



Universiteit
Leiden
The Netherlands

CD20 as target for immunotherapy

Engelberts, P.J.

Citation

Engelberts, P. J. (2019, January 10). *CD20 as target for immunotherapy*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/68231>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/68231>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/68231> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Engelberts, P.J.

Title: CD20 as target for immunotherapy

Issue Date: 2019-01-10

Dankwoord

Na het maken van mijn proefschrift is het ook tijd om mijn dankwoord te schrijven. Dat doe ik dan ook met ontzettend veel trots. Mijn hele promotie traject is een achtbaan geweest vol met hoogte- en dieptepunten, en daarnaast heb ik voor mijn gevoel ook het wereldrecord verbeterd in de categorie van '*langste promotie traject ooit*'. Daarom is dit het moment om dankbaarheid en nederigheid te tonen aan iedereen die een bijdrage geleverd heeft aan mijn promotie, mijn werkplezier en/of sociale uitspattingen.

Graag wil ik beginnen met mijn dank te geven aan mijn promotor: Paul Parren. Beste Paul, jouw wetenschappelijke drive en kennis heeft me altijd geïnspireerd, gemotiveerd maar ook gefrustreerd. Ze zeggen wel dat de aanhouder wint, maar zonder jouw vertrouwen in mij had ik niet hier gestaan.

Tevens natuurlijk mijn copromotor Esther Breij. Wetenschappelijk ijzersterk maar ook geduldig als ik weer eens wilde ideeën had. Bedankt voor je rust, geduld en inzichten. Je hebt een drukke baan, maar wist toch altijd extra tijd vrij te maken voor raad en daad wanneer nodig.

Daarnaast wil ik Genmab bedanken voor de kans en de ondersteuning om hier te komen. En met Genmab bedoel ik alle mensen die nu of vroeger voor Genmab werkten of gewerkt hebben. Het is onmogelijk om iedereen te benoemen maar ik dank jullie allemaal.

Het promoveren bij een bedrijf is zowel een vloek als een zegen. Frustraties over obstakels op de weg worden afgewisseld met een batterij aan kundige, gepassioneerde vakmensen met maar één doel: het maken van medicijnen voor patiënten om kwaliteit van leven te verbeteren. Dit is wat Genmab gelukt is en hopelijk lang blijft doen.

Waar er een eind is, is er ook een begin: Wendy (WMA) en Frank (FBE), de CD20 scientisten, jullie hebben me geholpen een Genmab PhD-er te worden.

Natuurlijk kun je nooit al het werk alleen doen. Joyce (JME), Marleen, Hendrik, Wendy (WJA), Danai en Rolf bedankt voor het mij aanleren van nieuwe technieken, het uit handen nemen van veel werk en de gezelligheid. Daarnaast wil ik ook graag mijn oude collega's bij het hybridoma team bedanken: Lisette, Eefje, Karin, Adinda, Roshnie, Egon, Martijn en Arnout. Ook de support afdeling wil ik graag bedanken voor hun inzet: Cora, Miranda, Anco, Justin, Ad, Bert, Zoltan, Jolanda, Gerry, Dick B, Peter Ros en alle anderen die dagelijks achter de schermen werken.

Michel, David en Riemke bedankt voor het creëren van de ruimte voor mij om te promoveren. Alle wetenschappers (scientisten en RA's) bij Genmab bedankt, voor de discussies, ideeën en sparren over wetenschap.

Ida bedankt voor het sparren over CD3x-CD20 maar vooral voor het voortzetten van mijn lievelingsproject.

I would like to thank the IPR department (Birgitte, Nina, Monica and Henriette) for critically reviewing and helping me to look at science from a different perspective.

Danita, Joost (JOM), Maarten en Aran bedankt voor de schrijftips en de visuele ondersteuning, zonder jullie was het boekje lang niet zo mooi geworden. En natuurlijk Joost Bakker voor de vormgeving en voorkant.

Kamergenoten, oud en nieuw: Hendrik, Mina, Bart (BGO), Danaï, Mirjam, Denise, Demelza, César, Isil, Romina, Luus, Jeffrey, Jeroen LvB, Erik, Maroeska, Danielle, Edward, Muriel, Mischa, Dennis V, Rik, Jantine en Thilo. Students that I had the privilege to supervise: Dibbolt, Reinier, Irati and Andreas: by explaining the science to you I understood it better myself.

Jeroen (JBR), Anniek (ABR) en Antonio, als je je thuis voelt, ga je vanzelf rare dingen doen zoals magazines schrijven, filmquizen organiseren en vooral denken dat je kunt acteren.

Genmab PhD's, Jeroen (JLA), Marije, Bart (BGO) en Simone (SIO), bedankt voor de discussies, inspirerende woorden en voorbeeld. Simone jij bent nu aan de beurt, succes.

De oud-Isotis mensen Frank, Robert, Sanne en Adrie, die eerder in me zagen dat ik het kon, jaren voordat ik het zelf zag.

LA1C: Aart, Patrick en Hans, al ruim 25 jaar trouwe vrienden en slechte kaartters.

UBV the Eagles: de oudste basketbalvereniging van Utrecht waar elke donderdag avond de frustraties weggespeeld en weggespoeld werden.

Paranimfen Jeroen en Frank, gedurende mijn 16 jaar bij Genmab rotsen in de branding.

Pa en ma bedankt voor de liefde en het leggen van de basis, en lieve pa al ben je er niet meer om dit mee te maken toch weet ik dat je trots bent. Jaap en Jannie bedankt voor de jarenlange onvermoeibare steun, liefde en gezelligheid. Broer John, bedankt dat je uiteindelijk inzag dat ik gelijk had en we daardoor vrienden geworden zijn. De rest van de familie, die ik niet allemaal afzonderlijk kan bedanken maar van wie ik wel veel houd.

Mijn vrouw Marieke: lieverd, zonder jouw steun had ik dit nooit kunnen doen. Ik ben niet de makkelijkste (dat zal iedereen beamen), maar doordat jij jezelf hebt weggecijferd, mij aangehoord heb wanneer ik het even niet meer zag zitten en de duw in de juiste richting is het gelukt.

En mijn kinderen, Lotte en Benjamin, voor de extra frustraties thuis als ze weer eens niet luisterden maar vooral voor de ontelbare knuffels, kusjes en onvoorwaardelijke liefde die ik nodig had om te realiseren waar ik het allemaal voor doe.

Publications

- 1 Winiarska M, Bil J, Wilczek E, Wilczynski GM, Lekka M, Engelberts PJ, et al. Statins impair antitumor effects of rituximab by inducing conformational changes of CD20. *PLoS Med.* 2008 Mar 25;5(3):e64.
- 2 Beurskens FJ, Ruuls SR, Engelberts PJ, Vink T, Mackus WJ, van de Winkel JG, et al. Complement activation impacts B-cell depletion by both type I and type II CD20 monoclonal antibodies. *Blood.* 2008 Nov 15;112(10):4354-5; author reply 5-6.
- 3 Beum PV, Peek EM, Lindorfer MA, Beurskens FJ, Engelberts PJ, Parren PW, et al. Loss of CD20 and bound CD20 antibody from opsonized B cells occurs more rapidly because of trogocytosis mediated by Fc receptor-expressing effector cells than direct internalization by the B cells. *J Immunol.* 2011 Sep 15;187(6):3438-47.
- 4 Beurskens FJ, Lindorfer MA, Farooqui M, Beum PV, Engelberts P, Mackus WJ, et al. Exhaustion of cytotoxic effector systems may limit monoclonal antibody-based immunotherapy in cancer patients. *J Immunol.* 2012 Apr 1;188(7):3532-41.
- 5 Engelberts PJ, Badoil C, Beurskens FJ, Boulay-Moine D, Grivel K, Parren PW, et al. A quantitative flow cytometric assay for determining binding characteristics of chimeric, humanized and human antibodies in whole blood: proof of principle with rituximab and ofatumumab. *J Immunol Methods.* 2013 Feb 28;388(1-2):8-17.
- 6 Da Roit F, Engelberts PJ, Taylor RP, Breij EC, Gritti G, Rambaldi A, et al. Ibrutinib interferes with the cell-mediated anti-tumor activities of therapeutic CD20 antibodies: implications for combination therapy. *Haematologica.* 2015 Jan;100(1):77-86.
- 7 van den Bremer ET, Beurskens FJ, Voorhorst M, Engelberts PJ, de Jong RN, van der Boom BG, et al. Human IgG is produced in a pro-form that requires clipping of C-terminal lysines for maximal complement activation. *MAbs.* 2015;7(4):672-80.
- 8 de Jong RN, Beurskens FJ, Verploegen S, Strumane K, van Kampen MD, Voorhorst M, et al. A Novel Platform for the Potentiation of Therapeutic Antibodies Based on Antigen-Dependent Formation of IgG Hexamers at the Cell Surface. *PLoS Biol.* 2016 Jan;14(1):e1002344.

- 9 Engelberts PJ, Voorhorst M, Schuurman J, van Meerten T, Bakker JM, Vink T, et al. Type I CD20 Antibodies Recruit the B Cell Receptor for Complement-Dependent Lysis of Malignant B Cells. *J Immunol.* 2016 Dec 15;197(12):4829-37.
- 10 Engelberts PJ, Breij ECW, Valerius T, Schuurman J, Parren P, Beurskens FJ. Response to Comment on “Type I CD20 Antibodies Recruit the B Cell Receptor for Complement-Dependent Lysis of Malignant B Cells”. *J Immunol.* 2018 Apr 15;200(8):2517.

Abbreviations

aa	amino acids
7-AAD	7-aminoactinomycin
ABC	antibody bound per cell
Abs	antibodies
ABC-DLBCL	activated B-cell diffuse large B-cell lymphoma
ABTS	2,2'-azino-bis [3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid]
ADC	antibody drug conjugate
ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity,
ADCP	antibody dependent cell-mediated phagocytosis
AF	alexaFluor®
ALL	acute lymphoblastic leukemia
ALM	alemtuzumab
AML	acute myeloid leukemia
ANOVA	analysis of variance
APC	allophycocyanin
ATC	activated T cells
ATCC	American type culture collection
B-CLL	B-cell chronic lymphocytic leukemia
BCR	B-cell receptor
BsAb	bispecific antibody
BiTe	bispecific T-cell engager
BL	burkitt's lymphoma
BLI	bioluminescent imaging
BM	bone marrow
B-NHL	B cell non-Hodgkin's lymphoma
Btk	bruton tyrosine kinase
BV	Brilliant Violet™
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridine
BSA	bovine serum albumin
C1q	complement component 1q
C5	complement component 5
CaMK-II	calmodulin-dependent protein kinase II
CACAO	cross-reactive anti-CD3 antibody one
CAR-T cells	chimeric antigen receptor-bearing T-cells
cCD20	circulating CD20

CD	cluster of Differentiation
CDC	complement dependent cytotoxicity
CDR	complementarity determining region
CFSE	carboxyfluorescein succinimidyl ester
C _H	heavy chain constant domain
CHO	chinese hamster ovary
CHOP	cyclophosphamide, hydroxydaunorubicin (doxorubicin; adriamycin), oncovin (vincristine) and prednisone
CHOP-RIT	Bexxar + CHOP
C _L	light chain constant domain
CLL	chronic lymphocytic leukemia
CLP	common lymphoid progenitor
C _{max}	maximum plasma concentration
CPM	counts per minute
CR	complete response
CR1	complement receptor 1
CR2	complement receptor 2
CRP	C-reactive protein
CSR	class switch rearrangement
CTRL	control
CV	coefficient of variation
hyperCVAD	cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin (adriamycin), dexamethasone followed by methotrexate and cytarabine
Cy	cyanine
DAR	drug-to-antibody ratio
DART	dual-affinity re-targeting
DIGS	detergent-insoluble glycolipid-enriched structures
DLBCL	diffuse large B-cell lymphoma
DLI	donor lymphocyte infusion
DMSO	dimethyl sulfoxide
DOX	doxorubicin
DR	durable response
DSMZ	deutsche sammlung von mikroorganismen und zellkulturen
DTT	dithiothreitol
DVD-Ig	dual-variable domain immunoglobulin
EC50	effective concentration 50%
ECACC	european collection of cell cultures
EDTA	Ethylene Diamine Tetra-Acetic Acid
EGFR	epidermal growth factor receptor

ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
EMA	european medicines agency
EPI	epirubicin
E:T	effector to target ratio
Fab	antigen-binding fragment
Fab-arm	half molecule of IgG
FACS	fluorescence activated cell sorting
Fc	fragment crystallizable
FC	fludarabine and cyclophosphamide
FcRn	neonatal Fc receptor
FCS	fetal calf serum
FcγR	Fc gamma receptor
FDA	food and drug administration
FISH	fluorescence in situ hybridization
FITC	fluorescein isothiocyanate
FL	follicular lymphoma
FOXP3	forkhead box P3
FSC	forward scatter
G-C	OBZ + chlorambucil
GC	germinal center
GC-DLBCL	germinal center Diffuse Large Cell B-Cell Lymphoma
GPA	Granulomatosis with Polyangiitis
HA	homotypic aggregation
HACA	human anti chimeric antibodies
HAMA	human anti mouse antibodies
HC	heavy chain
HDAC	histone deacetylase
HEK	human embryonic kidney cells
hIgG	human IgG
HI-NHS	heat inactivated normal human serum
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HRP	horse radish peroxidase
HPMA	N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide
huCAAO	humanized cross-reactive anti-CD3 antibody one
IBR	ibrutinib
IC50	inhibiting concentration 50%
IDE	idelalisib

Ig	immunoglobulin A, D, E, G, M
IGHV	mutated immunoglobulin heavy-chain variable region
IHC	immunohistochemistry
IMDM	isocove's modified Dulbecco's medium
IP	intraperitoneal
IT	immunotoxin
ITK	interleukin-2-inducible T-cell kinase
IV	intravenous
¹¹¹ In	Indium-111
¹³¹ I	Iodine-131
LC	Light Chain
LN	Lymph Node
LMP	lysosomal membrane permeabilization
mAb	monoclonal antibody
MAC	membrane attack complex
MCL	mantle cell lymphoma
MDS	myelodysplastic syndrome
MESF	molecules of equivalent soluble fluorophores
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	major histocompatibility complex
mIgG	mouse IgG
MM	multiple myeloma
MMAE	monomethyl auristatin E
MMAF	monomethyl auristatin F
MNC	mono nuclear cells
MoA	mechanism of action
MPA	microscopic polyangiitis
MS	multiple sclerosis
MS4A	membrane-spanning 4-domain family, subfamily A
MZL	marginal zone lymphoma
NHS	normal human serum
NHL	non-Hodgkin's lymphoma
NK cells	natural killer-cells
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
O-C	OFA + chlorambucil
O-CHOP	OFA + CHOP
O-FC	OFA + FC

OBZ	obinutuzumab
OD	optical density
OFA	ofatumumab
OR	overall response
ORR	overall response rate
OS	overall survival
PBS	phosphate buffered saline
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PC5	phycoerythrin-cyanin 5
PCD	programmed cell death
PD	progressive disease
PerCP	peridinin chlorophyll
Pen/strep	penicillin streptomycin
PFS	progression free survival
PI	propidium iodide
PI3K	phosphatidyl-4-5-biphosphate 3-kinase
PK	pharmacokinetics
PKC	protein kinase C
PLC	phospholipase C- γ 2
PMN	polymorph nuclear cells (neutrophils)
PS	phosphatidylserine
QFCM	quantitative flow cytometry
QiFi	quantitative indirect fluorescence intensity
R-C	RTX + chlorambucil
R-FC	RTX + FC
R-CHOP	RTX + CHOP
R-CVP	RTX + cyclophosphamide, vincristine sulfate, prednisone
RA	rheumatoid arthritis
RIT	radio-immunotherapy
RPMI	Roswell park memorial institute
RT	room temperature
RTX	rituximab
SA	streptavidin
sABC	specific antibody bound per cell
SC	subcutaneous
scFv	single-chain fragment variable
SCID	severe combined immune deficiency

SCT	stem cell transplantation
SD	standard deviation
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	standard error of mean
SHM	somatic hypermutation
SLE	systemic lupus erythomatosi
SMIP	small modular immunopharmaceutical
SSC	side scatter
T _{1/2}	half-life
TAA	tumor associated antigen
TAM	tumor associated macrophages
TBD	T cell dependent bispecific antibody
TCB	T cell specific antibodies
TCR	T cell receptor
Teff	effector T cell
Th	helper T cell
TIL	tumor infiltrating lymphocytes
Treg	regulatory T-cell
TRZ	trastuzumab
vc	valine-citruline
V _H	variable region of heavy chain
V _L	variable region of light chain
Vs	versus
WB	whole blood
WHO	world health organization
WM	Waldenström's macroglobulinemia
WT	wild type
⁹⁰ Y	Yttrium-90

Curriculum Vitae

Petrus Johannes (Patrick) Engelberts was born on September 17, 1975 in Utrecht, The Netherlands. In 1991 he finished high school at the Eijkman College in Utrecht and began a study laboratory research at the Middelbare Laboratorium School van Utrecht. In 1996, he received his degree and decided to continue his education at the Hogeschool van Utrecht, where he received his Bachelor of Science degree in 2001. Patrick then started working as a research technician at IsoTis in Bilthoven, a biomedical research company focusing on the regeneration of the patient's tissue, such as bone, cartilage and skin.

In 2002, Patrick started working at Genmab B.V. Utrecht, first as a research associate in the Hybridoma Unit and later as a research associate, junior scientist, senior research associate and principal research associate in the Antibody Science group. Here, he was involved in the pre-clinical development of ofatumumab and DuoBody-CD3xCD20. He was offered a PhD position under the supervision of Dr. Esther Breij and Prof. Dr. Paul Parren. During his PhD trajectory, Patrick studied the various ways to utilize CD20 as target for immunotherapy. The results of these studies are presented in this thesis.