ ou FcεRIγ, qui ont les domaines de signalisation ITAM (Figure 1.6) (74).

Les NCR sont un groupe important de récepteurs activateurs. Il comprend les récepteurs NKp46, NKp44 et NKp30 (75). NKp46 et NKp30 s'associent avec la chaîne du CD3ζ ou le FcεRIγ, tandis que NKp44 s'associe avec DAP12, mais possède aussi un domaine ITIM sur sa chaîne (76-78). Cet ITIM est cependant incapable de recruter les molécules SHP-1/2 et SHIP, donc ne peut avoir d'effets inhibiteurs (78). Les NCRs reconnaissent les molécules de la famille des sulfates d'héparan, qui peuvent indiquer des changements dans l'état des cellules (79). Des composants de plusieurs pathogènes sont aussi reconnus par les NCRs en général (75). Les récepteurs ont aussi des ligands spécifiques. Le NKp44 reconnaît les protéines NKp44L et PCNA, des protéines nucléaires dont l'expression aberrante à la surface survient suite à un stress cellulaire (80, 81). NKp44 lie aussi le PDGF-DD, un facteur de croissance sécrété par plusieurs tumeurs (82). Les tumeurs peuvent par contre produire le facteur NID1, un ligand inactif de NKp44 (83). L'attachement de NID1 empêche

la reconnaissance du PDGF-DD et protège les tumeurs. NKp30 reconnaît le ligand B7-H6 et la galectine-3, qui sont surexprimées par plusieurs cancers (84, 85). NKp30 peut aussi reconnaître le BAT3, qui peut être localisé à l'extérieur du noyau en raison d'un stress cellulaire comme pour NKp44L et PCNA (86). Le marqueur CD59 n'a pas de domaine de signalisation, mais sa liaison avec le ligand CD2 amplifie la réponse des NCRs NKp46 et NKp30 (87).

Le récepteur NKp80 appartient aussi à la famille des NCR (88). Le NKp80 ne s'associe pas à une protéine pour effectuer sa signalisation, il comporte un domaine HemITAM dans sa portion intracellulaire (89). Son ligand, AICL, est exprimé par les cellules d'origine myéloïde, mais aussi sur les cellules NK (90). La liaison de NKp80 avec AICL sur les cellules myéloïdes permet un dialogue entre ces cellules, mais contribue aussi à la surveillance des cancers d'origine myéloïde (88, 91). L'activation des cellules NK par l'IL-12 ou l'IL18 provoque une expression de AICL, qui à son tour cause une internalisation des récepteurs NKp80 (91).

Un autre récepteur important dans l'activation des NK est le récepteur NKG2D. Ses ligands sont les molécules MICA/B et les ULBP1-6 (92-94). Ces ligands sont surexprimés dans les cellules en état de stress (95). NKG2D s'apparie avec DAP10 (96). La protéine DAP10 possède un site de signalisation ITT-adjacent similaire à la signalisation du CD28, qui active l'intermédiaire PI3K (97).

Les récepteurs 2B4 et NTB-A ont une fonction ambivalente. Leur signalisation activatrice est dépendante du niveau de la protéine SAP. En absence de SAP, SHP-1 se lie aux récepteurs et leurs signaux deviennent inhibiteurs (98, 99). Le ligand de 2B4 a été identifié comme étant CD48, , mais celui de NTB-A est longtemps resté inconnu (100). NTB-A forme une association homophile avec les protéines NTB-A sur les cellules cibles (101).

Un autre récepteur activateur est le DNAM-1. Il lie les ligands PVR et Nectin-2, deux marqueurs associés avec le stress cellulaire (102). Le signal de DNAM-1 est initié par un motif ITT-adjacent comme pour DAP10 (103).

Finalement, certains récepteurs ont des fonctions très limitées en conditions normales. Le récepteur NKG2C reconnaît le HLA-E comme NKG2A, mais se lie à la protéine adaptateur DAP12 (Figure 1.6) (63, 104). NKG2C est principalement impliqué dans la réponse contre le

cytomégalovirus, bien que son rôle dans la réponse au cytomégalovirus ne soit pas clairement établi (63, 105).

Le récepteur NKG2E est souvent associé aux récepteurs activateurs des cellules NK. Il est très semblable au récepteur NKG2C et reconnaît aussi le ligand HLA-E (104). Sa fonction est cependant encore inconnue et il n'est pas exprimé à la surface des cellules NK en raison de sa région cytoplasmique qui le retient au réticulum endoplasmique (106). Il est donc peu probable qu'il serve directement de récepteur activateur pour les cellules NK.

Les molécules d'adhésion, principalement LFA-1 et LFA-2 (CD2), jouent aussi un rôle dans l'activation des cellules NK. Elles envoient le premier signal par Erk1/2 et l'abrogation de leur interaction ou de leur signalisation empêche les fonctions cytotoxiques des cellules NK (107, 108).

#### **1.1.4 Épuisement des cellules NK**

Le phénomène d'épuisement a été décrit sur les lymphocytes T cytotoxiques (109). Il est associé avec un défaut fonctionnel et des différences phénotypiques. L'épuisement est déclenché par une stimulation chronique des cellules T cytotoxiques. Les cellules épuisées se mettent à exprimer des molécules de points de contrôle; des récepteurs inhibiteurs dont l'activation contribue à diminuer la fonction. Les inhibiteurs de point de contrôle sont exprimés lors de l'activation normale des cellules et ils constituent dans ce contexte une stratégie pour éviter la suractivation, qui peut être très dévastatrice (109, 110). Les récepteurs des points de contrôle les mieux décrits sont probablement PD1 et CTLA4 et la découverte d'inhibiteurs de ces récepteurs a été récompensé par le prix Nobel de médecine de 2018. Les récepteurs TIGIT, LAG3 et Tim3 sont aussi des points de contrôle sur les lymphocytes T (109).

Les inhibiteurs des points de contrôle bloquent le contact et la signalisation des récepteurs associés avec l'épuisement. Des anticorps neutralisant les voies CTLA4 et PD-1 ont depuis été approuvés pour l'utilisation chez les patients atteints d'un vaste éventail de cancers, dont le mélanome, le cancer du sein triple-négatif et des cancers du tractus gastro-intestinal (111).

Les récepteurs associés à l'épuisement, PD-1, TIGIT, LAG3, KLRG1 et Tim3, ont aussi été observés sur les cellules NK de patients atteints de différents cancers (112). L'expression de ces marqueurs

est par contre très variable d'une étude à l'autre et même d'une tumeur à une autre. Une dysfonction globale des NK a aussi été observée, ce qui suggère l'existence d'un phénomène d'épuisement similaire à celui observé avec les cellules T. Malgré ce parallèle, le principe d'épuisement des cellules NK n'est pas encore entièrement défini. Les inhibiteurs de PD-1 ont été étudiés avec les cellules NK et montrent un effet (113, 114). Le récepteur Tim3 par contre, peut produire des effets activateurs ou inhibiteurs sur les NK (115, 116). Tim3 est aussi présent à la surface des cellules NK périphériques, ce qui représente une distribution différente que sur les lymphocytes T (116). Plusieurs essais cliniques pour des inhibiteurs sont d'ailleurs en cours et ciblent plusieurs de ces récepteurs de points de contrôle (112).

Le marqueur NKG2A agit aussi comme un point de contrôle pour les NK. Il s'agit d'un marqueur inhibiteur qui peut être surexprimé dans l'activation des NK. Des anticorps neutralisant l'interaction avec son ligand ont été étudiés (117). La neutralisation de NKG2A a aussi un effet sur les lymphocytes T cytotoxiques (117). Son ligand est d'ailleurs exprimé sur une forte proportion de tumeurs dans plusieurs cancers (118-120).

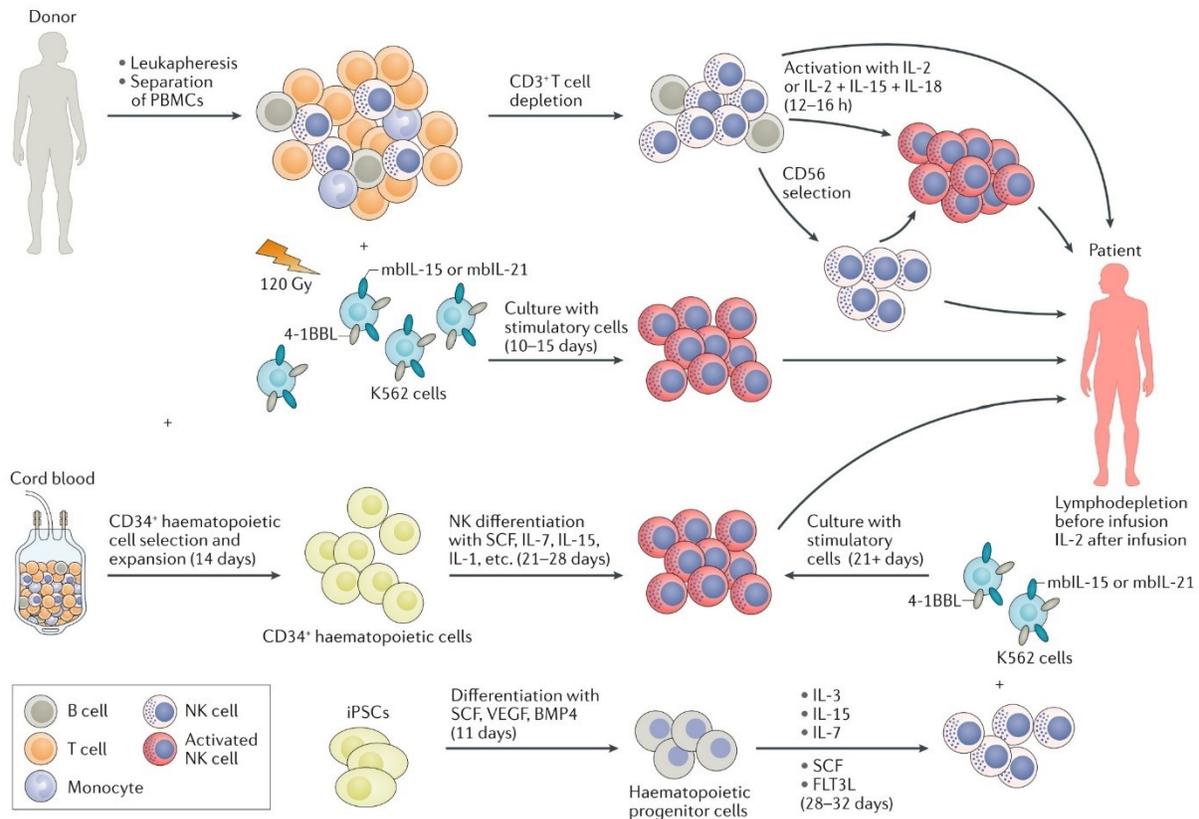
## **1.2 Immunothérapies à base de NK**

Les cellules NK, en raison de leurs fonctions naturelle anti-tumorales, représentent donc un choix intéressant de cellules pour l'immunothérapie du cancer. Une étude récente a démontré que ces les NK sont bien tolérées et peuvent avoir un effet soutenu dans un contexte de traitement allogénique (3).

### **1.2.1 Sources de NK**

Plusieurs sources ont été envisagées pour les immunothérapies à base de cellules NK (Figure 1.7). Une première possibilité pour développer une immunothérapie NK est à l'aide de lignées cellulaires NK. En effet la lignée de cellules NK92 a été approchée pour servir d'immunothérapie (121). Une irradiation des cellules NK92 est nécessaire avant l'infusion chez le patient pour éviter la prolifération incontrôlée de la lignée (122). Les cellules irradiées demeurent capables de survivre et d'exercer leur effet cytotoxique in vivo (122). Une stimulation est aussi nécessaire pour

augmenter l'activité des NK92. L'irradiation nécessaire des cellules diminue leur potentiel pour l'utilisation en clinique.



**Figure 1.7 – Sources et méthodes d’isolation, d’activation et de propagation des cellules NK primaires.** Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH : Springer Nature, Nature Reviews Drug Discovery, NK cells for cancer immunotherapy, Shimasaki N, Jain A, Campana D. Copyright 2020

La plus accessible est le sang périphérique et l'utilisation de NK obtenues par leukaphérèse a été évoquée dès 1984 (123). Depuis, des essais ont été menés pour évaluer la sûreté et l'efficacité des NK dérivées du sang (124, 125). L'utilisation de cellules NK allogéniques a aussi été théorisée d'après l'analyse de l'impact des NK dans la transplantation de cellules souches hématopoïétiques. L'utilisation de donneurs présentant des mésappariements KIR-HLA peut favoriser l'effet anti-leucémique post-greffe (126). Ces résultats ont été confirmés dans un contexte de traitement avec une immunothérapie de NK. L'utilisation de NK allogéniques provenant du sang est bien tolérée chez les patients (127-134). Les NK doivent cependant subir

une activation avant d'être infusées. Beaucoup ont expérimenté avec une stimulation avec l'IL-2 (127, 128, 131). Des systèmes d'expansion des NK ont aussi permis d'activer fortement les NK et augmenter leur nombre considérablement (133-135). Parmi les essais cliniques effectués avec des cellules NK amplifiées, une seule a rapporté le développement de symptômes de maladie du greffon contre l'hôte (134). Cette réaction est probablement due à une réaction de l'IL-2 administré avec des lymphocytes T allogéniques (134, 136).

Le sang de cordon ombilical est une source de cellules naïves intéressante. Les NK circulant dans le sang de cordon peuvent être isolées et mises en expansion, comme pour le sang périphérique, mais il est aussi possible de différencier les NK à partir de cellules souches hématopoïétiques du cordon (137, 138). Pour l'expansion des NK du cordon, des systèmes semblables à ceux employés pour le sang périphérique ont été utilisés, avec des cytokines ou des cellules nourricières (138-140). L'importance de l'éducation dans les immunothérapies de NK du cordon n'a pas encore été élucidée. Les cellules dérivées du cordon ont moins d'effet cytotoxique que les cellules provenant du sang périphérique (141). Plusieurs essais cliniques ont été initiés avec des NK issus du sang de cordon contre des leucémies ou lymphomes (141). Un des avantages principaux de l'utilisation des cellules de cordons est la grande disponibilité du sang de cordons dans les banques publiques (142).

Plus récemment, des auteurs ont réussi à différencier des cellules NK à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) (143-145). L'avantage est la possibilité de modifier les cellules à l'étape iPSC, avant la différenciation, et en raison de leurs capacités prolifératives, d'obtenir des banques de cellules iPSC modifiées prêtes à la différenciation toutes dérivées d'un même clone, donc standardisant le produit cellulaire final (146). Leurs effets contre différents cancers sont par contre moins prononcés que ceux des cellules amplifiées à partir du sang périphérique (143, 144, 147). Après leur différenciation, les cellules NK dérivées d'iPSC sont amplifiées *in vitro* comme les cellules du sang (143). Bien que les cellules iPSC semblent extrêmement prometteuses sur le plan clinique, cette technologie est toutefois plus récente et certaines étapes restent à régler avant qu'elles deviennent répandues en clinique (148).

L'utilisation de cellules NK en tant que thérapie comporte des avantages : les cellules NK ne causent pas de tempête inflammatoire, sont bien tolérées et il est possible d'administrer des cellules allogéniques. La tempête inflammatoire ou *cytokine release syndrome* (CRS) a été, entre autres, observée chez les patients traités avec des infusions de CAR-T (149). Il s'agit d'une réponse immune systémique démesurée. La cytokine IL-6 joue un rôle central dans la CRS et un traitement avec l'anticorps Tocilizumab est efficace pour aider à la diminuer (149). L'IL-1 et le TNF $\alpha$  semblent aussi impliqués dans le développement et la sévérité de la CRS et leur blocage par l'Anakinra et les anti-TNF $\alpha$  est efficace pour renverser les symptômes (150, 151). Ces cytokines sont majoritairement produites par les cellules macrophages et monocytes, et l'ablation de ces cellules pourrait permettre de prévenir la CRS (150).

Les cellules NK, lors de leur infusion, sont associées avec un profil cytokinique différent, avec une prédominance d'IFN $\gamma$  et de GM-CSF (152). Du TNF $\alpha$  peut être produit par les cellules NK, mais le niveau est plus faible qu'avec les cellules CAR-T (146). La meilleure démonstration cependant reste la démonstration chez les patients de l'innocuité des cellules CAR-NK (3). Dans cet essai, aucune incidence de CRS n'a été observée et ce, même avec la plus forte dose de cellules administrée.

### **1.2.2 Stratégies pour améliorer l'efficacité des cellules NK**

Plusieurs stratégies ont été envisagées pour augmenter la capacité cytotoxique des cellules NK. L'ajout de plusieurs facteurs permet d'ailleurs d'augmenter la capacité des cellules NK endogènes. L'exemple le plus probant est sans doute l'utilisation d'anticorps pour diriger les NK vers une cible prédéfinie. Le récepteur CD16 est capable de déclencher la lyse de cibles sans co-stimulation (153). Cette stratégie a été utilisée avec de nombreuses cibles (154). La mieux décrite de ces cibles est sans doute le Rituximab qui reconnaît l'antigène CD20 à la surface des lymphomes non-hodgkiniens (155, 156). Après le succès de cette stratégie, des anticorps ont été utilisés contre d'autres antigènes comme HER2, EGFR, GD2 et CD38 (157-160). L'importance du récepteur CD16 sur les NK, dans le traitement avec les anticorps, est mis en évidence par un polymorphisme. Le remplacement d'un acide aminé dans CD16 permet la liaison des IgG avec une plus grande

affinité. Les patients homozygotes pour cette mutation répondent mieux au traitement avec le Rituximab (156). Les anticorps ont aussi été utilisés avec un traitement de NK amplifiées (128).

Des stratégies pour augmenter l'affinité du récepteur CD16 ont été approchées. L'expression transitoire de la forme haute affinité de CD16 permet d'augmenter l'affinité pour les anticorps (161). Par contre, cette stratégie ne permet pas l'expression soutenue du transgène qui est perdu très rapidement. Pour éviter la perte rapide, un vecteur viral intégrant pourrait être utilisé (162). En plus, CD16 peut être libéré de la membrane par une protéase, ADAM17, ce qui limite son effet (163). L'incorporation d'une modification empêchant la coupure par ADAM17 avec la forme haute-affinité permet d'obtenir une forme optimale de CD16 (162).

Une autre stratégie pour diriger les fonctions effectrices des cellules NK a été mise au point avec un domaine ScFv spécifique pour CD16 et un domaine ScFv spécifique pour un antigène de la cellule tumorale (164). Cette molécule a une efficacité similaire à un anticorps monoclonal contre la leucémie (165). L'ajout d'un domaine IL-15 dans la molécule permet de promouvoir la survie des cellules NK en plus d'augmenter leur efficacité (166). Le désavantage de cette stratégie reste l'élimination du CD16 de la surface par la métalloprotéase ADAM17 (164). Des stratégies complémentaires pour éviter la perte de CD16 sont donc nécessaires pour optimiser cette stratégie, comme pour l'utilisation d'anticorps monoclonaux.

Les récepteurs inhibiteurs peuvent aussi être ciblés pour améliorer l'efficacité des cellules NK en immunothérapie. Des anticorps neutralisant l'engagement ou la signalisation des récepteurs inhibiteurs ont été étudiés ou sont présentement étudiés dans plusieurs essais cliniques (112, 167, 168). Des anticorps neutralisant les KIR, le NKG2A et le LILRB1 préviennent les interactions avec leurs ligands (169). Les récepteurs associés à l'épuisement, PD-1, TIGIT et Tim-3 ont pu aussi être modulés pour augmenter le contrôle des tumeurs par les cellules NK (170-172).

L'utilisation d'anticorps pour bloquer ces voies requiert une administration prolongée pour contourner leur élimination. Des stratégies alternatives ont été envisagées pour répondre à cette problématique. La transduction de protéines dont la fonction est de séquestrer le NKG2A et d'éviter la présentation à la surface a été mise au point (173). La suppression du NKG2A peut d'ailleurs se montrer plus efficace que la neutralisation avec un anticorps.

Une autre stratégie plus en amont, pour éviter la signalisation, est d'éliminer l'expression des différents récepteurs inhibiteurs. Plusieurs outils permettent d'empêcher l'expression, mais le développement de la technologie d'édition génomique par *Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats* (CRISPR) permet de modifier le génome à l'aide d'une nucléase dirigée par une séquence nucléique (174). Cette technologie peut être utilisée pour éliminer l'expression de récepteurs inhibiteurs sur les cellules NK (175). L'élimination du récepteur inhibiteur PD-1 sur les lymphocytes T par CRISPR a montré une amélioration de leur réactivité et permet une résistance aux signaux inhibiteurs (176).

Pour effectuer l'édition génomique, plusieurs stratégies d'acheminement des composants de CRISPR ont été développées (177). Les techniques les plus répandues sont l'électroporation/nucléofection, la lipofection et la transduction. La microinjection est aussi utilisée par certaines équipes, mais requiert une expertise et des équipements spécialisés, en plus d'être moins approprié pour la production d'un nombre important de cellules tel que requis dans les immunothérapies cellulaires. L'électroporation utilise des courants électriques pour acheminer les composants dans les cellules. Pour la lipofection et la transduction, des particules non-virales ou virales sont utilisées pour acheminer le cargo, respectivement. La lipofection utilise des lipides pour former des particules contenant le matériel de modification génétique. Les particules transitent cependant par l'endosome et ont une efficacité moindre que l'électroporation (178). L'intégration dans le génome associé avec la livraison par les particules virales augmente le risque d'observer des modifications hors-cible. Ces méthodes sont aussi immunogéniques et peuvent activer les cellules immunitaires (177). Finalement, une stratégie plus récente, par peptides pénétrants, utilise les propriétés de certains peptides qui sont complexés avec le cargo et permettent son entrée dans la cellule (179, 180).

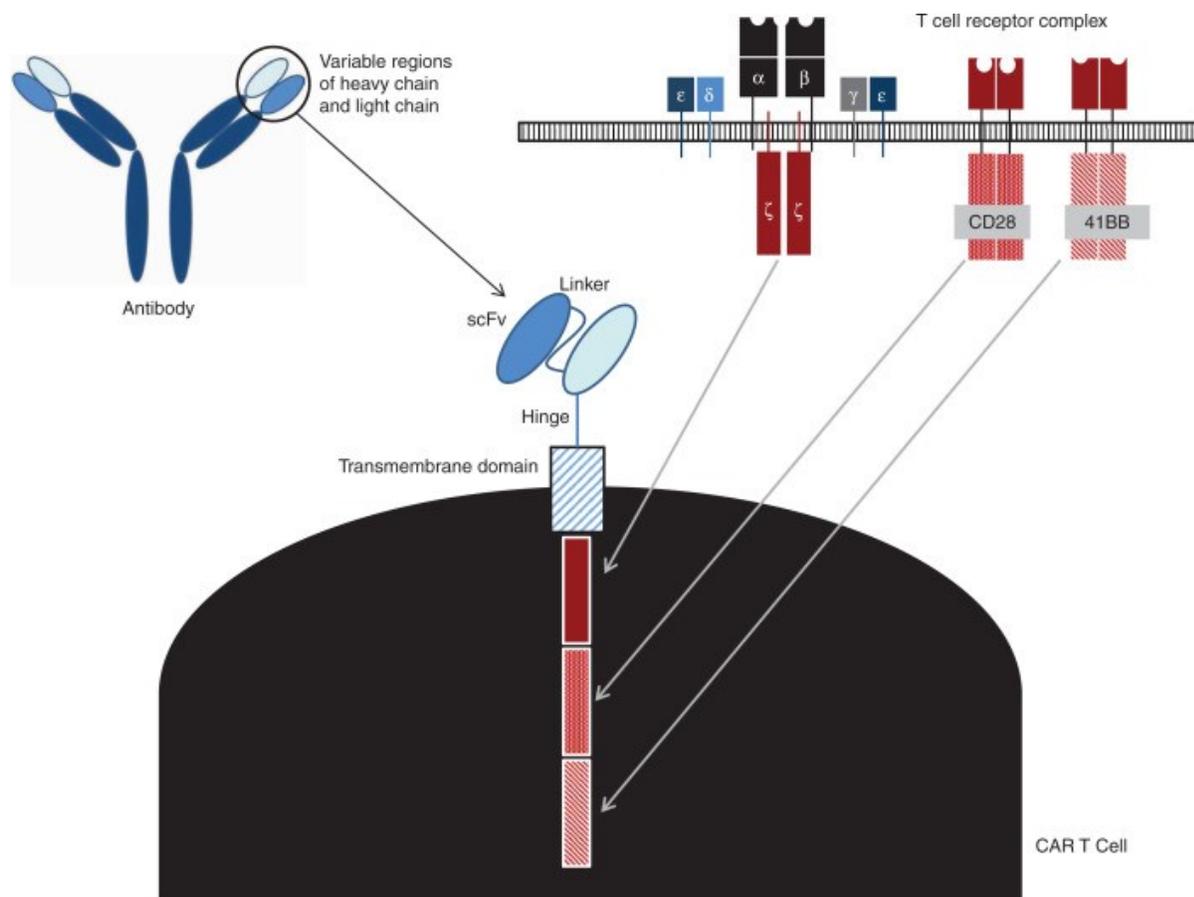
### **1.2.3 Récepteurs antigéniques chimériques**

S'inspirant de la rationnelle de l'utilisation d'anticorps pour diriger la cytotoxicité des cellules NK, l'utilisation de récepteurs d'antigènes chimériques (CAR) a été envisagée et développée dans les lymphocytes T. L'immunité humorale a la particularité d'être hautement spécifique avec une très forte affinité. Les premières tentatives de construction d'un récepteur chimérique ont

directement lié les deux fragments variables des chaînes légère et lourde, aux régions constantes des chaînes du TCR $\alpha$  et  $\beta$  (181). Par rapport à l'engagement du TCR, l'utilisation d'un segment d'anticorps permet la reconnaissance sans la présentation par le HLA. Comme les cancers et les virus peuvent développer des mécanismes pour limiter l'expression des HLA, contourner ce système présente un avantage certain.

### 1.2.3.1 Composants d'un CAR

L'expression de deux chaînes indépendantes requiert l'expression sur deux vecteurs indépendants. Pour simplifier le processus, les constructions ont pris la forme des CAR (Figure 1.7).



**Figure 1.8 – Composition et blocs constituants des récepteurs d'antigène chimériques.**

Copyright 2016 Newick K, Moon E, Albelda SM. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for solid tumors. Molecular therapy oncolytics. 2016;3:16006- under CC BY-NC-ND 4.0.

Les fragments variables ont été fusionnés pour créer un fragment variable en simple chaîne (ScFv) (182). Les fragments variables légers et lourds sont séparés par une courte chaîne de liaison (182, 183). La composition et longueur de cette chaîne est aussi importante que le choix des fragments variables dans la fonction du ScFv (183). Les chaînes de liaison longues peuvent déstabiliser l'association entre les deux parties variables et diminuer la spécificité du ScFv (184). Les chaînes de liaison courtes favorisent la formation de multimères et augmentent l'affinité du complexe (185, 186). Lorsque la chaîne de liaison est trop courte, les deux domaines variables d'une même protéine ne parviennent pas à s'associer et forment des complexes avec les domaines variables d'autres protéines. Les séquences de 15-20 acides aminés semblent par contre présenter un profil optimal au niveau du profil de multimérisation (186). Dans le cas d'un récepteur chimérique, la formation de multimères n'est pas idéale. La multimérisation des récepteurs TCR est l'un des facteurs qui permet sa signalisation (187). Les récepteurs chimériques doivent donc limiter la multimérisation pour éviter l'engagement du récepteur sans cible. Des séquences alternatives de chaînes de liaison ont été proposées pour améliorer les propriétés des ScFv, notamment la chaîne Withlow « 218 » qui réduit la digestion protéolytique et augmente l'affinité (188). L'ordre des fragments variables peut aussi avoir un impact sur l'expression et la fonction du ScFv (189).

L'affinité du ScFv peut être optimisée pour répondre à des besoins particuliers. En diminuant l'affinité de ScFv dirigés contre Her2, la reconnaissance de tumeurs Her2<sup>+</sup> est préservée, mais la reconnaissance des tissus sains est diminuée (190). Les cellules épithéliales des vaisseaux pulmonaires expriment une densité faible de Her2 et sont susceptibles d'être attaquées par des cellules CAR-T avec un ScFv de forte affinité (191). D'ailleurs, l'augmentation de l'affinité des ScFv ne semble pas corrélée avec une augmentation de l'effet ciblé des cellules au-delà d'un certain seuil (192).

Adjacent à la portion ScFv, un second espaceur est nécessaire, le domaine charnière. Le domaine charnière est primordial pour permettre la fonction du récepteur chimérique (193, 194). Sa longueur optimale dépend de la localisation de l'épitope reconnu par le ScFv (194). Les épitopes positionnés près de la membrane cellulaire de la cellule cible nécessitent une charnière plus

longue (195). La flexibilité d'une longue charnière permet au ScFv d'accéder à l'épitope avec un angle de contact adéquat. Au contraire, pour les épitopes plus distants de la membrane cellulaire, une charnière courte permet d'augmenter la réponse du récepteur (196). En plus de la longueur de la charnière, sa composition est aussi importante. Les régions charnières des corécepteur CD8 $\alpha$  et CD28 sont fréquemment utilisées (197, 198). Ces deux segments sont utilisés dans les thérapies approuvées par la FDA, Yescarta et Kymriah (199). Les régions CH2CH3 des IgGs ont aussi été utilisées dans les constructions de CARs (195, 200). Le domaine CH2 cause une réaction non dirigée contre l'antigène (201, 202). Des mutations de la région de reconnaissance par les récepteurs aux anticorps permettent d'empêcher l'activation en absence de cellules tumorales (201).

#### 1.2.3.2 Signalisation des CARs

Au début des développements des CAR, le domaine ScFv a été fusionné avec la région intracellulaire du CD3 $\zeta$ , une des sous unité de signalisation du TCR (203). La chaîne CD3 $\zeta$  a la particularité d'exprimer 3 ITAMs sur sa portion intracellulaire, donc envoie un signal puissant sur les lymphocytes T. Il a été rapidement évident que la signalisation seule du CD3 $\zeta$  n'était pas suffisante pour déclencher les processus cytotoxiques des lymphocytes T (204). Les CARs dits de seconde génération ont incorporé des domaines de co-stimulation pour résoudre ce problème. Le premier récepteur de co-stimulation à avoir été utilisé dans cette stratégie est CD28 (205). Le récepteur CD28 est bien connu comme un co-stimulateur important dans la réponse physiologique des lymphocytes T. Sa signalisation est particulière et implique les médiateurs PI3K et Grb2 (206).

D'autres protéines de co-stimulation ont été clonées pour servir dans les CARs de seconde génération. Le domaine intracellulaire de 4-1BB est très utilisé. L'utilisation de ce domaine, comparativement au CD28, présente des différences dans la force d'activation et dans les signaux de survie. Les cellules avec un CAR comportant un domaine 4-1BB sont donc retrouvées jusqu'à plusieurs années après leur infusion chez les patients. Parmi les autres domaines utilisés dans les constructions de seconde génération, on retrouve ICOS, OX40, CD27. Les récepteurs chimériques avec CD28 et 4-1BB ont réussi à se démarquer et ont été approuvés pour une utilisation thérapeutique.

De nombreuses stratégies ont été élaborées pour capitaliser sur le succès des CARs de seconde génération. Les CARs de troisième génération cumulent plus d'un domaine co-stimulateur dans le but de cumuler les effets. D'autres domaines ont aussi été combinés pour améliorer la technologie des cellules CAR-T. Une construction basée sur un KIR activateur et l'intermédiaire DAP12 a été utilisée dans un modèle murin de leucémie et a montré une efficacité comparable aux constructions de deuxième génération (207). Par contre, dans un modèle de tumeur solide, la construction KIR :DAP12 avait une meilleure efficacité que les constructions de seconde génération (207). Ce récepteur utilise la signalisation ITAM comme le CD3 $\zeta$ , mais sans inclure de domaine de co-stimulation.

### 1.2.3.3 Améliorations des CARs

Avec l'expérience de l'utilisation des CAR-T dans des cohortes plus nombreuses, l'échappement antigénique qui avait été prédit, est devenu évident (208-210). Une partie des patients souffrant de rechute après le traitement aux CAR-T ont perdu l'expression de l'antigène à la surface des cellules de leur cancer (210). Pour empêcher l'apparition ou la sélection de cellules sans antigène, l'utilisation de deux pressions de sélection a été envisagée. Plusieurs CAR peuvent être combinés pour cibler plus d'un antigène à la fois selon plusieurs stratégies. Certaines équipes ont développé des récepteurs chimériques avec plus d'un domaine ScFv sur la même chaîne protéique (211). D'autres ont plutôt opté pour des constructions exprimant deux chaînes distinctes ou pour des traitements séquentiels (212-214). Toutes les stratégies n'ont pas démontré d'effets adverses au-delà de ceux observés avec les CAR-T en général. De plus, l'apparition de cellules tumorales sans antigène a été prévenu avec l'utilisation de deux cibles, tel que prévu (214, 215).

Le second mécanisme menant à une rechutes chez les patients traités avec des CAR-T semble être lié à la faible persistance des cellules thérapeutiques (216). Les signaux cytokines sont importants pour maintenir les fonctions des cellules cytotoxiques et leur survie. Les domaines de signalisation ont été incorporés aux autres domaines d'un récepteur chimérique de seconde génération (217). Les motifs de signalisation en aval des récepteurs aux cytokines ont été identifiés (218). L'ajout de la signalisation STAT3 et STAT5 permet une augmentation de la prolifération des cellules T et un meilleur contrôle de la tumeur dans un modèle de leucémie (217).

L'ajout de cassettes permettant la sécrétion de facteurs de survie est une autre stratégie qui peut être ajoutée aux CARs. L'administration d'IL-2 cause de nombreux effets adverses qui peuvent même être très sérieux (219). La sécrétion autocrine d'IL-2 par les cellules T a été approchée pour contourner les effets adverses associés avec l'administration d'IL-2 (220). Les cellules T modifiées prolifèrent sans apport en IL-2 extérieur et gardent leur spécificité (221, 222). Malgré ces caractéristiques, l'utilisation de cellules modifiées pour produire l'IL-2 n'a montré aucun impact thérapeutique (223).

L'IL-12 est une autre cytokine pro-inflammatoire intéressante. Comme pour l'IL-2, le traitement systémique avec l'IL-12 est associé avec de nombreux effets adverses (224). L'expression de l'IL-12 par les cellules T diminue leur survie et peut causer des effets systémiques (225). L'utilisation d'un promoteur inductible par l'activation classique de la cellule permet d'éviter ces effets indésirables et augmente la fonction d'un CAR (226). Il est intéressant de noter que la toxicité systémique peut être évitée en limitant le nombre de cellules T utilisées dans le traitement (226, 227).

L'IL-15 promeut la survie pour les lymphocytes T, principalement ceux cytotoxiques, et semble donc un bon choix pour incorporer dans les thérapies (228). Son expression constitutive dans les cellules T permet d'améliorer la survie des cellules et leurs fonctions (229, 230). L'IL-15 peut toutefois promouvoir le développement de leucémies (231, 232). L'incorporation d'une stratégie pour éliminer les cellules modifiées permet d'améliorer la sûreté des immunothérapies cellulaires (230).

#### 1.2.3.4 Transition aux tumeurs solides

Finalement, le succès des CAR-T contre les tumeurs non solides, comme les leucémies, n'a pas pu être transposé aux tumeurs solides. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer la différence entre les tumeurs solides et non solides. Un premier point est l'état métabolique au sein des tumeurs solides. Les tumeurs sont très actives, mais utilisent principalement la glycolyse. Cela résulte en une hypoxie localisée et une acidification due à la production de lactate (233). Cet effet est connu sous le nom d'effet Warburg (234). L'acidification due au lactate a été démontrée comme inhibitrice pour les cellules T cytotoxiques (233, 235). D'autres facteurs de

l'environnement des tumeurs solides protègent la croissance de la tumeur. Les tumeurs contiennent aussi des cellules myéloïdes qui limitent les réponses immunitaires (236). Les cellules Treg peuvent aussi être recrutées au site tumoral et empêcher l'attaque de la tumeur (237).

Donc, l'expression d'autres cofacteurs a aussi été envisagée. Le ligand CD40L se lie au récepteur CD40, qui est présent sur les cellules dendritiques, macrophages et les lymphocytes B. Les cellules dendritiques et les macrophages sont connus pour leur présence dans l'environnement tumoral et peuvent favoriser la persistance de la tumeur. En ajoutant le CD40L à la surface des cellules effectrices, ces dernières sont capables de modifier le profil activateur des macrophages et des cellules dendritiques pour les rendre activateurs pour les cellules T (238). Le CD40L est aussi capable d'induire des modifications du profil phénotypique de la tumeur favorables pour la destruction de la tumeur (239). L'engagement de CD40 peut directement mener à l'apoptose des cellules tumorales (240). Il reste néanmoins à franchir un pas avant l'utilisation des CAR-T dans les cancers solides (241).

#### **1.2.4 CAR et cellules NK**

Devant le succès de ces stratégies sur les cellules T, leur application sur les cellules NK a été envisagée. La lignée NK92 a été la première source de cellules NK à être modifiée (242). Comme pour les cellules T, une construction basée sur le domaine de signalisation du CD3 $\zeta$  a été transduite dans la lignée NK92 (243). L'introduction d'un CAR sur les NK induit une réponse spécifique à l'antigène (243). Toutefois, l'utilisation d'une lignée cellulaire comme thérapie n'est pas idéale et ainsi les NK92 ont représenté plus une preuve de concept qu'un produit thérapeutique. Le problème majeur est la nécessité d'irradier ces cellules avant l'administration aux patients.

Un désavantage des cellules NK primaire est leur résistance aux modifications. En effet, les cellules NK isolées du sang périphérique sont notoirement difficiles à modifier par transfection ou par transduction (244, 245). La transduction est une des techniques utilisées pour la modification génétique des cellules. Malgré les avancées avec les vecteurs viraux, les cellules NK restent difficiles à modifier génétiquement. Cette résistance s'explique possiblement par la présence de mécanismes de défenses antiviraux dans les cellules NK (246, 247). Les cellules NK issues du

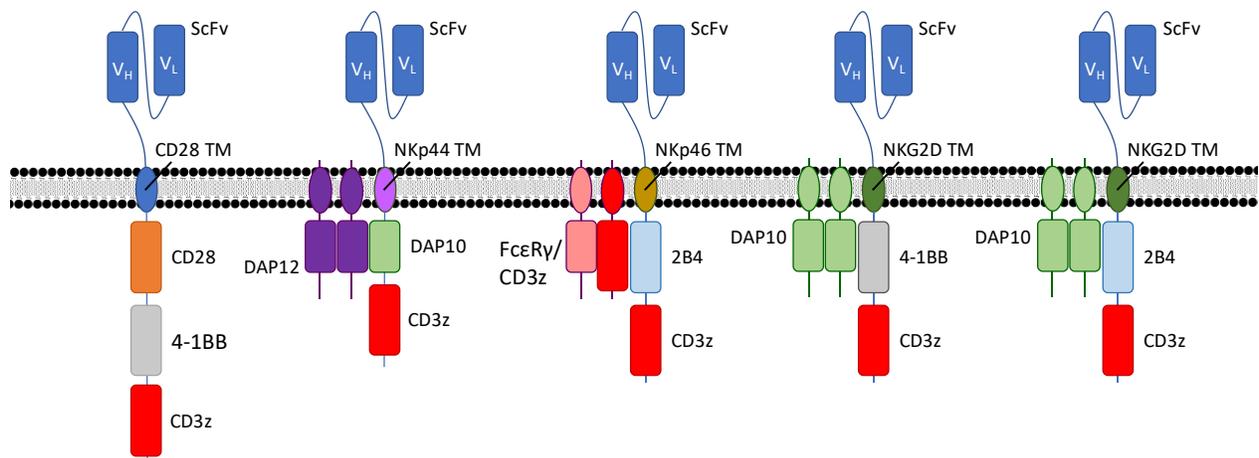
cordon et la lignée NK-92 sont toutefois plus faciles à transduire (244). Une autre solution pour produire des cellules CAR-NK est d'utiliser des cellules iPSC. En effectuant les modifications au stade iPSC, la transduction des cellules NK est totalement évitée. Une banque de cellules iPSC portant les modifications désirées peut être établie et les cellules NK dérivées par un protocole de différenciation.

Le principal désavantage des thérapies à base de NK est leur survie limitée. Il est évident pour les cellules de lignées que l'irradiation nuit à la survie à long terme des cellules. Cependant, même pour les autres sources de cellules NK, la survie reste un facteur limitant. Certaines stratégies ont été proposées pour augmenter la survie des NK. L'administration de cytokines permet d'aider. L'IL-2 est connu pour stimuler la survie des cellules NK, mais il est associé avec une augmentation de la morbidité associée au traitement et peut aussi favoriser l'amplification des Treg (248, 249). Comme précédemment discuté, l'IL-15 partage certaines chaînes de récepteur avec l'IL-2, mais ses effets sont différents.

L'utilisation de l'IL-15 a donc été étudiée pour augmenter la survie spécifique des NK (249, 250). À la différence de l'IL-2, l'IL-15 n'a pas le même effet sur les lymphocytes T cytotoxiques et les Treg que sur les NK (249, 251). La création de cytokines IL-15 recombinantes avec la fusion d'une section du récepteur IL15R $\alpha$  ou d'autres récepteurs a permis d'augmenter son activité biologique (252-254). Des résultats publiés récemment ont aussi montré que la sécrétion par les cellules NK permettait une survie long terme des cellules NK dans la circulation de patients (3). Il est donc possible de surmonter le problème posé par la courte survie des NK après infusion. Récemment, l'utilisation des cellules NK dérivées du cordon avec l'expression d'un CAR de seconde génération avec la sécrétion paracrine d'IL-15 a réussi à atteindre une réponse sur une majorité des patients traités et a réussi à observer des cellules NK en circulation jusqu'à un an après le traitement des patients (3).

Des constructions avec des domaines de signalisation plus ciblés sur la signalisation des cellules NK ont aussi été élaborées. L'utilisation du domaine intracellulaire de 2B4 avec le CD3 $\zeta$  permet une activation de la lyse de cellules leucémiques comparable à celle due à une construction de deuxième génération. La construction a aussi été utilisée dans un modèle *in vitro* de tumeur solide

primaire avec des résultats plus variables. Plusieurs récepteurs utilisent la signalisation par les ITAMs. Le DAP12 a été utilisé pour remplacer la signalisation par CD3 $\zeta$  (255). Malgré la présence d'un seul ITAM sur le DAP12, les auteurs ont observé un plus grand effet sur la lyse de cibles qu'avec le CD3 $\zeta$ . Une étude récente a aussi comparé plusieurs constructions avec des combinaisons de segments provenant de CD3 $\zeta$ , 4-1BB, 2B4, DAP12 et DAP10 (146). En plus de modifier la portion intracellulaire, les auteurs ont aussi expérimenté avec des portions transmembranaires de récepteurs qui s'associent à des adaptateurs par cette région. Les régions transmembranaires des récepteurs NKG2D, NKp44 et NKp46 ont été combinés dans les CARs (Figure 1.9). Les adaptateurs DAP10, DAP12 et CD3 $\zeta$ /Fc $\epsilon$ R $\gamma$  s'associent respectivement avec les chaînes utilisées. Les constructions comportant les sections du NKG2D, 2B4 et CD3 $\zeta$  ont montré les meilleures réponses dans des modèles de tumeur diffuse et solide (146).

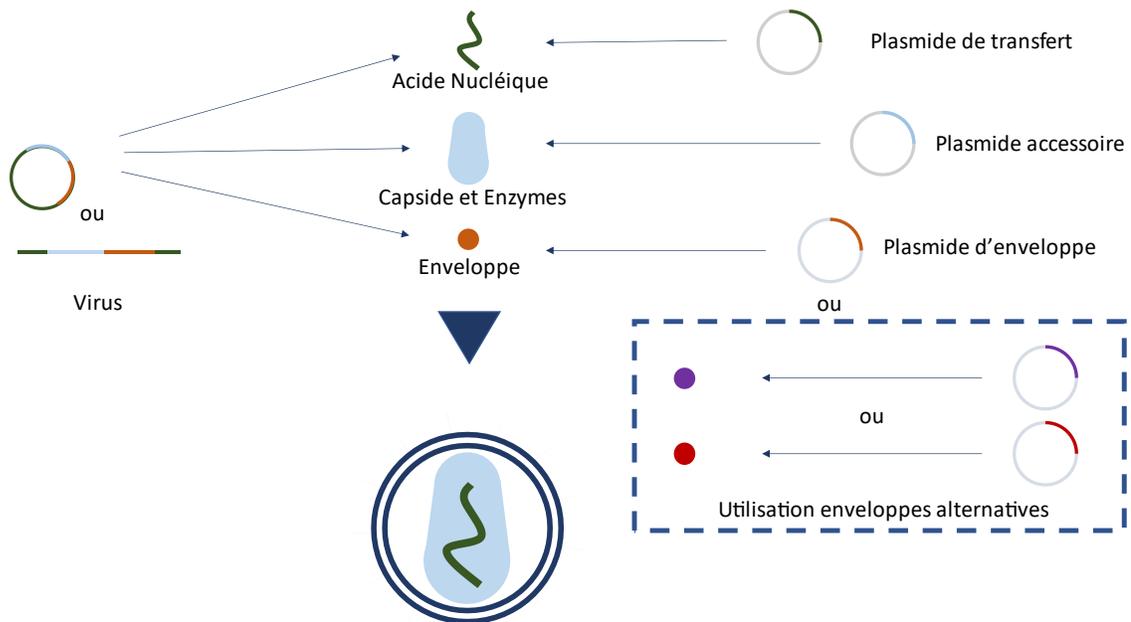


**Figure 1.9 – Représentation de constructions de récepteurs chimériques.**

Il est possible que les constructions optimales varient selon les modèles et selon la source des cellules NK utilisées. Certains montrent une efficacité des constructions avec les CAR de seconde génération classique ou même avec un CAR utilisant le CD3 $\zeta$  seul, alors que d'autres voient un effet marginal (146, 256, 257).

### 1.3 Pseudotypage des lentivirus

La production de particules virales mixtes, avec une enveloppe provenant d'un virus différent, a été observée avec des infections multiples (258). Les glycoprotéines d'enveloppe sont donc essentiellement interchangeables d'un virus à l'autre. Cette propriété a été utilisée pour modifier le tropisme des particules virales en remplaçant la protéine d'enveloppe, ce qui crée des virions pseudotypés (Figure 1.10) (259).



**Figure 1.10 – Pseudotypage des particules virales.**

La protéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G) a été identifiée pour le pseudotypage des particules en raison de ses propriétés avantageuses (260, 261). Son tropisme est très large puisque ses récepteurs principaux, la famille du récepteur de lipoprotéine de basse densité (LDLR), sont exprimés dans une majorité des cellules humaines (262). Son utilisation répandue en a fait le standard pour le pseudotypage des particules virales synthétiques.

Comme le VSV-G est peu efficace pour la transduction de certaines cellules, comme les lymphocytes non-stimulés, d'autres pseudotypes ont été utilisés (263). Notamment, l'utilisation du pseudotype RD114 a permis d'améliorer la transduction des cellules souches

hématopoïétiques et a servi pour la transduction de cellules NK primaires (264, 265). Malgré cette amélioration, la transduction des cellules NK reste limitée, ce qui rends le développement d'immunothérapies NK plus difficile. De nouvelles protéines pour le pseudotypage de virions ont récemment été utilisées pour améliorer la transduction d'autres cellules résistantes à la transduction (266-269).

## **1.4 Problématique de recherche**

Malgré les avancements dans les immunothérapies à base de cellules NK, certaines problématiques ne sont pas encore résolues. Certaines stratégies ont été développées pour rendre la modification des cellules NK plus aisée, mais la transduction des cellules NK dérivées du sang reste problématique. Comme ces cellules présentent d'autres avantages, comme une meilleure fonction que les cellules dérivées du cordon ou de cellules iPSC et ne sont pas dérivées d'une tumeur comme la lignée NK-92, il reste pertinent d'essayer d'améliorer les outils disponibles, entre autres pour les stratégies utilisant les cellules NK de la circulation.

## **1.5 Objectif du projet**

Le but du projet est de développer des améliorations pour l'immunothérapie avec des cellules NK pour améliorer leur efficacité et leur résistance aux environnements tumoraux défavorables.

## **1.6 Hypothèses**

D'après les connaissances sur les fonctions et propriétés des lymphocytes NK, nous émettons l'hypothèse que l'utilisation d'une enveloppe plus appropriée aiderait la transduction des NK et permettrait une production optimisée de cellules CAR-NK et que l'élimination du récepteur NKG2A rendrait les cellules résistantes aux signaux de HLA-E.



## Chapitre 2 – Premier article

### 2.1 Mise en contexte du premier article

Le premier objectif de ce projet a été d'améliorer la transduction des cellules NK. Nous avons donc étudié la protéine d'enveloppe BaEVRless dans le pseudotypage des particules lentivirales. Une fois la technique bien établie avec un rapporteur fluorescent, nous avons caractérisé la transduction avec des constructions CAR.

D'abord, ces expériences ont permis de démontrer la performance d'une nouvelle enveloppe pour la transduction des cellules NK. L'enveloppe BaEVRless permet une transduction plus efficace qu'avec les autres enveloppes, VSV-G, RD114 et MV-LV. De plus, la transduction était améliorée sur les cellules NK non-activées. Nous avons aussi démontré que l'utilisation d'une multiplicité d'infection faible (1 virus par cellule) permet une transduction d'une majorité de cellules (>60%).

Cet article nous a aussi permis de montrer que l'utilisation de l'enveloppe BaEVRless ne nuit pas à la prolifération, à la survie ou à la fonction des cellules NK. Le phénotype des cellules a aussi été évalué et est resté stable durant la transduction.

Parallèlement, l'analyse des cellules par RNAseq a permis de déterminer que les récepteurs du BaEVRless, ACT1 et ASCT2, sont exprimés sur les cellules NK isolées du sang périphérique. Ces récepteurs sont augmentés avec l'expansion des NK sur des cellules nourricières.

Une application de l'amélioration de la transduction des cellules NK pourrait être la génération de CAR-NK. Le vecteur de transfert a donc été modifié pour exprimer un récepteur chimérique reconnaissant l'antigène CD22. Il a été possible de transduire les cellules NK et l'expression du CAR a augmenté leur activité cytotoxique dans un modèle de leucémie résistant aux cellules NK. Une seconde construction avec un double CAR a permis de montrer que des vecteurs de transfert plus volumineux permettaient la production virale et la transduction des cellules NK. La construction avec un double CAR permet aussi la lyse de cellules exprimant l'un ou l'autre des antigènes.

Le détail de ces expériences est décrit dans l'article *Efficient and Robust NK-Cell Transduction With Baboon Envelope Pseudotyped Lentivector* par Aurelien BL Colamartino\*, William Lemieux\*, \*co-premier auteurs de façon équivalente) Panojot Bifsha, Simon Nicoletti, Nitin Chakravarti, Joaquín Sanz, Hugo Roméro, Silvia Selleri, Kathie Béland, Mélanie Guiot, Camille Tremblay-Laganière, Renée Dicaire, Luis Barreiro, Dean A Lee, Els Verhoeyen, Elie Haddad, publié dans le journal *Frontiers in Immunology* en 2019.

A Colamartino W Lemieux et P Bifsha ont effectués les expériences, aidés par S Nicoletti, H Roméro, S Selleri, M Guiot et C Tremblay-Laganière. ABL Colamartino, W Lemieux, P Bifsha et K Béland ont rédigé le manuscrit. N Chakravarti, et DA Lee ont effectué les analyses de RNAseq sur les cellules amplifiées dans un système utilisant l'IL-21. J Sanz et L Barreiro ont effectué les analyses de RNAseq sur les cellules amplifiées dans un système utilisant l'IL-15. R Dicaire a recruté les donneurs et récolté les prélèvements. E Haddad a généré les hypothèses, élaboré les plans d'expériences et rédigé le manuscrit. E Verhoeyen a fourni le plasmide du BaEVRless, discuté les résultats et rédigé le manuscrit.

**Colamartino ABL, Lemieux W, Bifsha P, Nicoletti S, Chakravarti N, Sanz J, et al. Efficient and Robust NK-Cell Transduction With Baboon Envelope Pseudotyped Lentivector. *Frontiers in Immunology*. 2019;10(2873).**

## Efficient and Robust NK-Cell Transduction With Baboon Envelope Pseudotyped Lentivector

**Running Title :** Efficient and Robust NK-Cell Transduction With BaEV

**Authors :**

Aurelien B. L. Colamartino<sup>1,2†</sup>, William Lemieux<sup>1,2†</sup>, Panojot Bifsha<sup>2</sup>, Simon Nicoletti<sup>2,3</sup>, Nitin Chakravarti<sup>4</sup>, Joaquín Sanz<sup>5,6</sup>, Hugo Roméro<sup>2</sup>, Silvia Selleri<sup>1,2</sup>, Kathie Béland<sup>2</sup>, Mélanie Guiot<sup>7,8</sup>, Camille Tremblay-Laganière<sup>1,2</sup>, Renée Dicaire<sup>2</sup>, Luis Barreiro<sup>2,9</sup>, Dean A. Lee<sup>10</sup>, Els Verhoeven<sup>11,12</sup> and Elie Haddad<sup>1,2,13</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, University of Montréal, Montréal, QC, Canada, <sup>2</sup>CHU Sainte-Justine Research Center, Montréal, QC, Canada, <sup>3</sup>INSERM U1163 and

CNRS ERL 8254, Medicine Faculty, Paris Descartes University, Necker Hospital, Paris, France,

<sup>4</sup>Department of Medical Oncology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, United States,

<sup>5</sup>Institute for Bio-computation and Physics of Complex Systems (BIFI), University of Zaragoza,

Zaragoza, Spain, <sup>6</sup>Department of Theoretical Physics, Faculty of Sciences, University of Zaragoza,

Zaragoza, Spain, <sup>7</sup>Pierre and Marie Curie University (PMCU) Paris 6, Paris, France, <sup>8</sup>Assistance

Publique Hopitaux De Paris (AP-HP), Paris, France, <sup>9</sup>Genetics Section, Department of Medicine,

University of Chicago, Chicago, IL, United States, <sup>10</sup>Center for Childhood Cancer and Blood

Disorders, Research Institute of Nationwide Children's Hospital, Columbus, OH, United States,

<sup>11</sup>CIRI, Université de Lyon, INSERM U1111, ENS de Lyon, Université Lyon 1, CNRS UMR 5308, Lyon,

France, <sup>12</sup>Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, Nice, France, <sup>13</sup>Department of Pediatrics,

University of Montréal, Montréal, QC, Canada, <sup>†</sup>These authors have contributed equally to this

work

**Corresponding author :**

Elie Haddad, MD, PhD

CHU Sainte-Justine Research Centre

3175, chemin de la Côte-Ste-Catherine

Montréal, Québec H3T 1C5 Canada

Telephone: (+1) 514-345-4931 x6217

Fax: (+1) 514-345-4897

**Funding :**

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (#PJT-156347 and # 130246), from the Research Chair in Pediatric Immunology by the Bank of Montreal (BMO) and from the Fonds d'innovation thérapeutique (FIT) from the Fondation Charles Bruneau to EH. WL was supported by a Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRQS) scholarship award and AC by the Cole Foundation scholarship award. SN was supported by the Fondation Bettencourt-Schueller (Ecole de l'INSERM-Liliane Bettencourt) and a fellowship from the Fondation ARC pour la recherche sur le cancer. EV was supported by Lentigen/Miltenyi Inc. (Boro Dropulic) for this study.

## 2.2 Abstract

NK-cell resistance to transduction is a major technical hurdle for developing NK-cell immunotherapy. By using Baboon envelope pseudotyped lentiviral vectors (BaEV-LVs) encoding eGFP, we obtained a transduction rate of  $23.0 \pm 6.6\%$  (mean  $\pm$  SD) in freshly-isolated human NK-cells (FI-NK) and  $83.4 \pm 10.1\%$  (mean  $\pm$  SD) in NK-cells obtained from the NK-cell Activation and Expansion System (NKAES), with a sustained transgene expression for at least 21 days. BaEV-LVs outperformed Vesicular Stomatitis Virus type-G (VSV-G)-, RD114- and Measles Virus (MV)-pseudotyped LVs ( $p < 0.0001$ ). mRNA expression of both BaEV receptors, ASCT1 and ASCT2, was detected in FI-NK and NKAES, with higher expression in NKAES. Transduction with BaEV-LVs encoding for CAR-CD22 resulted in robust CAR-expression on  $38.3 \pm 23.8\%$  (mean  $\pm$  SD) of NKAES cells, leading to specific killing of NK-resistant pre-B-ALL-RS4;11 cell line. Using a larger vector encoding a dual CD19/CD22-CAR, we were able to transduce and re-expand dual-CAR-expressing NKAES, even with lower viral titer. These dual-CAR-NK efficiently killed both CD19KO- and CD22KO-RS4;11 cells. Our results suggest that BaEV-LVs may efficiently enable NK-cell biological studies and translation of NK-cell-based immunotherapy to the clinic.

**Keywords:** NK-cell transduction, baboon retrovirus envelope pseudotyped lentivectors, chimeric antigen receptor, NK amplification and expansion system (NKAES), cytotoxicity

## 2.3 Introduction

The relative resistance of NK cells to transduction hampers the study of NK-cell biology and the development of NK cell-based immunotherapy. VSV-G-LVs, classically used to generate chimeric antigen receptor (CAR)-T cells (1), do not efficiently transduce NK-cells. RD114-pseudotype viral vectors represent an attractive alternative since their entry receptor, the sodium-dependent neutral amino acid transporter (ASCT2) (2, 3), is widely expressed in the hematopoietic lineage (4). However, despite encouraging initial report, RD114-based viral vectors only transduce NK-cells at low levels. Nevertheless, they recently enabled clinical development of cord-blood derived CAR-NK-cells (5). To fill the need for an efficient method for transducing NK cells, we investigated alternative pseudotyping proteins. Since the Baboon envelope pseudotyped lentiviral vector (BaEV-LV) binds ASCT1 (6) in addition to ASCT2 for viral entry, we assessed their efficacy to transduce NK-cells for therapeutic purposes. As observed independently by Bari et al. (7) our data demonstrate the efficacy of BaEV-LV in NK-cell transduction.

## 2.4 Methods

### *Cells and Culture Condition*

Blood samples were obtained from healthy volunteers after informed consent (IRB-approved protocol #CER-3527). NK-cells were enriched from PBMC using a CD56-positive selection kit (Stemcell Technologies, Canada). NK cells were expanded using the Amplification and Expansion System (NKAES) with irradiated K562mbIL21 or K562mbIL15 feeder cells as described (8, 9). Alternatively, NK-cells were amplified using NK-MACS Medium (130-114-429, Miltenyi) system according to manufacturer's instructions. RS4;11 (ATCC) CD19/22KO were generated using purified Cas9 protein and two gRNA targeting CD19 or CD22 (Integrated DNA Technologies). CD19KO and/or CD22KO cells were FACS-sorted based on loss of surface marker expression. Cells were cultured in DMEM (Wisent) or RPMI1640 supplemented with 10% FCS and penicillin/streptomycin (Gibco). Media were supplemented with 100 UI/mL IL-2 (Proleukin—Novartis Pharmaceuticals, Canada) for NK-cell cultures.

### *Plasmids and Viral Production*

An UCOE sequence (10) was added to the lentiviral vector pHR SIN-SFFV-eGFP (11) upstream of the SFFV promoter to produce pHUS-GFP vector. For the CAR-expression vector, GFP in pHUS-GFP was replaced by an anti-CD22 CAR (m971 ScFv) fused to 28BBz constructed from 28z and BBz (Dr. Orentas, National Cancer Institute) (12). For the dual CAR-expression vector, the GFP-cassette was replaced by 2nd-generation anti-CD19 and anti-CD22 CARs, separated by a self-cleaving T2A peptide (Figure 2.3A). The pMD2.G (VSV-G) was a gift from Didier Trono (Addgene plasmid#12259; <http://n2t.net/addgene:12259>; RRID:Addgene\_12259) and pLTR-RD114A (13) (RD114) was a gift from Jakob Reiser (Addgene plasmid#17576; <http://n2t.net/addgene:17576>; RRID:Addgene\_17576). The Measles virus (MV-LV) and BaEVRLess envelope plasmids were used as previously described (6). Titration was performed on HEK293T cells (ATCC) using serial virus dilutions (6).

### *Viral Transduction*

NKAES were transduced after 1 week of expansion. One day before transduction, a 12-well plate was coated with RetroNectin (Takara). The following day, concentrated vectors at indicated multiplicity of infection (MOI), were added to coated plates for 4 h at 37°C. Then NK cells were seeded in these wells in IL-2-supplemented medium and protamine sulfate (Pharmaceutical Partners of Canada Inc.) (8 ug/mL). The plates were then centrifuged at 1,000 g for 1 h and incubated at 37°C overnight. The next day, IL-2-supplemented medium was added to each well. Transduction was assessed on day 3 or day 5 after transduction for NKAES and freshly isolated NK-cells (FI-NK), respectively.

### *Flow Cytometry*

All samples were stained with anti-CD56-APC, anti-CD3-FITC (Biolegend) and 7AAD (BD Biosciences). Transgene expression was detected by flow cytometry on 7AAD<sup>-</sup> CD56(-APC)<sup>+</sup> CD3(-PE)<sup>-</sup> cells (Biolegend). For NK-cell receptor detection, samples were stained with DAPI, CD56-BV711, CD16-BV786, NKp30-AF647, NKp44-PE, NKp46-BV421 (Biolegend), NKG2D-APC (BD Biosciences), and NKG2A-PE (Miltenyi Biotec). CD3-BV650 and CD19-APC-Cy7 (Biolegend) markers were used as a gating exclusion strategy for the NK cell staining. Receptor expression was assessed on DAPI<sup>-</sup> CD56(-BV711)<sup>+</sup> CD3(-BV650)<sup>-</sup> cells. To detect CAR-expression, cells were incubated with 2 µl Siglec2(CD22)-Fc chimera (50 mg/ml, R&D) for 30 min at 4°C, washed and stained with anti-Fc-PE (Jackson Immune).

### *Cytotoxicity Assay*

Cytotoxicity was assessed 24 h after cell contact by flow cytometry. Targets cells were loaded with PKH26 dye (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's directives and seeded in 96 well round bottom plates. Effector cells were then added at different effector:target ratios and medium alone was added to control wells. Before acquisition, 7AAD was added to each well to discriminate dead cells. The cytotoxicity was calculated as:  $\text{Cytotoxicity (\%)} = [1 - \frac{\text{live targets (sample)}}{\text{live targets (control)}}] \times 100\%$ .

### *mRNA Quantification*

RNA-seq expression studies were independently performed in two laboratories (Accession #GSE128696, #GSE129044). For the FI-NK vs. IL-21-NKAES/IL-15-NKAES comparisons, extraction of total RNA was done using the RNeasy mini kit (Qiagen) and Total RNA Purification Plus Kit (Norgen Biotek), respectively. The quality of RNA was verified with 2100 Bioanalyzer (Agilent) prior to preparation of sequencing libraries with the TruSeq RNA Sample Prep v2 Kit. Quality of libraries was verified via Agilent 4200 TapeStation using a High Sensitivity D1000 ScreenTape Assay kit. For the IL-15 NKAES analysis, approximately 60–80 million paired-end 150 bp sequence reads per library were generated, whereas for the IL-21 NKAES analysis, 30 million single-end 101 bp sequence reads per library were generated, both using Illumina HiSeq4000 platform. Kallisto, an RNA quantification program based on pseudoalignment was used to obtain read count estimates per gene (14). The differential gene expression analysis was done using DESeq2, edgeR, and limma R packages.

#### *Statistical Analyses*

Statistical analyses were performed using GraphPad PRISM 8.0 (GraphPad Software). Statistical significance was determined by one-way or 2-way ANOVA with multiple testing and Bonferoni correction or using simple multiple T-tests with Holm-Sidak correction.

#### *Study Approval*

Blood samples were obtained from healthy volunteers after informed and written consent. The study was approved by the institutional ethical board of the CHU Sainte-Justine (approved protocol #CER-3527).

## 2.5 Results and Discussion

We first transduced NK cells expanded using the Amplification and Expansion System (NKAES) and freshly isolated NK-cells (FI-NK) with an eGFP-encoding LV and observed that in both cases, BaEV-LVs outperformed VSV-G-, MV-, and RD114- LVs (Figure 2.1A, 83.4 % mean transduction rate vs. 15.7, 13.7, and 37.8% for NKAES,  $p < 0.0001$ , and 23.0% vs. 10.4%, 2.1 and 7.8% for FI-NK,  $p < 0.0001$ , respectively). The mean fluorescence intensity (MFI) of GFP after transduction in NK cells was similar for BAEV, VSV-G and RD114 and significantly lower for MV-LV in NKAES (Figure 2.1B). The mean transduction rate with BaEV-LVs was higher than 60% for NKAES even at low MOI of 1, and ranged from 12.4% at a MOI of 1 to a maximum of 27.2% at a MOI of 10 for FI-NK (Figure 2.1C). Transgene expression persisted over time after transduction with BaEV-LVs, although a decrease was observed from 70.6 to 61.4% in 14 days for NKAES ( $p = 0.06$ ). Transduced FI-NK could be easily amplified after transduction (not shown). High transduction rates were also observed after NK-cell expansion on K562-mbIL15-41BBL feeder cells (8) or feeder-free NK MACS medium (15) (Figure 2.1D).

NK-cell receptors expression was assessed on untouched and BaEV-LV treated NKAES, which were either transduced (GFP+) or non-transduced (GFP-) (Figure 2.1E). There was no difference in CD56, CD16, NKG2D, NKG2A, NKp30, NKp44, and NKp46 receptors expression, suggesting that those markers are neither linked to the transduction efficiency, nor affected by the transduction (Figure 2.1E), unlike what has been recently reported (7). This difference could be attributed to the different expansion system used in our study.

The number of recovered living cells in both NKAES and FI-NK was preserved after transduction with BaEV-LVs (Figure 2.2A) although MV-LV transduction on NKAES yielded more living recovered cells than BaEV-LV transduction ( $p < 0.05$ ). Although the percentage of dead cells in culture was low for all conditions (Figure 2.2B), it was higher in NKAES transduced with MV-LV and RD114-LV as compared to BaEV ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively). Together these results suggest that BaEV-LV transduction did not affect viability nor NK-cell proliferation.

We then assessed whether NK-cell cytotoxic function was preserved after BaEV-LV transduction and confirmed that the cytotoxicity of eGFP-transduced NKAES cells against K562 cells was equivalent to non-transduced NKAES (Figures 2.2C,D).

RNAseq analyses of both FI-NK and NKAES showed that ASCT1 and ASCT2 mRNAs were detected at significantly higher frequency in both IL-15- and IL-21-NKAES than in FI-NK (Figures 2.2E,F), which may explain the higher transduction rate of NKAES. These data were confirmed by qPCR (not shown). Also, the expression of both BaEV receptors by NK cells may explain the higher transduction efficacy of BaEV-LVs as compared to RD114 which use only one of those receptors.

CAR-expressing NK-cells represent one of the most relevant clinical applications of efficient NK-cell transduction. We first tested a single 3rd generation CAR construct recognizing CD22 (Figure 2.3A). We obtained a transduction rate of  $38.3\% \pm 23.8\%$  (mean  $\pm$  SD) of NKAES and a high sustained level of CAR-expression ( $58.4\% \pm 7.8\%$ ; mean  $\pm$  SD) after sorting and re-expansion (Figures 2.3B,C). We demonstrated that CD22-CAR-NK-cells efficiently and specifically killed B-ALL RS4;11 target cells, which were resistant to untransduced NKAES (Figure 2.3D). We could obtain  $5 \times 10^8$  CAR-expressing cells from  $5 \times 10^5$  transduced cells after an expansion of 14 days (not shown). Since transgene size affects transduction efficacy (16, 17), we also tested a dual CAR-expressing vector with two independent chains recognizing CD19 and CD22. The length of the dual CAR-CD22/19 LV had a significant impact on virus production and NK transduction was lower ( $23.1 \pm 20.5\%$ ; mean  $\pm$  SD) (Figures 2.3E,F). However, we were able to sort and re-expand these dual-CAR-transduced NK-cells for 2 weeks, keeping the transgene expression at a high level ( $79.0 \pm 8.7\%$ ; mean  $\pm$  SD) (Figure 2.3E). These CAR-CD22/19-NKAES killed efficiently CD19KO or CD22KO-RS4;11 cells, which suggest that this strategy could be efficient for preventing tumor evasion to CAR therapy (18, 19) (Figure 2.3G).

In this study we showed that BaEV-LV is an efficient and robust tool to transduce NK cells. As a proof-of-concept, we generated large numbers of engineered CAR-NK-cells, which induced specific killing of antigen-bearing cancer cells, even with a large dual CAR-LV construct. This technique was robust and reproducible in different expansion systems, including a feeder-cell-free system. The higher level of transduction could open up possibilities for the use of this method

to generate an immunotherapeutic product. The prevalence of receptors, as seen by RNAseq, could explain the difference seen between the transduction of activated and resting NK cells. The fact that activated NK cells express both entry receptors at high level could also explain why this envelope protein is more efficient than the others. The development of such a tool could have a major impact on both basic research of NK-cell biology study and NK-cell-based immunotherapy.

## **2.6 Acknowledgements**

The authors would like to thank Dr. Dario Campana (St. Jude Children's Research Hospital) for the K562-mbIL15-41BBL cell line, and Dr. Rimas J. Orentas from the National Cancer Institute for the CAR-CD22 construct. This manuscript has been released as a Pre-Print at bioRxiv (20).

### **Conflict of interest :**

EV has a patent EP2761010 licensed to Lentigen/Miltenyi Inc. The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## 2.7 References

1. Levine BL, Humeau LM, Boyer J, MacGregor RR, Rebello T, Lu X, et al. . Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2006) 103:17372–7. 10.1073/pnas.0608138103
2. Rasko JE, Battini JL, Gottschalk RJ, Mazo I, Miller AD. The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1999) 96:2129–34. 10.1073/pnas.96.5.2129
3. Marin M, Lavillette D, Kelly SM, Kabat D. N-linked glycosylation and sequence changes in a critical negative control region of the ASCT1 and ASCT2 neutral amino acid transporters determine their retroviral receptor functions. *J Virol*. (2003) 77:2936–45. 10.1128/JVI.77.5.2936-2945.2003
4. Sandrin V, Boson B, Salmon P, Gay W, Negre D, Le Grand R, et al. . Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood*. (2002) 100:823–32. 10.1182/blood-2001-11-0042
5. Liu E, Tong Y, Dotti G, Shaim H, Savoldo B, Mukherjee M, et al. . Cord blood NK cells engineered to express IL-15 and a CD19-targeted CAR show long-term persistence and potent antitumor activity. *Leukemia*. (2018) 32:520–31. 10.1038/leu.2017.226
6. Girard-Gagnepain A, Amirache F, Costa C, Levy C, Frecha C, Fusil F, et al. . Baboon envelope pseudotyped LVs outperform VSV-G-LVs for gene transfer into early-cytokine-stimulated and resting HSCs. *Blood*. (2014) 124:1221–31. 10.1182/blood-2014-02-558163
7. Bari R, Granzin M, Tsang KS, Roy A, Krueger W, Orentas R, et al. . A distinct subset of highly proliferative and lentiviral vector (LV)-transducible NK cells define a readily engineered subset for adoptive cellular therapy. *Front Immunol*. (2019) 10:2001. 10.3389/fimmu.2019.02001
8. Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N, Imai C, Ma J, Lockey T, et al. . Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res*. (2009) 69:4010–7. 10.1158/0008-5472.CAN-08-3712

9. Denman CJ, Senyukov VV, Somanchi SS, Phatarpekar PV, Kopp LM, Johnson JL, et al. . Membrane-bound IL-21 promotes sustained ex vivo proliferation of human natural killer cells. *PLoS ONE*. (2012) 7:e30264. 10.1371/journal.pone.0030264
10. Muller-Kuller U, Ackermann M, Kolodziej S, Brendel C, Fritsch J, Lachmann N, et al. . A minimal ubiquitous chromatin opening element (UCOE) effectively prevents silencing of juxtaposed heterologous promoters by epigenetic remodeling in multipotent and pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Res*. (2015) 43:1577–92. 10.1093/nar/gkv019
11. Levy C, Amirache F, Girard-Gagnepain A, Frecha C, Roman-Rodriguez FJ, Bernadin O, et al. . Measles virus envelope pseudotyped lentiviral vectors transduce quiescent human HSCs at an efficiency without precedent. *Blood Adv*. (2017) 1:2088–104. 10.1182/bloodadvances.2017007773
12. Haso W, Lee DW, Shah NN, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Pastan IH, et al. . Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. (2013) 121:1165–74. 10.1182/blood-2012-06-438002
13. Zhang XY, La Russa VF, Reiser J. Transduction of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by using lentivirus vectors pseudotyped with modified RD114 envelope glycoproteins. *J Virol*. (2004) 78:1219–29. 10.1128/JVI.78.3.1219-1229.2004
14. Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol*. (2016) 34:525–7. 10.1038/nbt.3519
15. Kloss S, Oberschmidt O, Morgan M, Dahlke J, Arseniev L, Huppert V, et al. . Optimization of human NK cell manufacturing: fully automated separation, improved ex vivo expansion using IL-21 with autologous feeder cells, and generation of anti-CD123-CAR-expressing effector cells. *Hum Gene Ther*. (2017) 28:897–913. 10.1089/hum.2017.157
16. al Yacoub N, Romanowska M, Haritonova N, Foerster J. Optimized production and concentration of lentiviral vectors containing large inserts. *J Gene Med*. (2007) 9:579–84. 10.1002/jgm.1052

17. Cante-Barrett K, Mendes RD, Smits WK, van Helsdingen-van Wijk YM, Pieters R, Meijerink JP. Lentiviral gene transfer into human and murine hematopoietic stem cells: size matters. *BMC Res Notes*. (2016) 9:312. [10.1186/s13104-016-2118-z](https://doi.org/10.1186/s13104-016-2118-z)
18. Jacoby E, Nguyen SM, Fountaine TJ, Welp K, Gryder B, Qin H, et al. . CD19 CAR immune pressure induces B-precursor acute lymphoblastic leukaemia lineage switch exposing inherent leukaemic plasticity. *Nat Commun*. (2016) 7:12320. [10.1038/ncomms12320](https://doi.org/10.1038/ncomms12320)
19. Ruella M, Maus MV. Catch me if you can: leukemia Escape after CD19-Directed T cell immunotherapies. *Comput Struct Biotechnol J*. (2016) 14:357–62. [10.1016/j.csbj.2016.09.003](https://doi.org/10.1016/j.csbj.2016.09.003)
20. Colamartino ABL, Lemieux W, Bifsha P, Nicoletti S, Chakravarti N, Remon JS, et al. Efficient and robust NK-Cell transduction with Baboon Envelope pseudotyped lentivector: a major tool for immunotherapy. *bioRxiv*. (2019) 625285 [10.1101/625285](https://doi.org/10.1101/625285)

## 2.8 Legends

**Figure 2.1 – BaEV-LV efficiently transduces expanded (NKAES) and freshly isolated NK-cells (FI-NK).** (A) Transduction of NK amplification and Expansion System (NKAES) cells (K562mbIL21 system, left panel-in blue) or FI-NK (right panel- in red) using VSV-G (n = 3 and n = 6), Measles virus (MV; n = 3 each), RD114 (n = 7 and n = 6) or BaEV (n = 8 and n = 12) envelope pseudotyped LVs encoding eGFP at a MOI of 10. Fluorescence was evaluated by flow cytometry (\*\*\*\*P < 0.0001 for both NKAES and FI-NK; one-way ANOVA test with multiple testing and Bonferroni correction). On the middle panels are shown representative flow cytometry plots of GFP expression after NKAES-cell transduction with BaEV-LVs (untransduced, middle left; transduced, middle right). (B) Mean fluorescence intensity for GFP expression in NKAES cells (K562mbIL21 system, left panel-in blue) or FI-NK (right panel-in red) using VSV-G (n = 3 and n = 6), Measles virus (MV; n = 3 each), RD114 (n = 3 and n = 6) or BaEV (n = 8 and n = 12) envelope pseudotyped LVs encoding eGFP. Fluorescence was evaluated by flow cytometry (\*\*\*p < 0.001 and p = 0.0882 for NKAES and FI-NK respectively; one-way ANOVA test with multiple testing and Bonferroni correction). (C) Transduction of NKAES (left panel-blue; n = 5) or FI-NK (right panel-red; n = 3) using BaEV-LV-encoding eGFP at various multiplicities of infection (MOI) was measured by fluorescence. (D) BaEV-LV transduction of NKAES using K562mbIL21 or K562mbIL15 irradiated feeder cells (n = 4), or using the NK-MACS Medium (p = 0.4265; one-way ANOVA test with multiple testing and Bonferroni correction, n = 3). (E) Left panel: Flow cytometry plot representative of NK cell markers expression after NK-cell transduction with BaEV-LVs. Transduced (GFP positive) NKAES are in blue and non-transduced (GFP negative) NKAES are in red. Right panel: Mean fluorescence intensity for NK cell markers for untouched and BaEV-LV treated NKAES. BaEV-LV treated NKAES were gated according to GFP to separate transduced (GFP positive) or non-transduced (GFP negative) NKAES (p = 0.2994; 2-way ANOVA test with multiple testing and Bonferroni correction, n = 4). Data are presented as the mean ± SEM. For all experiments, NKAES and FI-NK were assessed at day 3 or day 5 post-transduction, respectively.

**Figure 2.2 – BaEV-LV transduction does not alter the phenotype or function of NK cells.** (A) Viability of NKAES (left panel; n = 3) or FI-NK (right panel; VSV-G and MV-LV n = 6, RD114 n = 3, BaEV n = 9) with different LVs was assessed via the ratio of living (7-AAD-negative) cells in the

culture normalized to the initial number of cells before transduction (\* $p < 0.05$  and  $p = 0.141$  for NKAES and FI-NK, respectively; one-way ANOVA test with multiple testing and Bonferroni correction). (B) Cell death, assessed by the percentage of 7-AAD positive cells, of NKAES (left panel; VSV-G, MV-LV and RD114  $n = 3$ , BaEV  $n = 8$ ) or FI-NK (right panel; VSV-G and RD114  $n = 6$ , MV-LV  $n = 3$ , BaEV  $n = 12$ ) with different LVs. Percentage of 7-AAD positive cells was calculated by flow cytometry after debris exclusion (\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  for NKAES, and  $p = 0.14$  for FI-NK; one-way ANOVA test with multiple testing and Bonferroni correction). (C) Flow cytometry plot showing the gating strategy used in cytotoxicity experiments. Cells were first gated on forward and side scatter (FSC-A, SSC-A) and then the live 7-AAD negative cells were selected. Finally, PKH26 stained target cells were gated to numerate the remaining cells. (D) Cytolytic function of BaEV-LV-transduced vs. untransduced NKAES cells against K562 target cells. Data represent the percentage of target lysis, assessed by flow cytometry relative to the effector/target ratio and normalized to targets alone. ( $p = 0.4012$ , 2-way ANOVA test with multiple testing and Bonferroni correction,  $n = 3$ ). (E) Quantitative expression of the viral receptors mRNAs assessed by RNA-seq in NKAES expanded with K562mbIL21 and in FI-NK-cells ( $n = 4$ , \*\* $p < 0.01$ , multiple T-tests with Holm-Sidak correction). (F) Quantitative expression of the viral receptors mRNAs assessed by RNA-seq in NKAES expanded with K562mbIL15 and in FI-NK-cells ( $n = 4$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , multiple T-tests with Holm-Sidak correction). Data are presented as the mean  $\pm$  SEM, except where noted. For all experiments, NKAES and FI-NK were assessed at day 3 or day 5 post-transduction, respectively.

**Figure 2.3 – BaEV-LVs allow robust CAR-expression in NK-cells.** (A) Schematic representation of the different LVs used for NK-cell transduction using BaEV-LV (relative scale according to size in base pairs). (B) Percentage of transduced NKAES cells using BaEV-LVs coding for an anti-CD22 CAR, assessed at day 3 after transduction (“transduced”;  $n = 15$ ) and after sorting and 1 week of re-expansion (“sorted/expanded”;  $n = 3$ ). (C) Flow cytometry plot representative of CAR-CD22 expression after NK-cell transduction with BaEV-LVs. (D) Cytotoxic assays of NKAES (either untransduced or CAR-CD22-NK-cells) against either parental (WT;  $n = 7$ ) or CD19/22KO-RS4;11 cells (B-ALL;  $n = 2$ ) (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; 2-way ANOVA test with multiple testing and Bonferroni correction). (E) Percentage of transduced NKAES cells using BaEV-

LVs coding for the dual CAR assessed at day 3 after transduction (“transduced”; n = 9) and after sorting and 2 weeks of re-expansion (“sorted/expanded”; n = 3). (F) Flow cytometry plot representative of dual CAR expression after NK-cell transduction with BaEV-LVs. (G) Cytotoxic assays using NKAES cells transduced with a dual CAR (left panel) or untransduced NKAES (right panel) against either parental (WT; n = 8 each), CD19KO (n = 3 for untransduced, n = 4 for CAR transduced), CD22KO (n = 1 for untransduced, n = 2 for CAR transduced) or CD19/CD22KO RS4;11 B-ALL cells (n = 3 for untransduced, n = 5 for CAR transduced). Data are presented as the mean  $\pm$  SEM.

# 2.9 Figures

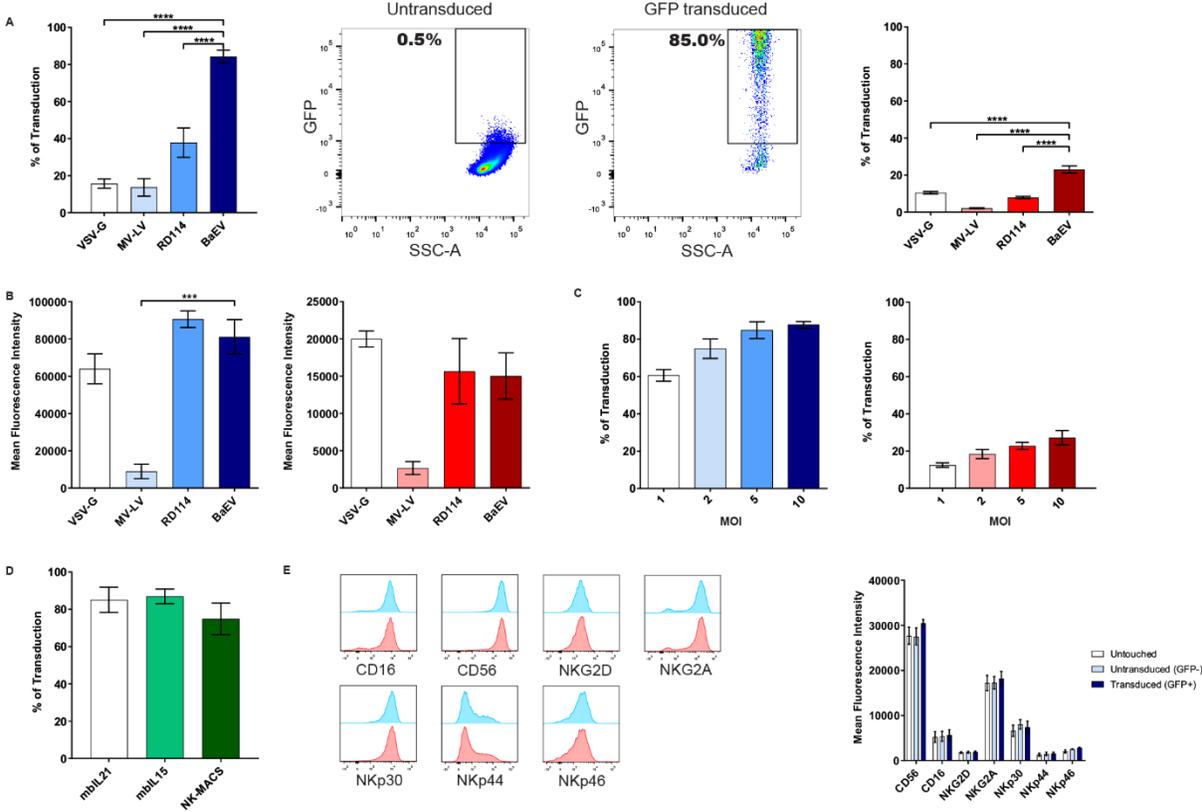
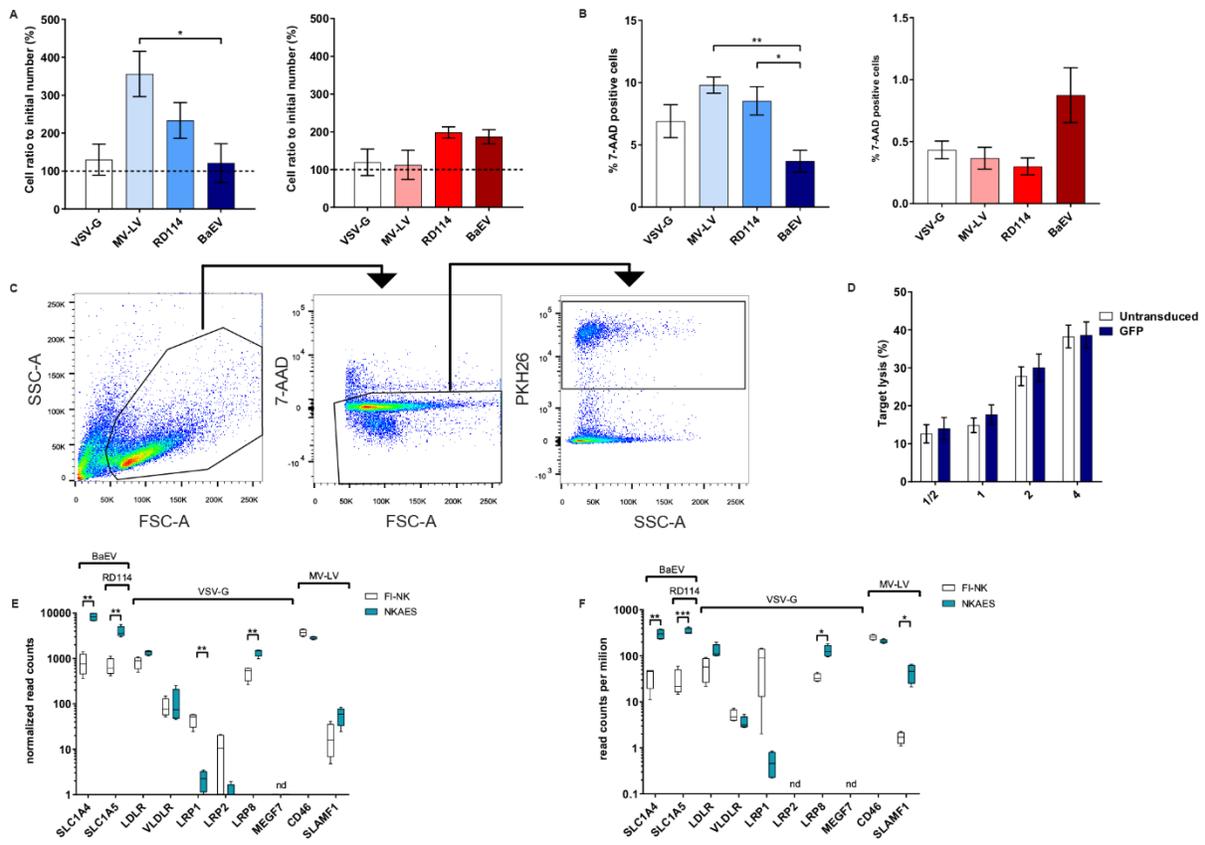
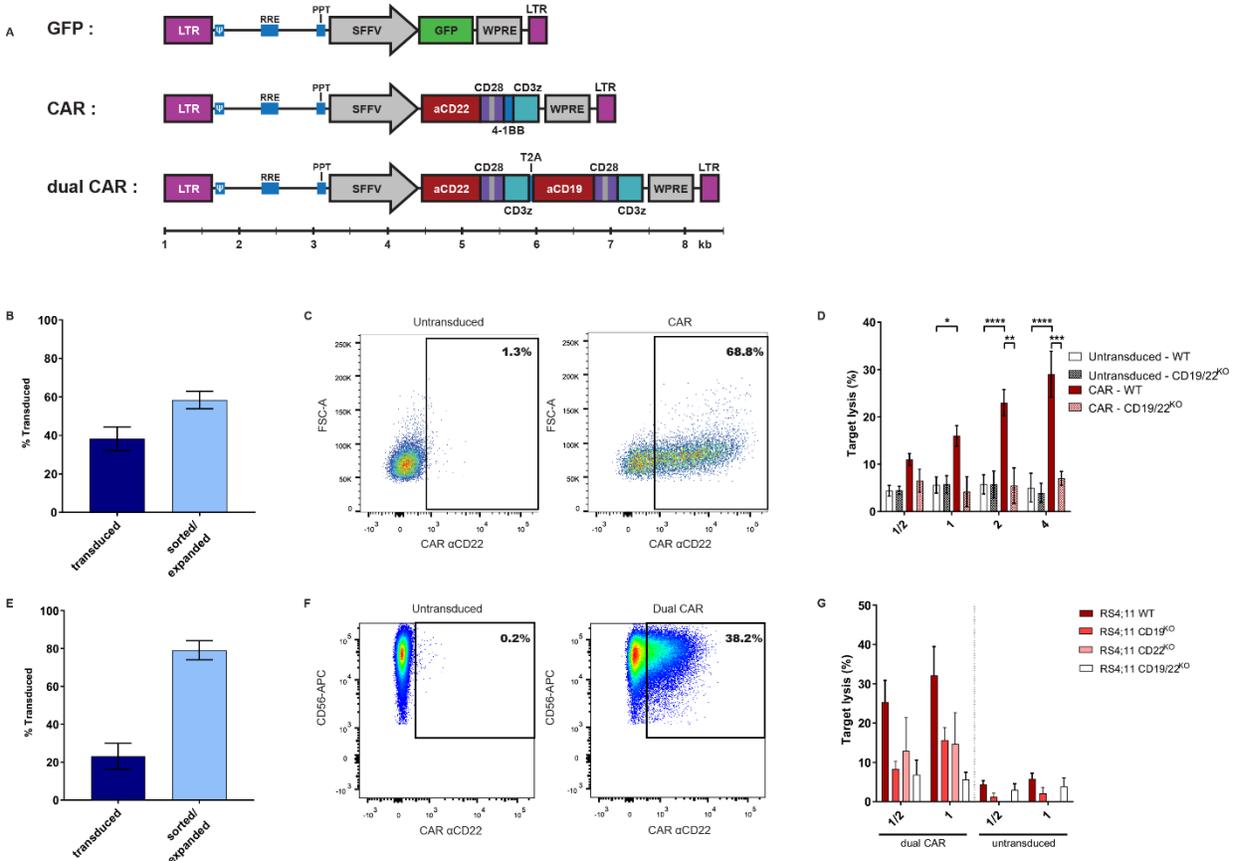


Figure 2.1 – BaEV-LV efficiently transduces expanded (NKAES) and freshly isolated NK-cells (FI-NK).



**Figure 2.2 – BaEV-LV transduction does not alter the phenotype or function of NK cells.**



**Figure 2.3 – BaEV-LVs allow robust CAR-expression in NK-cells.**

## Chapitre 3 – Second Article

### 3.1 Mise en contexte du second article

Le second objectif de ce projet a été d'adresser la sensibilité des cellules NK aux inhibiteurs de points de contrôle. Avec la modification génétique des cellules, le récepteur du HLA-E, NKG2A, a été diminué des cellules NKAES. L'effet de cette élimination a été caractérisé *in vitro* et *in vivo*.

D'abord, Les expériences ont permis de montrer que l'utilisation de la technologie CRISPR avec une nouvelle stratégie non-virale de transfection par shuttle permet d'effectuer une édition génomique efficace des cellules NKAES. Cette édition génomique se traduit par une diminution de l'expression de NKG2A (58.48%) qui peut être amélioré par tri cellulaire (17.61%).

Avec ces résultats, nous avons pu déterminer que les cellules exprimant moins NKG2A ne sont plus sensibles à l'inhibition effectuée par le HLA-E sur des modèles de cancers du sein et colorectaux surexprimant HLA-E.

Parallèlement, nous avons déterminé qu'une élimination complète de NKG2A sur la population cellulaire n'est pas nécessaire pour rendre les cellules NKAES résistantes aux signaux de HLA-E. Un effet plateau maximal peut être observé dans la résistance aux signaux inhibiteurs de HLA-E.

Finalement, l'effet observé a été évalué dans un modèle pré-clinique de cancer du sein. L'utilisation de cellules NKAES NKG2A-négatives a permis de retarder la croissance de la tumeur, mais sans avoir d'impact sur la survie des souris.

Le détail de ces expériences est en préparation pour la publication d'un article dans *Blood Advances*.

W Lemieux et D Guipouy ont effectué les expériences, aidés par Y Li. W Lemieux, D Guipouy et K Béland ont rédigé le manuscrit. E Haddad a généré les hypothèses, élaboré les plans d'expériences et rédigé le manuscrit. M Harvey, LJ Bordeleau et FT Michaud ont développé et mis au point la technologie de CRISPR et de shuttle.

Enhancement of NK cell cytotoxic activity against solid tumors by knockout of NKG2A

**Authors :**

William Lemieux<sup>1,2†</sup>, Delphine Guipouy<sup>1,2†</sup>, Mario Harvey<sup>3</sup>, Yuanyi Li<sup>1</sup>, Kathie Béland<sup>1</sup>, Louis-Jean Bordeleau<sup>3</sup>, François-Thomas Michaud<sup>3</sup>, Elie Haddad<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>CHU Sainte-Justine Research Center, Montréal, QC, Canada, <sup>2</sup>Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, University of Montréal, Montréal, QC, Canada, <sup>3</sup>Feldan Therapeutics, Québec, QC, Canada, <sup>4</sup>Department of Pediatrics, University of Montréal, Montréal, QC, Canada., <sup>†</sup>These authors have contributed equally to this work

**Corresponding author :**

Elie Haddad, MD, PhD

CHU Sainte-Justine Research Centre

3175, chemin de la Côte-Ste-Catherine

Montréal, Québec H3T 1C5 Canada

Telephone: (+1) 514-345-4931 x6217

Fax: (+1) 514-345-4897

**Funding :**

This work was supported by the *Programme de Soutien aux Organismes de Recherche et d'Innovation* (PSO) partnership between Feldan Therapeutics and the *Ministère de l'Économie et de l'Innovation - Québec* to EH. WL was supported by a Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRQS) scholarship award and DG by the MITACS Accelerate Scholarship.

## 3.2 Abstract

Efficacy of adoptive transfer of NK cell as immunotherapy for cancer can be dampened by their sensitivity to inhibitory mediators. Among these, several cancer types over-express HLA-E, a non-classical MHC signal, triggering an inhibitory signal in NK cells when binding to its ligand, NKG2A. Adoptive NK cell transfer relies on cell expansion in culture, and as NK cells in culture upregulate NKG2A, we aimed to knock-out the receptor on NK cells. By using a non-viral approach, we successfully performed CRISPR-mediated knock-out of the NKG2A receptor. The NKG2A knock-out cells were resistant to HLA-E mediated inhibition from both breast cancer ( $p < 0.0001$ ) and colon cancer ( $p = 0.0004$ ) in vitro. In vivo, a reduced tumor growth was observed in mice treated with NKG2A knock-out NK cells compared to mice treated with unmodified NK cells in a breast cancer model ( $p < 0.001$ ). Our results suggest that editing of NKG2A in NK cells could be a strategy to bypass the inhibition of HLA-E from tumors.

### 3.3 Introduction

NK cells are gaining momentum as an immunotherapeutic treatment of cancer (1), especially after the recent publication of the first successful treatment of B-cell malignancies with NK bearing a chimeric antigen receptor (CAR) (2). Indeed, the development of new methods for NK cells transduction has improved on their potential impact as they become easier to modify and tailor to specific needs (3).

NK cells are known for their efficient killing of infected and transformed cells (4). However, as is the case with T cells, NK cells are susceptible to negative regulators (5). As NK cells rely on the balance of activating and inhibitory signals, the abolishment of negative receptors could bypass the inhibitory environment in tumors. Based on this hypothesis, multiple clinical trials using neutralising antibodies against NK checkpoints molecules have been started (6). The atypical HLA class I molecule, HLA-E, is often upregulated in tumor environments and is a potent inhibitor of NK cells, thus making it an interesting checkpoint target (7, 8). Its inhibitory receptor NKG2A is expressed in activated NK cells and, interestingly NKG2A-expressing NK cells are enriched in HLA-E positive tumors (8). Other approaches based on genetic modification of NK cells have been investigated to boost the NK cell activity in HLA-E-positive tumors (8, 9). These approaches have the appeal of being free from regular administrations of antibodies to be efficient.

While viral genetic editing is useful to introduce new coding sequences such as CAR, it does not offer the ability to knock-out specific inhibitory gene(s) in NK cells without having the deleterious consequences of permanent activity of a CRISPR enzyme in the cells. Therefore, we aimed to evaluate a virus-free CRISPR-based approach to knock-out NKG2A expression in order to render NK cells resistant to the negative regulation of HLA-E. Using a novel delivery technique, we knocked-out NKG2A from expanded NK cells using a virus-free approach. This technique uses a non-integrating, peptide-based shuttle, to deliver the nucleoprotein complex (10). Using a non-constitutive approach allows to limit the risk of generating off-target modifications. Then we assessed the impact of this modification using *in vitro* and *in vivo* models.

## 3.4 Methods

### Cells and cell culture

Human cell lines 293T, MDA-MB-231 and HT29 were obtained from ATCC. Breast cancer MDA-MB-231 and colorectal carcinoma cells HT29 cells were transduced with a pHUS LUC-GFP virus and clones were sorted by flow cytometry with an AriaII cell sorter (BD Biosciences) based on GFP expression to have clonal expression of Luciferase. The MDA-MB-231 and HT29 cells with clonal expression of Luciferase-GFP were transduced with pHUS HLA-ECw1502 viral particles and sorted to obtain a homogeneous population expressing HLA-E along with the signal peptide of HLA-Cw1502. Cells were cultured in DMEM (Gibco) supplemented with 10% FCS and 1X penicillin/streptomycin (Wisent).

Blood samples were obtained from healthy volunteers after informed consent (IRB-approved protocol #CER-2019-1956). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by centrifugation on a Ficoll Paque (GE Healthcare) layer and washed in DPBS (Gibco).

### NK cells expansion

NK cells were expanded using the Amplification and Expansion System (NKAES) with irradiated K562mbIL21 feeder cells as described. Briefly, PBMC were cocultured with irradiated K562mbIL21 feeder cells in RPMI1640 (Gibco) supplemented with 10% FCS and 1X penicillin/streptomycin and 40 UI/mL IL-2 (Proleukin – Novartis Pharmaceuticals, Canada) for one week with medium addition each 2-3 days. After the expansion, remaining CD3<sup>+</sup> cells were removed with the EasySep™ Human CD3 Positive Selection Kit II (StemCell Technologies). Cell purity expansion was assessed by flow cytometry after staining with CD56-APC (Biolegend), CD3-FITC, 7-aminoactinomycin D (7-AAD; BD Biosciences), and NKG2A-PE (Miltenyi Biotech). K562mbIL21 feeder cells were kindly given by Dean A. Lee (Nationwide Children's Hospital). Re-expansion protocol of NKAES cells was identical, but with 100 UI/mL IL-2.

### NK cell CRISPR delivery

The shuttle mediated delivery was performed as previously described (10). The nucleases, Cpf1 (1.33  $\mu$ M) or MAD7 (3.2  $\mu$ M) were mixed with tracrRNA:crRNA complexes

(GGGGCAGAUUCAGGUCUGAG; IDT; 4  $\mu$ M) in sterile DPBS for 5 minutes at room temperature. The crRNA recognises a sequence within exon 3 of the NKG2A gene and was designed using the Benchling software. The complexed ribonucleoprotein (RNP) was added to the Feldan Shuttle protein (10  $\mu$ M) in equal ratio. NK cells were washed in DPBS and resuspended in 100  $\mu$ L of the RNP:Shuttle mix. The mix was incubated for 90 seconds at room temperature, before the addition of 400  $\mu$ L prewarmed complete medium. After pelleting the cells, medium was discarded and the cells were resuspended in RPMI1640 supplemented with 10% FCS and 1X penicillin/streptomycin and 100 UI/mL IL-2. Cells were either re-expanded or kept 24-48h in culture for genomic DNA extraction. The nucleases and Shuttle were synthesised by Feldan Therapeutics.

### **Constructs and viral production**

The pHUS Luciferase-GFP vector was constructed in our laboratory from the pHUS-GFP plasmid backbone and encodes for the firefly luciferase, an internal ribosome entry site (IRES) and eGFP. The pHUS HLA-ECw1502 vector was constructed by gene synthesis (IDT) of the HLA-E cDNA with the signal peptide replaced by that of HLA-Cw1502 and cloned in the pHUS GFP vector. Viral concentrate was produced as previously described with the VSVg pseudotyping envelope (3).

### **Genomic DNA extraction and T7E1 assay**

NKAES cells were pelleted and resuspended in 100  $\mu$ L 1X Phusion HF Buffer (Thermo Fisher Scientific) with 100  $\mu$ g Proteinase K (BioBasic) and 50  $\mu$ g RNase A (Qiagen). Lysis was performed for 30 minutes at 56°C and reaction was inactivated by heating 5 minutes at 96°C.

The targeted region was amplified on 2.5  $\mu$ L crude extract using the Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) as recommended, except using 0.3  $\mu$ M primers.

Amplicons were then denatured and re-annealed slowly to room temperature. After re-annealing, 2 U T7E1 enzyme (New England Biolab) or 1X NEBuffer 2 was added, the mix was incubated 60 minutes at 37°C and resolved on an agarose gel. The band density was evaluated with FIJI distribution of ImageJ (11, 12) using built-in functions.

### **Cytotoxicity assay**

For cytotoxicity experiments, target cells expressing Luciferase-GFP were seeded at 10<sup>4</sup> cells per well in 96-well plates and left to adhere overnight. Effector cells were added at different effector:target ratios and the co-culture was incubated for 24 hours at 37°C. Separated wells without effectors were included as a no lysis control. After the co-culture, medium was gently removed and wells were treated with trypsin, which was neutralised with the addition of 3 volumes of DPBS containing 20% of FBS, 2.21 mM EDTA (Thermo), and 0.8% 7AAD. After 15 minutes, samples were acquired with a LSR Fortessa cytometer (BD Biosciences). Specific lysis was calculated as: Cytotoxicity (%) = [1-live targets (sample)/live targets (control)] × 100%.

### **Xenograft model**

The NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) mice (Jackson) were maintained in specific pathogen free facilities at the Sainte-Justine Research Center's animal core facility. All animal experiments were performed in accordance with protocols approved by the institution's Institutional Animal Care and Use Committee (CIBPAR#2020-2323) following Good Laboratory Practices for Animal Research. Six to twelve weeks old mice were injected with 1x10<sup>5</sup> MDA-MB-231 cells expressing Luciferase-GFP intravenously. Starting one week later, weekly NKAES injections at a dose of 1x10<sup>7</sup> cells per mouse were given intravenously, followed by ALT-803 (500 ng) injection intraperitoneally (13). Tumor growth and circulating NK cells were monitored by weekly blood collection and bioluminescence imaging the day before each treatment round. The blood was stained with 7AAD, CD56-APC, CD3-FITC and NKG2A-PE and analysed by flow cytometry.

Following intraperitoneal administration of 3 mg XenoLight D-Luciferin, imaging was performed on an in vivo imaging system (Labeo Technologies). Image analysis and quantification was performed using the FIJI distribution of ImageJ (11, 12) using a custom script.

### **Statistical analyses**

Statistical analyses were performed with the use of GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software). Statistical significance was evaluated using Student's T-test, 2-way ANOVA, or Mantel-Cox test as specified. Where multiple testing was performed, correction using the Holm-Sidak method was used.

For regression analyses, the Gompertz function in Prism was used with the N1 variable constrained to a value of 100:

$$Y = N_0 \times e^{\ln\left(\frac{N_1}{N_0}\right) \times (1 - e^{-k \times x})}$$

The beginning of the plateau was characterised as the point where the slope is under 0.3 using the inverse derivative of the Gompertz equation:

$$x = \left( W \left[ -\ln\left(\frac{N_1}{N_0}\right) \times e^{\ln(Y') - \ln\left(N_1 \times \ln\left(\frac{N_1}{N_0}\right) \times k\right)} \right] - \ln(Y') + \ln\left(N_1 \times \ln\left(\frac{N_1}{N_0}\right) \times k\right) \right) / k$$

In order to make the calculations, the main branch of the Lambert W function was approximated as described (14):

$$W(z) \approx \frac{2 \times \ln(1 + 0.8842 \times \sqrt{2ez + 2}) - \ln\left(1 + 0.9294 \times \ln(1 + 0.5106 \times \sqrt{2ez + 2})\right) - 1.213}{1 + \frac{1}{(2 \times \ln(1 + 0.8842 \times \sqrt{2ez + 2}) + 4.688)}}$$

The 95% CI for the plateau were calculated using the 95% CI of the variables.

## 3.5 Results

### **NKG2A knock-out in NKAES cells**

A common factor among the diverse sources of NK that have been tested for immunotherapy, is their need for expansion and activation to be in sufficient number for treatment. This step can cause a change in expression of multiple receptors, notably NKG2A, the inhibitory receptor recognizing HLA-E (15). We were interested to see whether NK cells expanded in the NKAES feeder system expressed the inhibitory receptor NKG2A. While expression of NKG2A at the surface of primary NK cells freshly isolated from peripheral blood is below 50% ( $45.97 \pm 12.02\%$ ; mean $\pm$ SD), expansion in coculture markedly increased the prevalence of NKG2A<sup>+</sup> cells ( $80.72 \pm 7.29\%$ ; mean $\pm$ SD;  $p=0.0020$ , t-test) (Figure 3.1A).

Using the Feldan Shuttle technology, we delivered CRISPR ribonucleoproteins targeting the second exon of the gene. After a single delivery, T7E1 assay revealed a significant rate of gene editing ( $41.86 \pm 5.93\%$ ; mean $\pm$ SD,  $p<0.0001$ , t-test) (Figure 3.1B). This genomic editing resulted in a decrease of the proportion of cells expressing NKG2A at the surface, which was further improved with cell sorting ( $85.93 \pm 6.21\%$  compared to  $58.48 \pm 13.23\%$  and  $17.61 \pm 8.04\%$  respectively for untreated, treated, and treated and sorted; mean $\pm$ SD;  $p<0.0001$  for all comparisons, One-way ANOVA with Holm-Sidak correction) (Figure 3.1C-D).

### **Impact of NKA2E knock-out on NKEAS cells cytotoxicity against cancer cells lines**

HLA-E expression by tumor cells in vivo is triggered by pro-inflammatory signals such as IFN- $\gamma$  (8). However, cancer cell lines in culture do not express physiological levels of HLA-E, thereby limiting the evaluation the impact of HLA-E-NKG2A interaction in vitro. In order to circumvent this, we transduced the HLA-E gene together with the HLA-Cw1502 signal peptide on MDA-MB-231 and HT29 cell lines (Figure 3.2A). As expected, HLA-E expression inhibited the cytotoxicity of NKAES cells against both MDA-MB-231 and HT29 ( $p<0.0001$  and  $p=0.0075$  respectively; Two-way ANOVA). We then performed cytotoxic assays using NKEAS cells knocked-out or not for NKG2A. While NKG2A knock-down did not modify the cytotoxic activity towards HLA-E negative targets (not shown), NKG2A-knocked down NKAES cells displayed a significantly higher cytotoxic towards

HLA-E expressing targets ( $p < 0.0001$  for MDA-MB-231 HLA-E and  $p = 0.0004$  for HT29, Paired two-way ANOVA in both, Figure 3.2D and 3.2E).

We then assessed the level of NKG2A knock down that was necessary in NKAES cells to induce a similar cytotoxicity against HLA-E+ and WT cell lines similar. Using cell sorting by cytometry, we were able to generate a wide range of NKG2A expressing NKAES populations (Figure 3.3A). To assess if cytotoxicity activity of modified NKAES cells was directly related to the percentage of modified cells, NKAES populations with those different percentages of NKG2A negative cells were assayed for their specific lysis potential against MDA-MB-231 transduced with HLA-ECw1502 or wild-type MDA-MB-231. With these results, the specific lysis of NKAES against MDA-MB-231 transduced with HLA-ECw1502 was reported relative to the maximum obtained against wild-type MDA-MB-231 and plotted in relation to the proportion of NKG2A negative NK cells (Figure 3B). Using GraphPad Prism, non-linear regression using a Gompertz curve was performed and the regression formula could be calculated. Using the values and 95% confidence intervals for the formulas, it was possible to calculate the plateau at each ratio (Table 3.1). The same metric was calculated with the data of modified NKAES cells facing HT29 target cells (Figure 3.3C). The plateaux could also be calculated from the regression analysis against HT29 (Table 3.2). Plateau values ranged between 43% and 61% for MDA-MB-231 and between 48 and 68% for HT-29, meaning that a knock-down of NKG2A that induces a percentage of NKG2A-negative cells of 43 to 61% (or 48 to 68%) is sufficient to induce a cytotoxicity towards HLA-E+-MDA-MB-231 (or towards HLA-E+-HT29, respectively), that is similar to the cytotoxicity towards WT-MDA-MB-231 cells (or towards WT-HT29). This suggests that a complete knock-down of NKG2A is not absolutely necessary to abrogate the inhibitory signaling of HLA-E, even in a context of HLA-E is transduced and therefore dramatically over-expressed.

### **In vivo effect of NKG2A knocked-out NKAES cells**

Next, we looked at in vivo efficacy of this strategy using a xenogeneic mouse model. NSG mice were engrafted with  $1 \times 10^5$  MDA-MB-231 transduced with both a Luciferase-GFP reporter and HLA-ECw1502. Starting seven days later, the mice were treated weekly with  $1 \times 10^7$  NKAES cells by intravenous route. The circulating cells were monitored by venal blood draw and analysed with

flow cytometry for NKG2A expression. The percentage of NKG2A-negative circulating NK cells did not differ throughout the experiment ( $p=0.1998$ , Two-way ANOVA) and was higher in KO than in WT NKAES ( $p<0.0001$ , Two-way ANOVA) (Figure 3.4A). Tumor engraftment and development was followed by bioluminescence imaging and quantified using ImageJ (Figure 3.4B-C). Tumor growth, assessed by bioluminescence activity, was higher in mice injected with vector only (PBS) than in those injected with untreated NKAES (WT;  $p=0.0019$ , Two-way ANOVA with Holm-Sidak correction), and in both cases, tumor growth was higher than in mice injected with NKG2A knocked-out NKAES (KO,  $p<0.0001$ , Two-way ANOVA with Holm-Sidak correction). Survival of mice was also looked at, but no difference in the proportion of surviving mice could be observed (Figure 3.4D).

### 3.6 Discussion

Adoptive transfer of NK cells could be an efficient cellular immunotherapy in cancer and their use has been investigated in clinical trials. The NK expansion system used can be adapted to the clinic and has been shown to be well tolerated in patients (16, 17). Although their safety profile is excellent, their efficacy is still limited, especially for solid tumor (18). This lack of efficacy could be in part attributable to immune editing of the tumor and development of evasion mechanisms, such as the over expression of HLA-E. HLA-E was found to be expressed by a third of all solid tumors and to protect tumors from NK-cell mediated lysis (19). As shown in this study, expansion of NK cells in the NKAES protocol leads to the increase in the percentage of NKG2A positive cells. Expanded NKAES cells are thus likely to be susceptible to HLA-E-mediated inhibition. Using the Feldan Shuttle technology, we performed genomic editing of expanded NKAES cells. The advantage of a gene editing strategy is that it should allow for a permanent and a stable inhibition of the HLA-E:NKG2A axis, compared to the use of antibodies, which has to be administered at regular intervals (20). The infusion of CRISPR modified cells has also been shown to be safe(21). By using a non-viral approach for CRISPR modification, the risk of creating unwanted off-target editing is mitigated compared to constitutive viral-based approaches (22).

When we assessed the rate of allelic editing, we observed that a single treatment with the nuclease was able to yield significant editing. The observed mutations resulted in a decrease of the surface expression of NKG2A. However, the elimination of surface NKG2A was partial in the NK cell population, as a fraction of cells remained unedited. This is one of the limitations of using non-integrating approaches as the CRISPR components are transiently expressed, and this limits efficiency (23). However the shuttle method does not contain viral-derived components that can have immunogenic properties (24). Even the classical nucleofection techniques can trigger cellular stress pathways due to the formation of pores at the surface of the cell (25). As an answer to partial cell modification cell sorting is useful in selecting subsets of a cell population, and can easily be adapted to clinical standards (26).

The expression of HLA-E is secondary to immunological pressure on tumor cells, and standard cell lines tend to not express it in culture. To force the expression of HLA-E, IFN $\gamma$  can be used to mimic

the in-situ inflammatory environment of the tumor (27). In our experiments, we opted for the transduction of HLA-ECw1502 to provide reliable expression (28, 29). This strategy has also been demonstrated as a viable strategy as an in vivo model (8). As expected, the expression of HLA-E on target cells decreased the cytotoxic activity of NKAES cells. This inhibition was however rescued by the NKG2A knock out on the NK cells, in two different cancer cell lines, suggesting that this modification could represent a therapeutic strategy to treat solid tumors expressing HLA-E by NK cell immunotherapy. Our results are in line with the data reported by the Vivier team (20), in which they found that blocking NKG2A with an antibody increased the NK cell activity.

As the editing efficiency of our strategy was not complete, we were interested in understanding if the proportion of NKG2A positive cells was linked to the resistance to HLA-E signals. More precisely, we wanted to determine if there was a percentage of NKG2A positive cells in the NK population, under which there would be no further increase in the cytotoxic activity. By using the unsorted and the positive and negative NKG2A fractions after flow cytometry sorting, we were able to perform cytotoxicity experiments with a diverse range of NKG2A expression. When there was more NKG2A negative cells in the population, there was less difference of cytotoxicity against HLA-E versus wild-type targets. We also observed that above a certain threshold (between 43.53 and 71.32%) of NKG2A-negative cells, there was no further improvement of the specific lysis. This suggests that it may not be necessary to achieve a complete knockout of NKG2A in the NK cell population to rescue the HLA-E inhibition. This observation could be relevant for future therapeutic strategy design. Indeed, contrary to treatment with NKG2A blocking antibodies, not all cells will be affected by genetic modifications, and our data suggest that this would not be a limit for this strategy. Interestingly, Kamiya et al, who used the PEBL approach to block NKG2A, could achieve, after all steps of selection and purification, an expression of at most 20% NKG2A, and this was enough to overcome tumor resistance to NK cells in their experimental setting (8).

It is uncertain whether NKG2A blocking is sufficient by itself to improve survival of mice. It has been shown that neutralizing NKG2A antibodies alone did not have an impact on the survival, nor tumor growth in both a syngeneic and xenogeneic model (20). However, others have shown that a construction designed to retain NKG2A to the endoplasmic reticulum was sufficient to allow expanded NK cells to control the tumor in a xenogeneic breast cancer model (8). In our hands,

the in vivo efficacy of our strategy showed that edited NK cells were able to delay tumor growth, but did not improve mice survival. The combination of this strategy with other knock-outs to block other inhibitory pathways could prove more potent. Also, the combination of NKG2A editing with a chimeric antigen receptor could further potentialize that activity of NK cells and could be used as a potent immunotherapy strategy for cancer.

We have shown that CRISPR editing of NKG2A on NK cells was easy to perform using our shuttle strategy and that the edition obtained was efficient to bypass the inhibitory signaling of HLA-E. This represent an alternative to antibody-mediated blockade and transgene-mediated knock down. As HLA-E can be expressed in multiple cancer types, the exploration of this strategy in other cancer models could expand the potential applications beyond breast and colon cancers.

### **3.7 Disclosure**

The authors would like to thank Dr. Dean Lee (Research Institute of Nationwide Children's Hospital) for the K562-mbIL21-41BBL cell line.

#### **Conflict of interest :**

Mario Harvey, Louis-Jean Bordeleau et David Guay are paid by Feldan Therapeutics. The other authors declared they have no conflict of interest.

### 3.8 References

1. Shimasaki N, Jain A, Campana D. NK cells for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2020.
2. 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. *New England Journal of Medicine.* 2020;382(6):545-53.
3. Colamartino ABL, Lemieux W, Bifsha P, Nicoletti S, Chakravarti N, Sanz J, et al. Efficient and Robust NK-Cell Transduction With Baboon Envelope Pseudotyped Lentivector. *Frontiers in Immunology.* 2019;10(2873).
4. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol.* 2008;9(5):503-10.
5. Kwon H-J, Kim N, Kim HS. Molecular checkpoints controlling natural killer cell activation and their modulation for cancer immunotherapy. *Experimental & Molecular Medicine.* 2017;49(3):e311.
6. Zhang C, Liu Y. Targeting NK Cell Checkpoint Receptors or Molecules for Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology.* 2020;11(1295).
7. Valés-Gómez M, Reyburn HT, Erskine RA, López-Botet M, Strominger JL. Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *The EMBO journal.* 1999;18(15):4250-60.
8. Kamiya T, Seow SV, Wong D, Robinson M, Campana D. Blocking expression of inhibitory receptor NKG2A overcomes tumor resistance to NK cells. *J Clin Invest.* 2019;130.
9. Huang R-S, Shih H-A, Lai M-C, Chang Y-J, Lin S. Enhanced NK-92 Cytotoxicity by CRISPR Genome Engineering Using Cas9 Ribonucleoproteins. *Frontiers in Immunology.* 2020;11(1008).
10. Del'Guidice T, Lepetit-Stoffaès JP, Bordeleau LJ, Roberge J, Theberge V, Lauvaux C, et al. Membrane permeabilizing amphiphilic peptide delivers recombinant transcription factor and CRISPR-Cas9/Cpf1 ribonucleoproteins in hard-to-modify cells. *PLoS One.* 2018;13(4):e0195558.

11. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):671-5.
12. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676-82.
13. Xu W, Jones M, Liu B, Zhu X, Johnson CB, Edwards AC, et al. Efficacy and mechanism-of-action of a novel superagonist interleukin-15: interleukin-15 receptor  $\alpha$ Su/Fc fusion complex in syngeneic murine models of multiple myeloma. *Cancer research*. 2013;73(10):3075-86.
14. Winitzki S, editor *Uniform approximations for transcendental functions*. International conference on computational science and its applications; 2003: Springer.
15. Denman CJ, Senyukov VV, Somanchi SS, Phatarpekar PV, Kopp LM, Johnson JL, et al. Membrane-bound IL-21 promotes sustained ex vivo proliferation of human natural killer cells. *PLoS One*. 2012;7(1):e30264.
16. Ciurea SO, Schafer JR, Bassett R, Denman CJ, Cao K, Willis D, et al. Phase 1 clinical trial using mblL21 ex vivo-expanded donor-derived NK cells after haploidentical transplantation. *Blood*. 2017;130(16):1857-68.
17. Lee DA, Denman CJ, Rondon G, Woodworth G, Chen J, Fisher T, et al. Haploidentical Natural Killer Cells Infused before Allogeneic Stem Cell Transplantation for Myeloid Malignancies: A Phase I Trial. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2016;22(7):1290-8.
18. Matosevic S. Reprogramming of natural killer cells and their use in immunotherapies of solid tumors. *Immunotherapy*. 2020;0(0):null.
19. Lo Monaco E, Tremante E, Cerboni C, Melucci E, Sibilio L, Zingoni A, et al. Human leukocyte antigen E contributes to protect tumor cells from lysis by natural killer cells. *Neoplasia*. 2011;13(9):822-30.

20. Andre P, Denis C, Soulas C, Bourbon-Caillet C, Lopez J, Arnoux T, et al. Anti-NKG2A mAb Is a Checkpoint Inhibitor that Promotes Anti-tumor Immunity by Unleashing Both T and NK Cells. *Cell*. 2018;175(7):1731-43 e13.
21. Stadtmauer EA, Fraietta JA, Davis MM, Cohen AD, Weber KL, Lancaster E, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science*. 2020;367(6481):eaba7365.
22. Lino CA, Harper JC, Carney JP, Timlin JA. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Delivery*. 2018;25(1):1234-57.
23. Knopp Y, Geis FK, Heckl D, Horn S, Neumann T, Kuehle J, et al. Transient Retrovirus-Based CRISPR/Cas9 All-in-One Particles for Efficient, Targeted Gene Knockout. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 2018;13:256-74.
24. Afolabi LO, Adeshakin AO, Sani MM, Bi J, Wan X. Genetic reprogramming for NK cell cancer immunotherapy with CRISPR/Cas9. *Immunology*. 2019;158(2):63-9.
25. Anderson BR, Karikó K, Weissman D. Nucleofection induces transient eIF2 $\alpha$  phosphorylation by GCN2 and PERK. *Gene therapy*. 2013;20(2):136-42.
26. Klöß S, Oberschmidt O, Morgan M, Dahlke J, Arseniev L, Huppert V, et al. Optimization of Human NK Cell Manufacturing: Fully Automated Separation, Improved Ex Vivo Expansion Using IL-21 with Autologous Feeder Cells, and Generation of Anti-CD123-CAR-Expressing Effector Cells. *Human Gene Therapy*. 2017;28(10):897-913.
27. Malmberg K-J, Levitsky V, Norell H, Matos CTd, Carlsten M, Schedvins K, et al. IFN- $\gamma$  protects short-term ovarian carcinoma cell lines from CTL lysis via a CD94/NKG2A-dependent mechanism. *The Journal of Clinical Investigation*. 2002;110(10):1515-23.
28. Lee N, Goodlett DR, Ishitani A, Marquardt H, Geraghty DE. HLA-E Surface Expression Depends on Binding of TAP-Dependent Peptides Derived from Certain HLA Class I Signal Sequences. *The Journal of Immunology*. 1998;160(10):4951-60.

29. Kraemer T, Celik AA, Huyton T, Kunze-Schumacher H, Blasczyk R, Bade-Döding C. HLA-E: Presentation of a Broader Peptide Repertoire Impacts the Cellular Immune Response-Implications on HSCT Outcome. *Stem Cells Int.* 2015;2015:346714-.

### 3.9 Legends

**Figure 3.1. Expression and editing of NKG2A on expanded NK cells.** (A) Percentage of expression of NKG2A measured by flow cytometry on NK cells freshly isolated from peripheral mononuclear cells (NK; n=3) or on NK cells expanded in the NKAES system (NKAES; n=5) ( $p=0.0020$ ; T test). (B) Representative gel (left) and cumulative data of the efficiency of strand editing measured by the T7E1 assay in NKAES cells either untreated (n=4) or treated (n=5) with ribonuclease complex and shuttle ( $p<0.0001$ ; T test). (C) Representative examples of the surface expression of NKG2A on NKAES cells either untreated (WT), treated with ribonuclease complex and shuttle (KO), or treated with ribonuclease complex and shuttle and sorted on NKG2A negative expression (KO sorted). (D) Percentage of expression of NKG2A on NKAES cells either untreated (WT; n=12), treated (KO; n=12) with ribonuclease complex and shuttle, or treated and sorted (KO sorted; n=5) ( $p<0.0001$  for all comparisons; One-way ANOVA with Holm-Sidak correction).

**Figure 3.2. Impact of the expression of HLA-E at the surface of target cells on NKAES cells cytotoxicity.** (A) HLA-E surface expression on MDA-MB-231 (left panel) and HT29 (right panel) cell lines either wild type (blue) or transduced with a plasmid coding for HLA-ECw1501 (red). (B) Cytotoxic assay using NKAES cells (n=16) against MDA-MB-231 cells untransduced or transduced with a plasmid coding for HLA-ECw1501 ( $p<0.0001$ ; Paired Two-way ANOVA). (C) Cytotoxic assay using NKAES cells (n=7) against HT29 cells untransduced or transduced with a plasmid coding for HLA-ECw1501 ( $p=0.0075$ ; Paired Two-way ANOVA). (D) Cytotoxic assay using NKAES cells untreated (WT; n=11) or treated with ribonuclease complex and shuttle (KO; n=11) against MDA-MB-231 cells transduced with a plasmid coding for HLA-ECw1501 ( $p<0.0001$ ; Paired Two-way ANOVA). (E) Cytotoxic assay using NKAES cells untreated (WT; n=4) or treated with ribonuclease complex and shuttle (KO; n=4) against HT29 cells transduced with a plasmid coding for HLA-ECw1501 ( $p=0.0004$ ; Paired Two-way ANOVA).

**Figure 3.3. Population effect of NKG2A expression on HLA-E mediated cytotoxicity inhibition.**

(A) Representative examples of pre sorting population and the sorted and re-expanded fractions

for positive (NKG2A+) and negative (NKG2A-) expression of NKG2A. The cells from the pre-sorting population were also re-expanded (Unsorted). Sorting was performed from NKAES either untreated or treated with ribonuclease complex and shuttle and the cells were re-expanded for a week. (B) Relationship of the percentage of NKAES cells lacking NKG2A expression on the relative specific lysis against HLA-E+ targets compared to HLA-E- targets at different effector to target ratios against MDA-MB-231 ( $R^2=0.4095/0.5497/0.4989/0.4998$  respectively for the ratios 4:1/2:1/1:1/0.5:1; Nonlinear Gompertz Fit). (C) Relationship of the percentage of NKAES cells lacking NKG2A expression on the relative specific lysis against HLA-E+ targets compared to HLA-E- targets at different effector to target ratios against HT29 ( $R^2= 0.4803/0.4331/0.3523/0.4966$  respectively for the ratios 4:1/2:1/1:1/0.5:1; Nonlinear Gompertz Fit).

**Figure 3.4. Antitumor capacity of NKG2A-edited NKAES cells in immunodeficient mice.** (A-D) The mice were engrafted with  $1 \times 10^5$  MDA-MB-231 and treated weekly, starting seven days later, with PBS (n=4), untreated NKAES (WT; n=4) or sorted nuclease treated NKAES (KO; n=2) (A) Phenotyping of the circulating NKAES cells in NKAES-treated mice ( $p < 0.0001$ ; Two-way ANOVA). (B) Representative images from bioluminescent imaging analysed with ImageJ. Ventral images are shown. (C) Bioluminescence quantification of the images performed with ImageJ (Two-way ANOVA with Holm-Sidak correction). (D) Kaplan-Meier curve of the survival of the mice with the treatments.

### 3.10 Figures

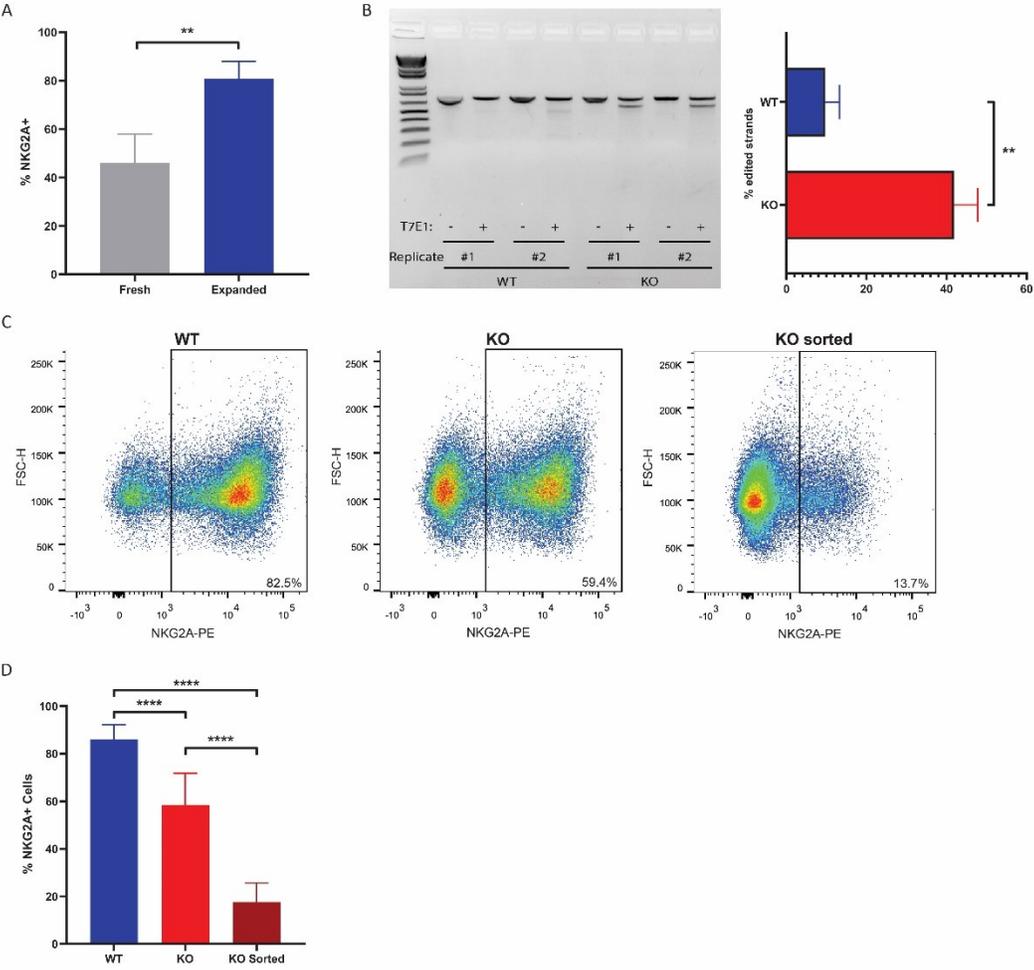
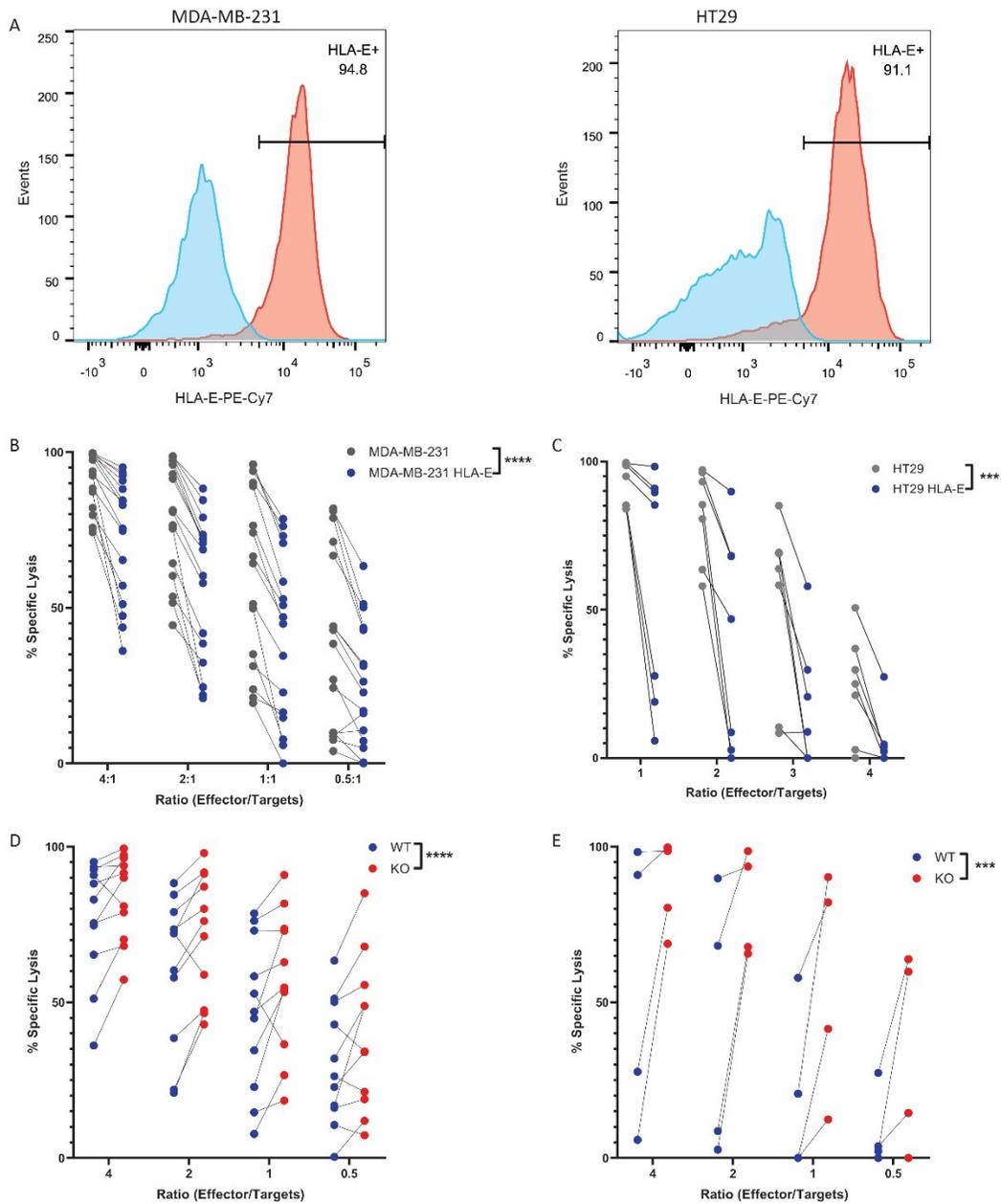
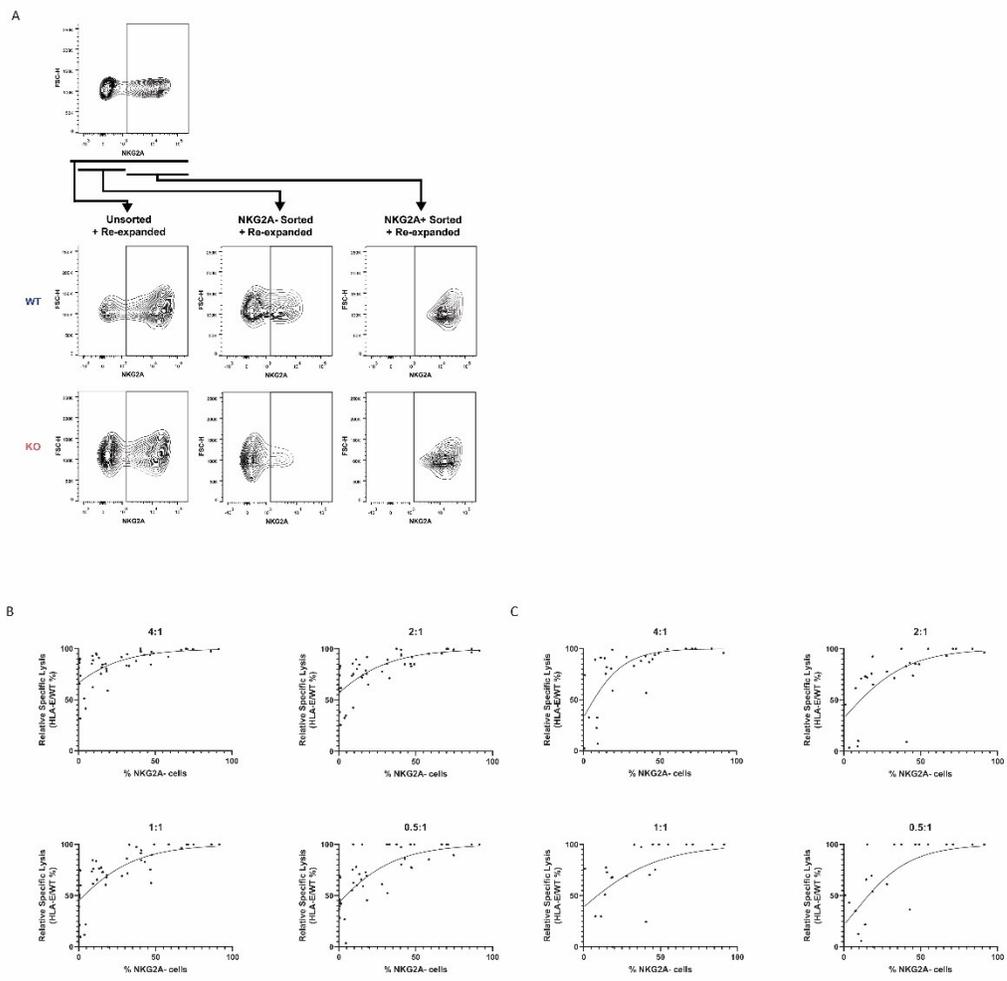


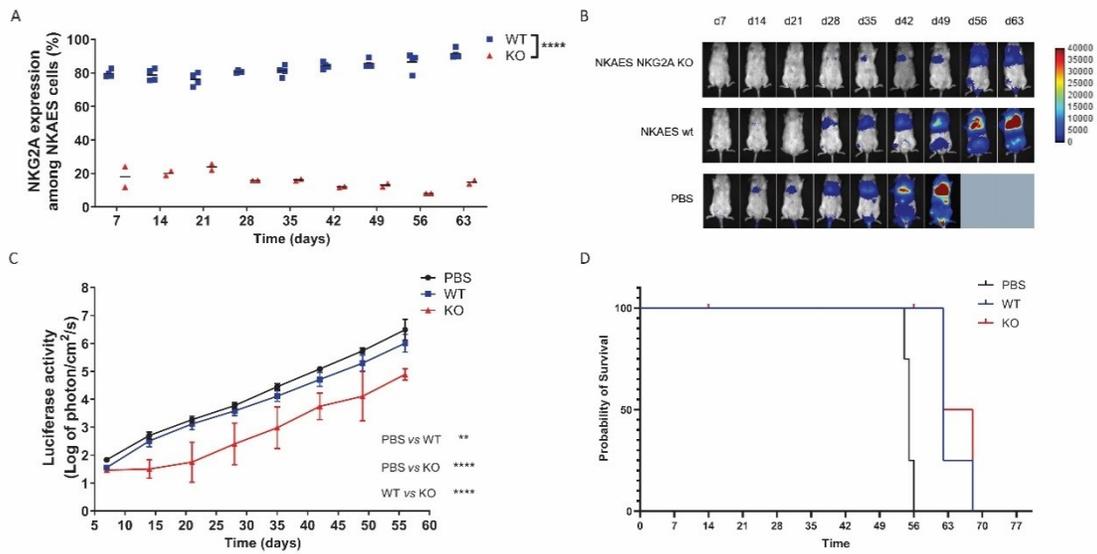
Figure 3.1 – Expression and editing of NKG2A on expanded NK cells.



**Figure 3.2 – Impact of the expression of HLA-E at the surface of target cells on NKAES cells cytotoxicity.**



**Figure 3.3 – Population effect of NKG2A expression on HLA-E mediated cytotoxicity inhibition.**



**Figure 3.4 – Antitumor capacity of NKG2A-edited NKAES cells in immunodeficient mice.**

### 3.11 Tables

**Tableau 3.1 – Regression parameters for MDA-MB-231**

<b>RATIO</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0.5</b>
<b>N<sub>0</sub></b>	66.50	56.77	45.12	43.27
<b>(95% CI)</b>	(57.47-74.86)	(48.40-64.71)	(33.85-56.01)	(31.71-54.52)
<b>K</b>	0.04306	0.04197	0.04213	0.04315
<b>(95% CI)</b>	(0.02245-0.07838)	(0.02616-0.06546)	(0.02509-0.06853)	(0.02574-0.06961)
<b>PLATEAU</b>	43.53	51.79	59.78	60.17
<b>(95% CI)</b>	(28.29-65.87)	(36.86-73.04)	(40.17-90.35)	(40.46-91.40)

**Tableau 3.2 – Regression parameters for HT-29**

<b>RATIO</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0.5</b>
<b>N<sub>0</sub></b>	32.79	32.29	38.79	21.54
<b>(95% CI)</b>	(6.870-55.59)	(5.719-54.35)	(11.94-64.83)	(1.059-47.19)
<b>K</b>	0.07054	0.04439	0.03483	0.04988
<b>(95% CI)</b>	(0.02951-0.1595)	(0.01907-0.1225)	(0.01125-0.07480)	(0.02122-0.1131)
<b>PLATEAU</b>	48.78	65.94	71.32	67.43
<b>(95% CI)</b>	(24.04-100)	(28.71-100)	(34.29-100)	(32.03-100)



## Chapitre 4 – Discussion

Les cellules NK sont de plus en plus utilisées dans les approches d'immunothérapies (2). L'utilisation de cellules NK pour l'immunothérapie comporte en effet certains avantages comparativement à l'utilisation de cellules T. L'effet adverse principal des lymphocytes T, le CRS est provoqué par les cytokines produites par les cellules T et peut mener à de graves complications ou même à la mort s'il n'est pas traité (270). Le profil sécrétoire des cellules NK est différent et n'implique pas les cytokines principalement associées au CRS, l'IL-6 majoritairement (149). Le profil thérapeutique des immunothérapies peut donc être amélioré en présence d'effets adverses moindres.

Un second avantage, l'absence de distinction entre soi et non-soi permet l'utilisation de cellules NK allogéniques. En effet, la maladie du greffon contre l'hôte, est dû à la reconnaissance et à l'attaque des cellules du patient par les cellules d'un donneur. Pour cette raison, les cellules T doivent provenir du patient lui-même (271). Les cellules NK n'ont pas de récepteurs qui permettent la distinction de cellules allogéniques, seulement la reconnaissance des cellules altérées par une infection ou par la transformation. Un des potentiels problèmes défaut des cellules NK allogéniques est leur expression des HLA de classe I, qui les rends sensibles au rejet par le système immunitaire du patient (272, 273).

La possibilité d'utiliser des cellules allogéniques pourrait permettre à son tour le développement de banques de cellules (274, 275). Le délai entre le diagnostic et l'administration de la thérapie est grandement amélioré puisque les cellules peuvent être préparées et cryopréservées. Les étapes de production et validation peuvent avoir lieu avant même le diagnostic. De plus, les coûts de production et de validation d'une préparation peuvent aussi être séparées pour plusieurs patients, ce qui augmente l'accessibilité de la thérapie. Le coût des immunothérapies à base de cellules CAR-T est présentement élevé, ce qui limite son utilisation (276-278). Les immunothérapies à base de cellules NK pourraient donc être intéressantes en parallèle ou en addition aux thérapies de CAR-T.

Malgré leurs avantages, certaines limitations rendent leur utilisation clinique plus complexe. Notamment les techniques qui permettent de modifier les cellules pour la thérapie génique et la production de cellules CAR-T ont une efficacité limitée sur les cellules NK (279). En plus, l'expression de mécanismes inhibiteurs par les cellules tumorales limite l'efficacité des cellules utilisées en immunothérapies (111). Dernièrement, la survie des cellules NK est plus courte que celle des cellules T dans la circulation normale (280).

Notre objectif était de développer des réponses à ces inconvénients des cellules NK, principalement d'améliorer la transduction des cellules NK et de bloquer les voies des inhibiteurs de contrôle.

#### **4.1 Transduction des cellules NK**

Malgré le développement des lentivirus, utilisés pour la thérapie génique, la transduction des cellules NK reste peu efficace. Certaines protéines d'enveloppe alternatives ont été proposées pour augmenter la transduction des cellules NK. L'utilisation de l'enveloppe du virus endogène félin RD114 a montré une amélioration de la capacité de transduction comparativement à l'utilisation de la protéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G) (265, 281).

La protéine d'enveloppe BaEVRless a récemment été décrite et permet une meilleure modification des cellules souches quiescentes (267). Le BaEVRless utilise deux transporteurs d'acide aminés, le transporteur d'acide aminés neutres (ASCT)-1 et ASCT-2, pour médier son entrée. Le récepteur ASCT-2 est partagé par le mécanisme d'entrée de la protéine RD114. L'expression des transcrits ARN a été étudié sur les cellules activées et quiescentes. Les cellules ayant été en contact avec des cellules nourricières exprimant l'IL-21 ou l'IL-15 membranaires possèdent plus des ARN messagers pour les deux récepteurs du BaEVRless. Il est donc possible que la stimulation des cellules permette une meilleure transduction. En utilisant l'enveloppe BaEVRless la transduction avec un lentivirus est nettement meilleure qu'avec le VSV-G et RD114 et ce pour les cellules NK activées ou quiescentes. La proportion de cellules exprimant la *green fluorescent protein* (GFP) avec RD114 est comparable à d'autres résultats publiés utilisant la même méthode d'expansion des cellules NK (282). Tel que prévu, la transduction est moins efficace dans les conditions non-stimulées. La transduction avec une dose dix fois moindre, d'un virus par

cellule, reste efficace pour transduire la majorité des cellules activées. Certaines agences réglementaires, comme la *Food and Drugs Association* (FDA), recommandent d'avoir moins de 5 intégrations par cellules (283). L'utilisation d'une multiplicité d'infection faible pourrait permettre de diminuer le risque d'obtenir plus de cinq intégrations par cellule.

De plus la transduction avec un titre égal permet d'avoir une intensité de transgène équivalente pour BaEVRless, VSV-G et RD114. La densité est cependant plus faible sur les cellules non-activées que sur les cellules qui ont été mises en expansion. Il est possible que cette différence soit observée en raison d'un nombre différent d'intégrations par cellule, mais le profil d'activation des cellules peut aussi avoir un impact sur l'expression des transgènes. De telles différences ont été observées sur des lymphocytes T ayant subi des activations différentes (284). Il est donc possible qu'un effet similaire provoque une plus faible expression dans les lymphocytes NK non-activés.

Pour vérifier que l'efficacité n'est pas dépendant de la méthode d'activation, d'autres méthodes d'activation ont été comparées aux cellules nourricières présentant l'IL-21. Les cellules nourricières avec la forme membranaire de l'IL-15 et le milieu commercial NK-MACS permettent des niveaux de transduction similaires. L'efficacité améliorée de transduction n'est donc restreinte à une seule technique d'activation des cellules NK. Le milieu NK-MACS est aussi compatible avec la translation vers un protocole clinique sans cellules nourricières (285).

La transduction avec des particules virales pourrait avoir un impact sur le phénotype de certaines cellules (286). Les cellules NK sont sensibles à certains signaux des *Toll-like receptors* (TLR) (287). Plusieurs marqueurs ont été étudiés à la surface des cellules avec et sans transduction, mais aucune différence significative n'a été observée. L'ajout du virus ne cause donc pas de modification phénotypique majeure des cellules NK. De plus, la transduction n'a pas d'impact sur la capacité lytique des NK contre la cible témoin K562. Finalement, la viabilité des cellules n'est pas différemment affectée par le pseudotypage avec BaEVRless comparativement à VSV-G, autant selon le nombre de cellules récoltées après la manipulation, que par la proportion de cellules viables. Les autres enveloppes étudiées, RD114 et les glycoprotéines modifiées du virus de la rougeole (MV-LV), causaient à la fois une plus forte proportion de cellules non-viables et une augmentation du nombre absolu de cellules récupérées. Il est donc possible que les particules

lentivirales pseudotypées avec ces protéines causent une activation de la prolifération et de l'activation des cellules NK.

La taille du transgène a un impact sur toutes les étapes de la production à la transduction avec un lentivirus (288, 289). Pour valider la possibilité d'utiliser l'enveloppe BaEVRless avec des inserts plus volumineux que la séquence codant pour la GFP, des constructions pour un ou deux CAR ont été préparées et les particules virales ont été utilisées pour transduire les cellules NK. La tailles des constructions atteignent environ 8500 paires de bases, comparable à la taille maximale utilisée en général (289). Malgré la grande taille de la construction, des niveaux de transduction avoisinant 20% ont pu être obtenus. L'enveloppe BaEVRless est donc compatible avec des vecteurs de transfert larges qui sont souvent utilisés dans la thérapie génique et la génération de cellules avec un CAR (3, 256).

## **4.2 Génération de NK-CAR**

Les vecteurs utilisés pour la transduction de larges transgènes contenaient des séquences codant pour des CAR anti-CD22 ou anti-CD22 et CD19. Le récepteur chimérique était détectable à la surface des cellules, qui ont été sélectionnées et mises en culture. Les cellules modifiées avec un CAR étaient capables d'effectuer la lyse spécifique de cellules leucémiques RS4;11 exprimant les antigènes reconnus par les récepteurs. La cible a été choisie en raison de sa résistance à la lyse NK, comparativement aux cellules REH, NALM6 et 697 (Données non-publiées obtenues au laboratoire). La lyse spécifique approche 30% au ratio 4 effecteurs contre 1 cible et avec les constructions typiques de CAR-T. Ce résultat est comparable aux résultats obtenus avec les cellules CAR-T contre la lignée NALM6 (290). La lyse cellulaire observée avec les cellules CAR-T contre la lignée leucémique REH est supérieure à celle observée ici. L'efficacité du CAR varie donc selon la cible utilisée. La densité des antigènes peut jouer un rôle dans cette différence, mais aussi l'expression différentielle de ligands inhibiteurs (112, 291).

Avec l'utilisation de la technologie CRISPR, les antigènes ciblés par les CAR ont pu être délétés des cellules leucémiques RS4;11. Les cellules n'exprimant pas l'antigène cible du CAR présenté par les cellules NK ne sont pas éliminées. Les cellules CAR-NK n'ont donc pas d'activité hors-cible et il y a donc peu de risque d'observer une attaque de tissus sains autre que les lymphocytes B. Pour les

cellules CAR-NK exprimant deux CAR à leur surface, elles ont montré une activité contre les cellules exprimant un ou deux antigènes. L'expression de deux CAR en tandem est donc une solution qui pourrait aussi être appliquée dans les NK, pour permettre de contourner l'évasion antigénique qui a été observée lors des traitements avec les CAR-T (215, 292).

Il est aussi possible que les chaînes de signalisation utilisées ne soient pas optimales pour permettre aux cellules NK d'attaquer les cellules cibles. En effet, bien que les constructions de CAR-T aient été utilisées et sont fonctionnelles dans les cellules NK, il a été démontré que des récepteurs conçus pour les cellules NK peuvent avoir une efficacité plus forte (146, 256).

### **4.3 Édition génomique de NKG2A**

Les cellules NK peuvent exprimer plusieurs récepteurs inhibiteurs pour divers ligands. Conformément aux résultats observés dans la littérature, les cellules NK en expansion expriment une forte proportion de NKG2A, un récepteur inhibiteur pour le HLA-E (173, 293). À l'aide d'une technique par peptides amphipatiques (180), une nucléoprotéine CRISPR ciblée contre le gène NKG2A a été introduite dans les cellules NK. En ciblant le début de l'ARN messager, la modification aléatoire du gène peut introduire un codon de terminaison prématuré et déstabilisé complètement l'ARN messager (294). Des modifications ont pu être détectées dans la séquence génomique des cellules à l'endroit ciblé. L'utilisation de peptides pénétrants produit généralement moins de modifications que l'utilisation de l'électroporation (177). L'efficacité d'édition génomique observée dans nos expériences est comparable à celle observée précédemment avec le même système ou avec une livraison par électroporation dans les cellules NK (180, 295). Ces modifications ont eu pour effet de réduire la proportion de cellules NK en expansion exprimant NKG2A à leur surface comme attendu.

D'autres stratégies ont été approchées dans la littérature pour contourner la signalisation de NKG2A. Les anticorps neutralisants ont été d'abord utilisés pour bloquer la signalisation par les points de contrôles PD-1 et CTLA4 sur les lymphocytes T (111). Les résultats cliniques ont montré que la neutralisation de NKG2A permet de renverser l'inhibition due à la présence de HLA-E dans

les tumeurs. La demi-vie des anticorps étant toutefois limitée, des administrations répétées seraient nécessaires pour conserver l'inhibition (296). Récemment une autre stratégie a été présentée. Une construction artificielle permet de retenir le récepteur NKG2A au réticulum endoplasmique pour empêcher l'expression à la surface (173). Cette stratégie qui repose sur l'expression d'un transgène pourrait être sensible aux effets d'atténuation épigénétique du promoteur (297).

L'effet de l'édition génomique a été testé contre des cellules de lignées de cancer du sein et du colon. Pour obtenir des lignées exprimant HLA-E, il a été transduit dans les lignées MDA-MB-231 et HT29, puisque les cellules de lignées l'expriment faiblement (298). Le peptide d'adressage du HLA-Cw1205 a été utilisé pour assurer une expression stable du HLA-E (299). Ce peptide est aussi exprimé par le cytomégalo virus (CMV) pour contourner les réponses immunes par HLA-E (300). L'utilisation d'une stimulation avec l'IFN $\gamma$  sur les cellules est utilisée dans certains cas pour forcer l'expression du HLA-E (301). Le contrôle de l'expression est par contre moins précis et contrôlable dans les modèles précliniques *in vivo*. Contre nos lignées transduites avec HLA-E, la délétion génétique de NKG2A a permis d'empêcher l'inhibition de la cytotoxicité. Ces résultats sont compatibles à ceux obtenus *in vitro* par la séquestration du NKG2A et par la neutralisation avec l'anticorps Monalizumab (173, 302). Une forte variabilité est observée entre différents donneurs comme pour les résultats obtenus avec l'anti-NKG2A (302).

Pour mieux comprendre la relation entre l'expression de NKG2A sur une population de cellules NK et l'inhibition de HLA-E, les cellules ont été sélectionnées et plusieurs niveaux d'expression ont été obtenus. Ces cellules ont été utilisées pour des essais de cytotoxicité. L'utilisation d'une normalisation sur la lyse spécifique contre la même lignée n'exprimant pas HLA-E permet de contrôler la variabilité inter-donneurs observée. La distribution des cellules suit une courbe non-linéaire et tel qu'attendu, plus la proportion de cellules NKG2A négatives est forte, moins les cellules sont sensibles à l'effet du HLA-E sur la lyse spécifique. Une observation supplémentaire peut être faite; il n'est pas nécessaire d'obtenir une population pure pour observer les effets. Les courbes atteignent un plateau entre 43 et 67% de cellules NKG2A négatives, selon la lignée et le nombre de cellules effectrices par cible. La pureté obtenue avec la stratégie d'un transgène

séquestrant NKG2A est conforme avec cette observation et présente un niveau de cellules NKG2A positives plus faible que ceux prédits par la régression (173).

Pour valider l'efficacité de l'édition génomique de NKG2A sur la résistance des cellules NK au HLA-E, un modèle xénogénique a été mis au point dans la souris NSG. Une semaine suivant l'administration de cellules de lignée tumorale MDA-MB-231 les cellules NK amplifiées ont été administrées. L'expression de NKG2A a été évaluée sur les cellules circulantes après chaque semaine de traitement et le phénotype ne montre pas de variation dans le temps. La croissance tumorale a été suivie par bioluminescence. L'administration de cellules NK non modifiées retarde légèrement la croissance du cancer dans la souris et l'administration de cellules n'exprimant pas NKG2A délaie significativement la croissance tumorale. La thérapie utilisant seulement la modification par CRISPR du gène NKG2A n'est pas suffisante pour éliminer complètement la tumeur. Bien que les cellules NKG2A négatives retardent la croissance, aucun avantage sur la survie n'a pu être observé comparativement au groupe traité avec les cellules NK non-modifiées. Dans certains cas il a été montré que l'inhibition seule de NKG2A permettait d'améliorer la survie dans des modèles pré-cliniques, alors que d'autres ont montré que la combinaison de plusieurs voies indépendantes permettait d'observer un effet (173, 302). Les modèles utilisés, bien que semblables, comportent des différences, notamment au niveau du choix de lignée cellulaire utilisée et de la source et composition des cellules effectrices utilisées.

#### **4.4 Translation vers la clinique**

Les résultats présentés montrent des améliorations qui sont intéressantes pour le développement de nouvelles immunothérapies NK. Dans nos travaux, nous avons touché la transduction par les lentivirus et l'édition génomique de HLA-E. Des cellules NK amplifiées à l'aide de cellules nourricières exprimant l'IL-21 ont été utilisées dans nos travaux. Cette méthode de culture des cellules NK peut être utilisée sur de nombreuses sources de cellules NK, permettant une flexibilité (2). De plus ce système d'expansion des cellules NK a été utilisé dans certains essais cliniques et a été montré comme bien toléré, avec peu d'effets indésirables (3, 133). En ajoutant une cassette pour faire sécréter l'IL-15 aux cellules NK, les cellules administrées ont pu être jusqu'à un an, alors que la survie des NK est plutôt estimée à deux semaines (3, 280). L'inclusion

d'une cytokine pourrait donc résoudre le problème de la survie plus faible des NK comparativement aux résultats observés avec les CAR-T.

Les étapes de transduction ou de modification génétique ne représentent pas non plus de limite à la transposition à la clinique. Plusieurs patients ont déjà été traités avec des cellules CAR-T modifiées par un lentivirus (303). La transduction est aussi utilisée pour corriger certains défauts congénitaux, comme la  $\beta$ -thalassémie ou le syndrome de Wiskott-Aldrich (304). À court terme, l'utilisation de vecteurs lentiviraux ne comporte pas de risque élevé. Des patients traités par des cellules transduites sont encore suivis pour étudier les effets à long terme (304). L'édition des cellules par CRISPR est toutefois une technique plus récente et moins bien étudiée. Des cellules T dont l'ADN a été modifié ont cependant été utilisées dans un essai clinique et aucune transformation en cellules malignes n'a été observée jusqu'ici (305). Les stratégies d'édition génomique sont donc compatibles avec l'utilisation dans un essai clinique. Il faudrait cependant inclure une vérification des coupures hors-cible qui peuvent se produire lors de l'utilisation du CRISPR. Le séquençage exhaustif, ou *deep-sequencing*, permet de résoudre les événements rares de modification hors-cible (306).

L'incorporation d'une stratégie dite de suicide, permettant l'élimination des cellules modifiées, est adoptée dans plusieurs cas. La thymidine kinase du virus de l'herpès simplex, des récepteurs de mort synthétiques ou encore des récepteurs reconnus par des anticorps thérapeutiques ont été utilisés pour éliminer des cellules greffées (307). La thymidine kinase permet une élimination graduelle, mais complète des cellules, cependant l'expression de la protéine virale peut déclencher une réponse immunitaire indésirable (308). Le récepteur artificiel iCasp9 n'est pas immunogénique, mais a montré une sélection partielle chez des patients (309). Il a tout de même été utilisé pour comme marqueur de sélection chez les patients, notamment avec des cellules CAR-NK (3). L'utilisation d'anticorps thérapeutiques comme contre le CD20 (rituximab) ou l'EGFR (cetuximab) bénéficie des données d'efficacité clinique et de sûreté accumulées par leur utilisation en clinique (310, 311). Ces anticorps ont toutefois des cibles sur les tissus normaux et peuvent éliciter des effets indésirables spécifiques, tel qu'une aplasie B dans le cas du rituximab ou des éruption cutanées pour le cetuximab (312). Les effets secondaires sont toutefois temporaires et bien caractérisés en raison de leur utilisation fréquente en clinique. Ils pourraient

donc être une excellente avenue pour ajouter une stratégie d'élimination des cellules NK. Ces résultats pourraient donc être facilement transposables à une utilisation clinique.

Finalement, la stratégie de modification génétique par CRISPR pourrait être appliquée à l'édition du gène de la bêta-2 microglobuline (B2M), qui est nécessaire pour l'expression de complexe HLA de classe I (272, 273). Cette modification permet d'éviter le rejet des cellules par les lymphocytes T. Pour éviter le rejet par les cellules NK du donneur, des stratégies ont été élaborées avec l'expression de HLA de classe I non-classiques, HLA-E ou HLA-G (272).



## Chapitre 5 – Conclusion

Avec le développement de nouvelles immunothérapies NK, certains désavantages de ces cellules doivent être adressés. Les travaux effectués dans le cadre de ce rapport visent à répondre à certains de ces points. Dans un premier temps, nous proposons une nouvelle glycoprotéine, BaEVRless, qui permet de produire des particules virales beaucoup plus infectieuses que celle portant le VSV-G ou le RD114 à leur surface. Nous avons aussi montré que le BaEVRless ne modifie pas le phénotype ou les capacités cytotoxiques des cellules NK transduites. L'amélioration de la transduction des cellules NK pourra permettre de faciliter la création de thérapies CAR-NK. Nous avons pu, grâce à l'enveloppe BaEVRless, produire des cellules CAR-NK avec un ou deux CAR à leur surface. Ces cellules CAR-NK étaient capables d'attaquer des cellules leucémiques normalement résistantes aux cellules NK.

Dans un second temps, avec une nouvelle technique par transporteurs protéiques, nous avons réussi à faire entrer les composants nécessaires pour effectuer une modification du gène NKG2A par CRISPR. L'édition génomique de NKG2A a permis d'empêcher l'inhibition par HLA-E, un des points de contrôle important dans les tumeurs. Nous avons d'ailleurs observé que cet effet était aussi observé *in vivo*, par un délai de la croissance tumorale dans un modèle xénogénique de cancer du sein. Nos données nous ont aussi permis d'observer que NKG2A pouvait être exprimé sur une fraction des cellules NK et celles-ci demeurent résistantes à HLA-E. L'édition par CRISPR pourrait représenter une nouvelle stratégie pour permettre aux cellules NK de résister aux signaux inhibiteurs des tumeurs.

Nous envisageons comme prochaine étape de combiner ces approches qui agissent sur des voies complémentaires. L'utilisation de chaînes intracellulaires optimisées pour les cellules NK comme présentées ailleurs pourrait aussi grandement améliorer les réponses observées avec les cellules CAR-NK (146). L'expression de HLA-E n'est qu'une des stratégies employées par les cancers pour éviter l'attaque par les réponses immunitaires. En plus de NKG2A, d'autres récepteurs pourraient être ciblés par CRISPR pour rendre les cellules NK plus actives dans les environnements

immunosuppresseurs. Les récepteurs PD-1, LAG3, TIGIT et Tim3 seraient de bons candidats selon les données actuelles (313).

## Références bibliographiques

1. Liu D. CAR-T “the living drugs”, immune checkpoint inhibitors, and precision medicine: a new era of cancer therapy. *Journal of Hematology & Oncology*. 2019;12(1):113.
2. Shimasaki N, Jain A, Campana D. NK cells for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2020.
3. 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. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(6):545-53.
4. Cichocki F, Sitnicka E, Bryceson YT. NK cell development and function – Plasticity and redundancy unleashed. *Seminars in Immunology*. 2014;26(2):114-26.
5. Cichocki F, Grzywacz B, Miller JS. Human NK Cell Development: One Road or Many? *Frontiers in Immunology*. 2019;10(2078).
6. Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010;2(6):640-53.
7. Beck RC, Padival M, Yeh D, Ralston J, Cooke KR, Lowe JB. The Notch ligands Jagged2, Delta1, and Delta4 induce differentiation and expansion of functional human NK cells from CD34+ cord blood hematopoietic progenitor cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(9):1026-37.
8. Fathman JW, Bhattacharya D, Inlay MA, Seita J, Karsunky H, Weissman IL. Identification of the earliest natural killer cell-committed progenitor in murine bone marrow. *Blood*. 2011;118(20):5439-47.
9. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Frontiers in Immunology*. 2018;9(1869).
10. Lopez-Vergès S, Milush JM, Pandey S, York VA, Arakawa-Hoyt J, Pircher H, et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood*. 2010;116(19):3865-74.
11. Chan A, Hong D-L, Atzberger A, Kollnberger S, Filer AD, Buckley CD, et al. CD56bright Human NK Cells Differentiate into CD56dim Cells: Role of Contact with Peripheral Fibroblasts. *The Journal of Immunology*. 2007;179(1):89-94.

12. Spits H, Cupedo T. Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:647-75.
13. Mebius RE, Rennert P, Weissman IL. Developing lymph nodes collect CD4<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> LTβ<sup>+</sup> cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. *Immunity.* 1997;7(4):493-504.
14. Boos MD, Yokota Y, Eberl G, Kee BL. Mature natural killer cell and lymphoid tissue-inducing cell development requires Id2-mediated suppression of E protein activity. *The Journal of experimental medicine.* 2007;204(5):1119-30.
15. Bernink JH, Peters CP, Munneke M, te Velde AA, Meijer SL, Weijer K, et al. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nature Immunology.* 2013;14(3):221-9.
16. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood.* 1990;76(12):2421-38.
17. Fort MM, Cheung J, Yen D, Li J, Zurawski SM, Lo S, et al. IL-25 Induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-Associated Pathologies In Vivo. *Immunity.* 2001;15(6):985-95.
18. Mjösberg JM, Trifari S, Crellin NK, Peters CP, van Drunen CM, Piet B, et al. Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161. *Nature Immunology.* 2011;12(11):1055-62.
19. Mjösberg J, Bernink J, Golebski K, Karrich Julien J, Peters Charlotte P, Blom B, et al. The Transcription Factor GATA3 Is Essential for the Function of Human Type 2 Innate Lymphoid Cells. *Immunity.* 2012;37(4):649-59.
20. Cupedo T, Crellin NK, Papazian N, Rombouts EJ, Weijer K, Grogan JL, et al. Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC<sup>+</sup> CD127<sup>+</sup> natural killer-like cells. *Nature Immunology.* 2009;10(1):66-74.
21. Hoorweg K, Cornelissen F, Aparicio-Domingo P, Papazian N, Kazemier G, Spits H, et al. Functional differences between human NKp44<sup>-</sup> and NKp44<sup>+</sup> RORC<sup>+</sup> innate lymphoid cells. *Frontiers in immunology.* 2012;3:72.

22. Cella M, Fuchs A, Vermi W, Facchetti F, Otero K, Lennerz JKM, et al. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature*. 2009;457(7230):722-5.
23. Konjević GM, Vuletić AM, Mirjačić Martinović KM, Larsen AK, Jurišić VB. The role of cytokines in the regulation of NK cells in the tumor environment. *Cytokine*. 2019;117:30-40.
24. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature*. 2000;408(6808):57-63.
25. Cifaldi L, Prencipe G, Caiello I, Bracaglia C, Locatelli F, De Benedetti F, et al. Inhibition of natural killer cell cytotoxicity by interleukin-6: implications for the pathogenesis of macrophage activation syndrome. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(11):3037-46.
26. Rosenau W, Moon HD. Lysis of homologous cells by sensitized lymphocytes in tissue culture. *Journal of the National Cancer Institute*. 1961;27(2):471-83.
27. Smith H. Antigenicity of carcinogen-induced and spontaneous tumours in inbred mice. *British journal of cancer*. 1966;20(4):831.
28. Oldham RK. Natural killer cells: artifact to reality: an odyssey in biology. *Cancer Metastasis Rev*. 1983;2(4):323-36.
29. Orange JS. Natural killer cell deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(3):515-25; quiz 26.
30. Moon WY, Powis SJ. Does Natural Killer Cell Deficiency (NKD) Increase the Risk of Cancer? NKD May Increase the Risk of Some Virus Induced Cancer. *Front Immunol*. 2019;10:1703.
31. Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(6):388-400.
32. Baran K, Dunstone M, Chia J, Ciccone A, Browne KA, Clarke CJ, et al. The molecular basis for perforin oligomerization and transmembrane pore assembly. *Immunity*. 2009;30(5):684-95.
33. Keefe D, Shi L, Feske S, Massol R, Navarro F, Kirchhausen T, et al. Perforin Triggers a Plasma Membrane-Repair Response that Facilitates CTL Induction of Apoptosis. *Immunity*. 2005;23(3):249-62.

34. 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;121(14):2659-68.
35. Brennan AJ, Chia J, Trapani JA, Voskoboinik I. Perforin deficiency and susceptibility to cancer. *Cell Death & Differentiation*. 2010;17(4):607-15.
36. Chowdhury D, Lieberman J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:389-420.
37. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 2007;35(4):495-516.
38. Tang D, Kang R, Berghe TV, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Research*. 2019;29(5):347-64.
39. Fellows E, Gil-Parrado S, Jenne DE, Kurschus FC. Natural killer cell-derived human granzyme H induces an alternative, caspase-independent cell-death program. *Blood*. 2007;110(2):544-52.
40. Jiang W, Chai NR, Maric D, Bielekova B. Unexpected Role for Granzyme K in CD56bright NK Cell-Mediated Immunoregulation of Multiple Sclerosis. *The Journal of Immunology*. 2011;187(2):781-90.
41. Kelly JM, Waterhouse NJ, Cretney E, Browne KA, Ellis S, Trapani JA, et al. Granzyme M Mediates a Novel Form of Perforin-dependent Cell Death. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(21):22236-42.
42. Kashii Y, Giorda R, Herberman RB, Whiteside TL, Vujanovic NL. Constitutive Expression and Role of the TNF Family Ligands in Apoptotic Killing of Tumor Cells by Human NK Cells. *The Journal of Immunology*. 1999;163(10):5358-66.
43. Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. *Journal of Cell Science*. 2005;118(2):265-7.
44. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. *Blood*. 2001;97(10):3146-51.

45. Robertson MJ. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol.* 2002;71(2):173-83.
46. Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nature Reviews Immunology.* 2012;12(4):239-52.
47. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song Y-J, Yang L, et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature.* 2005;436(7051):709-13.
48. Boudreau JE, Hsu KC. Natural Killer Cell Education and the Response to Infection and Cancer Therapy: Stay Tuned. *Trends Immunol.* 2018;39(3):222-39.
49. Raulet DH, Vance RE. Self-tolerance of natural killer cells. *Nature Reviews Immunology.* 2006;6(7):520-31.
50. MacDonald HR. NK cell tolerance: revisiting the central dogma. *Nature Immunology.* 2005;6(9):868-9.
51. Fernandez NC, Treiner E, Vance RE, Jamieson AM, Lemieux S, Raulet DH. A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood.* 2005;105(11):4416-23.
52. Pittari G, Liu X-R, Selvakumar A, Zhao Z, Merino E, Huse M, et al. NK Cell Tolerance of Self-Specific Activating Receptor KIR2DS1 in Individuals with Cognate HLA-C2 Ligand. *The Journal of Immunology.* 2013;190(9):4650-60.
53. Wagner AK, Wickström SL, Talerico R, Salam S, Lakshmikanth T, Brauner H, et al. Retuning of Mouse NK Cells after Interference with MHC Class I Sensing Adjusts Self-Tolerance but Preserves Anticancer Response. *Cancer Immunology Research.* 2016;4(2):113.
54. Joncker NT, Shifrin N, Delebecque F, Raulet DH. Mature natural killer cells reset their responsiveness when exposed to an altered MHC environment. *Journal of Experimental Medicine.* 2010;207(10):2065-72.
55. Pende D, Falco M, Vitale M, Cantoni C, Vitale C, Munari E, et al. Killer Ig-Like Receptors (KIRs): Their Role in NK Cell Modulation and Developments Leading to Their Clinical Exploitation. *Frontiers in Immunology.* 2019;10(1179).

56. Carr WH, Pando MJ, Parham P. KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *J Immunol.* 2005;175(8):5222-9.
57. Bottino C, Falco M, Sivori S, Moretta L, Moretta A, Biassoni R. Identification and molecular characterization of a natural mutant of the p50.2/KIR2DS2 activating NK receptor that fails to mediate NK cell triggering. *Eur J Immunol.* 2000;30(12):3569-74.
58. Bari R, Bell T, Leung W-H, Vong QP, Chan WK, Das Gupta N, et al. Significant functional heterogeneity among KIR2DL1 alleles and a pivotal role of arginine245. *Blood.* 2009;114(25):5182-90.
59. Lanier LL, Corliss BC, Wu J, Leong C, Phillips JH. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature.* 1998;391(6668):703-7.
60. Kikuchi-Maki A, Catina TL, Campbell KS. Cutting edge: KIR2DL4 transduces signals into human NK cells through association with the Fc receptor gamma protein. *J Immunol.* 2005;174(7):3859-63.
61. Rajagopalan S, Long EO. KIR2DL4 (CD158d): An activation receptor for HLA-G. *Front Immunol.* 2012;3:258.
62. Naiyer MM, Cassidy SA, Magri A, Cowton V, Chen K, Mansour S, et al. KIR2DS2 recognizes conserved peptides derived from viral helicases in the context of HLA-C. *Sci Immunol.* 2017;2(15).
63. Valés-Gómez M, Reyburn HT, Erskine RA, López-Botet M, Strominger JL. Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *The EMBO journal.* 1999;18(15):4250-60.
64. Vivier E, Nunès JA, Vély F. Natural Killer Cell Signaling Pathways. *Science.* 2004;306(5701):1517-9.
65. Cosman D, Fanger N, Borges L, Kubin M, Chin W, Peterson L, et al. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity.* 1997;7(2):273-82.
66. Samaridis J, Colonna M. Cloning of novel immunoglobulin superfamily receptors expressed on human myeloid and lymphoid cells: Structural evidence for new stimulatory and inhibitory pathways. *European Journal of Immunology.* 1997;27(3):660-5.

67. Vitale M, Castriconi R, Parolini S, Pende D, Hsu M-L, Moretta L, et al. The leukocyte Ig-like receptor (LIR)-1 for the cytomegalovirus UL18 protein displays a broad specificity for different HLA class I alleles: analysis of LIR-1+ NK cell clones. *International immunology*. 1999;11(1):29-35.
68. Yu K, Davidson CL, Wójtowicz A, Lisboa L, Wang T, Airo AM, et al. LILRB1 polymorphisms influence posttransplant HCMV susceptibility and ligand interactions. *The Journal of clinical investigation*. 2018;128(4):1523-37.
69. Guthmann MD, Tal M, Pecht I. A secretion inhibitory signal transduction molecule on mast cells is another C-type lectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(20):9397-401.
70. Ito M, Maruyama T, Saito N, Koganei S, Yamamoto K, Matsumoto N. Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. *J Exp Med*. 2006;203(2):289-95.
71. Huntington ND, Tabarias H, Fairfax K, Brady J, Hayakawa Y, Degli-Esposti MA, et al. NK cell maturation and peripheral homeostasis is associated with KLRG1 up-regulation. *the Journal of Immunology*. 2007;178(8):4764-70.
72. Wang JM, Cheng YQ, Shi L, Ying RS, Wu XY, Li GY, et al. KLRG1 negatively regulates natural killer cell functions through the Akt pathway in individuals with chronic hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2013;87(21):11626-36.
73. Anegón I, Cuturi MC, Trinchieri G, Perussia B. Interaction of Fc receptor (CD16) ligands induces transcription of interleukin 2 receptor (CD25) and lymphokine genes and expression of their products in human natural killer cells. *J Exp Med*. 1988;167(2):452-72.
74. Lanier LL, Yu G, Phillips JH. Analysis of Fc gamma RIII (CD16) membrane expression and association with CD3 zeta and Fc epsilon RI-gamma by site-directed mutation. *The Journal of Immunology*. 1991;146(5):1571-6.
75. Barrow AD, Martin CJ, Colonna M. The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease. *Frontiers in Immunology*. 2019;10(909).
76. Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro E, et al. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *The Journal of experimental medicine*. 1998;187(12):2065-72.

77. Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, Morelli L, et al. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *The Journal of experimental medicine*. 1999;190(10):1505-16.
78. Campbell KS, Yusa S-i, Kikuchi-Maki A, Catina TL. NKp44 triggers NK cell activation through DAP12 association that is not influenced by a putative cytoplasmic inhibitory sequence. *The Journal of Immunology*. 2004;172(2):899-906.
79. Hecht M-L, Rosental B, Horlacher T, Hershkovitz O, De Paz JL, Noti C, et al. Natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44 and NKp46 bind to different heparan sulfate/heparin sequences. *Journal of proteome research*. 2009;8(2):712-20.
80. Vieillard V, Strominger JL, Debré P. NK cytotoxicity against CD4<sup>+</sup> T cells during HIV-1 infection: A gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(31):10981-6.
81. Rosental B, Brusilovsky M, Hadad U, Oz D, Appel MY, Afergan F, et al. Proliferating cell nuclear antigen is a novel inhibitory ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *The Journal of Immunology*. 2011;187(11):5693-702.
82. Barrow AD, Edeling MA, Trifonov V, Luo J, Goyal P, Bohl B, et al. Natural killer cells control tumor growth by sensing a growth factor. *Cell*. 2018;172(3):534-48. e19.
83. Gaggero S, Bruschi M, Petretto A, Parodi M, Zotto GD, Lavarello C, et al. Nidogen-1 is a novel extracellular ligand for the NKp44 activating receptor. *Oncoimmunology*. 2018;7(9):e1470730.
84. Brandt CS, Baratin M, Yi EC, Kennedy J, Gao Z, Fox B, et al. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *Journal of Experimental Medicine*. 2009;206(7):1495-503.
85. Wang W, Guo H, Geng J, Zheng X, Wei H, Sun R, et al. Tumor-released Galectin-3, a soluble inhibitory ligand of human NKp30, plays an important role in tumor escape from NK cell attack. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(48):33311-9.

86. von Strandmann EP, Simhadri VR, von Tresckow B, Sasse S, Reiners KS, Hansen HP, et al. Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity*. 2007;27(6):965-74.
87. Marcenaro E, Augugliaro R, Falco M, Castriconi R, Parolini S, Sivori S, et al. CD59 is physically and functionally associated with natural cytotoxicity receptors and activates human NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol*. 2003;33(12):3367-76.
88. Vitale M, Falco M, Castriconi R, Parolini S, Zambello R, Semenzato G, et al. Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells. *Eur J Immunol*. 2001;31(1):233-42.
89. Dennehy KM, Klimosch SN, Steinle A. Cutting edge: NKp80 uses an atypical hemi-ITAM to trigger NK cytotoxicity. *The Journal of Immunology*. 2011;186(2):657-61.
90. Welte S, Kuttruff S, Waldhauer I, Steinle A. Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. *Nature Immunology*. 2006;7(12):1334-42.
91. Klimosch SN, Bartel Y, Wiemann S, Steinle A. Genetically coupled receptor-ligand pair NKp80-AICL enables autonomous control of human NK cell responses. *Blood*. 2013;122(14):2380-9.
92. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA. *Science*. 1999;285(5428):727-9.
93. Cosman D, Müllberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, et al. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*. 2001;14(2):123-33.
94. Radosavljevic M, Cuillerier Bt, Wilson MJ, Clément O, Wicker S, Gilfillan S, et al. A Cluster of Ten Novel MHC Class I Related Genes on Human Chromosome 6q24.2–q25.3. *Genomics*. 2002;79(1):114-23.
95. Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annual review of immunology*. 2013;31:413-41.
96. Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL, et al. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science*. 1999;285(5428):730-2.

97. Engels N, Wienands J. The signaling tool box for tyrosine-based costimulation of lymphocytes. *Current opinion in immunology*. 2011;23(3):324-9.
98. Parolini S, Bottino C, Falco M, Augugliaro R, Giliani S, Franceschini R, et al. X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *J Exp Med*. 2000;192(3):337-46.
99. Bottino C, Falco M, Parolini S, Marcenaro E, Augugliaro R, Sivori S, et al. NTB-A [correction of GNTB-A], a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *J Exp Med*. 2001;194(3):235-46.
100. Nakajima H, Cella M, Langen H, Friedlein A, Colonna M. Activating interactions in human NK cell recognition: the role of 2B4-CD48. *European journal of immunology*. 1999;29(5):1676-83.
101. Falco M, Marcenaro E, Romeo E, Bellora F, Marras D, Vély F, et al. Homophilic interaction of NTBA, a member of the CD2 molecular family: Induction of cytotoxicity and cytokine release in human NK cells. *European Journal of Immunology*. 2004;34:1663-72.
102. 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.
103. Zhang Z, Wu N, Lu Y, Davidson D, Colonna M, Veillette A. DNAM-1 controls NK cell activation via an ITT-like motif. *The Journal of experimental medicine*. 2015;212(12):2165-82.
104. Lanier LL, Corliss B, Wu J, Phillips JH. Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity*. 1998;8(6):693-701.
105. Malmberg K-J, Beziat V, Ljunggren H-G. Spotlight on NKG2C and the human NK-cell response to CMV infection. *European Journal of Immunology*. 2012;42(12):3141-5.
106. Orbelyan GA, Tang F, Sally B, Solus J, Meresse B, Ciszewski C, et al. Human NKG2E is expressed and forms an intracytoplasmic complex with CD94 and DAP12. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2014;193(2):610-6.
107. Zheng X, Wang Y, Wei H, Sun R, Tian Z. LFA-1 and CD2 synergize for the Erk1/2 activation in the Natural Killer (NK) cell immunological synapse. *J Biol Chem*. 2009;284(32):21280-7.

108. Barber DF, Faure M, Long EO. LFA-1 contributes an early signal for NK cell cytotoxicity. *J Immunol.* 2004;173(6):3653-9.
109. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(8):486-99.
110. Blank CU, Haining WN, Held W, Hogan PG, Kallies A, Lugli E, et al. Defining 'T cell exhaustion'. *Nature Reviews Immunology.* 2019;19(11):665-74.
111. Vaddepally RK, Kharel P, Pandey R, Garje R, Chandra AB. Review of Indications of FDA-Approved Immune Checkpoint Inhibitors per NCCN Guidelines with the Level of Evidence. *Cancers (Basel).* 2020;12(3).
112. Khan M, Arooj S, Wang H. NK Cell-Based Immune Checkpoint Inhibition. *Frontiers in Immunology.* 2020;11(167).
113. Guo Y, Feng X, Jiang Y, Shi X, Xing X, Liu X, et al. PD1 blockade enhances cytotoxicity of in vitro expanded natural killer cells towards myeloma cells. *Oncotarget.* 2016;7(30):48360-74.
114. Westin JR, Chu F, Zhang M, Fayad LE, Kwak LW, Fowler N, et al. Safety and activity of PD1 blockade by pidilizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: a single group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(1):69-77.
115. Gleason MK, Lenvik TR, McCullar V, Felices M, O'Brien MS, Cooley SA, et al. Tim-3 is an inducible human natural killer cell receptor that enhances interferon gamma production in response to galectin-9. *Blood.* 2012;119(13):3064-72.
116. Ndhlovu LC, Lopez-Verges S, Barbour JD, Jones RB, Jha AR, Long BR, et al. Tim-3 marks human natural killer cell maturation and suppresses cell-mediated cytotoxicity. *Blood.* 2012;119(16):3734-43.
117. André P, Denis C, Soulas C, Bourbon-Caillet C, Lopez J, Arnoux T, et al. Anti-NKG2A mAb is a checkpoint inhibitor that promotes anti-tumor immunity by unleashing both T and NK cells. *Cell.* 2018;175(7):1731-43. e13.
118. Zeestraten ECM, Reimers MS, Saadatmand S, Dekker JWT, Liefers GJ, van den Elsen PJ, et al. Combined analysis of HLA class I, HLA-E and HLA-G predicts prognosis in colon cancer patients. *British Journal of Cancer.* 2014;110(2):459-68.

119. Seliger B, Jasinski-Bergner S, Quandt D, Stoehr C, Bukur J, Wach S, et al. HLA-E expression and its clinical relevance in human renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(41):67360-72.
120. Gooden M, Lampen M, Jordanova ES, Leffers N, Trimpos JB, van der Burg SH, et al. HLA-E expression by gynecological cancers restrains tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(26):10656-61.
121. Tarn YK, Martinson JA, Doligosa K, Klingernann HG. Ex vivo expansion of the highly cytotoxic human natural killer cell line NK-92 under current good manufacturing practice conditions for clinical adoptive cellular immunotherapy. *Cytotherapy*. 2003;5(3):259-72.
122. Tonn T, Becker S, Esser R, Schwabe D, Seifried E. Cellular Immunotherapy of Malignancies Using the Clonal Natural Killer Cell Line NK-92. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*. 2001;10(4):535-44.
123. Rosenberg SA. Immunotherapy of Cancer by Systemic Administration of Lymphoid Cells Plus Interleukin-2. *Journal of Immunotherapy*. 1984;3(5).
124. Sakamoto N, Ishikawa T, Kokura S, Okayama T, Oka K, Ideno M, et al. Phase I clinical trial of autologous NK cell therapy using novel expansion method in patients with advanced digestive cancer. *J Transl Med*. 2015;13:277.
125. Lister J, Rybka WB, Donnenberg AD, deMagalhaes-Silverman M, Pincus SM, Bloom EJ, et al. Autologous peripheral blood stem cell transplantation and adoptive immunotherapy with activated natural killer cells in the immediate posttransplant period. *Clin Cancer Res*. 1995;1(6):607-14.
126. 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.
127. Bachanova V, Burns LJ, McKenna DH, Curtsinger J, Panoskaltsis-Mortari A, Lindgren BR, et al. Allogeneic natural killer cells for refractory lymphoma. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2010;59(11):1739-44.
128. Bachanova V, Sarhan D, DeFor TE, Cooley S, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, et al. Haploidentical natural killer cells induce remissions in non-Hodgkin lymphoma patients with low levels of immune-suppressor cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2018;67(3):483-94.

129. Björklund AT, Carlsten M, Sohlberg E, Liu LL, Clancy T, Karimi M, et al. Complete Remission with Reduction of High-Risk Clones following Haploidentical NK-Cell Therapy against MDS and AML. *Clin Cancer Res.* 2018;24(8):1834-44.
130. Curti A, Ruggeri L, D'Addio A, Bontadini A, Dan E, Motta MR, et al. Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand-mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute myeloid leukemia patients. *Blood.* 2011;118(12):3273-9.
131. Geller MA, Cooley S, Judson PL, Ghebre R, Carson LF, Argenta PA, et al. A phase II study of allogeneic natural killer cell therapy to treat patients with recurrent ovarian and breast cancer. *Cytotherapy.* 2011;13(1):98-107.
132. Lee DA, Denman CJ, Rondon G, Woodworth G, Chen J, Fisher T, et al. Haploidentical Natural Killer Cells Infused before Allogeneic Stem Cell Transplantation for Myeloid Malignancies: A Phase I Trial. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation.* 2016;22(7):1290-8.
133. Ciurea SO, Schafer JR, Bassett R, Denman CJ, Cao K, Willis D, et al. Phase 1 clinical trial using mbIL21 ex vivo-expanded donor-derived NK cells after haploidentical transplantation. *Blood.* 2017;130(16):1857-68.
134. Shah NN, Baird K, Delbrook CP, Fleisher TA, Kohler ME, Rampertaap S, et al. Acute GVHD in patients receiving IL-15/4-1BBL activated NK cells following T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood.* 2015;125(5):784-92.
135. Ishikawa T, Okayama T, Sakamoto N, Ideno M, Oka K, Enoki T, et al. Phase I clinical trial of adoptive transfer of expanded natural killer cells in combination with IgG1 antibody in patients with gastric or colorectal cancer. *International Journal of Cancer.* 2018;142(12):2599-609.
136. Lupo KB, Matosevic S. Natural Killer Cells as Allogeneic Effectors in Adoptive Cancer Immunotherapy. *Cancers.* 2019;11(6):769.
137. Luevano M, Madrigal A, Saudemont A. Generation of natural killer cells from hematopoietic stem cells in vitro for immunotherapy. *Cellular & molecular immunology.* 2012;9(4):310-20.

138. Shah N, Martin-Antonio B, Yang H, Ku S, Lee DA, Cooper LJ, et al. Antigen presenting cell-mediated expansion of human umbilical cord blood yields log-scale expansion of natural killer cells with anti-myeloma activity. *PLoS One*. 2013;8(10):e76781.
139. Vasu S, Berg M, Davidson-Moncada J, Tian X, Cullis H, Childs RW. A novel method to expand large numbers of CD56(+) natural killer cells from a minute fraction of selectively accessed cryopreserved cord blood for immunotherapy after transplantation. *Cytotherapy*. 2015;17(11):1582-93.
140. Spanholtz J, Tordoir M, Eissens D, Preijers F, van der Meer A, Joosten I, et al. High log-scale expansion of functional human natural killer cells from umbilical cord blood CD34-positive cells for adoptive cancer immunotherapy. *PLoS One*. 2010;5(2):e9221.
141. Sarvaria A, Jawdat D, Madrigal JA, Saudemont A. Umbilical Cord Blood Natural Killer Cells, Their Characteristics, and Potential Clinical Applications. *Frontiers in immunology*. 2017;8:329-.
142. Barker JN, Krepski TP, DeFor TE, Davies SM, Wagner JE, Weisdorf DJ. Searching for unrelated donor hematopoietic stem cells: Availability and speed of umbilical cord blood versus bone marrow. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2002;8(5):257-60.
143. Knorr DA, Ni Z, Hermanson D, Hexum MK, Bendzick L, Cooper LJ, et al. Clinical-scale derivation of natural killer cells from human pluripotent stem cells for cancer therapy. *Stem Cells Transl Med*. 2013;2(4):274-83.
144. Hermanson DL, Bendzick L, Pribyl L, McCullar V, Vogel RI, Miller JS, et al. Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Natural Killer Cells for Treatment of Ovarian Cancer. *Stem Cells*. 2016;34(1):93-101.
145. Ni Z, Knorr DA, Bendzick L, Allred J, Kaufman DS. Expression of chimeric receptor CD4ζ by natural killer cells derived from human pluripotent stem cells improves in vitro activity but does not enhance suppression of HIV infection in vivo. *Stem Cells*. 2014;32(4):1021-31.
146. Li Y, Hermanson DL, Moriarity BS, Kaufman DS. Human iPSC-Derived Natural Killer Cells Engineered with Chimeric Antigen Receptors Enhance Anti-tumor Activity. *Cell Stem Cell*. 2018.
147. Zeng J, Tang SY, Toh LL, Wang S. Generation of "Off-the-Shelf" Natural Killer Cells from Peripheral Blood Cell-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2017;9(6):1796-812.

148. Ortuño-Costela MDC, Cerrada V, García-López M, Gallardo ME. The Challenge of Bringing iPSCs to the Patient. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(24):6305.
149. Lee DW, Gardner R, Porter DL, Louis CU, Ahmed N, Jensen M, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood*. 2014;124(2):188-95.
150. Wei J, Liu Y, Wang C, Zhang Y, Tong C, Dai G, et al. The model of cytokine release syndrome in CAR T-cell treatment for B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020;5(1):134.
151. Hunter BD, Jacobson CA. CAR T-Cell Associated Neurotoxicity: Mechanisms, Clinicopathologic Correlates, and Future Directions. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2019;111(7):646-54.
152. Klingemann H. Are natural killer cells superior CAR drivers? *OncolImmunology*. 2014;3(4):e28147.
153. Bryceson YT, March ME, Ljunggren H-G, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*. 2006;107(1):159-66.
154. Wang W, Erbe AK, Hank JA, Morris ZS, Sondel PM. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology*. 2015;6:368-.
155. Maloney D, Liles T, Czerwinski D, Waldichuk C, Rosenberg J, Grillo-Lopez A, et al. Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. 1994.
156. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*. 2002;99(3):754-8.
157. Junttila TT, Parsons K, Olsson C, Lu Y, Xin Y, Theriault J, et al. Superior in vivo efficacy of afucosylated trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer. *Cancer Res*. 2010;70(11):4481-9.
158. Messersmith WA, Ahnen DJ. Targeting EGFR in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2008;359(17):1834-6.
159. Koehn TA, Trimble LL, Alderson KL, Erbe AK, McDowell KA, Grzywacz B, et al. Increasing the clinical efficacy of NK and antibody-mediated cancer immunotherapy: potential predictors of

successful clinical outcome based on observations in high-risk neuroblastoma. *Front Pharmacol.* 2012;3:91.

160. van de Donk NW, Janmaat ML, Mutis T, Lammerts van Bueren JJ, Ahmadi T, Sasser AK, et al. Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond. *Immunol Rev.* 2016;270(1):95-112.

161. Carlsten M, Levy E, Karambelkar A, Li L, Reger R, Berg M, et al. Efficient mRNA-Based Genetic Engineering of Human NK Cells with High-Affinity CD16 and CCR7 Augments Rituximab-Induced ADCC against Lymphoma and Targets NK Cell Migration toward the Lymph Node-Associated Chemokine CCL19. *Frontiers in Immunology.* 2016;7(105).

162. Zhu H, Blum RH, Bjordahl R, Gaidarova S, Rogers P, Lee TT, et al. Pluripotent stem cell-derived NK cells with high-affinity noncleavable CD16a mediate improved antitumor activity. *Blood.* 2020;135(6):399-410.

163. Jing Y, Ni Z, Wu J, Higgins L, Markowski TW, Kaufman DS, et al. Identification of an ADAM17 cleavage region in human CD16 (FcγRIII) and the engineering of a non-cleavable version of the receptor in NK cells. *PLoS One.* 2015;10(3):e0121788.

164. Wiernik A, Foley B, Zhang B, Verneris MR, Warlick E, Gleason MK, et al. Targeting natural killer cells to acute myeloid leukemia in vitro with a CD16 x 33 bispecific killer cell engager and ADAM17 inhibition. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2013;19(14):3844-55.

165. Gleason MK, Verneris MR, Todhunter DA, Zhang B, McCullar V, Zhou SX, et al. Bispecific and trispecific killer cell engagers directly activate human NK cells through CD16 signaling and induce cytotoxicity and cytokine production. *Molecular cancer therapeutics.* 2012;11(12):2674-84.

166. Vallera DA, Felices M, McElmurry R, McCullar V, Zhou X, Schmohl JU, et al. IL15 Trispecific Killer Engagers (TriKE) Make Natural Killer Cells Specific to CD33+ Targets While Also Inducing Persistence, In Vivo Expansion, and Enhanced Function. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2016;22(14):3440-50.

167. Zhang C, Liu Y. Targeting NK Cell Checkpoint Receptors or Molecules for Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology.* 2020;11(1295).

168. Godal R, Bachanova V, Gleason M, McCullar V, Yun GH, Cooley S, et al. Natural killer cell killing of acute myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia blasts by killer cell immunoglobulin-like receptor-negative natural killer cells after NKG2A and LIR-1 blockade. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2010;16(5):612-21.
169. Romagné F, André 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.
170. Hsu J, Hodgins JJ, Marathe M, Nicolai CJ, Bourgeois-Daigneault M-C, Trevino TN, et al. Contribution of NK cells to immunotherapy mediated by PD-1/PD-L1 blockade. *The Journal of Clinical Investigation*. 2018;128(10):4654-68.
171. Zhang Q, Bi J, Zheng X, Chen Y, Wang H, Wu W, et al. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity. *Nature Immunology*. 2018;19(7):723-32.
172. da Silva IP, Gallois A, Jimenez-Baranda S, Khan S, Anderson AC, Kuchroo VK, et al. Reversal of NK-cell exhaustion in advanced melanoma by Tim-3 blockade. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(5):410-22.
173. Kamiya T, Seow SV, Wong D, Robinson M, Campana D. Blocking expression of inhibitory receptor NKG2A overcomes tumor resistance to NK cells. *J Clin Invest*. 2019;130.
174. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*. 2012;337(6096):816.
175. Huang R-S, Shih H-A, Lai M-C, Chang Y-J, Lin S. Enhanced NK-92 Cytotoxicity by CRISPR Genome Engineering Using Cas9 Ribonucleoproteins. *Frontiers in Immunology*. 2020;11(1008).
176. Cherkassky L, Morello A, Villena-Vargas J, Feng Y, Dimitrov DS, Jones DR, et al. Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition. *The Journal of clinical investigation*. 2016;126(8):3130-44.
177. Lino CA, Harper JC, Carney JP, Timlin JA. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Delivery*. 2018;25(1):1234-57.

178. Liang X, Potter J, Kumar S, Zou Y, Quintanilla R, Sridharan M, et al. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J Biotechnol.* 2015;208:44-53.
179. Ramakrishna S, Kwaku Dad AB, Beloor J, Gopalappa R, Lee SK, Kim H. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Res.* 2014;24(6):1020-7.
180. Del'Guidice T, Lepetit-Stoffaes JP, Bordeleau LJ, Roberge J, Theberge V, Lauvaux C, et al. Membrane permeabilizing amphiphilic peptide delivers recombinant transcription factor and CRISPR-Cas9/Cpf1 ribonucleoproteins in hard-to-modify cells. *PLoS One.* 2018;13(4):e0195558.
181. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1989;86(24):10024-8.
182. Bird R, Hardman K, Jacobson J, Johnson S, Kaufman B, Lee S, et al. Single-chain antigen-binding proteins. *Science.* 1988;242(4877):423-6.
183. Gu X, Jia X, Feng J, Shen B, Huang Y, Geng S, et al. Molecular modeling and affinity determination of scFv antibody: proper linker peptide enhances its activity. *Annals of biomedical engineering.* 2010;38(2):537-49.
184. Yusakul G, Sakamoto S, Pongkitwitoon B, Tanaka H, Morimoto S. Effect of linker length between variable domains of single chain variable fragment antibody against daidzin on its reactivity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 2016;80(7):1306-12.
185. Dolezal O, Pearce LA, Lawrence LJ, McCoy AJ, Hudson PJ, Kortt AA. ScFv multimers of the anti-neuraminidase antibody NC10: shortening of the linker in single-chain Fv fragment assembled in VL to VH orientation drives the formation of dimers, trimers, tetramers and higher molecular mass multimers. *Protein engineering.* 2000;13(8):565-74.
186. Desplancq D, King DJ, Lawson ADG, Mountain A. Multimerization behaviour of single chain Fv variants for the tumour-binding antibody B72.3. *Protein Engineering, Design and Selection.* 1994;7(8):1027-33.
187. Minguet S, Swamy M, Alarcón B, Luescher IF, Schamel WWA. Full Activation of the T Cell Receptor Requires Both Clustering and Conformational Changes at CD3. *Immunity.* 2007;26(1):43-54.

188. Whitlow M, Bell BA, Feng S-L, Filpula D, Hardman KD, Hubert SL, et al. An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability. *Protein Engineering, Design and Selection*. 1993;6(8):989-95.
189. Burns WR, Zhao Y, Frankel TL, Hinrichs CS, Zheng Z, Xu H, et al. A High Molecular Weight Melanoma-Associated Antigen-Specific Chimeric Antigen Receptor Redirects Lymphocytes to Target Human Melanomas. *Cancer Research*. 2010;70(8):3027-33.
190. Liu X, Jiang S, Fang C, Yang S, Olalere D, Pequignot EC, et al. Affinity-Tuned ErbB2 or EGFR Chimeric Antigen Receptor T Cells Exhibit an Increased Therapeutic Index against Tumors in Mice. *Cancer Research*. 2015;75(17):3596-607.
191. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther*. 2010;18(4):843-51.
192. Chmielewski M, Hombach A, Heuser C, Adams GP, Abken H. T cell activation by antibody-like immunoreceptors: increase in affinity of the single-chain fragment domain above threshold does not increase T cell activation against antigen-positive target cells but decreases selectivity. *J Immunol*. 2004;173(12):7647-53.
193. Moritz D, Groner B. A spacer region between the single chain antibody- and the CD3 zeta-chain domain of chimeric T cell receptor components is required for efficient ligand binding and signaling activity. *Gene Ther*. 1995;2(8):539-46.
194. Guest RD, Hawkins RE, Kirillova N, Cheadle EJ, Arnold J, O'Neill A, et al. The Role of Extracellular Spacer Regions in the Optimal Design of Chimeric Immune Receptors: Evaluation of Four Different scFvs and Antigens. *Journal of Immunotherapy*. 2005;28(3).
195. James SE, Greenberg PD, Jensen MC, Lin Y, Wang J, Till BG, et al. Antigen Sensitivity of CD22-Specific Chimeric TCR Is Modulated by Target Epitope Distance from the Cell Membrane. *The Journal of Immunology*. 2008;180(10):7028-38.
196. Hudecek M, Lupo-Stanghellini M-T, Kosasih PL, Sommermeyer D, Jensen MC, Rader C, et al. Receptor Affinity and Extracellular Domain Modifications Affect Tumor Recognition by ROR1-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(12):3153-64.

197. Kochenderfer JN, Feldman SA, Zhao Y, Xu H, Black MA, Morgan RA, et al. Construction and preclinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Immunother.* 2009;32(7):689-702.
198. Alabanza L, Pegues M, Geldres C, Shi V, Wiltzius JJW, Sievers SA, et al. Function of Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptors with Human Variable Regions Is Affected by Hinge and Transmembrane Domains. *Molecular Therapy.* 2017;25(11):2452-65.
199. Zavras PD, Wang Y, Gandhi A, Lontos K, Delgoffe GM. Evaluating tisagenlecleucel and its potential in the treatment of relapsed or refractory diffuse large B cell lymphoma: evidence to date. *Onco Targets Ther.* 2019;12:4543-54.
200. Hombach A, Hombach AA, Abken H. Adoptive immunotherapy with genetically engineered T cells: modification of the IgG1 Fc 'spacer' domain in the extracellular moiety of chimeric antigen receptors avoids 'off-target' activation and unintended initiation of an innate immune response. *Gene Therapy.* 2010;17(10):1206-13.
201. Watanabe N, Bajgain P, Sukumaran S, Ansari S, Heslop HE, Rooney CM, et al. Fine-tuning the CAR spacer improves T-cell potency. *Oncolmmunology.* 2016;5(12):e1253656.
202. Hudecek M, Sommermeyer D, Kosasih PL, Silva-Benedict A, Liu L, Rader C, et al. The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity. *Cancer immunology research.* 2015;3(2):125-35.
203. Eshhar Z, Bach N, Fitzer-Attas CJ, Gross G, Lustgarten J, Waks T, et al. The T-body approach: potential for cancer immunotherapy. *Springer Semin Immunopathol.* 1996;18(2):199-209.
204. Brocker T, Karjalainen K. Signals through T cell receptor-zeta chain alone are insufficient to prime resting T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine.* 1995;181(5):1653-9.
205. Krause A, Guo H-F, Latouche J-B, Tan C, Cheung N-KV, Sadelain M. Antigen-dependent CD28 Signaling Selectively Enhances Survival and Proliferation in Genetically Modified Activated Human Primary T Lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine.* 1998;188(4):619-26.
206. Riha P, Rudd CE. CD28 co-signaling in the adaptive immune response. *Self Nonself.* 2010;1(3):231-40.

207. Wang E, Wang L-C, Tsai C-Y, Bhoj V, Gershenson Z, Moon E, et al. Generation of Potent T-cell Immunotherapy for Cancer Using DAP12-Based, Multichain, Chimeric Immunoreceptors. *Cancer Immunology Research*. 2015;3(7):815-26.
208. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(16):1507-17.
209. 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;377(26):2531-44.
210. Wang J, Hu Y, Huang H. Current development of chimeric antigen receptor T-cell therapy. *Stem Cell Investig*. 2018;5:44-.
211. Fry TJ, Shah NN, Orentas RJ, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Ramakrishna S, et al. CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. *Nature Medicine*. 2018;24(1):20-8.
212. Hossain N, Sahaf B, Abramian M, Spiegel JY, Kong K, Kim S, et al. Phase I experience with a bi-specific CAR targeting CD19 and CD22 in adults with B-cell malignancies. *Blood*. 2018;132(Supplement 1):490-.
213. Gardner R, Annesley C, Finney O, Summers C, Lamble AJ, Rivers J, et al. Early clinical experience of CD19 x CD22 dual specific CAR T cells for enhanced anti-leukemic targeting of acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2018;132(Supplement 1):278-.
214. Huang L, Wang N, Cao Y, Li C, Xiao Y, Xiao M, et al. CAR22/19 cocktail therapy for patients with refractory/relapsed B-cell malignancies. *Blood*. 2018;132(Supplement 1):1408-.
215. Schultz LM, Muffly LS, Spiegel JY, Ramakrishna S, Hossain N, Baggott C, et al. Phase I Trial Using CD19/CD22 Bispecific CAR T Cells in Pediatric and Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). *Blood*. 2019;134(Supplement\_1):744-.
216. Turtle CJ, Hanafi L-A, Berger C, Gooley TA, Cherian S, Hudecek M, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *The Journal of clinical investigation*. 2016;126(6):2123-38.

217. Kagoya Y, Tanaka S, Guo T, Anczurowski M, Wang CH, Saso K, et al. A novel chimeric antigen receptor containing a JAK-STAT signaling domain mediates superior antitumor effects. *Nat Med*. 2018.
218. Kiu H, Nicholson SE. Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth Factors*. 2012;30(2):88-106.
219. Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, Aebersold PM, Linehan WM, Seipp CA, et al. Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Ann Surg*. 1989;210(4):474-85.
220. Treisman J, Hwu P, Minamoto S, Shafer GE, Cowherd R, Morgan RA, et al. Interleukin-2-transduced lymphocytes grow in an autocrine fashion and remain responsive to antigen. *Blood*. 1995;85(1):139-45.
221. Liu K, Rosenberg SA. Transduction of an IL-2 gene into human melanoma-reactive lymphocytes results in their continued growth in the absence of exogenous IL-2 and maintenance of specific antitumor activity. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2001;167(11):6356-65.
222. Liu K, Rosenberg SA. Interleukin-2-independent proliferation of human melanoma-reactive T lymphocytes transduced with an exogenous IL-2 gene is stimulation dependent. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md : 1997)*. 2003;26(3):190-201.
223. Heemskerk B, Liu K, Dudley ME, Johnson LA, Kaiser A, Downey S, et al. Adoptive cell therapy for patients with melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered to secrete interleukin-2. *Human gene therapy*. 2008;19(5):496-510.
224. Leonard JP, Sherman ML, Fisher GL, Buchanan LJ, Larsen G, Atkins MB, et al. Effects of Single-Dose Interleukin-12 Exposure on Interleukin-12–Associated Toxicity and Interferon- $\gamma$  Production. *Blood*. 1997;90(7):2541-8.
225. Kerkar SP, Muranski P, Kaiser A, Boni A, Sanchez-Perez L, Yu Z, et al. Tumor-specific CD8+ T cells expressing interleukin-12 eradicate established cancers in lymphodepleted hosts. *Cancer research*. 2010;70(17):6725-34.
226. Chinnasamy D, Yu Z, Kerkar SP, Zhang L, Morgan RA, Restifo NP, et al. Local delivery of interleukin-12 using T cells targeting VEGF receptor-2 eradicates multiple vascularized tumors in

mice. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(6):1672-83.

227. Pegram HJ, Lee JC, Hayman EG, Imperato GH, Tedder TF, Sadelain M, et al. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood*. 2012;119(18):4133-41.

228. Stoklasek TA, Colpitts SL, Smilowitz HM, Lefrançois L. MHC class I and TCR avidity control the CD8 T cell response to IL-15/IL-15R $\alpha$  complex. *J Immunol*. 2010;185(11):6857-65.

229. Hsu C, Hughes MS, Zheng Z, Bray RB, Rosenberg SA, Morgan RA. Primary human T lymphocytes engineered with a codon-optimized IL-15 gene resist cytokine withdrawal-induced apoptosis and persist long-term in the absence of exogenous cytokine. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2005;175(11):7226-34.

230. Hoyos V, Savoldo B, Quintarelli C, Mahendravada A, Zhang M, Vera J, et al. Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia*. 2010;24(6):1160-70.

231. Hsu C, Jones SA, Cohen CJ, Zheng Z, Kerstann K, Zhou J, et al. Cytokine-independent growth and clonal expansion of a primary human CD8<sup>+</sup> T-cell clone following retroviral transduction with the IL-15 gene. *Blood*. 2007;109(12):5168-77.

232. Fehniger TA, Suzuki K, Ponnappan A, VanDeusen JB, Cooper MA, Florea SM, et al. Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med*. 2001;193(2):219-31.

233. Nakagawa Y, Negishi Y, Shimizu M, Takahashi M, Ichikawa M, Takahashi H. Effects of extracellular pH and hypoxia on the function and development of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Immunol Lett*. 2015;167(2):72-86.

234. Weinhouse S. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*. 1956;124(3215):267-9.

235. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*. 2007;109(9):3812-9.

236. Schupp J, Krebs FK, Zimmer N, Trzeciak E, Schuppan D, Tuettenberg A. Targeting myeloid cells in the tumor sustaining microenvironment. *Cell Immunol*. 2019;343:103713.

237. Chaudhary B, Elkord E. Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment and Cancer Progression: Role and Therapeutic Targeting. *Vaccines (Basel)*. 2016;4(3):28.
238. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med*. 1996;184(2):747-52.
239. Curran KJ, Seinstra BA, Nikhamin Y, Yeh R, Usachenko Y, van Leeuwen DG, et al. Enhancing antitumor efficacy of chimeric antigen receptor T cells through constitutive CD40L expression. *Mol Ther*. 2015;23(4):769-78.
240. Khong A, Nelson DJ, Nowak AK, Lake RA, Robinson BW. The use of agonistic anti-CD40 therapy in treatments for cancer. *Int Rev Immunol*. 2012;31(4):246-66.
241. Morgan MA, Schambach A. Chimeric Antigen Receptor T Cells: Extending Translation from Liquid to Solid Tumors. *Human Gene Therapy*. 2018;0(0):null.
242. Tran AC, Zhang D, Byrn R, Roberts MR. Chimeric zeta-receptors direct human natural killer (NK) effector function to permit killing of NK-resistant tumor cells and HIV-infected T lymphocytes. *The Journal of Immunology*. 1995;155(2):1000-9.
243. Uherek C, Tonn T, Uherek B, Becker S, Schnierle B, Klingemann HG, et al. Retargeting of natural killer-cell cytolytic activity to ErbB2-expressing cancer cells results in efficient and selective tumor cell destruction. *Blood*. 2002;100(4):1265-73.
244. 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.
245. Boissel L, Betancur M, Wels WS, Tuncer H, Klingemann H. Transfection with mRNA for CD19 specific chimeric antigen receptor restores NK cell mediated killing of CLL cells. *Leuk Res*. 2009;33(9):1255-9.
246. Sutlu T, Nystrom S, Gilljam M, Stellan B, Applequist SE, Alici E. Inhibition of intracellular antiviral defense mechanisms augments lentiviral transduction of human natural killer cells: implications for gene therapy. *Hum Gene Ther*. 2012;23(10):1090-100.
247. Lanier LL. Evolutionary struggles between NK cells and viruses. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(4):259-68.

248. Schwartz RN, Stover L, Dutcher JP. Managing toxicities of high-dose interleukin-2. *Oncology (Williston Park)*. 2002;16(11 Suppl 13):11-20.
249. Tao Q, Chen T, Tao L, Wang H, Pan Y, Xiong S, et al. IL-15 improves the cytotoxicity of cytokine-induced killer cells against leukemia cells by upregulating CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> cells and downregulating regulatory T cells as well as IL-35. *Journal of immunotherapy*. 2013;36(9):462-7.
250. Jakobisiak M, Golab J, Lasek W. Interleukin 15 as a promising candidate for tumor immunotherapy. *Cytokine & growth factor reviews*. 2011;22(2):99-108.
251. Sanjabi S, Mosaheb MM, Flavell RA. Opposing effects of TGF- $\beta$  and IL-15 cytokines control the number of short-lived effector CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunity*. 2009;31(1):131-44.
252. Chen Y, Chen B, Yang T, Xiao W, Qian L, Ding Y, et al. Human fused NKG2D–IL-15 protein controls xenografted human gastric cancer through the recruitment and activation of NK cells. *Cellular & Molecular Immunology*. 2017;14(3):293-307.
253. Kermer V, Baum V, Hornig N, Kontermann RE, Müller D. An antibody fusion protein for cancer immunotherapy mimicking IL-15 trans-presentation at the tumor site. *Molecular cancer therapeutics*. 2012;11(6):1279-88.
254. Bouchaud G, Garrigue-Antar L, Solé V, Quéméner A, Boublik Y, Mortier E, et al. The Exon-3-Encoded Domain of IL-15R $\alpha$  Contributes to IL-15 High-Affinity Binding and Is Crucial for the IL-15 Antagonistic Effect of Soluble IL-15R $\alpha$ . *Journal of Molecular Biology*. 2008;382(1):1-12.
255. Topfer K, Cartellieri M, Michen S, Wiedemuth R, Muller N, Lindemann D, et al. DAP12-based activating chimeric antigen receptor for NK cell tumor immunotherapy. *J Immunol*. 2015;194(7):3201-12.
256. Liu E, Tong Y, Dotti G, Shaim H, Savoldo B, Mukherjee M, et al. Cord blood NK cells engineered to express IL-15 and a CD19-targeted CAR show long-term persistence and potent antitumor activity. *Leukemia*. 2018;32(2):520-31.
257. Altvater 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. *Clin Cancer Res*. 2009;15(15):4857-66.
258. Závada J. The pseudotypic paradox. *J Gen Virol*. 1982;63 (Pt 1):15-24.

259. Page KA, Landau NR, Littman DR. Construction and use of a human immunodeficiency virus vector for analysis of virus infectivity. *J Virol.* 1990;64(11):5270-6.
260. Akkina RK, Walton RM, Chen ML, Li QX, Planelles V, Chen IS. High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J Virol.* 1996;70(4):2581-5.
261. Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science.* 1996;272(5259):263-7.
262. Finkelshtein D, Werman A, Novick D, Barak S, Rubinstein M. LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2013;110(18):7306-11.
263. Joglekar AV, Sandoval S. Pseudotyped Lentiviral Vectors: One Vector, Many Guises. *Hum Gene Ther Methods.* 2017;28(6):291-301.
264. Sandrin V, Boson B, Salmon P, Gay W, Nègre D, Le Grand R, et al. Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood.* 2002;100(3):823-32.
265. 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.
266. Frecha C, Costa C, Nègre D, Gauthier E, Russell SJ, Cosset FL, et al. Stable transduction of quiescent T cells without induction of cycle progression by a novel lentiviral vector pseudotyped with measles virus glycoproteins. *Blood.* 2008;112(13):4843-52.
267. Girard-Gagnepain A, Amirache F, Costa C, Levy C, Frecha C, Fusil F, et al. Baboon envelope pseudotyped LVs outperform VSV-G-LVs for gene transfer into early-cytokine-stimulated and resting HSCs. *Blood.* 2014;124(8):1221-31.
268. Levy C, Amirache F, Girard-Gagnepain A, Frecha C, Roman-Rodriguez FJ, Bernadin O, et al. Measles virus envelope pseudotyped lentiviral vectors transduce quiescent human HSCs at an efficiency without precedent. *Blood Adv.* 2017;1(23):2088-104.

269. Liu S-L, Halbert CL, Miller AD. Jaagsiekte Sheep Retrovirus Envelope Efficiently Pseudotypes Human Immunodeficiency Virus Type 1-Based Lentiviral Vectors. *Journal of Virology*. 2004;78(5):2642.
270. Shimabukuro-Vornhagen A, Gödel P, Subklewe M, Stemmler HJ, Schlößer HA, Schlaak M, et al. Cytokine release syndrome. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2018;6(1):56-.
271. Scarisbrick J, Dignan F, Tulpule S, Gupta E, Kolade S, Shaw B, et al. A multicentre UK study of GVHD following DLI: rates of GVHD are high but mortality from GVHD is infrequent. *Bone marrow transplantation*. 2015;50(1):62-7.
272. Riobos L, Hirata RK, Turtle CJ, Wang P-R, Gornalusse GG, Zavajlevski M, et al. HLA Engineering of Human Pluripotent Stem Cells. *Molecular Therapy*. 2013;21(6):1232-41.
273. Gornalusse GG, Hirata RK, Funk SE, Riobos L, Lopes VS, Manske G, et al. HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells. *Nat Biotechnol*. 2017;35(8):765-72.
274. Saetersmoen ML, Hammer Q, Valamehr B, Kaufman DS, Malmberg KJ. Off-the-shelf cell therapy with induced pluripotent stem cell-derived natural killer cells. *Semin Immunopathol*. 2019;41(1):59-68.
275. Suck G, Odendahl M, Nowakowska P, Seidl C, Wels WS, Klingemann HG, et al. NK-92: an 'off-the-shelf therapeutic' for adoptive natural killer cell-based cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2016;65(4):485-92.
276. Roth JA, Sullivan SD, Lin VW, Bansal A, Purdum AG, Navale L, et al. Cost-effectiveness of axicabtagene ciloleucel for adult patients with relapsed or refractory large B-cell lymphoma in the United States. *Journal of Medical Economics*. 2018;21(12):1238-45.
277. Lin JK, Muffly LS, Spinner MA, Barnes JI, Owens DK, Goldhaber-Fiebert JD. Cost Effectiveness of Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy in Multiply Relapsed or Refractory Adult Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2019;37(24):2105-19.
278. Whittington MD, McQueen RB, Ollendorf DA, Kumar VM, Chapman RH, Tice JA, et al. Long-term Survival and Cost-effectiveness Associated With Axicabtagene Ciloleucel vs Chemotherapy for Treatment of B-Cell Lymphoma. *JAMA Network Open*. 2019;2(2):e190035-e.

279. 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;21(8):835-47.
280. 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;4(4):e1002720-e.
281. Müller S, Bexte T, Gebel V, Kalensee F, Stolzenberg E, Hartmann J, et al. High Cytotoxic Efficiency of Lentivirally and Alpharetrovirally Engineered CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor Natural Killer Cells Against Acute Lymphoblastic Leukemia. *Frontiers in immunology.* 2020;10:3123-.
282. Streltsova MA, Barsov E, Erokhina SA, Kovalenko EI. Retroviral gene transfer into primary human NK cells activated by IL-2 and K562 feeder cells expressing membrane-bound IL-21. *Journal of Immunological Methods.* 2017;450:90-4.
283. Zhao Y, Stepto H, Schneider CK. Development of the First World Health Organization Lentiviral Vector Standard: Toward the Production Control and Standardization of Lentivirus-Based Gene Therapy Products. *Human Gene Therapy Methods.* 2017;28(4):205-14.
284. Costello E, Munoz M, Buetti E, Meylan PRA, Diggelmann H, Thali M. Gene transfer into stimulated and unstimulated T lymphocytes by HIV-1-derived lentiviral vectors. *Gene Therapy.* 2000;7(7):596-604.
285. Oberschmidt O, Morgan M, Huppert V, Kessler J, Gardlowski T, Matthies N, et al. Development of Automated Separation, Expansion, and Quality Control Protocols for Clinical-Scale Manufacturing of Primary Human NK Cells and Alpharetroviral Chimeric Antigen Receptor Engineering. *Human Gene Therapy Methods.* 2019;30(3):102-20.
286. Breckpot K, Emeagi P, Dullaers M, Michiels A, Heirman C, Thielemans K. Activation of Immature Monocyte-Derived Dendritic Cells After Transduction with High Doses of Lentiviral Vectors. *Human Gene Therapy.* 2007;18(6):536-46.
287. Lauzon NM, Mian F, MacKenzie R, Ashkar AA. The direct effects of Toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity. *Cellular Immunology.* 2006;241(2):102-12.

288. Yacoub Na, Romanowska M, Haritonova N, Foerster J. Optimized production and concentration of lentiviral vectors containing large inserts. *The Journal of Gene Medicine*. 2007;9(7):579-84.
289. Canté-Barrett K, Mendes RD, Smits WK, van Helsdingen-van Wijk YM, Pieters R, Meijerink JPP. Lentiviral gene transfer into human and murine hematopoietic stem cells: size matters. *BMC Research Notes*. 2016;9(1):312.
290. Haso W, Lee DW, Shah NN, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Pastan IH, et al. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2013;121(7):1165-74.
291. Ramakrishna S, Highfill SL, Walsh Z, Nguyen SM, Lei H, Shern JF, et al. Modulation of Target Antigen Density Improves CAR T-cell Functionality and Persistence. *Clinical Cancer Research*. 2019;25(17):5329-41.
292. Qin H, Ramakrishna S, Nguyen S, Fountaine TJ, Ponduri A, Stetler-Stevenson M, et al. Preclinical Development of Bivalent Chimeric Antigen Receptors Targeting Both CD19 and CD22. *Molecular therapy oncolytics*. 2018;11:127-37.
293. Denman CJ, Senyukov VV, Somanchi SS, Phatarpekar PV, Kopp LM, Johnson JL, et al. Membrane-bound IL-21 promotes sustained ex vivo proliferation of human natural killer cells. *PLoS One*. 2012;7(1):e30264.
294. Popp MW, Maquat LE. Leveraging Rules of Nonsense-Mediated mRNA Decay for Genome Engineering and Personalized Medicine. *Cell*. 2016;165(6):1319-22.
295. Naeimi Kararoudi M, Dolatshad H, Trikha P, Hussain S-RA, Elmas E, Foltz JA, et al. Generation of Knock-out Primary and Expanded Human NK Cells Using Cas9 Ribonucleoproteins. *JoVE*. 2018(136):e58237.
296. Saunders KO. Conceptual Approaches to Modulating Antibody Effector Functions and Circulation Half-Life. *Frontiers in Immunology*. 2019;10(1296).
297. Muller-Kuller U, Ackermann M, Kolodziej S, Brendel C, Fritsch J, Lachmann N, et al. A minimal ubiquitous chromatin opening element (UCOE) effectively prevents silencing of juxtaposed heterologous promoters by epigenetic remodeling in multipotent and pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(3):1577-92.

298. Lo Monaco E, Tremante E, Cerboni C, Melucci E, Sibilio L, Zingoni A, et al. Human leukocyte antigen E contributes to protect tumor cells from lysis by natural killer cells. *Neoplasia*. 2011;13(9):822-30.
299. Lee N, Goodlett DR, Ishitani A, Marquardt H, Geraghty DE. HLA-E Surface Expression Depends on Binding of TAP-Dependent Peptides Derived from Certain HLA Class I Signal Sequences. *The Journal of Immunology*. 1998;160(10):4951-60.
300. Powers CJ, Früh K. Signal Peptide-Dependent Inhibition of MHC Class I Heavy Chain Translation by Rhesus Cytomegalovirus. *PLOS Pathogens*. 2008;4(10):e1000150.
301. Malmberg K-J, Levitsky V, Norell H, Matos CTd, Carlsten M, Schedvins K, et al. IFN- $\gamma$  protects short-term ovarian carcinoma cell lines from CTL lysis via a CD94/NKG2A-dependent mechanism. *The Journal of Clinical Investigation*. 2002;110(10):1515-23.
302. Andre P, Denis C, Soulas C, Bourbon-Caillet C, Lopez J, Arnoux T, et al. Anti-NKG2A mAb Is a Checkpoint Inhibitor that Promotes Anti-tumor Immunity by Unleashing Both T and NK Cells. *Cell*. 2018;175(7):1731-43 e13.
303. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(16):1509-18.
304. Milone MC, O'Doherty U. Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia*. 2018;32(7):1529-41.
305. Stadtmauer EA, Fraietta JA, Davis MM, Cohen AD, Weber KL, Lancaster E, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science*. 2020;367(6481):eaba7365.
306. Cho SW, Kim S, Kim Y, Kweon J, Kim HS, Bae S, et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Research*. 2014;24(1):132-41.
307. Jones BS, Lamb LS, Goldman F, Di Stasi A. Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer. *Frontiers in pharmacology*. 2014;5:254-.
308. Traversari C, Markt S, Magnani Z, Mangia P, Russo V, Ciceri F, et al. The potential immunogenicity of the TK suicide gene does not prevent full clinical benefit associated with the use of TK-transduced donor lymphocytes in HSCT for hematologic malignancies. *Blood*. 2007;109(11):4708-15.

309. Di Stasi A, Tey S-K, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A, Martinez C, et al. Inducible Apoptosis as a Safety Switch for Adoptive Cell Therapy. *New England Journal of Medicine*. 2011;365(18):1673-83.
310. Molina A. A decade of rituximab: improving survival outcomes in non-Hodgkin's lymphoma. *Annu Rev Med*. 2008;59:237-50.
311. García-Foncillas J, Sunakawa Y, Aderka D, Wainberg Z, Ronga P, Witzler P, et al. Distinguishing Features of Cetuximab and Panitumumab in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors. *Frontiers in Oncology*. 2019;9(849).
312. Guan M, Zhou Y-P, Sun J-L, Chen S-C. Adverse events of monoclonal antibodies used for cancer therapy. *BioMed research international*. 2015;2015:428169-.
313. Merino AM, Kim H, Miller JS, Cichocki F. Unraveling exhaustion in adaptive and conventional NK cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 2020;n/a(n/a).