

Aus der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Abteilung für pädiatrische Hämatologie/Onkologie
(Gf. Direktor Univ.- Prof. Holger Lode)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

**Die präklinische Wirkung eines Fusionsproteins aus anti-Fibroblasten-
Aktivierungs-Protein-Antikörper und einer Interleukin-2 Variante (FAP-IL-2v) auf
den Behandlungseffekt von anti-GD₂-Antikörper Dinutuximab beta beim
Neuroblastom**

Inauguraldissertation
zur

Erlangung des akademischen
Grades
Doktor in der Medizin
(Dr. med.)

der
Universitätsmedizin
der
Universität Greifswald

2025

vorgelegt von:
Justus Leopold
geb. am: 14.07.1998
in: Neubrandenburg

Dekan/in:

1. Gutachter/in:

2. Gutachter/in:

Ort, Raum:

Tag der Disputation:

Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

Prof. Dr. med. Holger N. Lode,

Prof. Dr. med. Stefan Fest

Universitätsmedizin Greifswald,

Seminarraum 1 der Kinderklinik

02.04.2025

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
Abkürzungsverzeichnis	iii
Abbildungsverzeichnis	iv
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Neuroblastom	1
1.2 Therapie des Hochrisikoneuroblastoms	1
1.3 Antikörper-basierte Immuntherapie	2
1.4 Interleukin-2 und seine Variante	3
1.5 Tumorassoziierte Fibroblasten	4
1.6 <i>Fibroblast activation protein alpha (FAP)</i>	4
2 Methoden.....	6
2.1 Zellkultur	6
2.2 RT-PCR	6
2.3 ADCC.....	6
2.4 Isolierung primärer adulter muriner Fibroblasten (PAMF)	6
2.5 Analyse des Einflusses von Tumorzell-konditioniertem Medium auf die FAP- Expression der PAMF	7
2.6 Durchflusszytometrie	7
2.7 Etablierung eines murinen, therapieresistenten NB-Modells.....	7
2.8 Etablierung eines CAF-positiven In-vivo-Modells	7
2.9 Evaluation der antitumoralen Effekte der kombinierten Immuntherapie mit Dinutuximab beta und FAP-IL-2v <i>in vivo</i>	8
2.10 Statistische Analysen.....	8
3 Ergebnisse.....	9

3.1	Einfluss der FAP-IL-2v-Behandlung auf ADCC gegen NB Zellen	9
3.2	Induktion von FAP-Expression in primären Fibroblasten (PAMF)	9
3.3	FAP-Expression humaner Neuroblastomzellen und primärer muriner Tumore	10
3.4	Einfluss der PAMF auf das Tumorstadium und die Entwicklung von CAF... ..	12
3.5	Etablierung eines resistenteren In-vivo-Tumormodells.....	12
3.6	Einfluss der kombinierten Immuntherapie mit Dinutuximab beta und FAP-IL-2v auf Tumorstadium und EFS	13
3.7	Einfluss der Behandlung mit FAP-IL-2v auf tumorinfiltrierende Leukozyten....	15
4	Diskussion	18
5	Zusammenfassung	23
6	Summary	24
7	Literaturverzeichnis	25
	Veröffentlichungen	v

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
α SMA	<i>alpha smooth muscle actin</i>
BM-MSC	<i>bone marrow derived mesenchymal stem cells</i>
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CAF	<i>cancer-associated-fibroblasts</i>
CXCL-12	CXC-Motiv-Chemokin 12
DB	Dinutuximab beta
EFS	<i>event-free survival</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAP	<i>fibroblast activation protein alpha</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GD ₂	Disialogangliosid
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
IL-2	Interleukin-2
IL-2v	Interleukin-2 Variante
IL-6	Interleukin 6
IL-15	Interleukin 15
INRG	<i>International Neuroblastoma Risk Group</i>
INRGSS	<i>INRG Staging System</i>
INSS	<i>International Neuroblastoma Staging System</i>
ITC	<i>isotype control</i>
MDSC	<i>myeloid-derived suppressor cells</i>
M-MDSC	<i>monocytic MDSC</i>
NaCl	Natriumchlorid
NB	Neuroblastom
NCBI	<i>National center for Biotechnology Information</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PAMF	Primäre adulte murine Fibroblasten

PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD-1	<i>programmed cell death-1 receptor</i>
PD-L1	<i>programmed cell death-1 receptor ligand</i>
PM-MDSC	<i>polymorphonuclear MDSC</i>
RT	Reverse Transkription
SEM	<i>standard error of the mean</i>
TAM	tumorassoziierte Makrophagen
TCM	Tumorzell-konditioniertes Medium
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Analyse der FAP-Expression in murinem Tumorgewebe.	11
Abbildung 2: Etablierung eines resistenteren Tumormodells <i>in vivo</i> (A) und Effekte der kombinierten Immuntherapie mit DB und FAP-IL-2v <i>in vivo</i> (B, C)	14
Abbildung 3: Durchflusszytometrische Analyse der tumorinfiltrierenden Lymphozyten .	16

1 Einleitung

1.1 Das Neuroblastom

Das Neuroblastom ist eine maligne Erkrankung des Kindesalters mit immer noch niedrigen Heilungschancen (1). Die NB-Zellen entwickeln sich aus Neuralleistenzellen, die sich im gesunden Gewebe zum sympathischen Nervensystem ausdifferenzieren (2). Typischerweise treten die Tumoren im Nebennierenmark oder entlang des sympathischen Grenzstrangs auf. Dementsprechend präsentieren sich die Tumoren im Hals-, Thorax-, Bauch- oder Beckenbereich der Patienten (2). Die klinische Realität der Erkrankung ist sehr divers (3,4). Es treten spontane Rückbildungen auf, etwa 25% der erkrankten Kinder sterben jedoch innerhalb von 10 Jahren an der Erkrankung (3,4). In Deutschland erkranken pro Jahr in einer Kohorte von 1 Mio. Kindern unter 15 Jahren etwa 13 am Neuroblastom, auf Grund der Seltenheit der Erkrankungen wird das Neuroblastom zu den *ultra orphan diseases* (ORPHA:635) gezählt (3). Etwa die Hälfte wird im Stadium 1 – 3 diagnostiziert, 11% im Stadium 4S und 38% im Stadium 4 (3). Die Stadieneinteilung erfolgt mittels des INS-Systems (engl.: *International Neuroblastoma Staging System*), das 1988 entwickelt (5) und 2008 durch das INRGSS-System (engl.: *International Neuroblastoma Risk Group Staging System*) erweitert wurde (6). In der INSS-Einteilung erfolgt das Staging nach dem ersten operativen Eingriff. Im Gegensatz dazu nutzt das INRGSS neue Erkenntnisse und molekularbiologische Methoden, insbesondere radiologisch ermittelte Risikofaktoren, um eine differenziertere Risikoabschätzung vor Therapiebeginn zu ermöglichen. Die Risikoabschätzung erfolgt anhand der Wahrscheinlichkeit für ein *Event-Free-Survival* (EFS) von 5 Jahren, es wird eingeteilt in *very low-risk*, *low-risk*, *intermediate-risk* und *high-risk* (7). Die INGRSS-Einteilung ermöglichte es die Therapieintensität in Abhängigkeit vom individuellen Risiko der erkrankten Kinder zu steuern (8). Die meisten Patienten (>50%) haben bei der initialen Diagnosestellung ein Hochrisikoneuroblastom (9).

1.2 Therapie des Hochrisikoneuroblastoms

In der Hochrisikogruppe beginnt die multimodale Therapie typischerweise mit der Induktionsphase, bestehend aus intensiver Chemotherapie, operativer Tumorentfernung

und Stammzellernte (7,8). Es folgt die Konsolidierungsphase. In dieser wird eine Hochdosischemotherapie angewandt, nach Abschluss der Therapie erfolgt eine autologe Stammzelltransplantation. Insbesondere die Einführung der myeloablativen Chemotherapie mit anschließender Stammzelltransplantation führte zu einer Steigerung des Therapieerfolgs in der Hochrisikogruppe. So konnte die 5-Jahres-Überlebensrate von 29% in den Jahren 1990-1994 auf 50% im Zeitraum von 2005 bis 2010 gesteigert werden (7). In der Postkonsolidierungsphase bzw. in der Erhaltungstherapie wurden die Patienten mit Isotretionin behandelt (7). Erst durch die Einführung einer Antikörpertherapie gegen das auf fast allen Neuroblastomen exprimierte tumorassoziierte Antigen GD₂ gelang ein Behandlungsfortschritt mit einer Steigerung der 5-Jahres-Überlebensrate um 10-15% (1).

Das Disialogangliosid GD₂ wurde bereits in den 1980er Jahren als geeignetes Ziel einer Immuntherapie identifiziert (10,11). Trotz Steigerung der Überlebenswahrscheinlichkeit gibt es eine signifikante Zahl von Kindern deren Leben nicht gerettet werden kann, woraus sich die Notwendigkeit ergibt weiter nach Verbesserungsmöglichkeiten der Therapie zu suchen.

1.3 Antikörper-basierte Immuntherapie

Bei der Antikörper-basierten Immuntherapie des Neuroblastoms werden Anti-GD₂-Antikörper appliziert, die das GD₂ auf den Tumorzellen spezifisch erkennen. Nach der Bindung der Tumorzellen durch den Antikörper werden diese von körpereigenen Immunzellen erkannt und schließlich lysiert (ADCC, engl.: *antibody-dependent-cellular-cytotoxicity*) (12). Die Haupteffektorzellpopulationen der ADCC sind NK-Zellen (13,14), Granulozyten und Monozyten (15). Bereits in den 1990er Jahren konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Applikation von IL-2 und GM-CSF die ADCC deutlich verbessern kann (16–18). Diese Erkenntnisse trugen dazu bei, dass die erste Zulassung einer Anti-GD₂-Immuntherapie des Neuroblastoms in den USA eine Kombinationstherapie des monoklonalen, chimären (human/murin) Antikörpers Dinutuximab mit IL-2 und GM-CSF war (19). Der Anti-GD₂-Antikörper wurde für den europäischen Markt als Dinutuximab beta in CHO (engl.: *chinese hamster ovary*) Zellen hergestellt (14). Aufgrund von fehlenden Wirksamkeitsdaten einer zusätzlichen IL-2 oder GM-CSF Gabe wird er in der

EU für die Neuroblastombehandlung ohne die Kombination von Zytokinen eingesetzt (20).

Überraschenderweise konnte in dieser randomisierten Studie von Dinutuximab beta mit und ohne IL-2 der *in vitro* gezeigte positive Effekt einer zusätzlichen IL-2-Gabe nicht bestätigt werden, während die IL-2-bedingten Nebenwirkungen signifikant erhöht waren (20). Weitere Untersuchungen der DB+IL-2-Patientenkohorte erbrachten die Erkenntnis, dass die Applikation von IL-2 zwar zur Erhöhung der Menge der NK-Zellen führte, gleichzeitig aber die Menge an immunsuppressiven T_{reg} (regulatorische T-Zellen) stark induzierte (21). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die erhöhten T_{reg} Zahlen negativ mit dem Überleben der Patienten korrelierten (21). Diese Erkenntnisse zeigen, dass IL-2 nicht in der Lage ist die klinische Wirkung von Dinutuximab beta zu verbessern. Die Untersuchung anderer geeigneter Begleittherapien sind eine Option die Heilungschancen der Erkrankung zu verbessern.

1.4 Interleukin-2 und seine Variante

Wie oben beschrieben konnten antitumorale Effekte der Anti-GD₂-Antikörpertherapie *in vitro* durch IL-2 verbessert werden, ein Effekt, der in Patienten mit Neuroblastom vermutlich durch eine überwiegende IL-2-bedingte Induktion der T_{reg} nicht bestätigt werden konnte. Einer der Gründe dafür könnte die Expression des hochaffinen IL-2-Rezeptors auf T_{reg} sein (21). NK-Zellen exprimieren hingegen im nicht aktivierten Zustand lediglich den mittelaffinen IL-2-Rezeptor, der IL-2 mit etwa 50-fach niedrigerer Affinität bindet (22).

Um die präferentielle Aktivierung der T_{reg} durch IL-2 zu vermeiden, wurden verschiedene Strategien untersucht, unter anderem die spezifische Blockade des hochaffinen IL-2-Rezeptors durch anti-CD25 Antikörper (23–25). Eine weitere, in dieser Arbeit angewandte Strategie, ist die Verwendung einer modifizierten IL-2-Variante (IL-2v), bei der die Bindungsaffinität zum hochaffinen IL-2-Rezeptor aufgehoben ist, während die Bindungsaffinität zum mittelaffinen, auf NK-Zellen exprimierten Rezeptor nicht beeinflusst wird. So kann eine selektive Expansion der im Rahmen einer Anti-GD₂-Immuntherapie notwendigen Effektorzellen erreicht werden (22,26), ohne dabei immuninhibierende T_{reg} zu stimulieren. Ein weiterer Effekt des IL-2v ist die Minimierung der IL-2-vermittelten Nebenwirkungen, wie z.B. Kapillarleck-Syndrom oder Lungenödeme

(26,27). Darüber hinaus kann die Halbwertszeit und biologische Aktivität des IL-2v durch die kovalente Bindung an einen Antikörper erhöht werden (22). Ist dabei der Antikörper gegen ein tumorspezifisches Antigen gerichtet, kann IL-2v in die Tumormikroumgebung transportiert werden, ohne dabei systemische Effekte zu induzieren. In dieser Arbeit wurde ein Antikörper verwendet, der das auf tumorassoziierten Fibroblasten (CAF; engl.: *cancer-associated-fibroblasts*) exprimierte Protein FAP (engl.: *fibroblast activation protein alpha*) spezifisch erkennt. Dieser Anti-FAP-Antikörper wurde kovalent mit IL-2v verbunden (FAP-IL-2v) und bildet somit ein Immunzytokin, welches im Rahmen dieser Doktorarbeit auf seine antitumoralen Eigenschaften in Kombination mit Dinutuximab beta getestet wurde.

1.5 Tumorassoziierte Fibroblasten

Tumorassoziierte Fibroblasten sind eine in vielen soliden Tumoren vorhandene Zellpopulation (28). Diese entwickelt sich auf unterschiedliche Art und Weise aus Fibroblasten oder BM-MSC (Mesenchymale Stromazellen des Knochenmarks; engl.: *bone marrow derived mesenchymal stem cells*). Diese Zellen bilden einen wichtigen Teil des Stromas solider Tumoren und beeinflussen die Tumormikroumgebung zu Gunsten der malignen Erkrankung (28–30). Dies kann durch Zell-Zell-Kontakte, oder physische Veränderungen in der Tumormikroumgebung geschehen (31). Auch durch die Ausschüttung protumoraler Zytokine, wie CXCL-12, IL-6 oder TGF- β , fördern sie das Wachstum der Tumoren und können so unter anderem die Metastasierung fördern (31). Auch beim Neuroblastom sind CAF im Stroma der Tumoren vorhanden und beeinflussen den Verlauf der Erkrankung negativ (32,33).

1.6 *Fibroblast activation protein alpha* (FAP)

CAF exprimieren unter anderem die Proteine FAP und/oder α SMA (engl.: *alpha smooth muscle actin*) (28). FAP ist ein auf der Zelloberfläche lokalisiertes, dimeres Protein mit Proteaseaktivität (34). Es konnte in vielen malignen Erkrankungen epithelialer Herkunft auf der Oberfläche von CAF nachgewiesen werden, im gesunden Gewebe wird das Protein im Gegensatz zu α SMA lediglich bei der Wundheilung exprimiert (35,36). Die FAP-Expression konnte auch bei einigen malignen Erkrankungen auf Tumorzellen selbst nachgewiesen werden, z.B. beim Mammakarzinom, Kolorektalkarzinom,

Pankreaskarzinom und Magenkarzinom (37). Somit eignet sich FAP als Target für eine Immuntherapie.

In dieser Arbeit wurde eine kombinierte Immuntherapie gegen das Neuroblastom untersucht, mit dem Ziel die Vorarbeit zu leisten, um das klinische Ansprechen der Anti-GD₂ basierten Immuntherapie zu verbessern und das Überleben der Patienten zu steigern. Dabei wurde die antitumorale Wirksamkeit vom Anti-GD₂-Antikörper Dinutuximab beta in Kombination mit einem Anti-FAP-Antikörper – IL-2v Fusionsprotein (FAP-IL-2v) untersucht. Zunächst wurden *in vitro* die Auswirkungen von FAP-IL-2v auf NK-Zellen und T_{reg} sowie auf die durch DB gegen NB-Zellen vermittelte ADCC gezeigt. Im nächsten Schritt wurde die FAP-Expression auf NB-Zellen sowie in murinem Tumorgewebe analysiert. Abschließend wurden antitumorale Effekte der kombinierten Behandlung mit DB und FAP-IL-2v in einem syngenem, murinen NB-Modell *in vivo* evaluiert, gefolgt von einer Untersuchung der tumorinfiltrierenden Effektorzellen.

Mithilfe der Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind, hoffen wir eine neue, vielversprechende Kombinationsimmuntherapie gegen das Hochrisiko-NB der klinischen Anwendung ein Stück näher zu bringen.

2 Methoden

2.1 Zellkultur

Die Kulturbedingungen der humanen Neuroblastomzelllinien CHLA-20, CHLA-90, CHLA-136, CHLA-172, Kelly, SMS-KCN, LAN-1, HGW-1, HGW-3, HGW-5 (38) und HGW-B (39), sowie der als Kontrolle verwendeten humanen Fibroblasten Wi-38, und der murinen Neuroblastomzellen NXS2-HGW sowie der primär adulten murinen Fibroblasten (PAMF) (sh. 2.4) sind in der Publikation aufgeführt (39).

2.2 RT-PCR

In der Arbeit wurden RT-PCR-Analysen durchgeführt, um die Expression von FAP-mRNA verschiedener Neuroblastomzellen und muriner Tumoren zu untersuchen. Primer wurden mit der Primer 3-Software ausgewählt und mit dem Primer BLAST-Tool von NCBI auf FAP-Spezifität überprüft. Die Primer-Sequenzen aller analysierten Gene sind unten aufgeführt. Die Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) wurde als interne Kontrolle verwendet. Nach der RNA-Isolierung mittels RNeasy Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) folgte die RT-PCR und die Agarose-Gelelektrophorese. Die PCR-Produkte im Gel wurden mittels Ethidiumbromid visualisiert (ImageLab™-Software (BioRad Laboratories GmbH, München, Germany)) und anschließend densitometrisch relativ zu GAPDH quantifiziert (ImageJ 1,48 v, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Tabelle 1: PCR-Primer-Sequenzen

Gen	Forward-Primer-Sequenz	Reverse-Primer-Sequenz
FAP	ACCATGAAAAGTGTGAATGCT	TTTGAAAAGGTGGATCTCCTGGTC
GAPDH	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	ACACATTGGGGGTAGGAACA

2.3 ADCC

Zur Erfassung des Einflusses von FAP-IL-2v auf die durch DB vermittelte zelluläre zytotoxische Aktivität (*engl.*: antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC) der Effektorzellen gegen Tumorzellen wurde ein calcein-AM basierter Assay durchgeführt (39).

2.4 Isolierung primärer adulter muriner Fibroblasten (PAMF)

Um die FAP-Expression primärer muriner Fibroblasten zu analysieren und zu untersuchen, ob die Injektion syngener Fibroblasten in Kombination mit Tumorzellen zur

Entwicklung eines CAF-positiven Tumors führt, wurden Fibroblasten aus der Haut von Mäusen extrahiert (39).

2.5 Analyse des Einflusses von Tumorzell-konditioniertem Medium auf die FAP-Expression der PAMF

Um den Einfluss löslicher, von Tumorzellen sezernierter Moleküle auf die FAP-Expression primärer Fibroblasten zu untersuchen, wurden die primären Fibroblasten für 48h mit Tumorzell-konditioniertem Medium (TCM, engl.: *tumor-conditioned-medium*) kultiviert. Das TCM wurde nach 48-stündiger Kultivierung der murinen, zu den PAMF syngenen, NB-Zellen NXS2-HGW geerntet. Anschließend wurde die FAP-Expressionsstärke durchflusszytometrisch quantifiziert (39).

2.6 Durchflusszytometrie

Um die Oberflächenexpression von FAP auf verschiedenen Zelltypen zu quantifizieren sowie tumorinfiltrierende Leukozyten und Fibroblasten oder CAF zu identifizieren und quantifizieren, wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Es wurden spezifische Antikörper für die ausgewählten Antigene verwendet. Für jeden primären Antikörper wurde eine entsprechende Isotypkontrolle verwendet. Die genaue Auflistung der verwendeten Antikörper, die Gating-Strategie zum Identifizieren der einzelnen Zellpopulationen sowie das Protokoll sind in der Publikation aufgeführt (39).

2.7 Etablierung eines murinen, therapieresistenten NB-Modells

Um den antitumoralen Effekt einer zusätzlichen Therapie evaluieren zu können, wurde ein therapieresistentes syngenes murines Tumormodell auf Grundlage des Modells, mit dem die DB-Monotherapie untersucht wurde (38,40), etabliert. Dabei wurde mit den Behandlungen erst nach dem Etablieren eines messbaren Tumors gestartet. Das genaue Protokoll ist in der Publikation beschrieben (39).

2.8 Etablierung eines CAF-positiven In-vivo-Modells

Um zu überprüfen, ob die Implantation von Tumorzellen in Kombination mit syngenen Fibroblasten zur Ausbildung eines CAF-positiven Tumors führt, wurden den experimentellen Mäusen NXS2-HGW-mit PAMF-Zellen in einem 2:1 Verhältnis subkutan injiziert (39).

2.9 Evaluation der antitumoralen Effekte der kombinierten Immuntherapie mit Dinutuximab beta und FAP-IL-2v *in vivo*

Um die antitumorale Effektivität der kombinierten Immuntherapie zu untersuchen, wurde ein Tierversuch mithilfe des unter 2.7 beschriebenen Mausmodells durchgeführt. Hierfür wurden tumortragende Tiere mit DB in Kombination mit Anti-FAP-IL-2v-Antikörpern ab Tag 12 nach der Tumorimplantation behandelt. In den Kontrollgruppen wurden die Tiere mit DB und physiologischer Kochsalzlösung behandelt. Um IL-2 spezifische Einflüsse zu untersuchen, wurden weitere Kontrollgruppen mit DB+IL-2 und IL-2 behandelt. Die Tumorgroße wurde mit einem digitalen Messschieber gemessen und anschließend das Tumolvolumen berechnet. Zusätzlich wurde das ereignisfreie Überleben (EFS) analysiert. Das genaue Versuchsprotokoll ist in der Publikation beschrieben (39).

2.10 Statistische Analysen

Für die statistischen Analysen in dieser Arbeit wurde die Software SigmaPlot (Version 13.0, Jandel Scientific Software, San Rafael, CA, USA) verwendet. Nach Prüfung der Daten auf Normalverteilung wurde bei gegebener Normalverteilung der Student-*t*-Test, bei nicht normalverteilten Daten der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Um mehr als zwei Gruppen hinsichtlich einer Variablen zu vergleichen, wurde eine Varianzanalyse mittels ANOVA durchgeführt. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts, engl.: *standard error of the mean*) angegeben. Die Überlebenswahrscheinlichkeiten (ereignisfreies Überleben (EFS)) wurden mit dem LogRank-Test geschätzt, der Mehrfachvergleich wurde mit der Holm-Sidak-Methode für Post-hoc-Tests durchgeführt. Ein Tumolvolumen von 300 mm³ wurde als Ereignis definiert. Ein *P*-Wert von <0.05 (**P* oder #*P*) galt als signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss der FAP-IL-2v-Behandlung auf ADCC gegen NB Zellen

Zunächst wurde untersucht, ob das Immunzytokin FAP-IL-2v die DB-abhängige Antikörper vermittelte zytotoxische Aktivität der Leukozyten (ADCC) gegen Neuroblastomzellen verbessern kann. Hierfür wurden Spender-PBMCs mit FAP-IL-2v inkubiert und anschließend die Tumorzelllyse mittels eines Calcein-AM-basierten Zytotoxizitätstests analysiert (38). Zusätzlich wurde die Zellzahl der für eine Antikörper-basierte Immuntherapie wichtigen Zellpopulationen (T_{reg} , NK-Zellen) durchflusszytometrisch bestimmt. Mit IL-2 behandelte Zellen dienten dabei als eine zusätzliche Kontrolle.

Die Inkubation von Leukozyten mit FAP-IL-2v bewirkte eine fast zweifache Steigerung der DB-abhängigen zytotoxischen Aktivität der Leukozyten gegen die GD_2^+ NB-Zellen LAN-1 (25%) im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (15%; t – Test, $P < 0.05$).

Die Analyse des Einflusses von FAP-IL-2v auf die Zahl der Effektorzellen zeigte keine Änderung des Anteils der immuninhibierend wirkenden T_{reg} an den $CD4^+$ Zellen, während die Inkubation mit IL-2 zu einer Verdopplung des Anteils der T_{reg} (ANOVA, $P < 0.001$ vs. unbehandelt & FAP-IL-2v) führte. Bei der Untersuchung der NK-Zellen konnte überraschenderweise kein Unterschied im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Durch eine zusätzliche Kontrolle mit dem DB-Anti-Idiotyp-AK Ganglidiomab wurde die GD_2 -Spezifität des Effektes erwiesen. Dabei führte die Inkubation der Zellen mit Ganglidiomab zur Aufhebung der DB-abhängigen Tumorzelllyse.

Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen eine positive Wirkung des Immunzytokins auf die durch DB vermittelte Lyse der Tumorzellen, während die durch IL-2 vermittelte Induktion der immunsupprimierenden T_{reg} ausbleibt (39).

3.2 Induktion von FAP-Expression in primären Fibroblasten (PAMF)

Es ist bekannt, dass von Tumorzellen sezernierte lösliche Moleküle die Bildung von CAF in der Tumormikroumgebung induzieren können (31,33). Um den Einfluss dieser Faktoren in unserem Tumor-Modell zu untersuchen, wurde die FAP-Expression der murinen PAMF nach einer 48-stündigen Inkubation mit TCM durchflusszytometrisch untersucht.

Es konnte ein signifikanter Unterschied der FAP-Expression zwischen den Gruppen gemessen werden, die FAP-Expression der mit TCM behandelten Gruppe zeigte sich deutlich erhöht (t – Test, $P < 0.05$).

Dieses Ergebnis zeigt, dass die in unserem Modell verwendeten NXS2-HGW-Zellen lösliche Moleküle sezernieren, die einen CAF-Phänotyp der syngeneten PAMF induzieren (39).

3.3 FAP-Expression humaner Neuroblastomzellen und primärer muriner Tumore

Um eine Rolle des FAP beim Neuroblastom zu eruieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit die FAP-Expression humaner Neuroblastomzellen untersucht. Hierfür wurden aus Proben von NB-Hochrisikopatienten gewonnene primäre Zelllinien (HGW-1, HGW-3, HGW-5 (38) und HGW-B (39) und kommerziell verfügbare Zelllinien (CHLA-15, CHLA-20, CHLA-90, CHLA-136, CHLA-172, LAN-1, Kelly und SMS-KCN) untersucht.

Zunächst wurde die Expression von FAP auf mRNA-Ebene untersucht. Dabei konnte FAP mittels RT-PCR in einigen analysierten Zelllinien (HGW-B, CHLA-90 und CHLA-172) nachgewiesen werden. Anschließend wurde die FAP-Expression in diesen Zellen mittels durchflusszytometrischer Analyse auf Proteinebene verifiziert (39).

Um eine Eignung unseres Modells für eine FAP-basierte Therapie zu bestätigen, wurden im nächsten Schritt murine Tumoren auf das Vorhandensein von FAP untersucht.

In der RT-PCR-Analyse zeigte sich bei allen untersuchten Proben eine deutliche FAP-Expression, obwohl die NXS2-HGW-Zellen, die zur Etablierung dieser Tumoren verwendet wurden, keine FAP-Expression zeigten (39). Diese Daten bestätigen eine Rolle von FAP im Tumormilieu.

Im folgenden Schritt wurden die Tumoren zur Differenzierung der FAP exprimierenden Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Die Analyse bestätigte unsere RT-PCR-Daten bezüglich der fehlenden Expression auf Tumorzellen. Im Gegenteil dazu konnte FAP auf CD45⁺ Zellen (Gesamtleukozytenpopulation) nachgewiesen werden (Abbildung 1 A, B).

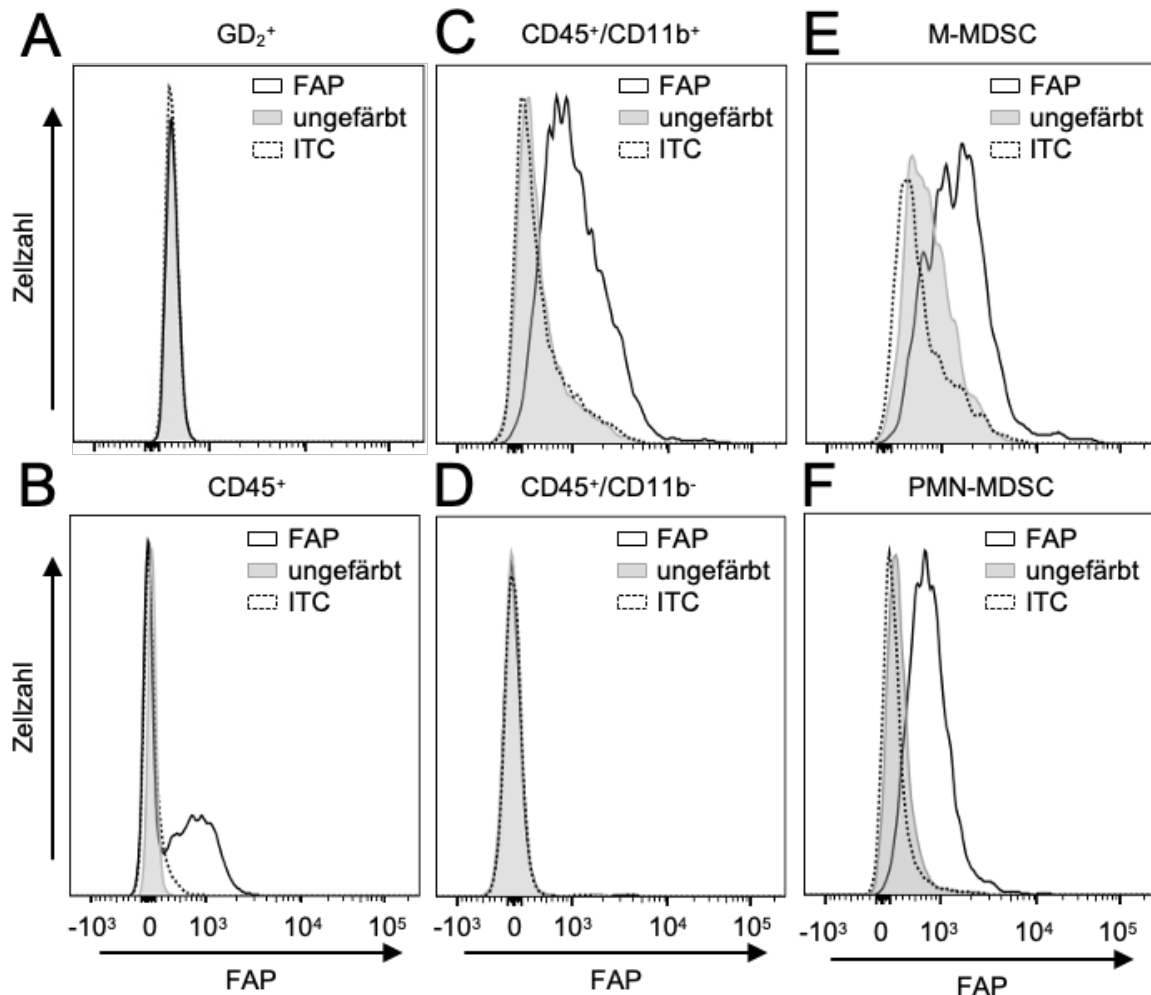


Abbildung 1: Analyse der FAP-Expression in murinem Tumorgewebe.

(A-F) Repräsentative Histogramme der durchflusszytometrischen Analysen der FAP-Expression in primärem murinen Tumorgewebe. Die Proben wurden bei Erreichen einer Tumorgröße von 750 mm³ entnommen und zur Gewinnung einer Einzelzelllösung enzymatisch aufgelöst. Sie wurden mit murinem anti-FAP-IgG und PE-markiertem Anti-murinem-IgG als primäre bzw. sekundäre Antikörper oder mit der entsprechenden ITC (schwarz gestrichelte Kurve) gefärbt. Ungefärbte Zellen dienten als Negativkontrolle (ungefärbt; grau ausgefüllte Kurve). (A) FAP-Expression der GD₂-positiven Zellpopulation. (B) FAP-Expression der CD45-positiven Zellpopulation. (C) FAP-Expression der CD45- und CD11b-positiven Zellpopulation. (D) FAP-Expression der CD45-positiven und CD11b-negativen Zellpopulation. (E) FAP-Expression der M-MDSC (CD45⁺/CD11b⁺/Ly6C^{hi}/Ly6G⁻)-Zellpopulation. (F) FAP-Expression der PMN-MDSC (CD45⁺/CD11b⁺/Ly6C^{lo}/Ly6G⁺)-Zellpopulation. Abbildung angepasst aus (39)

Zur detaillierten Identifizierung der FAP⁺-Leukozyten wurde die durchflusszytometrische Analyse auf unterschiedliche Leukozytenpopulationen erweitert. So konnte FAP eindeutig auf CD11b⁺ Leukozyten (GD₂⁻/CD45⁺/CD11b⁺) nachgewiesen werden, CD11b⁻ Leukozyten exprimierten hingegen kein FAP (Abbildung 1 C, D). Die CD45⁺/CD11b⁺ Zellen wurden, basierend auf vorherigen Arbeiten (40), weiter differenziert in monozytäre und polymorphkernige myeloide Suppressorzellen (engl.: *monocytic myeloid-derived*

suppressor cell, M-MDSC (CD11b⁺/Ly6C^{hi}/Ly6G⁻), engl.: *polymorphonuclear* MDSC, PMN-MDSC (CD11b⁺/Ly6C^{lo}/Ly6G⁺). FAP ließ sich sowohl bei beiden MDSC-Populationen als auch in der CD11b⁺/Ly6C⁻/Ly6G⁻ Zellpopulation nachweisen (Abbildung 1 E, F).

Zusammenfassend konnte FAP auf einigen humanen Neuroblastomzellen sowie auf tumorinfiltrierenden Leukozyten der murinen Tumoren detektiert werden.

3.4 Einfluss der PAMF auf das Tumorwachstum und die Entwicklung von CAF

Auf Grundlage unserer Daten, die eine Tumorzell-abhängige Induktion von FAP auf primären Fibroblasten belegen, und der Tatsache, dass CAF in humanen Neuroblastomen vorhanden sind (33,41), jedoch nicht in unserem In-vivo-Modell, wurde geprüft, ob die Injektion von NXS2-HGW in Kombination mit PAMF zur Entstehung von CAF-positiven Tumoren führt.

Die durchflusszytometrische Untersuchung des 22 Tage nach der kombinierten Injektion entnommenen Tumorgewebes konnte unerwarteterweise keine CD45⁺/FAP⁺ Zellen nachweisen. Auch der zusätzlich untersuchte Fibroblastenmarker CD140a konnte im Tumorgewebe nicht nachgewiesen werden. Der positive Einfluss der PAMF auf das Tumorwachstum konnte jedoch an den Tagen 16, 17 und 18 nach der Tumorzellimplantation gezeigt werden. Hier waren die Tumorumfänge in der NXS2-HGW + PAMF-Gruppe signifikant größer (t – Test, $P < 0.05$) als in der NXS2-HGW-Gruppe. Sowohl vor Tag 16 als auch an den folgenden Tagen ab Tag 19 konnte dieser Unterschied nicht mehr nachgewiesen werden (39).

Diese Ergebnisse zeigen, dass in unserem Modell keine CAF durch die Injektion von syngenen primären Fibroblasten im primären Tumorgewebe induziert werden können. Auf der Grundlage dieser Beobachtungen wurden in weiteren In-vivo-Experimenten NXS2-HGW-Zellen ohne PAMF injiziert.

3.5 Etablierung eines resistenteren In-vivo-Tumormodells

Die Immuntherapie des Neuroblastoms mit DB erwies sich in vorherigen In-vivo-Versuchen (40,42) als so effektiv, dass eine weitere Steigerung der Wirksamkeit durch ein zusätzliches Therapeutikum nicht möglich war. Um das Modell auch für die Untersuchungen kombinierter Therapien verwenden zu können, wurde der Behandlungsstart mit DB zu einem späteren Zeitpunkt der Tumorstadiumsphase (Tag

11, 12 oder 14 gegenüber Tag 4) verschoben, um ein gegen die DB-Immuntherapie resistentes Modell zu etablieren.

Wie erwartet nahm die antitumorale Aktivität der DB-Behandlung mit späterem Behandlungsstart ab. Die Analyse des Tumorwachstums der Gruppen, bei denen mit der DB-Immuntherapie an Tag 12 oder 14 nach der Tumorimplantation begonnen wurde, führte im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zu keinem signifikanten Unterschied des Tumolvolumens verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe (Abbildung 2A).

Als Ergebnis dieser Experimente wurde der Behandlungsstart bei weiteren Experimenten auf Tag 12 nach der Tumorimplantation festgelegt, da dies der erste Behandlungszeitpunkt war ab dem das Tumorwachstums von der unbehandelten Kontrolle nicht unterscheidbar war und somit die Untersuchung antitumoraler Effekte zusätzlicher Therapeutika ermöglicht. Zu diesem Startzeitpunkt lag das Tumolvolumen bei etwa 100 mm³.

3.6 Einfluss der kombinierten Immuntherapie mit Dinutuximab beta und FAP-IL-2v auf Tumorwachstum und EFS

Nach der oben beschriebenen Etablierung eines resistenten In-vivo-Modells wurde der Einfluss der kombinierten Immuntherapie auf das Tumorwachstum und das EFS untersucht. Hierfür wurden die Mäuse mit DB in Kombination mit FAP-IL-2v behandelt (39). Kontrolltiere erhielten eine DB- oder FAP-IL-2v-Monotherapie. Um IL-2-spezifische Effekte zu untersuchen, wurden zwei zusätzliche Gruppen (DB + IL-2 und IL-2) untersucht.

Die Kombination von DB mit FAP-IL-2v führte im Vergleich zu den Kontrollen zu einer stärkeren Inhibition des Tumorwachstums (d14, *t*-Test, $P < 0.01$ vs. DB, $P < 0.05$ vs. DB+IL-2) und einem verbesserten EFS (Holm-Sidak-Methode, $P < 0.05$ vs. DB, $P < 0.05$ vs. DB+IL-2) (Abbildung 2B, C). Am Ende des Beobachtungszeitraums zeigten die Tiere der Kontrollgruppen ein dreifach größeres Tumolvolumen als die Tiere, welche mit der kombinierten Immuntherapie behandelt wurden. Insbesondere die Unterschiede des Tumolvolumens zwischen der DB+FAP-IL-2v Gruppe und den DB+IL-2 sowie der DB-Monotherapie verdeutlichen den Vorteil der kombinierten Behandlung. Weiterhin zeigt die Analyse des vielfach in klinischen Studien als Endpunkt verwendete EFS eine etwa

vierfach niedrigere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Events in der Kombinationstherapiegruppe gegenüber den restlichen DB behandelten Gruppen. Die Untersuchung der IL-2-Effekte zeigte wie erwartet keine messbare Inhibition des Tumorstwachstums durch dieses Zytokin.

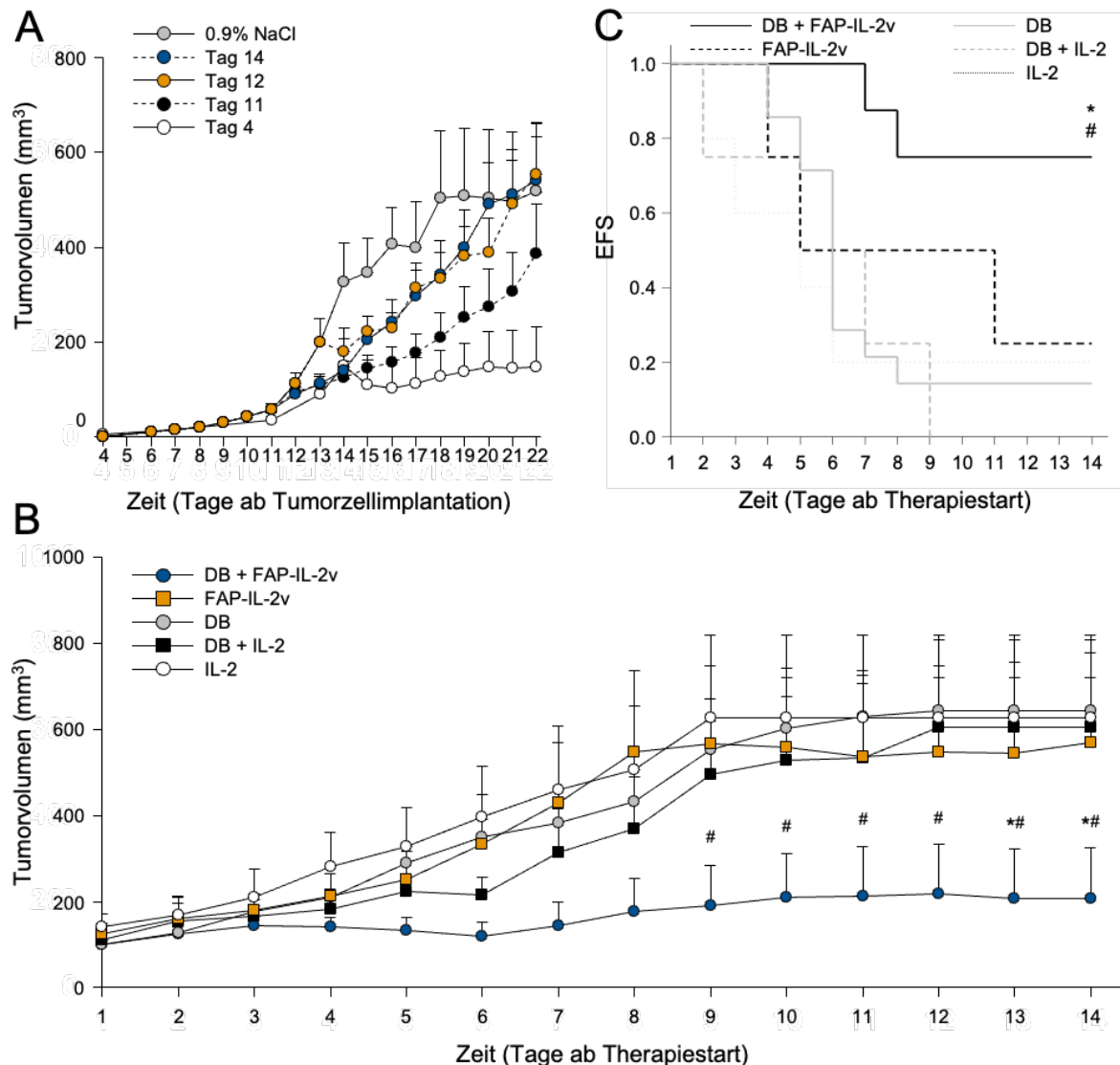


Abbildung 2: Etablierung eines resistenteren Tumormodells *in vivo* (A) und Effekte der kombinierten Immuntherapie mit DB und FAP-IL-2v *in vivo* (B, C)

(A) Um eine resistenterere Version des murinen syngenem NB-Tumormodells zu etablieren, wurde die DB-Behandlung in einer späteren Wachstumsphase des Tumors begonnen. Nach der Etablierung von Primärtumoren wurden drei spätere Zeitpunkte für den DB-Behandlungsbeginn ausgewählt (Tag 11 (schwarze Kreise, gestrichelte Linie), Tag 12 (orange Kreise, durchgezogene Linie) und Tag 14 (blaue Kreise, gestrichelte Linie)) und mit Tag 4 verglichen. Tag 4 entspricht dem Zeitpunkt des DB-Behandlungsbeginns im vorherigen NB-Modell (weiße Kreise, durchgezogene Linie). Die Den Mäusen der unbehandelten Kontrollgruppe wurde das gleiche Volumen 0.9% NaCl appliziert (graue Kreise, durchgezogene Linie). Wenn Mäuse aufgrund der Tumormast vorzeitig aus dem Experiment ausschieden wurde die letzte Messung in die Berechnung des Tumorstwachstums zu den folgenden Zeitpunkten einbezogen. Die Daten sind als Mittelwert + SEM dargestellt. (B) Analyse des Tumorstwachstums bei Mäusen, die mit DB in Kombination mit FAP-IL-2v (DB+FAP-IL-2v (blaue Kreise), FAP-IL-2v (orange Quadrate), DB (graue Kreise), DB in Kombination mit IL-2 (DB

+ IL-2, schwarze Quadrate) und IL-2 (weiße Kreise) behandelt wurden. Wenn Mäuse aufgrund der Tumorlast vorzeitig aus dem Experiment ausschieden wurde die letzte Messung in die Berechnung des Tumorwachstums zu den folgenden Zeitpunkten einbezogen. Die Daten sind als Mittelwert + SEM dargestellt. *t*-Test, **P* < 0.05 vs. DB+IL-2, #*P* < 0.05 vs. DB. (C) Analyse der Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens (EFS) bei Mäusen, die mit DB in Kombination mit FAP-IL-2v (DB+FAP-IL-2v, schwarze durchgezogene Linie), FAP-IL-2v (schwarze gestrichelte Linie), DB (graue durchgezogene Linie), DB in Kombination mit IL-2 (DB+IL-2, graue gestrichelte Linie) und IL-2 (schwarze gepunktete Linie) behandelt wurden. Ein Tumorzellenvolumen von 300 mm³ wurde als Ereignis definiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem LogRank-Test, der multiple Vergleich mit der Holm-Sidak-Methode. **P* < 0,05 vs. DB; #*P* < 0,05 vs. DB+IL-2.

Abbildung angepasst aus(39)

Zusammengefasst konnte *in vivo* gezeigt werden, dass die Behandlung mit FAP-IL-2v die antitumoralen Effekte der DB-Immuntherapie deutlich verbessert und so einen vielversprechenden Therapieansatz darstellt.

3.7 Einfluss der Behandlung mit FAP-IL-2v auf tumorinfiltrierende Leukozyten

In der Analyse des Tumorwachstums und des EFS zeigte sich ein deutlicher Vorteil der kombinierten Immuntherapie mit DB und FAP-IL-2v. Um die Mechanismen der Therapieverbesserung in der Tumormikroumgebung zu untersuchen, wurden die tumorinfiltrierenden Leukozyten analysiert, der Fokus der Analyse lag dabei auf den für die antitumorale Effektivität wichtigen NK-Zellen und CD8⁺-T-Zellen sowie den immunsuppressiv wirkenden T_{reg}.

In der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich wie die antitumorale Effektivität der DB-Therapie durch die zusätzliche Applikation von FAP-IL-2v verbessert wurde. Die tumorprotektiv wirkenden T_{reg} waren in der DB+IL-2-Gruppe etwa doppelt so häufig wie in der DB+FAP-IL-2v-Gruppe (Abbildung 3C). Weiterhin zeigte sich eine Tendenz zur stärkeren Infiltration des Tumors durch NK-Zellen in der Kombinationsgruppe (7.55%) gegenüber der DB+IL-2-Gruppe (2.19%), ein statistisch signifikanter Unterschied ließ sich bei dieser Gruppengröße jedoch nicht nachweisen (Abbildung 3A). Bei der Untersuchung der CD8⁺-Zellen zeigte sich eine 5-fache Erhöhung in der Kombinationstherapiegruppe im Vergleich zur DB+IL-2-Gruppe (Abbildung 3B). Im Vergleich der FAP-IL-2v-Monotherapie mit der IL-2-Monotherapie zeigte sich eine 7-fache Erhöhung der NK-Zellen in der FAP-IL-2v-Gruppe, sowie eine 3-fach höhere Zahl an T_{reg} in der IL-2 Gruppe. Diese Daten unterstreichen den deutlichen Vorteil von FAP-IL-2v gegenüber IL-2 hinsichtlich der Induktion von NK-Zellen sowie der ausbleibenden T_{reg}-Stimulation, sowohl in der Mono- als auch in der Kombinationstherapie.

Zusätzlich zu den Zellzahlen wurde das $CD8^+/T_{reg}$ -Verhältnis analysiert. Für dieses ist bei einigen malignen Erkrankungen eine positive Korrelation mit einer positiven Prognose beschrieben (43–47). Aus diesem Grund wurde das $CD8^+/T_{reg}$ -Verhältnis auch in unserem Versuch bestimmt. Es konnten statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Monotherapien mit FAP-IL-2v (29.6) und IL-2 (4.9) festgestellt werden (t – Test, $P < 0.05$). Für den Vergleich der Kombinationstherapiegruppe (24.6) mit der DB+IL-2-Gruppe (3) wurde eine Tendenz zu einer Erhöhung des Verhältnisses zu Gunsten der Kombinationstherapie festgestellt, auf Grund kleiner Gruppengrößen war allerdings keine Signifikanz der Unterschiede feststellbar (t – Test, $P = 0.072$) (Abbildung 3D).

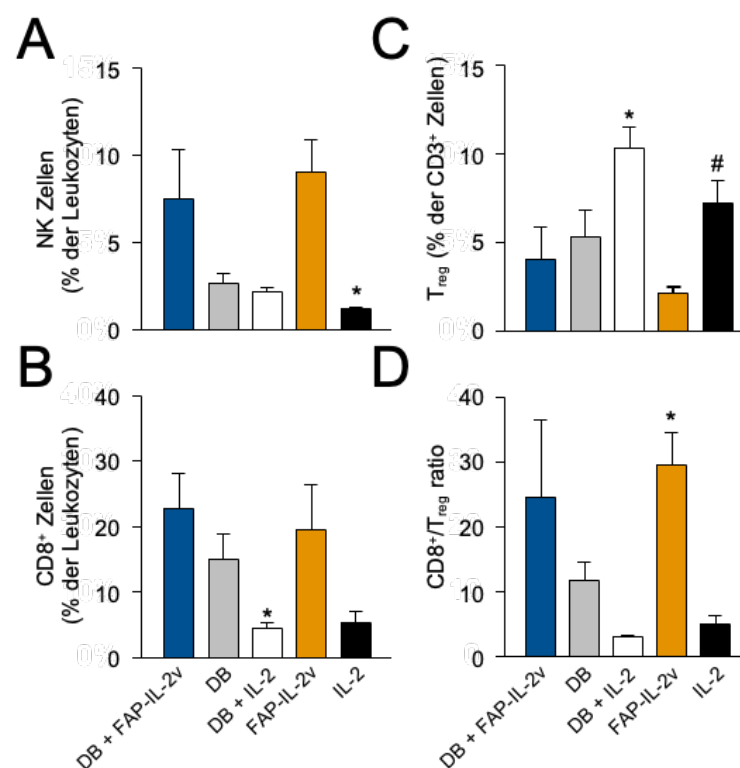


Abbildung 3: Durchflusszytometrische Analyse der tumorinfiltrierenden Lymphozyten

Zur Untersuchung des Einflusses der kombinierten DB- und FAP-IL-2v-Behandlung auf tumorinfiltrierende Lymphozyten wurde primäres Tumorgewebe durchflusszytometrisch analysiert. Die entnommenen Tumore wurden enzymatisch zu einer Einzelzelllösung verdaut. Um die NK- (A) und zytotoxischen T-Zellen (B) sowie die T_{reg}-Zellen (C) zu analysieren, wurden die für die jeweiligen Populationen spezifischen Antigene CD335 (NK-Zellen), CD8 (zytotoxische T-Zellen) sowie CD25 und FoxP3 (T_{reg}) markiert. Zusätzlich wurde das Verhältnis zwischen zytotoxischen T-Zellen und T_{reg} (D) ermittelt. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der jeweiligen Effektorzellpopulation an (allen vitalen) CD45-positiven Leukozyten für NK- und zytotoxische T-Zellen und an (allen vitalen) CD3-positiven Leukozyten für T_{reg}. Die Daten wurden mittels ANOVA mit entsprechenden Post-hoc-Test, oder mittels t -Test, ausgewertet. (A) $*P < 0.05$ vs. FAP-IL-2v, (B) $*P < 0.05$ vs. DB+FAP-IL-2v, (C) $*P < 0.05$ vs. DB+FAP-IL-2v, # $P < 0.05$ vs. FAP-IL-2v, (D) $*P < 0.05$ vs. IL-2. Abbildung angepasst aus (39)

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass FAP sowohl beim humanen als auch beim murinen Neuroblastom nachweisbar ist und ein geeignetes Target darstellt. Die *in vitro* gezeigte positive Wirkung des modifizierten IL-2v im Rahmen einer Anti-GD₂-Immuntherapie konnte *in vivo* deutlich bestätigt werden. Es war eine deutliche Steigerung der antitumoralen Wirksamkeit der Anti-GD₂-Immuntherapie durch die zusätzliche Applikation von FAP-IL-2v messbar. Zusätzlich hatten die Tiere, die die Kombinationsimmuntherapie erhielten, eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für ein längeres EFS. Die durch das Immunzytokin verbesserte Effektivität der DB-Behandlung lässt sich durch den von uns gemessenen Einfluss des modifizierten IL-2v auf die tumorinfiltrierenden Leukozyten, insbesondere die Stimulation der NK-Zellen und ausbleibende T_{reg} Induktion, gut erklären.

Somit gelang es uns eine Grundlage für eine neue vielversprechende Behandlungsstrategie gegen das Hochrisikoneuroblastom zu demonstrieren, um zukünftig das Überleben der Kinder mit der tödlichen Erkrankung zu steigern.

4 Diskussion

Die Einführung der Anti-GD₂-Immuntherapien des Hochrisikoneuroblastoms, des häufigsten, soliden, extrakraniellen Tumors des Kindesalters, hat die Aussichten für erkrankte Kinder signifikant verbessert und ist ein großer Therapiemeilenstein (1,19). Gleichzeitig erleidet weiterhin ein großer Anteil der Patienten ein Fortschreiten der Erkrankung, häufig bis zum Tode (1). Ein erster, auf vielversprechenden In-vitro-Daten basierender Ansatz die antitumorale Aktivität der Anti-GD₂-Antikörper zu verbessern, war die zusätzliche Gabe von immunstimulierenden Zytokinen wie z.B. IL-2 und GM-CSF (19). Im Verlauf der Anwendung dieser Therapie konnte allerdings kein zusätzlicher Nutzen der Zytokingabe nachgewiesen werden. Im Gegenteil: Patienten, die zusätzlich ein Zytokin erhielten, erlitten häufiger zytokinassoziierte Nebenwirkungen als Patienten, die keine Zytokine erhielten (20). In der durch Troschke-Meurer et. al. durchgeführten Analyse der Immunprofile der mit oder ohne IL-2 behandelten Kinder zeigte sich zwar eine IL-2-abhängige Vermehrung der ADCC vermittelnden NK-Zellen, gleichzeitig wurden jedoch die immuninhibierenden T_{reg} IL-2-abhängig um ein Vielfaches erhöht (21). Aus diesen Erkenntnissen ergibt sich die Notwendigkeit einen Weg zu finden antitumorale NK-Zellen zu stimulieren ohne immuninhibierende T_{reg} zu induzieren.

Ziel dieser Arbeit war es, im Rahmen einer Anti-GD₂-Immuntherapie die antitumoralen Effekte eines neuen Immunzytokins zu untersuchen, das gezielt NK-Zellen stimuliert ohne T_{reg} zu induzieren, um eine Strategie zur Verbesserung der Wirksamkeit der Immuntherapie bei Patienten zu testen. Das Immunzytokin FAP-IL-2v wurde entwickelt, um diese spezifischen Limitationen der Gabe von IL-2 zu überkommen. Das mutierte IL-2v bindet den hochaffinen IL-2-Rezeptor (CD25) der T_{reg} nicht. Um eine längere Halbwertszeit und eine tumorlokalisierte Wirkung zu erzielen, wurde das IL-2v an einen Antikörper gekoppelt, der spezifisch FAP erkennt, dessen Expression streng an malignes Geschehen gebunden ist (48).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass FAP-IL-2v *in vitro* eine dem des Wildtyp-IL-2 vergleichbare positive Wirkung auf die durch den Anti-GD₂-Antikörper Dinutuximab beta vermittelte ADCC hat. Gleichzeitig blieb die Induktion der T_{reg} aus. Somit stellt das Immunzytokin FAP-IL-2v eine vielversprechende Alternative zu IL-2 dar.

Die im nächsten Schritt durchgeführte Analyse der FAP-Expression im murinen Modell, das im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, zeigte eine FAP-Expression ausschließlich durch CD11b⁺ Leukozyten. Diese Zellen wurden weiter charakterisiert als M-MDSC oder PMN-MDSC. Auch einige Zellen der CD11b⁺-non-MDSC Population, wahrscheinlich TAM (Tumor-assoziierte Makrophagen) (49), zeigten eine FAP-Expression. Sowohl für die MDSC-Populationen als auch für TAM ist eine immunsuppressive, protumorale Funktion bekannt (40,49). Durch den Nachweis dieser FAP-positiven, immunsuppressiven Leukozyten postulierten wir eine Rolle dieser Zellen als alternatives Target des Immunzytokins FAP-IL-2v in der Tumormikroumgebung.

Eines der wichtigsten Tools in der experimentellen Onkologie für die Evaluierung verschiedener Therapien ist ein geeignetes *in vivo* Modell. Um unser syngenes murines Tumormodell für die Untersuchung kombinierter Therapien nutzbar zu machen, wurde der Behandlungsstart auf einen späteren Zeitpunkt verschoben, so dass die Tumoren gegen die im vorherigen Modell sehr effektive Monotherapie mit Dinutuximab beta resistent wurden. Dies ermöglichte die im Folgenden durchgeführten Untersuchungen der zusätzlichen antitumoralen Effekte der Kombinationsbehandlung.

Wir konnten in diesem verschärften Modell zeigen, dass die Kombination von Dinutuximab beta mit FAP-IL-2v zu einer deutlichen Erhöhung der antitumoralen Aktivität der Anti-GD₂-Antikörpertherapie führt. Dies zeigt sich in einer signifikanten Reduktion des Tumorumfanges und dem signifikant verbesserten EFS. Diese Daten werden durch Versuche anderer Gruppen bestätigt, welche bei der Kombination eines IL-2v mit ADCC fähigen Antikörpern wie Trastuzumab oder Cetuximab ebenfalls eine bessere antitumorale Effektivität feststellten (22,48). Als wesentlichen Grund für diese Verbesserung konnten wir die niedrigen T_{reg}-Zahlen in der Kombinationstherapiegruppe ausmachen. Die beobachtete T_{reg}-Induktion der klinisch angewandten DB+IL-2-Therapie (21) ist vermutlich einer der Gründe für die fehlende klinische Wirksamkeit der IL-2-Kombi-Behandlung, so dass wir hier einen Weg aufzeigen können diese durch eine neue Alternative zu optimieren. Neben den deutlich niedrigeren T_{reg}-Zahlen ist auch die Vermehrung zytotoxischer T-Zellen (CD8⁺) eine Wirkung des FAP-IL-2v. Gesteigerte Tumordinfiltration durch CD8⁺-Zellen ist beim Neuroblastom als prognostisch günstig beschrieben worden (50,51). Die Induktion dieser Zellen durch das Immunzytokin könnte somit einen positiven Einfluss auf die Prognose der Patienten haben.

Interessanterweise exprimieren NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen vermehrt Immuncheckpoints wie PD-1 wenn sie sich im aktivierten Zustand befinden (51,52). Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Anti-GD₂-Immuntherapie die Expression des dazugehörigen Liganden PD-L1 auf Neuroblastomzellen induziert, sowie die PD-1 Expression auf NK-Zellen erhöht (42,53). Eine Blockade dieses Checkpoints in Kombination mit einer Anti-GD₂-Immuntherapie konnte sowohl im murinen Modell (42,53), als auch in ersten humanen Versuchen (54) deutliche Therapieerfolge erzielen. Die von FAP-IL-2v vermittelte Induktion dieser Zellen lässt vermuten, dass die Kombination mit einer Immuncheckpointblockade synergistische Effekte erzielen könnte. Ob sich dieser Effekt in der klinischen Anwendung nachweisen lässt muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

Ein weiterer vielversprechender Ansatz, welcher im Rahmen Zytokin-bedingter Verbesserung der antitumoralen Effekte einer Antikörper-basierten -Immuntherapie erforscht wird, ist die Verwendung von Interleukin-15 zur selektiven NK-Zell-Expansion. Für dieses Molekül konnte in präklinischen Modellen in Kombination mit einem Anti-GD₂-Antikörper eine antitumorale Aktivität festgestellt werden, die NK-Zellen wurden deutlich vermehrt (55). Die Daten dieser Studie bestätigen unsere Ergebnisse, dass die Verabreichung eines selektiv auf NK-Zellen wirkenden Zytokins eine effektive Verbesserung der Anti-GD₂-Immuntherapie bewirken kann. Einer der Limitationen bei der systemischen Applikation von Zytokinen, sind Nebenwirkungen, wie z.B. ein Lungenödem, Anämie, Fieber und Abgeschlagenheit. So traten auch bei der Anwendung von IL-15 in Menschen zytokinassozierte Nebenwirkung auf, zudem ist auf Grund der kurzen Halbwertszeit von IL-15 eine tägliche Gabe erforderlich (56). Im Gegensatz dazu ist denkbar, dass die durch die Kopplung an einen FAP-Antikörper erreichte tumorlokale Wirkung des FAP-IL-2v solche systemischen Nebenwirkungen minimieren kann. Prinzipiell wäre die Kombination der Anti-GD₂-Immuntherapie mit beiden Zytokinen denkbar, die Untersuchung der Eignung sollte Gegenstand zukünftiger Studien sein.

In der klinischen Realität sind Neuroblastome durch eine stark immunsuppressive und protumorale Mikroumgebung gekennzeichnet (57). Dies stellt für die Behandlung mit einer Anti-GD₂-Immuntherapie eine erhebliche Schwierigkeit dar. Die immunsuppressive Umgebung wird zu einem großen Teil durch nichtmaligne Zellen, unter anderem T_{reg}, TAM, MDSC und CAF aufrecht erhalten (32,57,58). Durch ihre immunsuppressiven

Eigenschaften sind diese Zellen als Ziel einer Therapie geeignet. Unter anderem werden Ansätze untersucht die immuninhibierende Wirkung der T_{reg} zu minimieren. Eine Möglichkeit auf diese Zellen Einfluss zu nehmen ist eine anti-CD25 gerichtete Antikörpertherapie zur selektiven T_{reg} Depletion (23,24). Eine mögliche unerwünschte Wirkung der anti-CD25 Therapie ist jedoch die Depletion von CD25-positiven, antitumoralen Effektorzellen wie etwa aktivierten NK-Zellen oder aktivierten $CD8^+$ Zellen (25). Ob sich die direkt gegen T_{reg} gerichteten Ansätze eignen eine Anti-GD₂-Immuntherapie ähnlich stark zu verbessern, wie die von uns gezeigte Methode, sollte in weiteren Studien erforscht werden.

Eine weitere relevante Zellpopulation sind die MDSC. So ist eine Inhibierung der Effektivität einer Anti-GD₂-CAR-T-Zelltherapie durch MDSC beschrieben (59). In weiteren Experimenten konnte demonstriert werden, dass ein spezifisches Depletieren von MDSC durch einen Tyrosinkinase-Inhibitor (60) oder eine Chemotherapie (40) im Mausmodell zur Verbesserung einer Immuntherapie führt. Unsere Ergebnisse, die eine FAP-Expression auf murinen MDSC nachweisen, zeigen einen Weg auf, diese Zellen spezifisch zu eliminieren, und so die Effektivität etablierter Behandlungen zu verbessern. Ob FAP-positive MDSC auch in humanen Neuroblastomen vorkommen ist bisher nicht bekannt, dies muss in weiteren Studien untersucht werden. Zusätzlich konnten wir FAP auf $CD11b^+$ -non-MDSC-Leukozyten, wahrscheinlich TAM (49), nachweisen. Auch für das spezifische Ausschalten der immunsuppressiven, tumorprotektiven TAM wurde bereits eine antitumorale Effektivität beschrieben (61), so dass unsere Ergebnisse auch hier einen möglichen neuen Therapieansatz aufzeigen könnten.

Neben den FAP exprimierenden Leukozyten stellt auch die uns beschriebene FAP-Expression einiger humaner Neuroblastomzellen einen möglichen Ansatz einer antitumoralen Therapie dar. Weiterhin sind FAP-positive CAF ein weiteres vielversprechendes Ziel einer antitumoralen Therapie (62). Für zukünftige Untersuchungen einer CAF-spezifischen Therapie in unserem Modell wäre ein möglicher Ansatz eine orthotope Tumorimplantation zur Generierung eines CAF-positiven Neuroblastoms, wie von Borriello et al. demonstriert (63).

Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse eine relevante FAP-Expression auch im humanen und murinen Neuroblastom und könnten für weitere, zukünftige Therapieansätze wegweisend sein.

Ein weiterer Ansatz die ADCC von Dinutuximab beta zu verbessern wurde von Troschke-Meurer et. al. demonstriert. Hierbei wurde der Anti-GD₂-Antikörper mit in der Induktionsphase angewandten Chemotherapeutika kombiniert. So gelang es die ADCC der kombinierten Therapie *in vitro* um ein Vielfaches zu steigern (64). Lode et al. konnten die Wirksamkeit dieser Kombination in einem *Compassionate Use Programm* bei Patienten mit therapierefraktärem Neuroblastom klinisch mit einigem Erfolg testen (65). Während ein positiver Einfluss der Chemotherapie auf NK-Zellen als Grundlage des synergistischen Effekts diskutiert wurde, konnte auch ein negativer Einfluss der Chemotherapeutika auf die NK-Zellen im Rahmen dieser Studien nicht ausgeschlossen werden. Eine zusätzliche Stimulation dieser Zellen durch FAP-IL-2v wäre eine Möglichkeit den synergistischen Effekt der Chemoimmuntherapie zu verstärken. Dies wäre ein mögliches Ziel zukünftiger Studien.

Zusätzlich zur Anwendbarkeit des FAP-IL-2v beim Neuroblastom eröffnet sich durch die ubiquitäre Expression von FAP bei malignen Erkrankungen epithelialen Ursprungs (30,35) die Möglichkeit, die Anwendung des Moleküls auf weitere Tumorarten zu erweitern (48). Es wurde die Verträglichkeit und Wirksamkeit von FAP-IL-2v als Monotherapie bei 13 verschiedenen malignen Erkrankungen, unter anderen bei Melanomen und Plattenepithelkarzinomen getestet (66). Die im Rahmen der Studie analysierten Leukozyten bestätigten unsere präklinischen Analysen, die NK-Zellen und CD8⁺ T-Zellen zeigten sich massiv erhöht, während die T_{reg}-Zahlen unverändert blieben (66). Eine antitumorale Aktivität der Monotherapie konnte bei 3 Patienten gemessen werden, allerdings lässt die Veränderung der Effektorzellen vermuten, dass eine Kombination mit einem ADCC-fähigen Antikörper wie Dinutuximab beta zu einer deutlichen antitumoralen Aktivität führen würde. Dies konnte für murine Modelle bereits von unserer Arbeitsgruppe im Rahmen dieser Arbeit (39) und von Waldhauer et. al. gezeigt werden (48).

Zusammenfassend konnten wir die antitumorale Wirksamkeit der Anti-GD₂-Immuntherapie durch die zusätzliche Gabe des Immunzytokins FAP-IL-2v deutlich verbessern. Die niedrigen T_{reg}-Zahlen und vermehrte Tumordinfiltration durch NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen zeigen den deutlichen Effekt des Immunzytokins. Die von uns gezeigte FAP-Expression auf Neuroblastomzellen und immunsuppressiven Zellen im Tumormilieu eröffnet weitere Optionen antitumorale Therapien zu verbessern.

5 Zusammenfassung

Die Behandlung von Hochrisiko-Neuroblastom-Patienten mit dem Anti-GD₂-Antikörper (AK) Dinutuximab beta (DB) hat das Überleben der Patienten um 15% verbessert. Die AK-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) ist der wichtigste Wirkmechanismus und wird hauptsächlich durch NK-Zellen vermittelt. Die gleichzeitige Behandlung mit IL-2 zeigte keinen zusätzlichen klinischen Nutzen, wahrscheinlich auf Grund einer starken Induktion immuninhibierender T_{reg}. Daher untersuchten wir hier eine DB-basierte Immuntherapie in Kombination mit dem Immunzytokin FAP-IL-2v, welches aus einem *fibroblast-activation-protein-α* (FAP)-spezifischen AK besteht, der mit einer mutierten IL-2-Variante (IL-2v) verknüpft ist. Das mutierte IL-2v hat eine aufgehobene Bindung des hochaffinen IL-2-Rezeptors, wodurch NK-Zellen ohne Induktion von T_{reg} stimuliert werden. Die Auswirkungen von FAP-IL-2v auf NK-Zellen, T_{reg} und die DB vermittelte ADCC, sowie die FAP-Expression in NB wurden mittels RT-PCR-Analyse, Durchflusszytometrie und einem Calcein-AM-basierten Zytotoxizitätstest untersucht. Darüber hinaus wurde der Einfluss von löslichen Faktoren, die von Tumorzellen sezerniert werden, auf die FAP-Expression durch primäre Fibroblasten untersucht. Schließlich wurde eine kombinierte Immuntherapie mit DB und FAP-IL-2v in einem resistenten syngenem murinen NB-Modell untersucht.

Die Inkubation von Leukozyten mit FAP-IL-2v verstärkte die DB-spezifische ADCC ohne Induktion von T_{reg}. Ebenso gelang es eine FAP-Expression durch humane NB-Zellen und *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) im murinen Tumorgewebe nachzuweisen. Des Weiteren konnte eine tumorzellabhängige Verstärkung der FAP-Expression durch primäre Fibroblasten nachgewiesen werden. Anschließend konnte *in vivo* bewiesen werden, dass die Kombination von DB mit FAP-IL-2v zu einem stark verringerten Tumorstadium und einer deutlich verbesserten Überlebensrate der behandelten Mäuse führt. Im Tumorgewebe zeigte sich eine vermehrte Tumordinfiltration durch NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen sowie eine geringere Anzahl von T_{reg} im Vergleich zu den Kontrollen.

Zusammenfassend belegen unsere Daten, dass FAP-IL-2v die Wirksamkeit von DB gegen NB verstärkt und eine vielversprechende Alternative zu IL-2 darstellt.

6 Summary

Treatment of high-risk neuroblastoma patients with the anti-GD₂ antibody (ab) dinutuximab beta (DB) has improved patient survival by 15%. Ab-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) is the main mechanism of action and is mainly mediated by NK cells. Concomitant treatment with IL-2 showed no additional therapeutic benefit, probably due to a strong induction of immunoinhibitory T_{reg}. Therefore, we investigated here whether an additional treatment of NB with FAP-IL-2v improves antitumor efficacy of DB-based immunotherapy. The mutant IL-2v has an abolished binding to the high-affinity IL-2 receptor and stimulates NK cells without induction of T_{reg}. The effects of FAP-IL-2v on NK cells, T_{reg} and DB-mediated ADCC as well as FAP expression in NB were investigated by RT-PCR analysis, flow cytometry and a calcein-AM-based cytotoxicity assay. In addition, the influence of soluble factors secreted by tumor cells on FAP expression by primary fibroblasts was investigated. Finally, combined immunotherapy with DB and FAP-IL-2v was investigated in a resistant syngeneic murine NB model.

Our results show that incubation of leukocytes with FAP-IL-2v results in a clear enhancement of DB-specific ADCC. Importantly, in contrast to IL-2, treatment of leukocytes with FAP-IL-2v did not result in induction of T_{reg}. Next, analysis of human NB cells and myeloid-derived suppressor cells (MDSC) showed FAP-expression by these cells. A tumor cell-dependent enhancement of FAP expression by primary fibroblasts was demonstrated. In the next step, combinatorial treatment of murine high-risk neuroblastoma with DB and FAP-IL-2v was tested *in vivo*. We found that additional treatment of tumor bearing mice with FAP-IL-2v strongly increased antitumor efficacy of DB showing a reduction in tumor burden and significantly improved EFS. Finally, analysis of tumor tissue showed increased tumor infiltration by NK cells and cytotoxic T cells as well as reduced numbers of T_{reg} compared to controls treated with either DB, IL-2 or a combination thereof.

Together, our data show a significant improvement of antitumor effects of DB by addition of FAP-IL-2v, thus suggesting FAP-IL-2v as a promising alternative to IL-2.

7 Literaturverzeichnis

1. Ladenstein R, Pötschger U, Valteau-Couanet D, Luksch R, Castel V, Ash S, Laureys G, Brock P, Michon JM, Owens C, Trahair T, Chi Fung Chan G, Ruud E, Schroeder H, Beck-Popovic M, Schreier G, Loibner H, Ambros P, Holmes K, Castellani MR, Gaze MN, Garaventa A, Pearson ADJ, Lode HN. Investigation of the Role of Dinutuximab Beta-Based Immunotherapy in the SIOPEN High-Risk Neuroblastoma 1 Trial (HR-NBL1). *Cancers* [Internet]. 2020;12(2). Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/2/309>
2. Maris JM. Recent Advances in Neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2010 Jun 10;362(23):2202–11.
3. Berthold F, Spix C, Kaatsch P, Lampert F. Incidence, Survival, and Treatment of Localized and Metastatic Neuroblastoma in Germany 1979–2015. *Pediatr Drugs*. 2017 Dec;19(6):577–93.
4. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer*. 2003 Mar;3(3):203–16.
5. Brodeur GM, Seeger RC, Barrett A, Berthold F, Castleberry RP, D’Angio G, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Freeman AI. International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 1988 Dec;6(12):1874–81.
6. Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K, Kaneko M, London WB, Matthay KK, Nuchtern JG, von Schweinitz D, Simon T, Cohn SL, Pearson ADJ, INRG Task Force. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009 Jan 10;27(2):298–303.
7. Pinto NR, Applebaum MA, Volchenboum SL, Matthay KK, London WB, Ambros PF, Nakagawara A, Berthold F, Schleiermacher G, Park JR, Valteau-Couanet D, Pearson ADJ, Cohn SL. Advances in Risk Classification and Treatment Strategies for Neuroblastoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2015 Sep 20;33(27):3008–17.
8. Tolbert VP, Matthay KK. Neuroblastoma: clinical and biological approach to risk stratification and treatment. *Cell Tissue Res*. 2018 May 1;372(2):195–209.
9. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *The Lancet*. 2007 Jun 23;369(9579):2106–20.
10. Lammie G, Cheung N, Gerald W, Rosenblum M, Cordoncardo C. GANGLIOSIDE GD(2) EXPRESSION IN THE HUMAN NERVOUS-SYSTEM AND IN NEUROBLASTOMAS - AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY. *Int J Oncol*. 1993 Nov 1;3(5):909–15.

11. Mujoo K, Cheresch DA, Yang HM, Reisfeld RA. Disialoganglioside GD2 on Human Neuroblastoma Cells: Target Antigen for Monoclonal Antibody-mediated Cytolysis and Suppression of Tumor Growth¹. *Cancer Res.* 1987 Feb 1;47(4):1098–104.
12. Biburger M, Lux A, Nimmerjahn F. Chapter Three - How Immunoglobulin G Antibodies Kill Target Cells: Revisiting an Old Paradigm. In: Alt FW, editor. *Advances in Immunology*. Academic Press; 2014. p. 67–94.
13. Alderson KL, Sondel PM. Clinical Cancer Therapy by NK Cells via Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity. *BioMed Res Int.* 2011 Jan 1;2011(1):379123.
14. Zeng Y, Fest S, Kunert R, Katinger H, Pistoia V, Michon J, Lewis G, Ladenstein R, Lode HN. Anti-neuroblastoma effect of ch14.18 antibody produced in CHO cells is mediated by NK-cells in mice. *Mol Immunol.* 2005 Jul;42(11):1311–9.
15. Gómez Román VR, Murray JC, Weiner LM. Chapter 1 - Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC). In: Ackerman ME, Nimmerjahn F, editors. *Antibody Fc*. Boston: Academic Press; 2014. p. 1–27.
16. Barker E, Mueller BM, Handgretinger R, Herter M, Yu AL, Reisfeld RA. Effect of a chimeric anti-ganglioside GD2 antibody on cell-mediated lysis of human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 1991 Jan 1;51(1):144–9.
17. Hank JA, Robinson RR, Surfus J, Mueller BM, Reisfeld RA, Cheung NK, Sondel PM. Augmentation of Antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxicity following in Vivo Therapy with Recombinant Interleukin 21. *Cancer Res.* 1990 Sep 1;50(17):5234–9.
18. Nguyen R, Houston J, Chan WK, Finkelstein D, Dyer MA. The role of interleukin-2, all-trans retinoic acid, and natural killer cells: surveillance mechanisms in anti-GD2 antibody therapy in neuroblastoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2018 Apr 1;67(4):615–26.
19. Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, Chen HX, Smith M, Anderson B, Villablanca JG, Matthay KK, Shimada H, Grupp SA, Seeger R, Reynolds CP, Buxton A, Reisfeld RA, Gillies SD, Cohn SL, Maris JM, Sondel PM. Anti-GD2 Antibody with GM-CSF, Interleukin-2, and Isotretinoin for Neuroblastoma. *N Engl J Med.* 2010 Sep 30;363(14):1324–34.
20. Ladenstein R, Pötschger U, Valteau-Couanet D, Luksch R, Castel V, Yaniv I, Laureys G, Brock P, Michon JM, Owens C, Trahair T, Chan GCF, Ruud E, Schroeder H, Beck Popovic M, Schreier G, Loibner H, Ambros P, Holmes K, Castellani MR, Gaze MN, Garaventa A, Pearson ADJ, Lode HN. Interleukin 2 with anti-GD2 antibody ch14.18/CHO (dinutuximab beta) in patients with high-risk neuroblastoma (HR-NBL1/SIOPEN): a multicentre, randomised, phase 3 trial.

Lancet Oncol. 2018 Dec;19(12):1617–29.

21. Troschke-Meurer S, Siebert N, Marx M, Zumpe M, Ehlert K, Mutschlechner O, Loibner H, Ladenstein R, Lode HN. Low CD4⁺/CD25⁺/CD127⁻ regulatory T cell- and high INF- γ levels are associated with improved survival of neuroblastoma patients treated with long-term infusion of ch14.18/CHO combined with interleukin-2. *OncoImmunology*. 2019 Dec 2;8(12):1661194.
22. Klein C, Waldhauer I, Nicolini VG, Freimoser-Grundschober A, Nayak T, Vugts DJ, Dunn C, Bolijn M, Benz J, Stihle M, Lang S, Roemmele M, Hofer T, Van Puijenbroek E, Wittig D, Moser S, Ast O, Brünker P, Gorr IH, Neumann S, De Vera Mudry MC, Hinton H, Cramer F, Saro J, Evers S, Gerdes C, Bacac M, Van Dongen G, Moessner E, Umaña P. Cergutuzumab amunaleukin (CEA-IL2v), a CEA-targeted IL-2 variant-based immunocytokine for combination cancer immunotherapy: Overcoming limitations of aldesleukin and conventional IL-2-based immunocytokines. *OncoImmunology*. 2017 Mar 4;6(3):e1277306.
23. Flynn MJ, Hartley JA. The emerging role of anti-CD25 directed therapies as both immune modulators and targeted agents in cancer. *Br J Haematol*. 2017;179(1):20–35.
24. Rech AJ, Mick R, Martin S, Recio A, Aqui NA, Powell DJ, Colligon TA, Trosko JA, Leinbach LI, Pletcher CH, Tweed CK, DeMichele A, Fox KR, Domchek SM, Riley JL, Vonderheide RH. CD25 Blockade Depletes and Selectively Reprograms Regulatory T Cells in Concert with Immunotherapy in Cancer Patients. *Sci Transl Med*. 2012 May 16;4(134):134ra62-134ra62.
25. Tanaka A, Sakaguchi S. Targeting Treg cells in cancer immunotherapy. *Eur J Immunol*. 2019;49(8):1140–6.
26. Chen X, Ai X, Wu C, Wang H, Zeng G, Yang P, Liu G. A novel human IL-2 mutein with minimal systemic toxicity exerts greater antitumor efficacy than wild-type IL-2. *Cell Death Dis*. 2018 Sep 24;9(10):1–12.
27. Krieg C, Létourneau S, Pantaleo G, Boyman O. Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2010 Jun 29;107(26):11906–11.
28. Xing F, Saidou J, Watabe K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci J Virtual Libr*. 2010 Jan 1;15:166–79.
29. Liu T, Han C, Wang S, Fang P, Ma Z, Xu L, Yin R. Cancer-associated fibroblasts: an emerging target of anti-cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol*. 2019 Aug 28;12(1):86.

30. Liu T, Zhou L, Li D, Andl T, Zhang Y. Cancer-Associated Fibroblasts Build and Secure the Tumor Microenvironment. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2019 Apr 24 [cited 2024 Jul 11];7. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2019.00060/full>
31. Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, DeNardo DG, Egeblad M, Evans RM, Fearon D, Greten FR, Hingorani SR, Hunter T, Hynes RO, Jain RK, Janowitz T, Jorgensen C, Kimmelman AC, Kolonin MG, Maki RG, Powers RS, Puré E, Ramirez DC, Scherz-Shouval R, Sherman MH, Stewart S, Tlsty TD, Tuveson DA, Watt FM, Weaver V, Weeraratna AT, Werb Z. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer*. 2020 Mar;20(3):174–86.
32. Blavier L, Yang RM, DeClerck YA. The Tumor Microenvironment in Neuroblastoma: New Players, New Mechanisms of Interaction and New Perspectives. *Cancers*. 2020 Oct;12(10):2912.
33. Hashimoto O, Yoshida M, Koma Y, Yanai T, Hasegawa D, Kosaka Y, Nishimura N, Yokozaki H. Collaboration of cancer-associated fibroblasts and tumour-associated macrophages for neuroblastoma development. *J Pathol*. 2016 Oct;240(2):211–23.
34. Aertgeerts K, Levin I, Shi L, Snell GP, Jennings A, Prasad GS, Zhang Y, Kraus ML, Salakian S, Sridhar V, Wijnands R, Tennant MG. Structural and Kinetic Analysis of the Substrate Specificity of Human Fibroblast Activation Protein α *. *J Biol Chem*. 2005 May 20;280(20):19441–4.
35. Dolznig H, Schweifer N, Puri C, Kraut N, Rettig WJ, Kerjaschki D, Garin-Chesa P. Characterization of cancer stroma markers: In silico analysis of an mRNA expression database for fibroblast activation protein and endosialin. *Cancer Immun*. 2005 Jan 1;5(1):10.
36. Garin-Chesa P, Old LJ, Rettig WJ. Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci*. 1990 Sep;87(18):7235–9.
37. Fitzgerald AA, Weiner LM. The role of fibroblast activation protein in health and malignancy. *Cancer Metastasis Rev*. 2020 Sep 1;39(3):783–803.
38. Siebert N, Seidel D, Eger C, Jüttner M, Lode HN. Functional Bioassays for Immune Monitoring of High-Risk Neuroblastoma Patients Treated with ch14.18/CHO Anti-GD2 Antibody. Busson P, editor. *PLoS ONE*. 2014 Sep 16;9(9):e107692.
39. Siebert N, Leopold J, Zumpe M, Troschke-Meurer S, Biskupski S, Zikoridse A, Lode HN.

The Immunocytokine FAP-IL-2v Enhances Anti-Neuroblastoma Efficacy of the Anti-GD2 Antibody Dinutuximab Beta. *Cancers*. 2022 Oct 4;14(19):4842.

40. Siebert N, Zumpe M, Von Lojewski L, Troschke-Meurer S, Marx M, Lode HN. Reduction of CD11b⁺ myeloid suppressive cells augments anti-neuroblastoma immune response induced by the anti-GD2-antibody ch14.18/CHO. *OncoImmunology*. 2020 Jan;9(1):1836768.

41. Zeine R, Salwen HR, Peddinti R, Tian Y, Guerrero L, Yang Q, Chlenski A, Cohn SL. Presence of cancer-associated fibroblasts inversely correlates with Schwannian stroma in neuroblastoma tumors. *Mod Pathol*. 2009 Jul;22(7):950–8.

42. Siebert N, Zumpe M, Jüttner M, Troschke-Meurer S, Lode HN. PD-1 blockade augments anti-neuroblastoma immune response induced by anti-GD₂ antibody ch14.18/CHO. *OncoImmunology*. 2017 Oct 3;6(10):e1343775.

43. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, Frosina D, Gnjjatic S, Ambrosone C, Kepner J, Odunsi T, Ritter G, Lele S, Chen YT, Ohtani H, Old LJ, Odunsi K. Intraepithelial CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8⁺/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci*. 2005 Dec 20;102(51):18538–43.

44. Semeraro M, Adam J, Stoll G, Louvet E, Chaba K, Poirier-Colame V, Sauvat A, Senovilla L, Vacchelli E, Bloy N, Humeau J, Buque A, Kepp O, Zitvogel L, André F, Mathieu MC, Delaloge S, Kroemer G. The ratio of CD8⁺/FOXP3 T lymphocytes infiltrating breast tissues predicts the relapse of ductal carcinoma in situ. *OncoImmunology*. 2016 Oct 2;5(10):e1218106.

45. Shen Z, Zhou S, Wang Y, Li R lun, Zhong C, Liang C, Sun Y. Higher intratumoral infiltrated Foxp3⁺ Treg numbers and Foxp3⁺/CD8⁺ ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010 Oct 1;136(10):1585–95.

46. Sideras K, Galjart B, Vasaturo A, Pedroza-Gonzalez A, Biermann K, Mancham S, Nigg AL, Hansen BE, Stoop HA, Zhou G, Verhoef C, Sleijfer S, Sprengers D, Kwekkeboom J, Bruno MJ. Prognostic value of intra-tumoral CD8⁺/FoxP3⁺ lymphocyte ratio in patients with resected colorectal cancer liver metastasis. *J Surg Oncol*. 2018;118(1):68–76.

47. Solis-Castillo LA, Garcia-Romo GS, Diaz-Rodriguez A, Reyes-Hernandez D, Tellez-Rivera E, Rosales-Garcia VH, Mendez-Cruz AR, Jimenez-Flores JR, Villafana-Vazquez VH, Pedroza-Gonzalez A. Tumor-infiltrating regulatory T cells, CD8/Treg ratio, and cancer stem cells are correlated with lymph node metastasis in patients with early breast cancer. *Breast Cancer*. 2020 Sep 1;27(5):837–49.

48. Waldhauer I, Gonzalez-Nicolini V, Freimoser-Grundschober A, Nayak TK, Fahrni L, Hosse RJ, Gerrits D, Geven EJW, Sam J, Lang S, Bommer E, Steinhart V, Husar E, Colombetti S, Van Puijtenbroek E, Neubauer M, Cline JM, Garg PK, Dugan G, Cavallo F, Acuna G, Charo J, Teichgräber V, Evers S, Boerman OC, Bacac M, Moessner E, Umaña P, Klein C. Simlukafusp alfa (FAP-IL2v) immunocytokine is a versatile combination partner for cancer immunotherapy. *mAbs*. 2021 Jan 1;13(1):1913791.
49. Arnold JN, Magiera L, Kraman M, Fearon DT. Tumoral Immune Suppression by Macrophages Expressing Fibroblast Activation Protein- α and Heme Oxygenase-1. *Cancer Immunol Res*. 2014 Feb 3;2(2):121–6.
50. Bao R, Spranger S, Hernandez K, Zha Y, Pytel P, Luke JJ, Gajewski TF, Volchenboum SL, Cohn SL, Desai AV. Immunogenomic determinants of tumor microenvironment correlate with superior survival in high-risk neuroblastoma. *J Immunother Cancer*. 2021 Jul;9(7):e002417.
51. Chowdhury F, Dunn S, Mitchell S, Mellows T, Ashton-Key M, Gray JC. PD-L1 and CD8+PD1+ lymphocytes exist as targets in the pediatric tumor microenvironment for immunomodulatory therapy. *OncoImmunology*. 2015 Oct 3;4(10):e1029701.
52. Song M, Huang Y, Hong Y, Liu J, Zhu J, Lu S, Wang J, Sun F, Huang J, Xu J, Tang Y, Xia JC, Zhang Y. PD-L1-expressing natural killer cells predict favorable prognosis and response to PD-1/PD-L1 blockade in neuroblastoma. *OncoImmunology*. 2024 Dec 31;13(1):2289738.
53. Siebert N, Zumpe M, Schwencke CH, Biskupski S, Troschke-Meurer S, Leopold J, Zikoridse A, Lode HN. Combined Blockade of TIGIT and PD-L1 Enhances Anti-Neuroblastoma Efficacy of GD2-Directed Immunotherapy with Dinutuximab Beta. *Cancers*. 2023 Jun 23;15(13):3317.
54. Ehlert K, Hansjuergens I, Zinke A, Otto S, Siebert N, Henze G, Lode H. Nivolumab and dinutuximab beta in two patients with refractory neuroblastoma. *J Immunother Cancer*. 2020 May 15;8(1):e000540.
55. Nguyen R, Moustaki A, Norrie JL, Brown S, Akers WJ, Shirinifard A, Dyer MA. Interleukin-15 Enhances Anti-GD2 Antibody-Mediated Cytotoxicity in an Orthotopic PDX Model of Neuroblastoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2019 Dec 15;25(24):7554–64.
56. Miller JS, Morishima C, McNeel DG, Patel MR, Kohrt HEK, Thompson JA, Sondel PM, Wakelee HA, Disis ML, Kaiser JC, Cheever MA, Streicher H, Creekmore SP, Waldmann TA, Conlon KC. A First-in-Human Phase I Study of Subcutaneous Outpatient Recombinant Human IL15 (rhIL15) in Adults with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2018 Apr 2;24(7):1525–

35.

57. Pistoia V, Morandi F, Bianchi G, Pezzolo A, Prigione I, Raffaghello L. Immunosuppressive Microenvironment in Neuroblastoma. *Front Oncol* [Internet]. 2013 Jun 26;3. Available from:

<https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2013.00167/full>

58. Joshi S. Targeting the Tumor Microenvironment in Neuroblastoma: Recent Advances and Future Directions. *Cancers*. 2020 Aug;12(8):2057.

59. Tumino N, Weber G, Besi F, Del Bufalo F, Bertaina V, Paci P, Quatrini L, Antonucci L, Sinibaldi M, Quintarelli C, Maggi E, De Angelis B, Locatelli F, Moretta L, Vacca P, Caruana I. Polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells impair the anti-tumor efficacy of GD2.CAR T-cells in patients with neuroblastoma. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol*. 2021 Nov 12;14(1):191.

60. Ishfaq M, Pham T, Beaman C, Tamayo P, Yu AL, Joshi S. BTK Inhibition Reverses MDSC-Mediated Immunosuppression and Enhances Response to Anti-PDL1 Therapy in Neuroblastoma. *Cancers*. 2021 Feb 16;13(4):817.

61. Song L, Asgharzadeh S, Salo J, Engell K, Wu H wei, Sposto R, Ara T, Silverman AM, DeClerck YA, Seeger RC, Metelitsa LS. α 24-invariant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor-associated macrophages. *J Clin Invest*. 2009 Jun 1;119(6):1524–36.

62. Glabman RA, Choyke PL, Sato N. Cancer-Associated Fibroblasts: Tumorigenicity and Targeting for Cancer Therapy. *Cancers*. 2022 Jan;14(16):3906.

63. Borriello L, Nakata R, Sheard MA, Fernandez GE, Sposto R, Malvar J, Blavier L, Shimada H, Asgharzadeh S, Seeger RC, DeClerck YA. Cancer-Associated Fibroblasts Share Characteristics and Protumorigenic Activity with Mesenchymal Stromal Cells. *Cancer Res*. 2017 Sep 14;77(18):5142–57.

64. Troschke-Meurer S, Zumpe M, Meißner L, Siebert N, Grabarczyk P, Forkel H, Maletzki C, Bekeschus S, Lode HN. Chemotherapeutics Used for High-Risk Neuroblastoma Therapy Improve the Efficacy of Anti-GD2 Antibody Dinutuximab Beta in Preclinical Spheroid Models. *Cancers*. 2023 Jan;15(3):904.

65. Lode HN, Ladenstein R, Troschke-Meurer S, Struppe L, Siebert N, Zumpe M, Ehlert K, Huber S, Glogova E, Hundsdorfer P, Eggert A, Zaniewska-Tekieli A, Balwierz W, Wiczorek A. Effect and Tolerance of N5 and N6 Chemotherapy Cycles in Combination with Dinutuximab Beta in Relapsed High-Risk Neuroblastoma Patients Who Failed at Least One Second-Line Therapy. *Cancers*. 2023 Jan;15(13):3364.

66. Steeghs N, Gomez-Roca C, Rohrberg KS, Mau-Sørensen M, Robbrecht D, Tabernero J, Ahmed S, Rodriguez-Ruiz ME, Ardeshir C, Schmid D, Sleiman N, Watson C, Piper-Lepoutre H, Dejardin D, Evers S, Boetsch C, Charo J, Teichgräber V, Melero I. Safety, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Antitumor Activity from a Phase I Study of Simlukafusp Alfa (FAP-IL2v) in Advanced/Metastatic Solid Tumors. *Clin Cancer Res.* 2024 Jul 1;30(13):2693–701.

Veröffentlichungen

1. Siebert, N.*; **Leopold, J.***; Zumpe, M.; Troschke-Meurer, S.; Biskupski, S.; Zikoridse, A.; Lode, H.N. The Immunocytokine FAP-IL-2v Enhances Anti-Neuroblastoma Efficacy of the Anti-GD₂ Antibody Dinutuximab Beta. *Cancers* **2022**, *14*, 4842. <https://doi.org/10.3390/cancers14194842>
* authors contributed equally to the publication
2. Siebert, N.; Zumpe, M.; Schwencke, C.H.; Biskupski, S.; Troschke-Meurer, S.; **Leopold, J.**; Zikoridse, A.; Lode, H.N. Combined Blockade of TIGIT and PD-L1 Enhances Anti-Neuroblastoma Efficacy of GD2-Directed Immunotherapy with Dinutuximab Beta. *Cancers* **2023**, *15*, 3317.
<https://doi.org/10.3390/cancers15133317>

Article

The Immunocytokine FAP-IL-2v Enhances Anti-Neuroblastoma Efficacy of the Anti-GD₂ Antibody Dinutuximab Beta

Nikolai Siebert ^{*,†}, Justus Leopold [†], Maxi Zumpe , Sascha Troschke-Meurer , Simon Biskupski, Alexander Zikoridse and Holger N. Lode ^{*}

Department of Pediatric Oncology and Hematology, University Medicine Greifswald, 17475 Greifswald, Germany

* Correspondence: nikolai.siebert@med.uni-greifswald.de (N.S.); holger.lode@uni-greifswald.de (H.N.L.);

Tel.: +49-3834-86-6329 (N.S.); +49-3834-86-6300 (H.N.L.)

† These authors contributed equally to this work.

Simple Summary: Since IL-2 co-treatment did not show any therapeutic benefit in the GD₂-directed treatment of high-risk neuroblastoma (NB) but strongly induced regulatory T cells (Treg), we investigated here the immunocytokine FAP-IL-2v stimulating NK and cytotoxic T cells without induction of Treg. We first detected FAP on NB- and myeloid-derived suppressor cells (MDCS) in tumor tissue and showed a tumor-cell-dependent enhancement in FAP expression by fibroblasts. Treatment of leukocytes with FAP-IL-2v increased ADCC mediated by the anti-GD₂ antibody dinutuximab beta (DB) against NB cells. We next evaluated the antitumor efficacy of a combinatorial immunotherapy by applying DB and FAP-IL-2v and observed strongly reduced tumor growth and improved survival in experimental mice. Analysis of tumor tissue revealed increased NK and cytotoxic T cell numbers and reduced Treg compared to controls. Our data show that FAP-IL-2v is a potent immunocytokine that augments the efficacy of DB against NB, providing a promising alternative to IL-2.



Citation: Siebert, N.; Leopold, J.; Zumpe, M.; Troschke-Meurer, S.; Biskupski, S.; Zikoridse, A.; Lode, H.N. The Immunocytokine FAP-IL-2v Enhances Anti-Neuroblastoma Efficacy of the Anti-GD₂ Antibody Dinutuximab Beta. *Cancers* **2022**, *14*, 4842. <https://doi.org/10.3390/cancers14194842>

Academic Editor: David Wong

Received: 8 September 2022

Accepted: 29 September 2022

Published: 4 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Treatment of high-risk neuroblastoma (NB) patients with the anti-GD₂ antibody (Ab) dinutuximab beta (DB) improves survival by 15%. Ab-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) is the major mechanism of action and is primarily mediated by NK cells. Since IL-2 co-treatment did not show a therapeutic benefit but strongly induced Treg, we investigated here a DB-based immunotherapy combined with the immunocytokine FAP-IL-2v, which comprises a fibroblast activation protein α (FAP)-specific Ab linked to a mutated IL-2 variant (IL-2v) with abolished binding to the high-affinity IL-2 receptor, thus stimulating NK cells without induction of Treg. Effects of FAP-IL-2v on NK cells, Treg and ADCC mediated by DB, as well as FAP expression in NB, were investigated by flow cytometry, calcein-AM-based cytotoxicity assay and RT-PCR analysis. Moreover, the impact of soluble factors released from tumor cells on FAP expression by primary fibroblasts was assessed. Finally, a combined immunotherapy with DB and FAP-IL-2v was evaluated using a resistant syngeneic murine NB model. Incubation of leukocytes with FAP-IL-2v enhanced DB-specific ADCC without induction of Treg. FAP expression on NB cells and myeloid-derived suppressor cells (MDCS) in tumor tissue was identified. A tumor-cell-dependent enhancement in FAP expression by primary fibroblasts was demonstrated. Combination with DB and FAP-IL-2v resulted in reduced tumor growth and improved survival. Analysis of tumor tissue revealed increased NK and cytotoxic T cell numbers and reduced Treg compared to controls. Our data show that FAP-IL-2v is a potent immunocytokine that augments the efficacy of DB against NB, providing a promising alternative to IL-2.

Keywords: neuroblastoma; immunotherapy; dinutuximab beta; fibroblast activation protein α ; FAP-IL-2v; myeloid-derived suppressor cells

1. Introduction

Neuroblastoma (NB) is a malignant disease of childhood with a poor prognosis in the high-risk group [1]. In Europe, treatment of high-risk NB patients with the chimeric anti-GD₂

antibody (Ab) dinutuximab beta (DB) in combination with the immune stimulating cytokine interleukin-2 (IL-2) resulted in a 15% improvement in 5-year survival compared to the standard treatment [2]. Therapeutic Ab directed against tumor antigens mediates antitumor effects primarily through the induction of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), whereby natural killer (NK) cells are the major effector cells. Indeed, it was shown that the depletion of NK cells resulted in the complete abrogation of the antitumor effects mediated by DB [3]. The rationale of combining DB with IL-2 for NB treatment was based on the stimulating effects of IL-2 on NK cells. However, evaluation of the progression-free (PFS) and overall survival (OS) probabilities in high-risk NB patients treated with or without IL-2 did not reveal any additional treatment benefit of IL-2, while higher treatment-related toxicity was observed in the patients who additionally received IL-2 [4]. Although administration of IL-2 resulted in an approximately three-fold increase in cytotoxic NK cells [5], thus confirming the rationale of using IL-2 in combination with DB, the undesired strong expansion of regulatory T cells (Treg) with increased levels over 20-fold compared to the baseline was also detected in the patients of the combinatorial cohort [5]. These results explain in part the unexpected absence of the clinical benefit of IL-2.

The use of alternative immune-stimulating agents that do not preferentially induce immune-inhibiting cells may provide an alternative. One promising molecule in this context is the mutated variant of IL-2 (IL-2v), with reduced binding to the IL-2RA subunit of the high-affinity trimeric IL-2 receptor (IL-2RABG; A, B and G for α (CD25), β (CD122) and γ receptor chain (CD132)) [6] expressed by Treg but with efficient binding to the intermediate-affinity dimeric IL-2RBG [6] expressed by NK and resting T cells. Recently, the proliferation of NK cells and effective activation of cytotoxic T cells without preferential activation of Treg has been shown *in vitro* after incubation of peripheral blood mononuclear cells with IL-2v conjugated with an Ab against the fibroblast activation protein α (FAP) [7]. Due to abolished Fc γ receptor binding (P329G LALA mutations), FAP-IL-2v does not induce ADCC against FAP-positive cells and serves as a vehicle for IL-2v, transporting it into the tumor microenvironment. Importantly, the activating effects of FAP-IL-2v on effector cells by IL-2v has been shown to be translated into the considerably enhanced antitumor activity of these effector cells against tumor cells mediated by the therapeutic Ab [7], thus clearly showing advantageous therapeutic effects compared to the non-modified IL-2.

Moreover, as the administration of cytokines is known to be associated with systemic side effects, the usage of immunocytokines (tumor-specific Ab genetically linked to cytokines) transporting cytokines directly into the site of tumor could overcome this obstacle. A common tumor-associated antigen is the fibroblast-activating protein (FAP), which is detectable in tumor tissue of different malignancies. FAP is a dimeric protease localized primarily on the cell surfaces of cancer-associated fibroblasts (CAFs), which have been shown to play a protumoral role [8]. Generally, CAFs are known to increase tumor cell invasion, angiogenesis and tumor growth and their presence correlates with a poor prognosis [8]. Importantly, CAFs have been detected in NB [9], thus suggesting FAP targeting as a promising therapeutic strategy against this aggressive tumor. Based on these observations, we hypothesized that a combinatorial treatment of NB with DB and the immunocytokine FAP-IL-2v can further augment the antitumor efficacy of DB.

In the present study, we first investigated the effects of FAP-IL-2v on Treg and ADCC mediated by DB against NB cells. Next, we assessed FAP expression by primary and well-known NB cells, as well as in a murine NB tumor tissue. We then investigated the impact of soluble factors released from tumor cells on FAP expression by primary fibroblasts isolated from murine skin tissue. Finally, we evaluated the antitumor efficacy of the combinatorial treatment with DB and FAP-IL-2v *in vivo* using our syngeneic murine-resistant NB model, followed by the analysis of tumor-infiltrating effector cells.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Statement

All procedures involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Informed consent was obtained from all individual participants (Ethics Board of the Medical Faculty of the University Greifswald, approval code number: BB 014/14, 24 January 2014). All procedures involving animal experiments were approved by the animal welfare committee (Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern, approval code number: LALLF M-V/7221.3-1-011/20, 7 September 2020) and approved and supervised by the commissioner for animal welfare at the University Medicine Greifswald representing the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

2.2. Cell Cultivation

The human NB cell lines CHLA-20, CHLA-90, CHLA-136 and CHLA-172, as well as in-house-established cell lines from tumor samples derived from high-risk NB patients (HGW-1, HGW-3, HGW-5) [10] and the newly established cell line HGW-B, were cultivated in IMDM (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) supplemented with 4 mM stable glutamine (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 30 U/mL penicillin and 0.03 mg/mL streptomycin (0.3× P/S; PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) and 20% FBS Good (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany). The primary cell line HGW-B was established as described for the cell lines HGW-1, HGW-3, HGW-5 [10]. The human NB cells Kelly, SMS-KCN and LAN-1 were cultivated in RPMI 1640 (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany) supplemented with 2 mM stable glutamine, 0.3× P/S and 10% Sera Plus (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany). The human FAP-positive cell line Wi-38 served as a positive control was cultivated in DMEM (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany) supplemented with 2 mM stable glutamine, 0.3× P/S, 15% FBS Good and 1× NEAA (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany). The murine NB cells NXS2-HGW [11,12] used for the tumor cell implantation in vivo were cultivated in DMEM supplemented with 2 mM stable glutamine, 0.3× P/S and 10% FBS Good. Primary adult murine fibroblasts (PAMF) isolated from skin tissue of A/J mice were cultivated in DMEM supplemented with 4 mM stable glutamine, 0.3× P/S, 1× ITS (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany) and 15% FBS Good. Prior to cultivation, mycoplasma contamination analysis was performed for every cell line using the MYCOALERT Detection Kit (Lonza Cologne GmbH, Cologne, Germany). Only mycoplasma-negative cell lines were used for experiments. All cell lines were passaged no more than 30 times.

2.3. ADCC

To analyze effects of FAP-IL-2v on the cellular cytotoxic activity of effector cells (ADCC) mediated by DB, a non-radioactive calcein-AM-based cytotoxicity assay was used, as previously described [10]. Briefly, leukocytes of healthy donors were cultivated for five days using RPMI 1640 (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany) supplemented with 2 mM stable glutamine, 0.3× P/S and 10% Sera Plus (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany). To show the effects of FAP-IL-2v on ADCC, culture medium was supplemented with 1 µg/mL/day of FAP-IL-2v. Untreated leukocytes and leukocytes incubated with IL-2 (3000 IU/mL/day) served as controls. To induce ADCC against NB cells, DB (10 µg/mL) and an effector-to-target cell ratio of 40:1 were used. The GD₂-positive human NB cells LAN-1 (5000 cells/well) served as targets cells. The GD₂ specificity of ADCC was confirmed using the anti-idiotypic Ab ganglidiomab [13]. The DB-independent cytotoxicity of leukocytes (AICC, antibody-independent cellular cytotoxicity) was evaluated by incubation of leukocytes with tumor cells with rituximab.

2.4. Isolation of PAMF

To assess FAP expression by primary fibroblasts and address whether the injection of syngeneic NB cells in combination with primary fibroblasts results in the development of CAF-positive tumors, we first isolated fibroblasts from the skin tissue of female adult A/J mice. After mice were sacrificed, the fur was removed with hair removal cream. Following disinfection (70% ethanol), skin samples were extracted and cut into small pieces of around 2×2 mm size using a scalpel. Tissue samples were then enzymatically digested using a Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) for 90 min at 37°C . To remove debris, the samples were then filtered using a $70\ \mu\text{m}$ cell strainer. The obtained single-cell solution was finally cultivated in PAMF-specific medium, as described above.

2.5. Analysis of Tumor-Cell-Dependent Impact of FAP Expression by PAMF

To evaluate the effects of soluble factors released by NB cells on the FAP expression on primary fibroblasts, PAMF were cultivated with tumor-conditioned medium (TCM) followed by flow cytometry analysis of FAP. For this, 1×10^4 PAMF of the first or second passage was seeded and cultivated for 24 h. Thereafter, 50% of the culture medium was replaced with the tumor-conditioned medium harvested after 48 h cultivation of the murine NB cells NXS2-HGW.

Finally, the treated cells were harvested and used for flow cytometry analysis.

2.6. Establishment of a Resistant Version of the NB Model In Vivo

Since the immunotherapy with DB (i.p., five consecutive days, 3 mg/kg bw/day, start of treatment: four days after tumor cell implantation) showed strong antitumor efficacy against NB in our syngeneic tumor model, resulting in constant tumor regression [12,14], we aimed to establish a more resistant version of this model allowing the evaluation of different therapeutic agents in combination with DB. For this, we started DB treatments in a later tumor growth phase. The new treatment protocol was established by the comparison of the following three time points at which the DB immunotherapy was started: day 11, 12 and 14. Briefly, for all in vivo experiments, mice were randomized prior to tumor cell injection. Female 11-week-old A/J mice (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) were granted a two-week acclimatization time, accommodated in groups of maximum 6 animals in standard animal laboratories (12 h light/dark cycle, $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ room temperature, $60\% \pm 20\%$ humidity) with ad libitum access to water and standard laboratory chow. Mice of all experimental groups were subcutaneously injected with 2×10^6 tumor cells on the left ventral flank, followed by the DB immunotherapy (i.p., five consecutive days, 3 mg/kg/day bw). Untreated controls received an equivalent volume of 0.9% NaCl. The treatments were started either on day 8 or day 11 or day 14 after tumor cell implantation. Tumor and/or treatment burden parameters [12] were assessed every two days after tumor cell injection and daily starting on day 8. Tumors were measured using a caliper, followed by tumor volume calculation according to the formula $(\text{length} \times \text{width} \times \text{height})/2$. Mice were sacrificed when tumors exceeded $750\ \text{mm}^3$. For those mice killed ahead of schedule, the tumor volume data of the last measurement were included into the calculation of the group-specific average volumes at the subsequent time points.

After a more resistant version of our syngeneic tumor model was established, the new treatment protocol was used in the following in vivo experiments for the evaluation of the antitumor efficacy of the combinatorial therapy with FAP-IL-2v and DB.

2.7. Induction of CAF Development in Tumor Tissue In Vivo

Prior to the evaluation of the antitumor efficacy of the combinatorial treatment, we investigated whether injection of the tumor cells NXS2-HGW in combination with the syngeneic PAMF led to the development of CAFs in tumor tissue. For this, mice of an additional experimental group were subcutaneously injected in the left ventral flank with 2×10^6 tumor cells in combination with 1×10^6 PAMF ($\geq 95\%$ viability). Prior to this, PAMF were isolated from murine skin tissue and cultivated for one week, as described above.

2.8. Evaluation of Antitumor Effects of Combinatorial Immunotherapy with DB and FAP-IL-2v

To evaluate the treatment efficacy of DB in combination with FAP-IL-2v, a lethal syngeneic murine NB model in a more resistant version was used, as described above. Mice were treated i.p. with DB (five consecutive days, 3 mg/kg/day bw) or FAP-IL-2v Ab (twice a week, 1 mg/kg bw) or with a combination of both. Untreated controls received the equivalent volumes of 0.9% NaCl. Moreover, to show IL-2-dependent effects, mice of an additional control group were treated with IL-2 (twice a week, 3×10^6 IU/kg bw/day).

2.9. Flow Cytometry

To identify different populations of tumor-infiltrating leukocytes or fibroblasts or to determine the surface abundance of FAP in different cell types, flow cytometry analysis was performed. For this, PE-labeled anti-human anti-FAP Ab (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) or rabbit anti human/mouse anti-FAP (Abcam plc, Cambridge, UK) and respective PE-labeled Fc-specific secondary Ab (Abcam plc, Cambridge, UK) were used. NB cells were detected using the Alexa Fluor647-labeled anti-GD₂ chimeric Ab DB. Fibroblasts were identified using FITC-labeled anti-mouse anti-CD140a REAfinity Ab (Miltenyi Biotec, Teterow, Germany). For detection of different tumor-infiltrating leukocyte populations described below, the following Ab were utilized: APC-Vio[®] 770-labeled anti-mouse CD3 REAfinity[™] Ab, VioGreen[™]-labeled anti-mouse CD4 Antibody REAfinity[™], PerCP-labeled anti-mouse CD8a REAfinity[™] Ab, Vio[®] Bright FITC-labeled anti-mouse CD11b REAfinity[™] Ab, PE-Vio[®] 770-labeled anti-mouse CD25 REAfinity[™] Ab, PE-labeled anti-mouse CD335 REAfinity[™] Ab, APC-labeled anti-mouse FoxP3 REAfinity[™] Ab (all Miltenyi Biotec, Teterow, Germany), APC/Cy-7-labeled anti-mouse Ly6C Ab and PerCP-labeled anti-mouse Ly6G Ab (BioLegend, San Diego, CA, USA). For every primary Ab, respective ITC were used to determine the potential background caused by nonspecific Ab binding.

First, primary tumors were resected from the experimental mice, followed by the preparation of tumor tissue single-cell suspensions using a Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotec, Teterow, Germany), according to the manufacturer's protocol. After assessment of cell numbers and viability, $1 \pm 2 \times 10^6$ cells were used for the analysis.

The following leukocyte populations were detected in murine tumor tissue using antigen-specific Ab: T cells (CD45+/CD3+), cytotoxic T cells (CD45+/CD3+/CD8+), NK cells (CD45+/CD3−/CD335+), Treg (CD3+/CD4+/CD25+/FoxP3+), CD11b-positive immune cells (CD45+/CD11b+), M-MDSC (CD45+/CD11b+/Ly6C^{high}/Ly6G−), PMN-MDSC (CD45+/CD11b+/Ly6C^{low}/Ly6G+) and Ly6C− and Ly6G-negative immune cells expressing CD11b (CD45+/CD11b+/Ly6C−/Ly6G−). Respective human leukocyte populations were identified as follows: NK cells (CD3−/CD56+), Treg (CD3+/CD4+/CD25+/CD127−).

To exclude unspecific binding of the detection Ab to Fc receptor-expressing cells, samples were first incubated with the FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec, Teterow, Germany). For intracellular staining, the FoxP3 Staining Buffer Set (Miltenyi Biotec, Teterow, Germany) was used according to the manufacturer's protocol. To exclude dead cells in the samples prepared for the detection of the cell surface antigens, 4 μL of a 0.1 mg/mL 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) solution was added 5 min prior to acquisition using a BD CANTO II cytometer and FACS Diva software (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). For the intracellular staining, Viability[™] 405/452 Fixable Dye (Miltenyi Biotec, Teterow, Germany) was used according to manufacturer's protocol. Data were analyzed with FlowJo V10 software (Ashland, OR, USA). Moreover, based on the flow cytometry results, the numbers of NK and cytotoxic T cells as well as Treg were calculated as a percentage of all viable tumor-infiltrating leukocytes and T cells, respectively. Additionally, the ratio of cytotoxic T cells to Treg was assessed.

2.10. Statistics

For statistical analysis, SigmaPlot software (Version 13.0, Jandel Scientific Software, San Rafael, CA, USA) was used. First, the acquired data sets were tested for normal distribution. Based on the outcome, either the Mann–Whitney-U-test or Student *t*-test, if

the assumption of normality was met, and analysis of variance (ANOVA) to compare more than two samples regarding the significance of a metric trait, were applied. All data are presented as mean \pm SEM (standard error of the mean). Survival probabilities (event-free survival (EFS)) were estimated using the LogRank test, and multiple comparison was done with the Holm–Sidak method for post-hoc testing. A tumor volume of 300 mm³ was defined as an event. A *p* value of <0.05 (* *p* or # *p*) was considered significant, <0.01 (** *p*) very significant and <0.001 highly significant (***) *p*.

3. Results

3.1. FAP-IL-2v Effects on ADCC Mediated by DB against NB Cells

To investigate whether the immunocytokine FAP-IL-2v augments ADCC mediated by DB against NB cells, we used a calcein-AM-based cytotoxicity assay. Untreated leukocytes and leukocytes incubated with IL-2 instead of FAP-IL-2v served as controls.

As expected, IL-2 treatment enhanced the cytotoxic activity of leukocytes against the GD₂-positive NB cells LAN-1 (Figure 1A) compared to the untreated controls. This effect was GD₂-specific, as incubation with the anti-idiotype Ab ganglidiomab completely abrogated ADCC, resulting in similar cytotoxicity levels compared to the negative control (AICC). Similar to the effects observed for IL-2, treatment of leukocytes with the immunocytokine FAP-IL-2v significantly increased ADCC mediated by DB (Figure 1A). An additional incubation with ganglidiomab confirmed the GD₂ specificity of the observed effects.

These data clearly show a positive effect of FAP-IL-2v on ADCC against NB cells mediated by DB.

3.2. FAP-IL-2v and IL-2 Effects on Treg

Next, we investigated effects of FAP-IL-2v on Treg. Leukocytes incubated with IL-2 served as controls. Additionally, the effects of both agents on NK cells and cytotoxic T cells (CD8+) were evaluated.

As expected, incubation of leukocytes with IL-2 resulted in a strong increase in Treg numbers compared to the untreated controls (Figure 1B). In contrast, we found similar numbers of Treg after the treatment of leukocytes with FAP-IL-2 compared to the negative control, clearly confirming the fact that IL-2v does not stimulate this cell population. Interestingly, we did not observe any change in the CD8+ and NK cell numbers compared to the untreated controls (Figure 1B).

In summary, incubation of leukocytes with FAP-IL-2v did not stimulate Treg, in contrast to the strong effects of IL-2, leading to an almost two-fold increase in their numbers. These data suggest the rationale of using FAP-IL-2v in combination with DB instead of IL-2.

3.3. FAP Expression by Neuroblastoma Cells

To investigate FAP expression by human NB cells, both well-known (CHLA-15, CHLA-20, CHLA-90, CHLA-136, CHLA-172, LAN-1, Kelly and SMS-KCN) and primary cell lines established from tumor samples derived from high-risk NB patients (HGW-1, HGW-3, HGW-5 and HGW-B) were analyzed by RT-PCR.

While most of the human cell lines analyzed were found to be FAP-negative, FAP mRNA was detected in the cell lines HGW-B, CHLA-90 and CHLA-172 (Figure 2A). Additional analysis of FAP surface abundance using flow cytometry confirmed our RT-PCR results, showing different levels of FAP for these three cell lines (Figure 2B).

These results show both FAP-positive and FAP-negative NB cells, suggesting FAP's role in NB.

3.4. Impact of Tumor Cells on FAP Expression by Primary Fibroblasts (PAMF)

Since soluble factors released by tumor cells can induce CAF development in tumor tissue [15,16], we investigated whether the expression of FAP by primary fibroblasts can be affected by the soluble factors released by the murine NB cells NXS2-HGW used in our *in vivo* experiments. We first isolated primary adult murine fibroblasts (PAMF) from the

skin of adult A/J mice, followed by the flow cytometry analysis of the basal FAP abundance (Figure 3A), as described in the Materials and Methods Section. Additionally, a fibroblast marker, CD140a, was used to identify fibroblasts by flow cytometry.

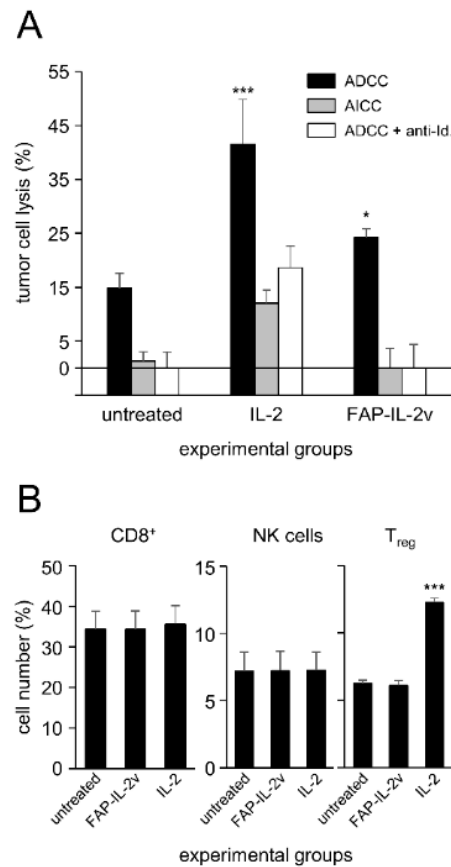


Figure 1. Analysis of FAP-IL-2v effects on GD₂-directed ADCC mediated by dinutuximab beta and on the number of cytotoxic T cells, NK cells and Treg. Leukocytes of healthy donors were treated with either FAP-IL-2v or IL-2 for five days, followed by the analysis of the DB ADCC against the GD₂-positive NB cells LAN-1 and flow cytometry analysis of different effector cell populations. Leukocytes cultivated without FAP-IL-2 and IL-2 served as negative controls (untreated). **(A)** ADCC (black columns) against tumor cells using DB and leukocytes treated with either FAP-IL-2 or IL-2 was assessed using a calcein-AM-based cytotoxicity assay. To show DB-independent tumor cells' lysis (AICC; grey columns) and the GD₂ specificity of the ADCC (white columns), additional samples were incubated with rituximab instead of DB and the anti-idiotype Ab of DB ganglidiomab, respectively. *t*-test. *** $p < 0.001$ vs. untreated ADCC; * $p < 0.05$ vs. untreated ADCC. **(B)** The effects of FAP-IL-2v and IL-2 on the number of cytotoxic T cells (CD8⁺), NK cells and Treg were analyzed using flow cytometry. Data are presented as % of the cells relative to all CD3⁺, lymphocytes and CD4⁺ cells for cytotoxic T cells, NK cells and Treg, respectively. ANOVA followed by appropriate post-hoc comparison test. *** $p < 0.001$ vs. untreated and FAP-IL-2v.

As expected, PAMF showed a clear signal for CD140a (Figure 3A). Similarly, flow cytometry analysis revealed a basal level of FAP (Figure 3A), thus confirming the suitability of both markers for fibroblast detection. Importantly, incubation of PAMF with tumor-conditioned medium (TCM) for 48 h resulted in a significant, approximately two-fold increase in FAP expression compared to the untreated control (Figure 3B). Interestingly, a TCM-dependent increase in CD140a was also observed (Figure 3C); however, the difference was not statistically significant.

These results clearly show a tumor-cell-dependent enhancement in FAP levels by primary fibroblasts, suggesting the NB-dependent induction of CAFs in tumor tissue.

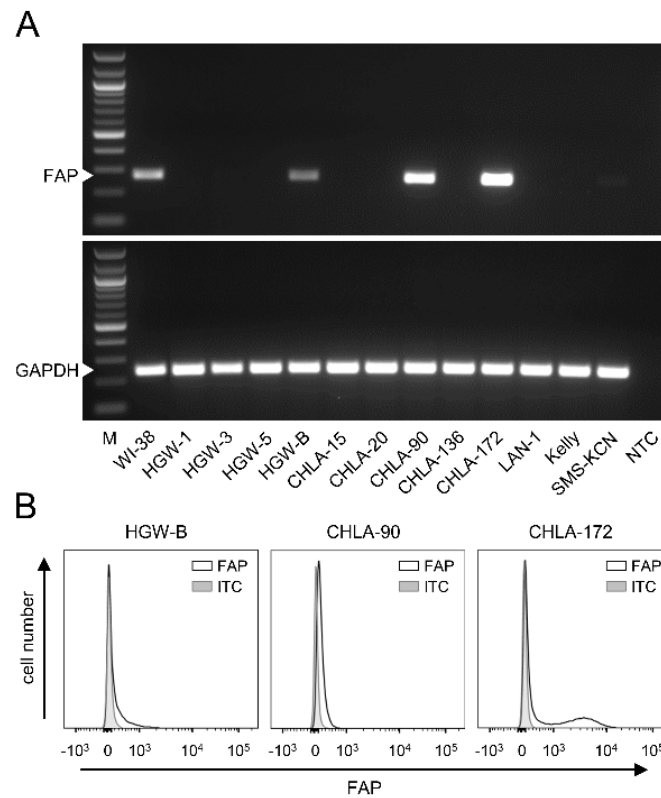


Figure 2. Analysis of FAP expression by human NB cells. **(A)** Representative images of the RT-PCR analysis of FAP mRNA levels (PCR product size: 268 bp) in NB cells derived from tumors of high-risk NB patients (HGW-1, HGW-3, HGW-5, HGW-B) and well-known NB cell lines (CHLA-15, CHLA-20, CHLA-90, CHLA-136, CHLA-172, LAN-1, Kelly, SMS-KCN). Human fibroblasts WI-38 were used as a positive and GAPDH (PCR product size: 238 bp) as an internal control. M: marker, NTC: no template control. **(B)** Representative histograms of the flow cytometry analysis of FAP abundance in human NB cells (HGW-B, CHLA-90, CHLA-172). Cells were stained with anti-human FAP-PE Ab (black curve) or appropriate ITC (grey-filled curve). Full gel images can be found at Supplementary Materials.

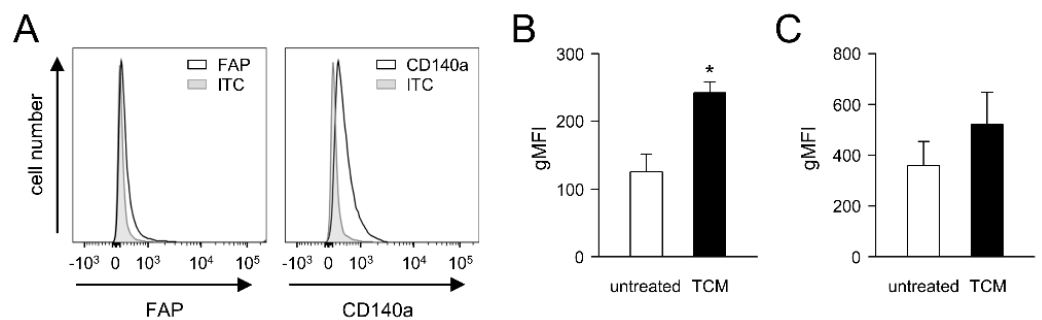


Figure 3. Analysis of tumor-cell-dependent effects on FAP abundance in PAMF. **(A)** Representative histograms of flow cytometry analysis of baseline levels of FAP and CD140a by PAMF. Primary fibroblasts were isolated from skin of female adult A/J mice and cultivated for up to two passages prior to analysis. Cells were then stained with mouse anti-FAP IgG and PE-labeled anti-murine IgG Ab, which served as primary and secondary Ab, respectively (black curve), and with FITC-labeled anti-mouse CD140a Ab or appropriate ITC (grey-filled curve). **(B,C)** Impact of soluble factors secreted by the tumor cells NXS2-HGW on FAP **(B)** and CD140a expression by PAMF **(C)**. PAMF were incubated with either TCM (TCM, black columns) or control medium for 48 h (untreated, open columns). Expression levels are presented as gMFI quantified according to the following formula: gMFI of sample—gMFI of ITC. *t*-test. * $p < 0.05$.

3.5. FAP Expression in Primary Murine Tumor Tissue

Next, we analyzed FAP mRNA levels in primary tumors collected from the experimental mice three weeks after s.c. injection of the syngeneic NB cells NXS2-HGW. RT-PCR analysis revealed a clear FAP signal in all tumor tissue samples analyzed (Figure 4A).

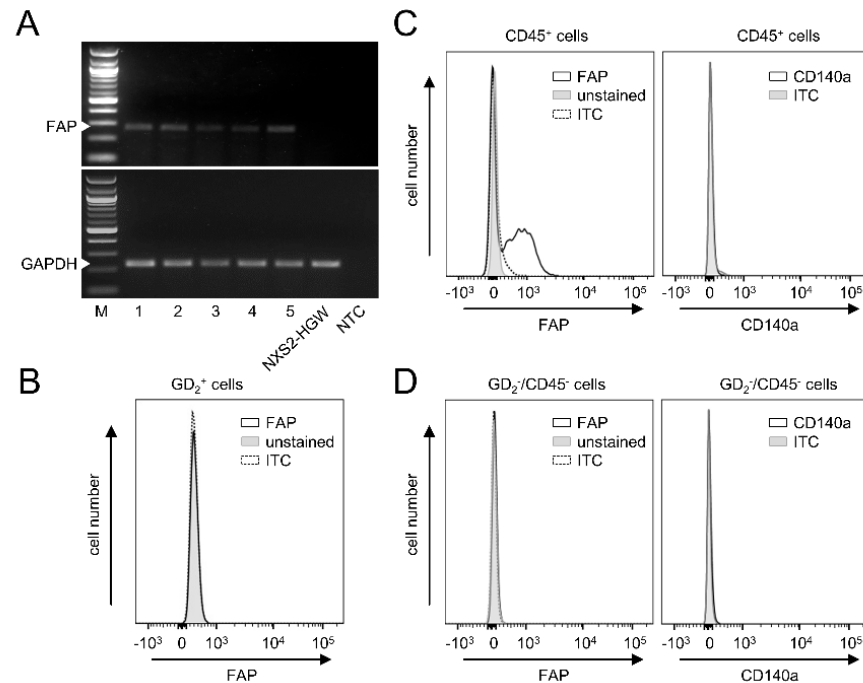


Figure 4. Analysis of FAP and CD140a expression in murine tumor tissue. (A) Representative images of the RT-PCR analysis of FAP mRNA levels (PCR product size: 268 bp) in five tumor tissue samples (1–5) and by the murine tumor cells NXS2-HGW that were used for tumor cell implantation. GAPDH (PCR product size: 238 bp) served as an internal control. M: marker, NTC: no template control. (B) A representative histogram of the flow cytometry analysis of FAP and CD140a abundance in the GD₂⁻ and CD45 double-negative cells within primary tumor tissue. Samples were collected when tumors reached a size of 750 mm³, followed by enzymatic digestion to obtain a single-cell solution. Samples were then stained with rabbit anti-mouse anti-FAP IgG and PE-labeled anti-rabbit IgG Ab, which served as primary and secondary Ab and FITC-labeled anti-mouse CD140a Ab, respectively (black curve), or appropriate ITC (black dashed curve). Unstained cells served as negative control (unstained; grey-filled curve). (C) A representative histogram of the flow cytometry analysis of FAP and CD140a abundance in the CD45-positive cells detected in tumor tissue. (D) A representative histogram of the flow cytometry analysis of FAP levels in NXS2-HGW cells that served for induction of primary tumors. Full gel images can be found at Supplementary Materials.

Interestingly, in contrast to the tumor tissue, we could not detect any FAP mRNA by the GD₂-positive murine NB cells NXS2-HGW that served for tumor establishment *in vivo* (Figure 4A). These results could be confirmed by flow cytometry, showing a lack of FAP by NXS2-HGW (Figure 4D).

Next, we analyzed which cell populations within the tumor tissue express FAP. We defined CAFs as double-positive cells for FAP and CD140a and double-negative cells for GD₂ (NB-specific marker) and CD45 (leukocyte-specific marker). Surprisingly, we could not detect CAFs in tumor tissue (Figure 4B), thus suggesting a lack of these cells in our model. Interestingly, FAP could be clearly detected by the CD45 cell population (Figure 4C), suggesting a role for FAP as a target in the tumor microenvironment expressed by tumor-infiltrating leukocytes.

In summary, our results show clear FAP expression in primary tumor tissue, thus showing the suitability of our syngeneic tumor model to test a combinatorial treatment with DB and the immunocytokine FAP-IL-2v. Since the NB cells that were used for tumor

implantation were found to be FAP-negative and we could not detect CAFs in the primary tumor tissue, we hypothesized FAP's role by tumor-infiltrating leukocytes.

Next, we investigated in more detail which cell populations of the tumor-infiltrating leukocytes express FAP. Since we previously showed a tumor-promoting role of CD11b-positive cells in NB [14], we assessed first FAP expression by this cell population (GD2⁻/CD45⁺/CD11b⁺). In contrast to the CD11b-negative cells (GD2⁻/CD45⁺/CD11b⁻) (Figure 5D), CD11b-positive cells showed a clear signal for FAP (Figure 5A), suggesting an additional role of CD11b-positive cells in FAP-mediated effects in NB.

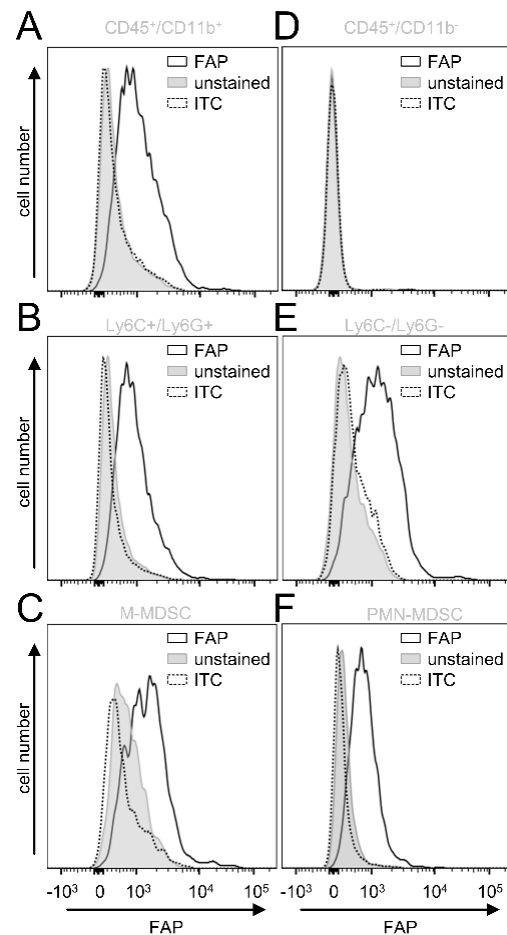


Figure 5. Analysis of FAP expression by tumor-infiltrating leukocytes. (A–F) Representative histograms of the flow cytometry analysis of FAP expression by leukocytes (CD45⁺) found within primary tumor tissue. Samples were collected when tumors reached a size of 750 mm³, followed by enzymatic digestion to obtain a single-cell solution. Samples were then analyzed to show FAP expression (black solid line) using mouse anti-FAP IgG and PE-labeled anti-murine IgG Ab as primary and secondary Ab by CD11b-positive (A; CD45⁺/CD11b⁺) and CD11b-negative leukocytes (D; CD45⁺/CD11b⁻), MDSCs (B; CD45⁺/CD11⁺/Ly6C⁺/Ly6G⁺), CD11b⁺ leukocytes excepting MDSC (E; CD45⁺/CD11b⁺/Ly6C⁻/Ly6G⁻), as well as two MDSC populations, M-MDSC (C; CD45⁺/CD11b⁺/Ly6C^{high}/Ly6G⁻) and PMN-MDSCs (F; CD45⁺/CD11b⁺/Ly6C^{low}/Ly6G⁺). Unstained cells (unstained; grey-filled curve) and cells incubated with appropriate isotype control (ITC, grey dashed line) served as negative controls.

To further characterize the FAP-positive CD11b cell fraction, we included additional cell markers to determine the immune-suppressive cells of the myeloid lineage MDSC, namely monocytic (M)- (CD11b⁺/Ly6C^{high}/Ly6G⁻) and polymorphonuclear (PMN)-MDSC (CD11b⁺/Ly6C^{low}/Ly6G⁺). Interestingly, both MDSC populations (Figure 5C,F) and the CD11b⁺ cells that did not express Ly6C and Ly6G showed a clear FAP signal (Figure 5B,E).

In summary, analysis of tumor tissue revealed a lack of CAFs in our *in vivo* model. Importantly, we detected FAP on tumor-infiltrating CD11b+ cells, especially by M- and PMN-MDSC, as well as CD11b+ cells that did not express Ly6C and -G, probably tumor-associated macrophages (TAM), as has been shown in tumors of Lewis lung carcinoma [17].

3.6. Impact of Fibroblasts Injected in Combination with Tumor Cells on Tumor Growth

Based on our data showing the tumor-cell-dependent induction of FAP on primary fibroblasts and on the fact that CAFs were found in human NB [9,15], but not in our murine tumor model, we addressed the question of whether the injection of murine tumor cells in combination with PAMF results in the development of CAF-positive tumors. Tumor development was evaluated daily after the implantation of tumor cells in combination with PAMF in a ratio of 2:1 in comparison to the growth of tumor cells injected without PAMF.

Although the analysis of tumor growth revealed significantly higher tumor volumes in mice injected with tumor cells in combination with PAMF between days 16 and 18 compared to the controls (tumor cells only), tumor growth in both groups was found to be very similar on most days (Figure 6A). Unexpectedly, flow cytometry analysis of tumor tissue collected three weeks after the injection of tumor cells in combination with PAMF did not show any FAP- or CD140a-positive cells in the GD₂⁻/CD45⁻ cell population (Figure 6B).

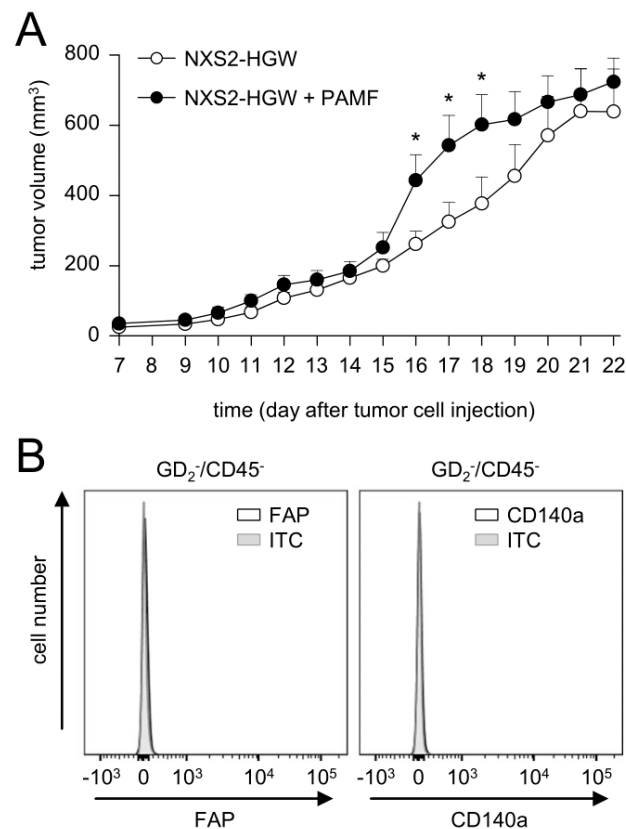


Figure 6. Impact of PAMF on tumor growth. (A) Analysis of tumor growth in mice injected with either NXS2-HGW (open circles) or NXS2-HGW in combination with PAMF (closed circles). Tumors were surgically resected on day 22 after tumor cell injection. Co-injection was performed at the tumor-cell-to-PAMF ratio of 2:1. When mice were sacrificed ahead of schedule due to tumor burden, the last measurement was included into the calculation of tumor growth at subsequent time points. Data are given as mean + SEM. * $p < 0.05$, t -test (B) Representative histograms of flow cytometry analysis of FAP and CD140a levels in tumor tissue of mice injected with NXS2-HGW in combination with PAMF. To detect CAFs (FAP⁺/CD140a⁺), leukocytes and tumor cells were excluded from the analysis using CD45 and GD₂ expression, respectively.

These results indicate that the development of CAFs in our model could not be effectively induced by the co-injection of syngeneic primary fibroblasts and tumor cells. Based on these observations, we injected NB cells without PAMF for tumor induction in further in vivo experiments.

3.7. Establishment of a More Resistant In Vivo Tumor Model

Since the immunotherapy with DB (i.p., five consecutive days, 3 mg/kg bw/day, start of treatment: four days after tumor cell implantation) showed, in our syngeneic tumor model, strong antitumor efficacy against NB, resulting in constant tumor regression [12,14], we aimed to establish a more resistant version of this tumor model allowing the evaluation of the combinatorial immunotherapy with DB and FAP-IL-2v. For this, we started DB treatments in a later tumor growth phase (day 11, 12 and 14), after the development of measurable tumors.

As expected, starting the DB immunotherapy on days 11, 12 and 14 resulted in a steady decrease in the antitumor effects compared to starting on day 4 (Figure 7A). Untreated mice showed the strongest tumor growth compared to every experimental group receiving DB; however, the differences between the tumor volumes of the untreated mice and the mice of the two groups “day 12” and “day 14” were statistically not significant, thus indicating the development of a more resistant tumor against DB treatment compared with the mice of the “day 11” and “day 4” groups.

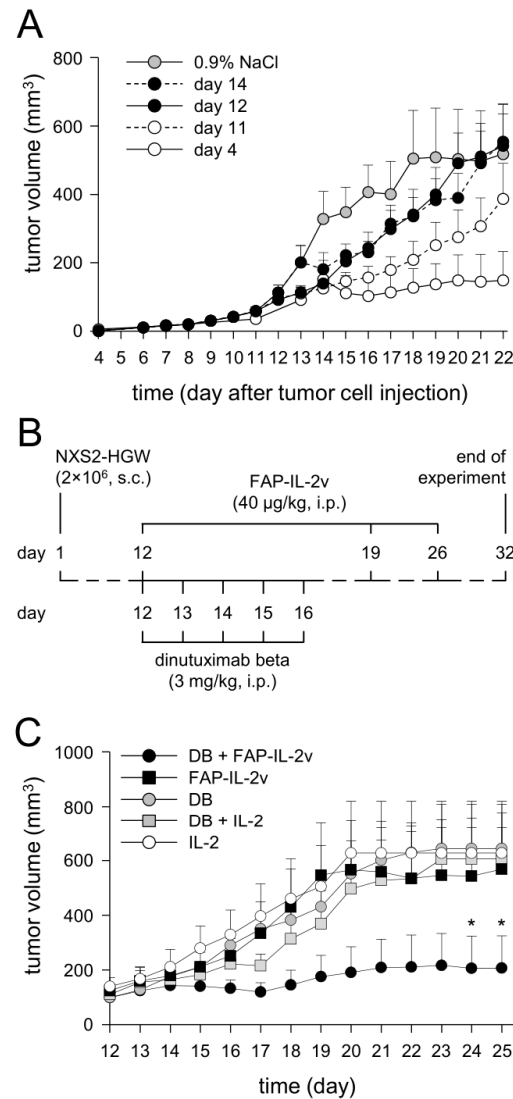


Figure 7. Cont.

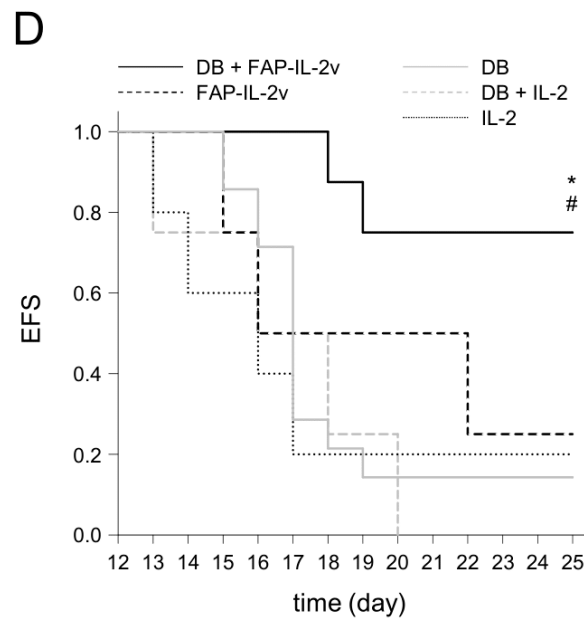


Figure 7. Establishment of a more resistant in vivo tumor model (A) and effects of the combinatorial immunotherapy with DB and FAP-IL-2v in vivo (B–D). (A) To establish a more resistant version of the murine syngeneic NB tumor model, DB treatment was started in a later tumor growth phase. After establishment of primary tumors, three later time points at which DB treatment was started (day 11 (open circles, dashed line), 12 (closed circles, solid line) and 14 (closed circles, dashed line)) were compared with day 4, representing the DB treatment starting time point of the previous NB model (open circles, solid line). Mice receiving equivalent doses of 0.9% NaCl served as controls (grey circles, solid line). When mice were sacrificed ahead of schedule due to tumor burden, the last measurement was included into the calculation of tumor growth at subsequent time points. Data are given as mean + SEM. (B) Schematic overview of the treatment protocol. The murine syngeneic GD₂-expressing NB cells NXS2-HGW were injected on day 1, followed by establishment of primary tumors. When tumor size of 100 mm³ was reached (indicated as day 12), treatment was started. Mice received either DB or FAP-IL-2v or a combination of both. To investigate IL-2-dependent effects, mice of two additional control groups were treated with IL-2 and DB in combination with IL-2. Tumor growth was determined daily. (C) Analysis of tumor growth in mice treated with DB in combination with FAP-IL-2v (DB + FAP-IL-2v, black solid line, closed circles), FAP-IL-2v (black solid line, closed squares), DB (black solid line, grey circles), DB in combination with IL-2 (DB + IL-2, black solid line, grey squares) and IL-2 (black solid line, open circles). When mice were sacrificed ahead of schedule due to tumor burden, the last measurement was included into the calculation of tumor growth at subsequent time points. Data are given as mean + SEM. * $p < 0.05$ vs. DB + IL-2, *t*-test. (D) Analysis of event-free survival (EFS) probabilities in mice treated with DB in combination with FAP-IL-2v (DB + FAP-IL-2v, black solid line), FAP-IL-2v (black dashed line), DB (grey solid line), DB in combination with IL-2 (DB + IL-2, grey dashed line) and IL-2 (black dotted line). A tumor volume of 300 mm³ was defined as an event. Statistical analysis was performed using LogRank test; multiple comparison was done with Holm–Sidak method. * $p < 0.05$ vs. DB; # $p < 0.05$ vs. DB + IL-2.

For further experiments, we used the treatment schedule of the first group of the treated mice that showed similar tumor growth to the untreated controls, namely the “day 12” group. In this group, tumors achieved a volume of approximately 100 mm³ at the start of treatment.

3.8. Evaluation of Antitumor Effects of Combinatorial Immunotherapy with DB and FAP-IL-2v

After the successful establishment of a more resistant version of our syngeneic tumor model allowing the evaluation of the antitumor efficacy of combinatorial therapeutic strategies, we treated mice showing tumors of approximately 100 mm³ volume with DB in

combination with the immunocytokine FAP-IL-2v (Figure 7B). Additionally, mice treated with IL-2 instead of FAP-IL-2v, as well as mice receiving IL-2 only, served as controls.

As expected, the immunotherapy with DB showed, in the resistant tumor model, similar tumor growth compared to the monotherapy controls with FAP-IL-2 or IL-2 (Figure 7C). Interestingly, additional treatment of mice that received DB with IL-2 did not show any beneficial effects of IL-2 on tumor growth compared with the mice that were treated with DB without IL-2 (Figure 7C). In contrast, the combinatorial immunotherapy with DB and FAP-IL-2v resulted in superior antitumor effects, showing the strongest tumor growth inhibition compared to every control group (Figure 7C). These results clearly show that an additional treatment with FAP-IL-2v Ab augments the efficacy of the immunotherapy with DB against NB.

Further analysis of EFS confirmed our results of tumor growth evaluation. The superior effects on EFS could be observed in the mice treated with DB in combination with FAP-IL-2v (Figure 7D), further underlining the improvement in anti-GD₂ Ab immunotherapies by the immunocytokine FAP-IL-2v against NB.

Together, our results show an FAP-IL-2v-dependent improvement in the DB-mediated antitumor effects against resistant NB, resulting in delayed tumor growth and an increase in survival compared to the respective monotherapy. Moreover, IL-2 did not show any benefit in combination with DB, confirming data reported in high-risk NB patients [4].

3.9. Assessment of Therapy-Dependent Effects on Tumor-Infiltrating Lymphocytes

Finally, we investigated the effects of the combinatorial treatment on different leukocyte populations infiltrating tumor tissue. We focused our analysis on the antitumoral effector NK and cytotoxic T cells (CD8+) as well as immune-suppressive Treg. Although the flow cytometry analysis was performed using tumors showing a volume of around 750 mm³, i.e., in a late growth phase, we still could observe clear therapy-dependent effects.

Compared to the control mice treated with IL-2 only, mice of the DB immunotherapy group showed higher numbers of NK and CD8+ T cells (Figure 8A,B), indicating the induction of antitumoral effector cells. However, the difference between the groups was statistically not significant, probably due to the low number of tumors available for the analysis. Furthermore, we observed, in the mice treated with DB, reduced Treg numbers (Figure 8C), thus further indicating the antitumor efficacy of the anti-GD₂ Ab DB even in a more resistant model. As hypothesized, an additional treatment with the immunocytokine FAP-IL-2v augmented the antitumor effects of DB, resulting in a further increase in NK and CD8+ T cells as well as a reduction in Treg (Figure 8A–C). However, a single-agent treatment of mice with FAP-IL-2 Ab also led to elevated numbers of NK and CD8+ T cells as well as a reduction in Treg (Figure 8A–C), suggesting the immune-stimulating effects of IL-2v.

These results could be clearly confirmed by the analysis of the CD8+/Treg ratio, showing the highest levels in the mice receiving either DB in combination with FAP-IL-2v or FAP-IL-2v as a single-agent treatment (Figure 8D).

Together, the single-agent treatment of resistant NB with the anti-GD₂ Ab DB resulted in an increase in antitumoral NK and CD8+ T cells as well as a reduction in immune-suppressive Treg-infiltrating primary tumors. The combinatorial treatment of mice with DB and FAP-IL-2v further increased the infiltration of tumors by NK and CD8+ T cells and resulted in a further reduction in Treg, probably due to the preferential stimulation of antitumoral effector cells by IL-2v. These results show an improvement in the DB immunotherapeutic efficacy by the immunocytokine FAP-IL-2, thus suggesting this combinatorial treatment as a promising strategy against resistant NB.

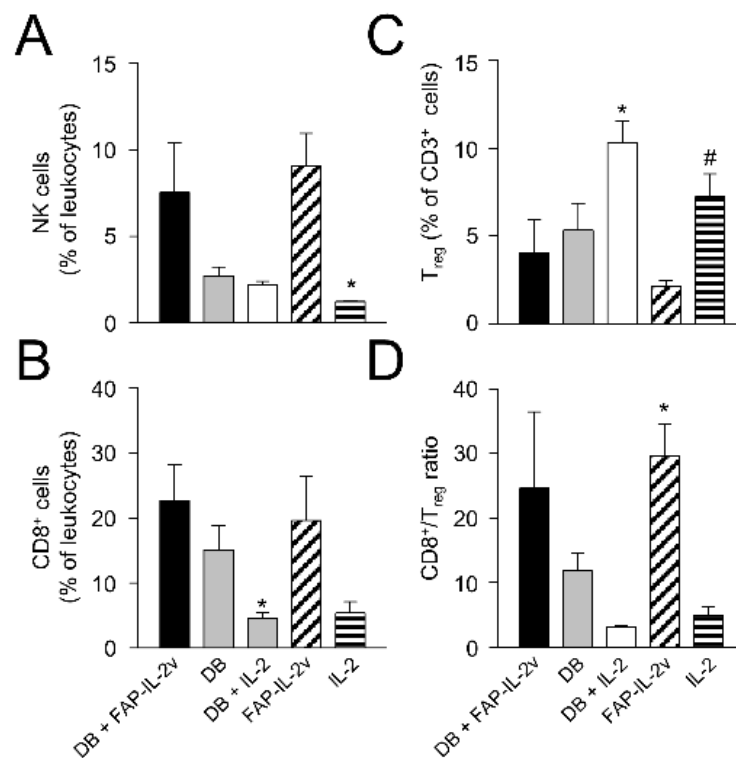


Figure 8. Flow cytometry analysis of tumor-infiltrating lymphocytes. To investigate effects of the combinatorial DB + FAP-IL-2v treatment on tumor-infiltrating lymphocytes, primary tumor tissue was analyzed using flow cytometry. After resection, primary tumor tissue samples were enzymatically digested to obtain a single-cell solution. To assess NK (A) and cytotoxic T cells (B) as well as Treg (C), the effector-cell-population-specific antigens CD335 and CD8 as well as CD25 and FocP3 were marked, respectively. Additionally, the ratio of cytotoxic T cells to Treg (D) was calculated. Results are presented as a percentage of the respective effector cell population cells relative to all viable CD45- or CD3-positive leukocytes for NK and cytotoxic T cells or Treg, respectively. ANOVA followed by appropriate post-hoc comparison test and *t*-test. (A) * $p < 0.05$ vs. FAP-IL-2v, (B) * $p < 0.05$ vs. DB + FAP-IL-2v, (C) * $p < 0.05$ vs. DB + FAP-IL-2v, # $p < 0.05$ vs. FAP-IL-2v, (D) * $p < 0.05$ vs. IL-2.

4. Discussion

The successful treatment of high-risk NB remains a major challenge in pediatric oncology. Although immunotherapeutic approaches, especially with monoclonal anti-GD₂ Ab, have shown promising results, around one third of NB patients still die [18]. To improve the antitumor efficacy of anti-GD₂ Ab, different cytokines were additionally included into the treatment protocols. The most prominent are IL-2 and GM-CSF, which activate two cell populations primarily mediating ADCC, namely NK cells and granulocytes, respectively. In Europe, an effective increase in NK cells could be shown in high-risk NB patients after the application of DB in combination with IL-2 compared to the patients of the IL-2-free treatment arm [5]. We here additionally confirmed *in vitro* a stimulating effect of IL-2 on the antitumor cytotoxicity of effector cells, showing an almost two-fold increase in ADCC mediated by DB after treatment of leukocytes with IL-2. However, the positive effects of IL-2 on NK cells and ADCC did not result in the improved survival of the high-risk NB patients compared to those patients who received immunotherapy without IL-2 [4]. A detailed comparison of the immune cells in the patients of both cohorts revealed a strong (21-fold) induction of Treg after application of IL-2 and almost unchanged Treg levels in the patients of the IL-2-free treatment arm [5]. Such a preferential induction of the immune-inhibiting cells by IL-2 can partly explain the missing survival benefit of the additional usage of IL-2 against NB, thus underlining a need for alternative strategies to activate antitumor effector cells only.

One promising alternative cytokine that showed the effective activation of NK cells, increasing the GD₂-specific ADCC against NB cells *in vitro*, as well anti-NB efficacy *in vivo*, is IL-15 [19]. Importantly, recombinant human IL-15 has been already evaluated in cancer patients [20]. However, the systemic application of cytokines is associated with strong side effects. To overcome this problem, tumor-specific Ab conjugated with immune-stimulating cytokines, called immunocytokines, were developed and showed promising results in the treatment of cancer patients. In melanoma patients, treatment with the GD₂-specific Ab hu14.18-IL-2 resulted in immune activation and showed reversible clinical toxicity with no grade 4 adverse events [21,22]. This immunocytokine was also used in clinical trials against refractory or recurrent NB, demonstrating safety profiles and antitumor efficacy [23,24]. Despite these promising results, the application of such immunocytokines can still activate Treg, thus hampering the antitumor effects of the immunotherapy.

Here, we investigated the anti-NB effects of the immunocytokine FAP-IL-2v in combination with DB. The rationale of using FAP-IL-2v was based on the fact that the mutated IL-2 (IL-2v) is able to preferentially stimulate antitumor effector cells such as NK cells without activating effects on the immune-inhibiting Treg [7]. Moreover, it was shown that the incubation of effector cells with FAP-IL-2v enhanced ADCC against colon and gastric cancer cells by the therapeutic Ab directed against tumor antigens [7]. In the present study, we could clearly confirm these results in NB, showing a strong FAP-IL-2-dependent increase in ADCC against tumor cells mediated by DB. Moreover, flow cytometry analysis of Treg did not show any induction compared to the untreated controls. In contrast, IL-2 treatment resulted in a strong increase in Treg, confirming the results in NB patients treated with DB in combination with IL-2 [5].

The observed increase in DB-specific ADCC by FAP-IL-2 in our *in vitro* experiments was clearly translated into an FAP-IL-2v-dependent improvement in the antitumor effects of DB against aggressively growing GD₂-positive NB tumors *in vivo*. In contrast to our previously established tumor model [12], whereby treatments were started four days after tumor cell implantation, in the present study, we used a more resistant model of NB allowing the evaluation of combinatorial treatments. We changed the start of treatment to a later time point, at least 12 days after tumor cell implantation, after primary tumors were established at a size of 100 mm³, thus showing more resistant characteristics. Our *in vivo* data are in line with the data of Klein and colleagues, showing, in murine models of human cancers, such as leukemia, breast or lung cancer, FAP-IL-2v efficacy when combined with therapeutic Ab directed against tumor antigens [6]. Moreover, in the present study, the comparison of the antitumor efficacy of DB given as a monotherapy and DB in combination with IL-2 did not show any benefit regarding the additional treatment with IL-2, thus further confirming the results from the clinical study published by Ladenstein and colleagues showing a lack of superior effects of IL-2 [4].

Although the application of FAP-IL-2 has been reported to stimulate effector cells in the periphery [6] as well, the fusion of IL-2v to the anti-FAP Ab was performed to preferentially transport an additional stimulating agent (IL-2v) into the tumor tissue. Since FAP expression has been shown in NB and we could here confirm both FAP expression by human NB cell lines and in murine primary tumor tissue, as well as the NB-cell-dependent induction of FAP on fibroblasts, we suggest that both effects contribute to the efficacy of the immunocytokine FAP-IL-2v in the periphery and in the tumor tissue. In our tumor model, we detected FAP only by tumor-infiltrating CD11b-positive leukocytes, especially by the two MDCS populations, M- and PMN-MDSC. We found FAP also on the Ly6C and Ly6G double-negative cells, which are probably TAM, as has been reported by Arnold and colleagues [17]. To clarify the question of whether these FAP-positive cells in tumor tissue are indeed TAMs, further studies are required.

5. Conclusions

In summary, we showed a FAP-IL-2v-dependent increase in ADCC against NB cells mediated by the chimeric anti-GD₂ Ab DB. We detected FAP in tumor tissue, with major

expression by tumor-infiltrating MDSC. The combinatorial treatment of resistant NB with DB and FAP-IL-2 in vivo effectively inhibited tumor growth, improved the survival of tumor-bearing mice and resulted in an increase in cytotoxic T and NK cells, as well as a reduction in Treg found in tumor tissue. These data indicate that treatment with the immunocytokine FAP-IL-2v augments the efficacy of DB against resistant NB, probably by targeting MDSC and stimulating NK cells.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers14194842/s1>. Full gel images can be found at Supplementary Materials.

Author Contributions: Conceptualization, N.S., S.T.-M., M.Z. and H.N.L.; methodology, N.S., S.T.-M., M.Z., J.L. and H.N.L.; data curation, S.T.-M., M.Z., J.L., S.B. and A.Z.; writing—original draft preparation, N.S.; writing—review and editing, N.S., S.T.-M., M.Z., J.L., J.L., S.B., A.Z. and H.N.L.; supervision, N.S. and H.N.L.; project administration, N.S., S.T.-M. and M.Z.; funding acquisition, N.S. and H.N.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the University Medicine Greifswald, grant number 97237000; F. Hoffmann-La Roche Ltd., Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) and Hector Stiftungen, Germany, grant number M2116.

Institutional Review Board Statement: All procedures involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Informed consent was obtained from all individual participants (Ethics Board of the Medical Faculty of the University Greifswald, approval code number: BB 014/14, 24 January 2014). All procedures involving animal experiments were approved by the animal welfare committee (Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern, approval code number: LALLF M-V/7221.3-1-011/20, 7 September 2020) and approved and supervised by the commissioner for animal welfare at the University Medicine Greifswald representing the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: The authors thank Theodor Koepp and Maria Asmus (University Medicine Greifswald, Pediatric Hematology and Oncology, Greifswald, Germany) for their excellent technical assistance and Ana Rodriguez (F. Hoffmann-La Roche Ltd.) for her excellent support in the coordination of the project. FAP-IL-2v was provided by the Roche Innovation Center Zurich.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Paraboschi, I.; Privitera, L.; Kramer-Marek, G.; Anderson, J.; Giuliani, S. Novel Treatments and Technologies Applied to the Cure of Neuroblastoma. *Children* **2021**, *8*, 482. [[CrossRef](#)]
2. Ladenstein, R.; Pötschger, U.; Valteau-Couanet, D.; Luksch, R.; Castel, V.; Ash, S.; Laureys, G.; Brock, P.; Michon, J.M.; Owens, C.; et al. Investigation of the Role of Dinutuximab Beta-Based Immunotherapy in the SIOPEN High-Risk Neuroblastoma 1 Trial (HR-NBL1). *Cancers* **2020**, *12*, 309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Zeng, Y.; Fest, S.; Kunert, R.; Katinger, H.; Pistoia, V.; Michon, J.; Lewis, G.; Ladenstein, R.; Lode, H.N. Anti-neuroblastoma effect of ch14.18 antibody produced in CHO cells is mediated by NK-cells in mice. *Mol. Immunol.* **2005**, *42*, 1311–1319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ladenstein, R.; Pötschger, U.; Valteau-Couanet, D.; Luksch, R.; Castel, V.; Yaniv, I.; Laureys, G.; Brock, P.; Michon, J.M.; Owens, C.; et al. Interleukin 2 with anti-GD2 antibody ch14.18/CHO (dinutuximab beta) in patients with high-risk neuroblastoma (HR-NBL1/SIOPEN): A multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2018**, *19*, 1617–1629. [[CrossRef](#)]

5. Troschke-Meurer, S.; Siebert, N.; Marx, M.; Zumpe, M.; Ehlert, K.; Mutschlechner, O.; Loibner, H.; Ladenstein, R.; Lode, H.N. Low CD4⁺/CD25⁺/CD127⁻ regulatory T cell- and high INF- γ levels are associated with improved survival of neuroblastoma patients treated with long-term infusion of ch14.18/CHO combined with interleukin-2. *Oncoimmunology* **2019**, *8*, 1661194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Klein, C.; Waldhauer, I.; Nicolini, V.G.; Freimoser-Grundschober, A.; Nayak, T.; Vugts, D.J.; Dunn, C.; Bolijn, M.; Benz, J.; Stihle, M.; et al. Cergutuzumab amunaleukin (CEA-IL2v), a CEA-targeted IL-2 variant-based immunocytokine for combination cancer immunotherapy: Overcoming limitations of aldesleukin and conventional IL-2-based immunocytokines. *Oncoimmunology* **2017**, *6*, e1277306. [[CrossRef](#)]
7. Waldhauer, I.; Gonzalez-Nicolini, V.; Freimoser-Grundschober, A.; Nayak, T.K.; Fahrni, L.; Hosse, R.J.; Gerrits, D.; Geven EJ, W.; Sam, J.; Lang, S.; et al. Simlukafusp alfa (FAP-IL2v) immunocytokine is a versatile combination partner for cancer immunotherapy. *MAbs* **2021**, *13*, 1913791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Xin, L.; Gao, J.; Zheng, Z.; Chen, Y.; Lv, S.; Zhao, Z.; Yu, C.; Yang, X.; Zhang, R. Fibroblast Activation Protein- α as a Target in the Bench-to-Bedside Diagnosis and Treatment of Tumors: A Narrative Review. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 648187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Zeine, R.; Salwen, H.R.; Peddinti, R.; Tian, Y.; Guerrero, L.; Yang, Q.; Chlenski, A.; Cohn, S.L. Presence of cancer-associated fibroblasts inversely correlates with Schwannian stroma in neuroblastoma tumors. *Mod. Pathol.* **2009**, *22*, 950–958. [[CrossRef](#)]
10. Siebert, N.; Seidel, D.; Eger, C.; Juttner, M.; Lode, H.N. Functional bioassays for immune monitoring of high-risk neuroblastoma patients treated with ch14.18/CHO anti-GD2 antibody. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e107692. [[CrossRef](#)]
11. Lode, H.N.; Xiang, R.; Varki, N.M.; Dolman, C.S.; Gillies, S.D.; Reisfeld, R.A. Targeted interleukin-2 therapy for spontaneous neuroblastoma metastases to bone marrow. *J. Natl. Cancer Inst.* **1997**, *89*, 1586–1594. [[CrossRef](#)]
12. Siebert, N.; Zumpe, M.; Juttner, M.; Troschke-Meurer, S.; Lode, H.N. PD-1 blockade augments anti-neuroblastoma immune response induced by anti-GD2 antibody ch14.18/CHO. *Oncoimmunology* **2017**, *6*, e1343775. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Lode, H.N.; Schmidt, M.; Seidel, D.; Huebener, N.; Brackrock, D.; Bleeke, M.; Reker, D.; Brandt, S.; Mueller, H.P.; Helm, C.; et al. Vaccination with anti-idiotype antibody ganglidiomab mediates a GD(2)-specific anti-neuroblastoma immune response. *Cancer Immunol. Immunother.* **2013**, *62*, 999–1010. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Siebert, N.; Zumpe, M.; von Lojewski, L.; Troschke-Meurer, S.; Marx, M.; Lode, H.N. Reduction of CD11b(+) myeloid suppressive cells augments anti-neuroblastoma immune response induced by the anti-GD(2) antibody ch14.18/CHO. *Oncoimmunology* **2020**, *9*, 1836768. [[CrossRef](#)]
15. Hashimoto, O.; Yoshida, M.; Koma, Y.; Yanai, T.; Hasegawa, D.; Kosaka, Y.; Nishimura, N.; Yokozaki, H. Collaboration of cancer-associated fibroblasts and tumour-associated macrophages for neuroblastoma development. *J. Pathol.* **2016**, *240*, 211–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Sahai, E.; Astsaturov, I.; Cukierman, E.; DeNardo, D.G.; Egeblad, M.; Evans, R.M.; Fearon, D.; Greten, F.R.; Hingorani, S.R.; Hunter, T.; et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat. Rev. Cancer* **2020**, *20*, 174–186. [[CrossRef](#)]
17. Arnold, J.N.; Magiera, L.; Kraman, M.; Fearon, D.T. Tumoral immune suppression by macrophages expressing fibroblast activation protein- α and heme oxygenase-1. *Cancer Immunol. Res.* **2014**, *2*, 121–126. [[CrossRef](#)]
18. Keyel, M.E.; Reynolds, C.P. Spotlight on dinutuximab in the treatment of high-risk neuroblastoma: Development and place in therapy. *Biologics* **2019**, *13*, 1–12. [[CrossRef](#)]
19. Nguyen, R.; Moustaki, A.; Norrie, J.L.; Brown, S.; Akers, W.J.; Shirinifard, A.; Dyer, M.A. Interleukin-15 Enhances Anti-GD2 Antibody-Mediated Cytotoxicity in an Orthotopic PDX Model of Neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 7554–7564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Miller, J.S.; Morishima, C.; McNeel, D.G.; Patel, M.R.; Kohrt HE, K.; Thompson, J.A.; Sondel, P.M.; Wakelee, H.A.; Disis, M.L.; Kaiser, J.C.; et al. A First-in-Human Phase I Study of Subcutaneous Outpatient Recombinant Human IL15 (rhIL15) in Adults with Advanced Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *24*, 1525–1535. [[CrossRef](#)]
21. King, D.M.; Albertini, M.R.; Schalch, H.; Hank, J.A.; Gan, J.; Surfus, J.; Mahvi, D.; Schiller, J.H.; Warner, T.; Kim, K.; et al. Phase I clinical trial of the immunocytokine EMD 273063 in melanoma patients. *J. Clin. Oncol.* **2004**, *22*, 4463–4473. [[CrossRef](#)]
22. Ribas, A.; Kirkwood, J.M.; Atkins, M.B.; Whiteside, T.L.; Gooding, W.; Kovar, A.; Gillies, S.D.; Kashala, O.; Morse, M.A. Phase I/II open-label study of the biologic effects of the interleukin-2 immunocytokine EMD 273063 (hu14.18-IL2) in patients with metastatic malignant melanoma. *J. Transl. Med.* **2009**, *7*, 68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Osenga, K.L.; Hank, J.A.; Albertini, M.R.; Gan, J.; Sternberg, A.G.; Eickhoff, J.; Seeger, R.C.; Matthay, K.K.; Reynolds, C.P.; Twist, C.; et al. A phase I clinical trial of the hu14.18-IL2 (EMD 273063) as a treatment for children with refractory or recurrent neuroblastoma and melanoma: A study of the Children’s Oncology Group. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 1750–1759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Shusterman, S.; London, W.B.; Gillies, S.D.; Hank, J.A.; Voss, S.D.; Seeger, R.C.; Reynolds, C.P.; Kimball, J.; Albertini, M.R.; Wagner, B.; et al. Antitumor activity of hu14.18-IL2 in patients with relapsed/refractory neuroblastoma: A Children’s Oncology Group (COG) phase II study. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 4969–4975. [[CrossRef](#)]