



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).

DANKWOORD

Aan ieder begin komt een eind, zo ook aan dit proefschrift waar ik ontzettend trots op ben. Trots niet alleen op de inhoud, maar ook op degenen die gedurende de afgelopen jaren onmisbare stenen hebben bijgedragen aan dit proefschrift. Ik kan onmogelijk iedereen bij naam noemen die een rol heeft gespeeld in de totstandkoming van dit proefschrift, maar weet dat ik een ieder die zich aangesproken voelt enorm dankbaar ben.

Ik wil graag een aantal mensen specifiek bedanken. Te beginnen mijn promotor Paul Parren, bedankt dat je mij de kans hebt gegeven om mijn promotieonderzoek te doen binnen Genmab. Ik waardeer het ontzettend dat je ook na je vertrek bij Genmab jezelf hebt ingezet om mijn promotietraject te blijven begeleiden. Jouw passie voor de wetenschap, enorme schat aan kennis en je altijd scherpe blik hebben me geïnspireerd en gemotiveerd en zijn onmisbaar geweest in de totstandkoming van dit proefschrift.

Dan natuurlijk mijn copromotor Esther Breij, zonder jouw onvermoeibare steun had ik hier niet gestaan. Ondanks je volle agenda, kon ik altijd bij je terecht voor advies, nieuwe ideeën of gewoon een kop koffie en een goed gesprek.

Het begon allemaal bij het Antibody Research and Technologies team, ofwel ART. Frank (FBE) en Rob (RJO), bedankt voor het delen van jullie enthousiasme over HexaBody moleculen, het complement systeem en het oneindig aantal mogelijke variaties van IgG Fc puntmutaties. Marleen, bedankt voor het me wegwijs maken op lab en bovenal de gezelligheid tijdens koffie/lunch pauzes en buiten werktijd. Dan Janine, jouw deur staat altijd open en ik wil je bedanken voor de warme en inspirerende gesprekken. Ook bedankt aan andere (oud) ART teamgenoten: Bart-Jan, Gijs, Aran, Els, Xiaoguang, Kusai, Desiree, Jennifer, Klara, Tessa en Michel.

Ik vervolgde mijn promotietraject in het DuoHexaBody-CD37 team binnen Translational Research (TR). Marije, we begonnen als kamergenoten en al gauw werden we ook project teamgenoten. Bedankt voor alle gezelligheid en (PhD-gerelateerde) steun de afgelopen jaren, het is een feestje om met jou te werken! Juliette, de boemerang van Genmab; ik leerde je dubbel kennen als student en projectgenoot, vervolgens ook tijdelijk als collega, maar bovenal als super goede vriendin. Ik ben trots dat ik jou en Marije naast me mag hebben staan als paranimfen! Ook bedankt aan andere (oud) CD37- en TR

teamgenoten: Kristin, Ingrid (INI), Louise, Grietje, Laura (LVR), Berris, Laurens, Saida, Naomi, Kim, Wendy (WJA) en Barbara.

Dan mijn oud-kamergenoten Joyce, Ilse, Grietje, Maayke, Petra (PRB), Soeniel en Marije; bedankt voor de gezelligheid, eindeloze snoepvoorraden en fijne kerstsferen op de kamer. Studenten die ik heb mogen begeleiden; Lisa, Julie, Juliette, Janita en Sander: bedankt voor al het werk dat jullie me uit handen hebben genomen. Genmab oud-promovendi; Jeroen (JLA), Bart (BGO), Patrick (PEN) en Marije: bedankt voor het geven van het goede voorbeeld.

I also would like to thank Genmab colleagues at other departments, including LD&T (Rik (RRA), Marcel (MAR) and Dennis (DEV)), NAPR (Sandra (SVE), Jeroen (JBR), Ilse, Marcel (MBR), Patrick (PEN) and Bart (BGO)) and IPR/Medical Affairs (Monica, Bilge and Payal), for their one-team spirit and efforts to support this thesis. Daarnaast natuurlijk ook Joost Bakker en Laurant Blommers; bedankt voor de prachtige vormgeving van dit proefschrift.

In addition, I would like to thank colleagues at the University of Virginia (Ron and Margaret), Amsterdam Medical Centre (Hilma, Tuna and Martine), Radboud University Medical Centre (Annemiek and Simar) and Genentech (Greg), whom I have had the privilege to collaborate with during the past few years.

Natuurlijk valt geen promotietraject te voltooien zonder ontspanning. Liesbeth, zonder onze sauna uitjes ieder kwartaal had ik het niet volgehouden. Vriend(inn)en in en rondom Houten; bedankt voor de gezelligheid en de slapeloze nachten in de Ubica en omstreken.

Pap, mam, jullie onvermoeibare vertrouwen in mij zorgt ervoor dat ik iedere dag het beste uit mezelf kan halen, bedankt! Met vier kids is het ook altijd een gezellige boel aan tafel. Anouk, Joost en Manon, jullie zijn de leukste thuis!

Tot slot, lieve Jeroen: tussen de regels door ben jij degene die me heeft geholpen er een samenhangend verhaal van te maken. Dankzij jouw rotsvaste vertrouwen, oneindige geduld, luisterende oor, overzichtelijke Excelletjes en bovenal onvoorwaardelijke liefde is het me gelukt.

PUBLICATIONS

1. van der Horst HJ, Oostindie SC, Cillessen S, et al. Potent Preclinical Efficacy of DuoHexaBody-CD37 in B-Cell Malignancies. *Hemasphere* 2021; **5**(1): e504.
2. Oostindie SC, van der Horst HJ, Kil LP, et al. DuoHexaBody-CD37^{*}, a novel biparatopic CD37 antibody with enhanced Fc-mediated hexamerization as a potential therapy for B-cell malignancies. *Blood Cancer J* 2020; **10**(3): 30.
3. Lubbers R, Oostindie SC, Dijkstra DJ, et al. Carbamylation reduces the capacity of IgG for hexamerization and complement activation. *Clin Exp Immunol* 2020; **200**(1): 1-11.
4. Engelberts PJ, Hiemstra IH, de Jong B, Schuurhuis DH, Meesters J, Beltran Hernandez I, Oostindie SC, et al. DuoBody-CD3xCD20 induces potent T-cell-mediated killing of malignant B cells in preclinical models and provides opportunities for subcutaneous dosing. *EBioMedicine* 2020; **52**: 102625.
5. Oostindie SC, van der Horst HJ, Lindorfer MA, et al. CD20 and CD37 antibodies synergize to activate complement by Fc-mediated clustering. *Haematologica* 2019; **104**(9): 1841-52.
6. Cook EM, Lindorfer MA, van der Horst H, Oostindie SC, et al. Antibodies That Efficiently Form Hexamers upon Antigen Binding Can Induce Complement-Dependent Cytotoxicity under Complement-Limiting Conditions. *J Immunol* 2016; **197**(5): 1762-75.
7. de Jong RN, Beurskens FJ, Verploegen S, Strumane K, van Kampen MD, Voorhorst M, Horstman W, Engelberts PJ, Oostindie SC, 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; **14**(1): e1002344.

ABBREVIATIONS

| | | | |
|------------|--|-----------|--|
| AAALAC | association for assessment and accreditation of laboratory animal care | 51Cr | chromium-51 |
| 7-AAD | 7-aminoactinomycin | CRIB | charge repulsion induced bispecificity |
| Ab | antibody | CRP | complement regulatory protein |
| ABC | activated B cell | CTRL | control |
| (s)ABC | (specific) antibody bound per cell | DC | dendritic cells |
| ABC-DLBCL | activated B-cell diffuse large B-cell lymphoma | DLBCL | diffuse large B-cell lymphoma |
| ABTS | 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) | DMSO | dimethyl sulfoxide |
| ADC | antibody drug conjugate | DR5 | death receptor 5 |
| ADCC | antibody-dependent cellular cytotoxicity | DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| ADCP | antibody-dependent cellular phagocytosis | EBV | Epstein-Barr virus |
| AF | Alexa Fluor® | EC | extra cellular |
| AGK | G237A, E430G, S440K | EC50 | effective concentration 50% |
| AID | activation-induced deaminase | ECD | extra cellular domain |
| AKT | protein kinase B | EDTA | Ethylene Diamine Tetra-Acetic Acid |
| ALL | acute lymphoblastic leukemia | EGFR | epidermal growth factor receptor |
| AML | acute myeloid leukemia | ELISA | enzyme linked immuno sorbent assay |
| ANOVA | analysis of variance | ET | energy transfer |
| APC | allophycocyanin | E:T | effector to target ratio |
| ATCC | American Type Culture Collection | Fab | fragment antigen binding |
| AUC | area under the curve | FACS | fluorescence activated cell sorting |
| BaCa | Bispecific-Anchored Cytotoxicity Activator | Fc | Fragment crystallizable |
| BCR | B-cell receptor | FcR | Fc receptor |
| BL | Burkitt's lymphoma | FcRn | neonatal Fc receptor |
| BLA | Biologics license application | FCS | fetal calf serum |
| BMMC | bone marrow mononuclear cells | FcγR | Fc gamma receptor |
| bNAb | broadly neutralizing antibody | FDA | food and drug administration |
| B-NHL | B-cell non-Hodgkin's lymphoma | FELASA | European laboratory animal science associations |
| BSA | bovine serum albumin | FITC | fluorescein isothiocyanate |
| BV | brilliant violet | FL | follicular lymphoma |
| CAR | chimeric antigen receptro | FOLR-1 | folate receptor-1 |
| CAR-T cell | chimeric antigen receptor-bearing T-cell | FRET | Förster resonance energy transfer |
| CCR4 | C-C Motif Chemokine Receptor 4 | GC | germinal center |
| CD | cluster of differentiation | GCB | germinal center B cell |
| CDC | complement-dependent cytotoxicity | GC-DLBCL | germinal center diffuse large B-cell lymphoma |
| CDR | complementarity-determining region | gMFI | geometric mean fluorescence intensity |
| CDX | cell line-derived xenograft | HC | heavy chain |
| CFSE | carboxyfluorescein succinimidyl ester | HEK | human embryonic kidney |
| CH | heavy chain constant domain | HER(2, 3) | human epidermal growth factor receptor |
| CI | combination index | HERA | hexavalent receptor agonist |
| CL | light chain constant domain | HI-NHS | heat-inactivated normal human serum |
| CLL | chronic lymphocytic leukemia | HIV | human immunodeficiency virus |
| CODV-Ig | cross-over dual variable Ig-like protein | HLA | human leucocyte antigen |
| COVID-19 | coronavirus disease 2019 | hMDM | human monocyte-derived macrophage |
| | | HRP | horseradish peroxidase |
| | | Hx | hexamerization-enhanced |

| | | | |
|------------------|---|------------|---|
| IC ₅₀ | inhibiting concentration 50% | PerCP | peridinin chlorophyll |
| Ig | immunoglobulin (A, D, E, G, M) | Pen/strep | penicillin streptomycin |
| IgV | immunoglobulin variable region | PI | propidium iodide |
| IgC | immunoglobulin constant region | PI3K | phosphatidyl-4-5-biphosphate 3-kinase |
| IL | interleukin | PK | pharmacokinetics |
| IP | intraperitoneal | RGE | G236R, E430G, K439E |
| ITAM | immunoreceptor tyrosine-based activation motif | RLU | relative luminescence units |
| ITIM | immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif | RNA | ribonucleic acid |
| IV | intravenous | RR | relapsed/refractory |
| LC | light chain | RT | room temperature |
| LN | lymph node | SARS-CoV-2 | severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 |
| mAb | monoclonal antibody | SC | subcutaneous |
| MAC | membrane attack complex | sdAb | single-domain antibody |
| MCL | mantle cell lymphoma | SCID | severely combined immunodeficient |
| mCRC | metastatic colorectal cancer | SD | standard deviation |
| mCRP | membrane complement regulatory protein | SEM | standard error of the mean |
| M-CSF | macrophage colony stimulating factor | SHM | somatic hypermutation |
| MESF | molecules of equivalent soluble fluorophores | SMIP | small immune-pharmaceutical protein |
| MET | tyrosine-protein kinase Met | SOCS3 | suppressor of cytokine signalling 3 |
| MFI | mean fluorescence intensity | TCR | T-cell receptor |
| MHC | major histocompatibility complex | TEM | tetraspanin-enriched microdomain |
| MM | multiple myeloma | TI | therapeutic index |
| MNC | mono nuclear cells | TI | test item |
| MPER | membrane-proximal external region | TNFR | tumor necrosis factor receptor |
| MoA | mechanism of action | TNFRSF | tumor necrosis factor receptor super family |
| MZL | marginal zone lymphoma | TRAIL | tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand |
| NC | negative control | WB | whole blood |
| ND | newly diagnosed | WT | wild type |
| ND | not determined | VHH | single domain antibody |
| NHS | normal human serum | ZEBOV | Zaire ebolavirus |
| NHL | non-hodgkin's lymphoma | | |
| NK | natural killer | | |
| NKT | natural killer T cell | | |
| NOS | not otherwise specified | | |
| NSCLC | non-small cell lung cancer | | |
| OX40 | tumor necrosis factor receptor superfamily member 4 | | |
| PBMC | peripheral blood mononuclear cells | | |
| PBS | phosphate buffered saline | | |
| PBST | phosphate buffer saline supplemented with tween | | |
| PC | positive control | | |
| PCD | programmed cell death | | |
| PDX | patient-derived xenograft | | |
| PE | R-Phycoerythrin | | |

CURRICULUM VITAE

Simone Charlotte Oostindie was born on September 17, 1990 in Delft, The Netherlands. After finishing her high school at Lyceum de Hoven in Gorinchem in 2008, she studied Biology at Wageningen University & Research (WUR). In 2012, she received her Bachelor's degree and continued with her Master's degree Biology, which she received in 2014. During her Master's degree, she performed internships at The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research in Australia, where she studied the effect of regulatory signals on lymphocyte proliferation and survival and at Genmab, where she worked on synergistic antibody combinations targeting B-cell malignancies. In January 2015, she initially started as a research associate at Genmab in the Antibody Research and Technology department working on the discovery of novel technology platforms for the generation of differentiated therapeutic antibodies. She was then offered a PhD position under the supervision of Prof. Dr. Paul W.H.I. Parren and Dr. Esther C.W. Breij. During her PhD program, she worked in the Antibody Research and Technology department to study antibody clustering mechanisms to enhance therapeutic potency, as well as in the Translational Research department, where she was involved in the preclinical development of DuoHexaBody-CD37. The results of these studies are presented in this thesis.

