



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Clustering: a rational design principle for potentiated antibody therapeutics

Oostindie, S.C.

Citation

Oostindie, S. C. (2022, May 18). *Clustering: a rational design principle for potentiated antibody therapeutics*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3304220>

Version: Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3304220>

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

SAMENVATTING IN HET NEDERLANDS

Ons immuunsysteem

Ons immuunsysteem (afweersysteem) beschermt ons tegen dagelijkse blootstelling aan ziekteverwekkers afkomstig van buiten het lichaam, zoals virussen en bacteriën. Ons immuunsysteem bestaat onder andere uit B cellen, een type witte bloedcellen, welke in staat zijn om antilichamen (eiwitten) te maken die deze ziekteverwekkers kunnen herkennen en eraan binden. Eenmaal gebonden dient een antilichaam als een herkenningspunt voor andere onderdelen van het immuunsysteem, welke vervolgens worden geactiveerd om de ziekteverwekker op te ruimen. Dit noemen we ook wel het opwekken van een immuunrespons. Tijdens een immuunrespons vermenigvuldigen B cellen zich en kunnen ze hun antilichamen moduleren om te zorgen dat deze de ziekteverwekker nog beter kunnen herkennen. Op deze manier past het immuunsysteem zich in rap tempo aan (adaptief) om binnen enkele dagen te evolueren tot een zeer specifieke afweer, welke in staat is om vele verschillende ziekteverwekkers te herkennen en te vernietigen.

Tumoren

Naast blootstelling aan ziekteverwekkers afkomstig van buiten ons lichaam, kan ziekte ook ontstaan door lichaamseigen cellen die zich oncontroleerbaar gaan vermenigvuldigen en waaruit vervolgens een lokaal gezwel of tumor ontstaat. Daar waar gezonde cellen in het lichaam sterk worden gereguleerd en enkel delen wanneer dat nodig is, zoals bij cel vernieuwing of herstel, zijn bij de vorming van een gezwel of tumor één of meerdere cellen ontsnapt aan deze regulerende mechanismen. Men spreekt van kanker in het geval van kwaadaardig groeiende tumoren welke, in tegenstelling tot goedaardige of benigne tumoren, in staat zijn om het orgaan waarin ze zijn ontstaan te vernietigen en uit te kunnen zaaien (metastase) richting andere organen in het lichaam. Tumoren kunnen grofweg worden onderverdeeld in twee categorieën: hematologische (niet-solide) en solide tumoren. Hematologische tumoren ontstaan vaak uit witte bloedcellen of de voorlopers daarvan, zoals het beenmerg, of uit afweercellen die zich bevinden in lymfoïde organen zoals lymfeklieren. In tegenstelling tot hematologische tumoren, ontstaan solide tumoren in uit orgaan specifieke cellen, zoals cellen in de borst, longen en lever, en vormen een stevige tumormassa of gezwel.

De belangrijkste behandelingen voor kanker bestaan uit het chirurgisch verwijderen van de tumor, radiotherapie en chemotherapie. Voornamelijk radiotherapie en chemotherapie brengen ook vervelende bijwerkingen met

zich mee, omdat ze niet alleen de tumorcellen elimineren en/of hun groei beperken, maar ook schade toebrengen aan gezonde lichaamscellen. Nieuwe doelgerichte therapieën zijn daarom volop in ontwikkeling om specifiek de tumorcel te kunnen treffen en schade aan gezond weefsel zoveel mogelijk te beperken. Hierbij wordt steeds vaker het immuunsysteem ingezet om tumorcellen te bestrijden.

Antilichamen

Antilichamen vormen een van de mogelijke doelgerichte therapieën om kanker te behandelen. Een antilichaam is een Y-vormig eiwitmolecuul en bevat twee domeinen; een Fab-domein bestaande uit twee fragmenten die binden aan een antigeen, ofwel een specifiek herkenningspunt op het oppervlak van een ziekteverwekker of tumorcel, en een Fc-domein welke kan interacteren met diverse moleculen en cellen van het immuunsysteem. De mens heeft vijf antilichaamklassen; IgA, IgD, IgE, IgG en IgM, waarbij Ig staat voor immunoglobuline en de toegevoegde letter staat voor de klasse. IgG is de meest voorkomende antilichaam klasse in bloed en kan verder worden onderverdeeld in vier typen; IgG1, IgG2, IgG3, en IgG4. Therapeutische antilichamen zijn meestal van het type IgG1 en kunnen op verschillende manieren zorg dragen voor het elimineren van de ziekteverwekker. Binding van het Fab-domein aan een antigeen op het oppervlak van een ziekteverwekker kan zijn functie blokkeren (neutralisatie), zoals bijvoorbeeld het infecteren van gezonde cellen. Daarnaast kan een gebonden antilichaam via zijn Fc-domein ook herkend worden door andere moleculen en cellen van het immuunsysteem, welke vervolgens worden geactiveerd om de ziekteverwekker te elimineren. Eliminatie kan bijvoorbeeld plaatsvinden door stoffen (aanwezig in bloed of geproduceerd door afweercellen) die gaatjes maken in de ziekteverwekker, waardoor deze sterft, of door een signaal te geven aan een afweercel om de ziekteverwekker op te eten en te verteren (fagocytose).

Promotieonderzoek

Tijdens mijn promotieonderzoek heb ik bestudeerd hoe antilichamen samenwerken om ziekteverwekkers, en in het bijzonder tumor cellen, te elimineren. In **Hoofdstuk 1** wordt uitgelegd dat samenwerking tussen antilichamen plaats kan vinden door middel van clustering na binding aan receptoren (antigenen) die tot expressie komen op het oppervlak van een (tumor) cel. Cel-gebonden antilichamen kunnen onder andere clusters vormen via non-covalente interacties tussen Fc-domeinen, wat resulteert in hexameer-vormige complexen van zes antilichamen welke in staat zijn om efficiënter interacties aan te gaan met andere moleculen en cellen van het immuunsysteem. Een van die moleculen is genaamd C1q en vormt een onderdeel van een systeem aan factoren aanwezig in bloed, genaamd het complement systeem, die verantwoordelijk zijn voor eliminatie (lysis) van antilichaam-gebonden cellen. Antilichaam

hexamerizatie blijkt essentieel te zijn voor herkenning en binding van C1q en de daaropvolgende eliminatie van de cel. Daarnaast kunnen we hexamerizatie verder verbeteren door middel van puntmutaties in het Fc-domein van het antilichaam. Naast puntmutaties, ontdekten we in **Hoofdstuk 2** dat hexamerizatie ook verbeterd kan worden door antilichamen te combineren gericht tegen twee verschillende receptoren die tot expressie komen op dezelfde cel. We vonden dat deze antilichaam combinaties gemixte hexameer-vormige complexen kunnen vormen die leiden tot betere eliminatie van tumor cellen. Deze strategie brengt zodoende ook verschillende cel receptoren dicht bij elkaar en is daarom mogelijk ook relevant voor toekomstige combinatietherapieën.

De opgedane kennis over de rol van antilichaam clustering in het effectief elimineren van tumor cellen, zoals beschreven in dit proefschrift, kan ook bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën. In **Hoofdstuk 3** beschrijf ik de preklinische ontwikkeling van DuoHexaBody-CD37, een antilichaam gericht tegen het CD37 antigeen die tot expressie komt op tumor B cellen. De ontwikkeling van dit antilichaam was specifiek gericht op het optimaliseren van tumor cel eliminatie door middel van het activeren van het complement systeem. Naast het introduceren van een puntmutatie in het Fc-domein van dit antilichaam om hexamerizatie te verbeteren, ontdekten we dat het binden van twee verschillende herkenningspunten, ofwel epitopen, op hetzelfde CD37 antigeen leidde tot verdere verbetering van antilichaam hexamerizatie en complement-gemedieerde tumor cel lysis. DuoHexaBody-CD37 bevat daarom, naast een hexamerizatie-verbeterende puntmutatie in het Fc-domein, een Fab-domein welke twee verschillende CD37 epitopen bindt (bispecifiek). De preklinische activiteit van DuoHexaBody-CD37 werd verder bestudeerd in primaire tumor B cellen afkomstig van patiënten en is beschreven in **Hoofdstuk 4**. Momenteel wordt de veiligheid en voorlopige werkzaamheid van deze medicijn kandidaat getest in mensen met verschillende typen hematologische tumoren.

De ontdekking dat antilichamen gericht tegen verschillende cel receptoren samen kunnen werken door te clusteren in gemengde hexameer-vormige complexen, inspireerde het ontwerp van een nieuwe technologie om de functie van antilichamen te moduleren en verbeteren in **Hoofdstuk 5**. Deze technologie is gebaseerd op antilichaam combinaties die zijn ontworpen om alleen samen te werken in teams als beide componenten tegelijk zijn gebonden aan twee verschillende receptoren die tot expressie komen op dezelfde cel. Door het moduleren van interacties tussen twee verschillende antilichaam-componenten met behulp van puntmutaties in het Fc-domein, creëerden we 'AND-gated' antilichaam paren die een combinatie van twee invoersignalen (dubbele antigeenbinding) vereisen om activering van een functionele output

te licenseren (zoals bijvoorbeeld complement activatie). Op deze manier bleek het mogelijk om antilichaam clustering nauwkeurig af te stemmen en te beperken tot cellen van voorkeur, waardoor mogelijk ook het venster tussen werkzaamheid en/of veiligheid kan worden vergroot.

De fundamentele rol van antilichaam clustering als een centrale trigger voor de algehele functionaliteit van antilichamen wordt besproken in **Hoofdstuk 6**. Hierin vat ik uitgebreid samen hoe antilichaam clustering zowel natuurlijke als therapeutische antilichaam werkingsmechanismen orkestreert. Daarnaast wordt beschreven hoe antilichaam clustering kan dienen als een ontwerpprincipe voor het verbeteren van de antilichaam functie of het introduceren van nieuwe eigenschappen in de volgende generatie nieuwe antilichaam therapieën.

De gedetailleerde studies naar de biologie van antilichaam clustering, zoals beschreven in dit proefschrift, tonen aan dat er meerdere strategieën zijn om de clustering van antilichamen te versterken en de functie van antilichamen te verbeteren. De impact van deze verschillende strategieën wordt besproken in **Hoofdstuk 7**. De studies in dit proefschrift illustreren dat het begrijpen van antilichaam structuur en functie, evenals antilichaam interacties met zowel antigenen als effectormoleculen of cellen, cruciaal is voor het ontwerpen van nieuwe en effectievere antilichaam therapieën voor de behandeling van menselijke ziekten zoals kanker.