



Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu
Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Rozprawa doktorska

**Modulacja cytotoksyczności zależnej od dopełniacza przeciwciał
anty-CD20 w kontekście współczesnej immunoterapii nowotworów
limfoproliferacyjnych**

Lek. Alan Majeranowski

Promotor: prof. dr hab. Marcin Okrój

Drugi Promotor: dr hab. Andrzej Mital

Zakład Biologii Komórki i Immunologii
Instytut Biotechnologii Medycznej i Onkologii Doświadczalnej GUMed

Gdańsk 2026

Chciałbym złożyć serdeczne podziękowania:

Mojemu Promotorowi, Panu prof. dr. hab. Marcinowi Okrojowi za opiekę naukową nad niniejszą rozprawą, nieustające wsparcie na każdym etapie realizacji projektu, całą przekazaną wiedzę, wielowarstwowy mentoring, stworzenie warunków umożliwiających prowadzenie badań naukowych oraz przedstawienie immunologii w fascynujący sposób. Jego pasja, doświadczenie, zaangażowanie oraz inspirujące podejście do pracy naukowej miały kluczowe znaczenie dla powstania niniejszej pracy.

Mojemu Drugiemu Promotorowi i Kierownikowi Specjalizacji, Panu dr. hab. Andrzejowi Mitalowi za ustawiczną opiekę nad rozwojem klinicznym w zakresie hematologii i koagulologii, nieustające życzliwe wsparcie, cenne uwagi oraz pomoc w interpretacji wyników badań. Jego charyzma, wiedza i doświadczenie były niezwykle pomocne w realizacji projektu badawczego.

Wszystkim Koleżankom i Kolegom z Zakładu Biologii Komórki i Immunologii MWB UG i GUMED, w szczególności dr. Grzegorzowi Stasiłojciowi, dr Małgorzacie Stasiłój, dr Aleksandrze Urban, dr Darii Budce, mgr Alicji Kuźniewskiej, mgr Marcie Greglewskiej, lic. Nadii Panasiuk za bezcenną pomoc i wsparcie przy przeprowadzonych doświadczeniach i wspólnie budowaną świetną atmosferę w laboratorium.

Wszystkim Koleżankom i Kolegom z Kliniki Hematologii, Transplantologii i Terapii Komórkowych, w szczególności mgr Joannie Kubach i lek. Agacie Ogłozie-Puchowskiej za wszelką pomoc przy rekrutacji pacjentów do badania oraz pobieraniu i przechowywaniu materiału biologicznego.

Mojemu Dziadkowi Włodzimierzowi za pozostawanie inspiracją i wzorem do naśladowania.

Oraz Mojej Żonie Oli i Dzieciom: Adamowi, Anieli i Aleksandrowi za nadawanie mojej pracy najgłębszego sensu.

Informacje dodatkowe

Publikacje naukowe w czasopismach z listy filadelfijskiej, w których wykorzystano wyniki opisane w niniejszej pracy doktorskiej oraz publikacje wykorzystane jako autocytowania

1) Alan Majeranowski, Grzegorz Stasiłojć, Nadia Panasiuk, Marcin Okrój Selection of laboratory assays for reliable assessment of complement-dependent cytotoxicity: impact of assay choice on CDC quantification. Front Immunol. 2026;17:1786368. doi.org/10.3389/fimmu.2026.1786368

2) Aleksandra Urban, Alan Majeranowski, Grzegorz Stasiłojć, Patrycja Koszałka, Anna Felberg, Michał Taszner, Jan M. Zaucha, Marcin Okrój In silico designed gain-of-function variants of complement C2 support cytocidal activity of anticancer monoclonal antibodies. Cancers (Basel). 2022;14:1270. doi.org/10.3390/cancers14051270

3) Alicja Kuźniewska, Alan Majeranowski, Sara Henry, Daria Kowalska, Grzegorz Stasiłojć, Aleksandra Urban, Jan M. Zaucha, Marcin Okrój The acquisition of complement-dependent cytotoxicity by the type II anti-CD20 therapeutic antibody obinutuzumab. Cancers (Basel). 2023;16: 49. doi.org/10.3390/cancers16010049.

4) Anna Felberg, Michał Taszner, Aleksandra Urban, Alan Majeranowski, Kinga Jaskuła, Aleksandra Jurkiewicz, Grzegorz Stasiłojć, Anna M. Blom, Jan M. Zaucha, Marcin Okrój Monitoring of the Complement System Status in Patients With B-Cell Malignancies Treated With Rituximab. Front Immunol. 2020;11: 584509. doi.org/10.3389/fimmu.2020.584509

Nazwy i numery projektów badawczych w ramach których wykonano badania do pracy doktorskiej:

1) Grant „Młody Twórca Nauki” realizowany w ramach Programu „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” (MNiSW) nr MTN 664/351/63/73-3317 (2021) zatytułowany „Modulacja działania terapeutycznego przeciwciała anty-CD20, obinutuzumabu poprzez suplementację surowicy mutantem gain-of-function białka C2 dopełniacza” – kierownik: lek. Alan Majeranowski budżet 50.000 PLN

2) Grant OPUS z Narodowego Centrum Nauki (NCN) nr 2015/18/M/NZ6/00334 zatytułowany „Charakterystyka funkcjonalna i potencjał terapeutyczny mutacji typu GOF (gain of function) białka C2 układu dopełniacza” – kierownik: prof. dr hab. Marcin Okrój, budżet 1.291.000 PLN

3) Grant SONATA BIS z Narodowego Centrum Nauki (NCN) nr 2014/14/E/NZ6/00182 zatytułowany „Znaczenie układu dopełniacza w nowotworzeniu i terapiach nowotworowych” – kierownik: prof. dr hab. Marcin Okrój, budżet 1.945.000 PLN

4) Grant OPUS z Narodowego Centrum Nauki (NCN) nr 2023/51/B/NZ6/01810 zatytułowany „Rzadkie warianty genetyczne białek układu dopełniacza jako czynniki etiologiczne chorób autoimmunologicznych” – kierownik: prof. dr hab. Marcin Okrój, budżet 3.047.000 PLN

1. Spis treści

1. Spis treści.....	5
2. Wykaz skrótów.....	7
3. Streszczenie.....	14
4. Abstract.....	17
5. Część teoretyczna.....	20
5.1. Wprowadzenie do układu dopełniacza.....	20
5.1.1. Organizacja i funkcje układu dopełniacza.....	22
5.2. Regulacja układu dopełniacza.....	24
5.3. Przeciwciała monoklonalne anty-CD20.....	27
5.3.1. Mechanizm działania i podział przeciwciał anty-CD20: typ I i typ II.....	29
5.4. Interakcje przeciwciał anty-CD20 z układem dopełniacza.....	33
5.4.1. Cytotoksyczność zależna od dopełniacza (ang. complement-dependent cytotoxicity, CDC).....	34
5.4.2. Cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał (ang. antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) i inne mechanizmy z udziałem komórek odpornościowych.....	36
5.4.3. Wpływ aktywacji dopełniacza na komórki nowotworowe.....	39
5.4.4. Modulacja dopełniacza w eksperymentalnej terapii nowotworów limfoproliferacyjnych.....	47
5.5. Rola przeciwciał anty-CD20 w nowoczesnych terapiach przeciwnowotworowych....	49
5.6. Nowe kierunki rozwoju przeciwciał terapeutycznych anty-CD20.....	52
5.7. Białko C2 w układzie dopełniacza.....	61
5.7.1. Warianty gain of function (GoF) białka C2.....	64

6. Część badawcza I.....	69
6.1. Omówienie celu I.....	69
6.2. Metodologia części badawczej I.....	71
6.2.1. Linie komórkowe.....	71
6.2.2. Ludzka surowica.....	72
6.2.3. Testy CDC.....	73
6.3. Wyniki części badawczej I	77
6.4. Dyskusja części badawczej I	83
7. Część badawcza II.....	85
7.1. Omówienie celu II.....	85
7.2. Metodologia części badawczej II.....	88
7.2.1. Komórki CLL i surowica.....	88
7.2.2. Analiza cytotoksyczności zależnej od dopełniacza.....	93
7.2.2.1. Cytometria przepływowa.....	93
7.2.2.2. Test CDC w środowisku pełnej krwi.....	94
7.2.3. Wariant typu GoF białka C2.....	94
7.3. Wyniki części badawczej II.....	95
7.4. Dyskusja części badawczej II.....	103
8. Wnioski końcowe.....	106
9. Bibliografia.....	108
10. Spis tabel i rycin.....	140

2. Wykaz skrótów

A	(<i>ang.</i> area) pole impulsu sygnału
ADCC	(<i>ang.</i> antibody-dependent cellular cytotoxicity) cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał
ADCP	(<i>ang.</i> antibody-dependent cellular phagocytosis) fagocytoza komórkowa zależna od przeciwciał
AEs	(<i>ang.</i> adverse events) działania niepożądane
AML	(<i>ang.</i> acute myeloid leukemia) ostra białaczka szpikowa
AP	(<i>ang.</i> alternative pathway) droga alternatywna układu dopełniacza
ASTCT	(<i>ang.</i> American Society for Transplantation and Cellular Therapy) Amerykańskie Towarzystwo ds. Transplantacji i Terapii Komórkowej
ATM	(<i>ang.</i> ataxia-telangiectasia mutated) gen kodujący kinazę serynowo-treoninową
B-ALL	(<i>ang.</i> B-cell acute lymphoblastic leukemia) ostra białaczka limfoblastyczna z komórek B
BCR	(<i>ang.</i> B-cell receptor) receptor B-komórkowy
BsAbs	(<i>ang.</i> bispecific antibodies) przeciwciała bispecyficzne
C1Inh	inhibitor kompleksu C1dopełniacza
C4BP	(<i>ang.</i> C4b-binding protein) białko wiążące C4b
CA	(<i>ang.</i> cofactor activity) aktywność kofaktorowa
CAR-T	(<i>ang.</i> chimeric antigen receptor T cells) limfocyty T z chimerycznym receptorem antygenowym)
CCP	(<i>ang.</i> complement control protein) domena kontrolująca dopełniacz
CDC	(<i>ang.</i> complement-dependent cytotoxicity) cytotoksyczność zależna od dopełniacza

CFD	(<i>ang.</i> complement factor D) gen czynnika D układu dopełniacza
CFH	(<i>ang.</i> complement factor H) gen czynnika H układu dopełniacza
CFHR	(<i>ang.</i> complement factor H-related protein) gen kodujący białko pokrewne czynnikowi H układu dopełniacza)
CLL	(<i>ang.</i> chronic lymphocytic leukemia) przewlekła białaczka limfocytowa
CLL-IPI	(<i>ang.</i> chronic lymphocytic leukemia international prognostic index) międzynarodowy indeks prognostyczny w przewlekłej białaczce limfocytowej
CP	(<i>ang.</i> classical pathway) droga klasyczna układu dopełniacza
CR	(<i>ang.</i> complete response) odpowiedź całkowita
CR1	(<i>ang.</i> complement receptor 1) receptor dopełniacza typu 1
CRP	białko C-reaktywne
CRS	(<i>ang.</i> cytokine release syndrome) zespół uwalniania cytokin
cSCC	(<i>ang.</i> cutaneous squamous cell carcinoma) rak kolczystokomórkowy skóry
CtRP	(<i>ang.</i> complement regulatory proteins) białka regulatorowe dopełniacza
CYT-1	cytoplazmatyczna domena 1
DAA	(<i>ang.</i> decay-acceleratin activity) aktywność przyspieszająca rozpad konwertaz dopełniacza
DAF	(<i>ang.</i> decay-acceleration factor) czynnik przyspieszający rozpad konwertaz dopełniacza
DAMP	(<i>ang.</i> damage-associated molecular patterns) wzorce molekularne związane z uszkodzeniami
DLBCL	(<i>ang.</i> diffuse large B-cell lymphoma) chłoniak rozlany z dużych komórek B
DMSO	dimetylosulfotlenek

DNA	(<i>ang.</i> deoxyribonucleic acid) kwas deoksyrybonukleinowy
FSC	(<i>ang.</i> forward scatter) rozpraszanie światła w kierunku przednim, korelujące z wielkością komórki
EBV	(<i>ang.</i> Epstein–Barr virus) wirus Epsteina–Barr
EFS	(<i>ang.</i> event free survival) przeżycie wolne od zdarzeń
EL4	(<i>ang.</i> mouse lymphoma cell line) – linia chłoniaka mysiego EL4
Erk	(<i>ang.</i> extracellular signal-regulated kinase) kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym
FB	(<i>ang.</i> factor B) czynnik B układu dopełniacza
FBS	(<i>ang.</i> fetal bovine serum) płodowa surowica bydlęca
FCN	fikolina
FcR	receptor fragmentu Fc immunoglobulin
FcRn	receptor noworodkowy dla fragmentu Fc immunoglobulin
FD	(<i>ang.</i> factor D) czynnik D układu dopełniacza
FDA	(<i>ang.</i> Food and Drug Administration) Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków
FH	(<i>ang.</i> factor H) czynnik H układu dopełniacza
FHL-1	(<i>ang.</i> factor H-like protein 1) białko 1 podobne do czynnika H
FHR	(<i>ang.</i> factor H-related protein) białko pokrewne czynnikowi H
FI	(<i>ang.</i> factor I) czynnik I układu dopełniacza
FITC	izotiocyanian fluoresceiny
FL	(<i>ang.</i> follicular lymphoma) chłoniak grudkowy
G-CSF	(<i>ang.</i> granulocyte colony-stimulating factor) - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów
GLUT1	transporter glukozy typu 1

GM-CSF	(<i>ang.</i> granulocyte macrophage colony-stimulating factor) czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów
GoF	(<i>ang.</i> gain of function) wariant powodujący konstytutywny wzrost aktywności białka
GPI	glikozylofosfatydyloinozitol
H	(<i>ang.</i> height) wysokość impulsu sygnału
Hb	stężenie hemoglobiny
ICANS	(<i>ang.</i> immune effector cell–associated neurotoxicity syndrome) neurotoksyczność związana z efektorową aktywnością limfocytów T
IFN-γ	interferon gamma
IgG	immunoglobulina klasy G
IGHV	(<i>ang.</i> immunoglobulin heavy variable) gen kodujący region zmienny łańcucha ciężkiego immunoglobuliny
IgM	immunoglobulina klasy M
IL	interleukina
IRRs	(<i>ang.</i> infusion-related reactions) reakcje związane z infuzją
ITGB2	(<i>ang.</i> integrin subunit beta 2) gen podjednostki beta-2 integryny
IVIG	(<i>ang.</i> intravenous immunoglobulin) dożylna terapia immunoglobulinowa
ICOS-L⁺	(<i>ang.</i> Inducible T-cell Co-Stimulator Ligand) indukowalny ligand kostymulatora limfocytów T
Komórki NK	komórki naturalnie cytotoksyczne
LAT1	transporter aminokwasów typu L
LP	(<i>ang.</i> lectin pathway) droga lektynowa układu dopełniacza
mAb	(<i>ang.</i> monoclonal antibody) przeciwciało monoklonalne
MAC	(<i>ang.</i> membrane attack complex) kompleks atakujący błonę

MACPF	(<i>ang.</i> membrane attack complex perforin-like) domena podobna do kompleksu atakującego błonę i perforyny
MASP	(<i>ang.</i> MBL-associated serine proteases) serynowe proteazy związane z MBL
MBL	(<i>ang.</i> mannose-binding lectin) lektyna wiążąca mannozę
MCL	(<i>ang.</i> mantle cell lymphoma) chłoniaka z komórek płaszcza
MCP	(<i>ang.</i> membrane cofactor protein) białko kofaktorowe błonowe (alternatywna nazwa dla CD46)
MCP	(<i>ang.</i> membrane cofactor protein) gen białka kofaktorowego błonowego
MDS	(<i>ang.</i> myelodysplastic syndrome) zespół mielodysplastyczny
MFI	mediana intensywności fluorescencji
MHC	(<i>ang.</i> major histocompatibility complex) główny układ zgodności tkankowej
MIDAS	(<i>ang.</i> metal ion-dependent adhesion site) miejsce adhezji zależne od wiązania jonów metali
MM	(<i>ang.</i> multiple myeloma) szpiczak mnogi
motyw ITAM	(<i>ang.</i> immunoreceptor tyrosine-based activation motif) motyw aktywacyjny oparty na resztach tyrozynowych
motyw ITIM	(<i>ang.</i> immunoreceptor tyrosine-based Inhibitory motif) motyw inhibitorowy oparty na resztach tyrozynowych
MTT	test metyloctazolyloctetrazoliowy
NHL	(<i>ang.</i> non Hodgkin lymphoma) chłoniak nieziarniczy
NHS	(<i>ang.</i> normal human serum) normalna (referencyjna) surowica ludzka
ΔNHS	normalna surowica ludzka inaktywowana termicznie
ORR	(<i>ang.</i> overall response rate) całkowity odsetek odpowiedzi na leczenie
Oś PI3K–AKT	oś kinazy 3-fosfatydylinozytolu kinazy białkowej B

PAMP	(<i>ang.</i> pathogen-associated molecular patterns) wzorce molekularne związane z patogenami
PBS	(<i>ang.</i> phosphate buffered saline) sól fizjologiczna buforowana fosforanami
PE	(<i>ang.</i> phycoerythrin) – kanał fluorescencji
PE-A	pole impulsu fluorescencji w kanale PE
PI	jodek propidyny
PI-low / PI-high	populacje o odpowiednio niskiej i wysokiej intensywności fluorescencji PI
PI3K	(<i>ang.</i> phosphoinositide 3-kinase) kinaza 3-fosfatydyloinozytolu
PML	(<i>ang.</i> progressive multifocal leukoencephalopathy) postępująca wieloogniskowa leukoencefalopatia
Pożywka RPMI 1640	pożywka (<i>ang.</i> Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium)
PRM	(<i>ang.</i> pattern recognition molecule) cząsteczka rozpoznająca wzorce
Przeciwciała anty HLA	(<i>ang.</i> anti-human leukocyte antigen) przeciwciała skierowane przeciwko ludzkim antygenom leukocytarnym
R-CHOP	(rytuksymab, cyklofosfamid, doksorubicyna, winkrystyna, prednizon)
R/R	(<i>ang.</i> relapsed/refractory) nawrotowy/oporny
ROS	(<i>ang.</i> reactive oxygen species) reaktywne formy tlenu
RTX	rytuksymab
scFv	(<i>ang.</i> single-chain variable fragment) jednołańcuchowy fragment zmienny przeciwciała
SCR	(<i>ang.</i> short consensus repeat) krótkie odcinki zgodności

SDS-PAGE	(<i>ang.</i> sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis) elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności dodecylsiarczanu sodu
SP	(<i>ang.</i> serine protease) domena proteazy serynowej
SQLC	(<i>ang.</i> squamous cell lung cancer) rak płaskonabłonkowy płuca
SSC	(<i>ang.</i> side scatter) rozpraszanie boczne, korelujące z ziarnistością i złożonością wewnętrzną komórki
TanCAR7	limfocyty T zmodyfikowane genetycznie do ekspresji tandemu receptorów CAR
TNF	(<i>ang.</i> tumor necrosis factor) czynnik martwicy nowotworu)
TP53	(<i>ang.</i> tumor protein p53) gen kodujący białko supresorowe p53
Treg	limfocyty T regulatorowe
vWFA	(<i>ang.</i> von Willebrand factor type A) domena typu A czynnika von Willebranda
WBA	(<i>ang.</i> whole blood assay) test w pełnej krwi
WBC	(<i>ang.</i> white blood cells) całkowita liczba leukocytów we krwi obwodowej
WWOX	(<i>ang.</i> WW domain-containing oxidoreductase) gen kodujący oksydoreduktazę zawierającą domenę WW
XTT	2,3-bis(2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenylo)-2H-tetrazolium-5-karboksanilid (sól tetrazoliowa)

3. Streszczenie

Układ dopełniacza stanowi istotny element odporności wrodzonej oraz ważny mechanizm efektorowy immunoterapii opartej na przeciwciałach monoklonalnych stosowanych w leczeniu chorób limfoproliferacyjnych. W przypadku przeciwciał skierowanych przeciwko antygenowi CD20, aktywacja klasycznej drogi dopełniacza prowadzi do powstania konwertaz C3 i C5, a następnie do formowania kompleksu atakującego błonę. Kompleks ten tworzy por w błonie komórkowej i wywołuje lizę komórki docelowej stanowiąc atrybut cytotoksyczności zależnej od dopełniacza. Skuteczność tego mechanizmu zależy zarówno od właściwości przeciwciała, jak i od funkcjonalnego stanu układu dopełniacza oraz działania jego regulatorów. Celem niniejszej pracy była ocena możliwości wzmocnienia aktywacji układu dopełniacza przez terapeutyczne przeciwciało anti-CD20 obinutuzumab poprzez zastosowanie hiperaktywnego wariantu składnika C2 klasycznej drogi dopełniacza. Obinutuzumab należy do przeciwciał anti-CD20 typu II, które wykazują wysoką zdolność indukcji mechanizmów zależnych od receptorów Fcγ, takich jak cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał oraz fagocytoza zależna od przeciwciał, a także bezpośredniego indukcji śmierci komórkowej, przy jednocześnie ograniczonej zdolności do aktywacji dopełniacza. W pracy przyjęto hipotezę, że modulacja aktywności elementów kaskady dopełniacza na poziomie konwertaz może zwiększyć udział cytotoksyczności zależnej od dopełniacza w działaniu tego przeciwciała.

Pierwszy etap badań obejmował optymalizację metod oznaczania cytotoksyczności zależnej od dopełniacza w warunkach *in vitro*. Ze względu na bardzo szybką kinetykę aktywacji układu dopełniacza oraz krótki czas aktywności konwertaz, konieczne było dobranie odpowiedniego czasu inkubacji oraz metody detekcji umożliwiającej szybki i powtarzalny odczyt. Porównano trzy strategie oznaczania cytotoksyczności: test cytometryczny z wykorzystaniem jodku propidyny, test metaboliczny oparty na redukcji rezazuryny oraz test uwalniania kalceiny. Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem linii komórkowych *Raji* i *Ramos*, różniących się wrażliwością na atak układu dopełniacza. Na podstawie uzyskanych wyników wybrano metodę charakteryzującą się najwyższą wiarygodnością pomiaru.

W kolejnym etapie badań oceniono wpływ rekombinowanego wariantu typu gain-of-function składnika C2 na cytotoksyczność zależną od dopełniacza indukowaną przez przeciwciała anti-CD20. Zastosowanie hiperaktywnego wariantu C2 prowadziło do zwiększenia stabilności i aktywności klasycznej konwertazy C3, co skutkowało nasileniem

cytotoksyczności zależnej od dopełniacza w modelach komórkowych. Efekt ten obserwowano zarówno w przypadku rytuksymabu, jak i obinutuzumabu. W szczególności wykazano, że wzmocnienie aktywności konwertaz umożliwia uzyskanie mierzalnej aktywności cytotoksycznej zależnej od dopełniacza również w przypadku przeciwciała typu II, które w warunkach standardowych wykazuje ograniczoną zdolność do aktywacji tej kaskady. Następnie przeprowadzono analizę działania hiperaktywnego wariantu C2 w modelu pierwotnych komórek przewlekłej białaczki limfocytowej izolowanych od pacjentów zakwalifikowanych do leczenia. Komórki te wykazywały zróżnicowaną wrażliwość na cytotoksyczność zależną od dopełniacza oraz na jej wzmocnienie poprzez suplementację wariantami białka C2. Analiza fenotypowa komórek białaczki nie wykazała jednoznacznej zależności pomiędzy poziomem ekspresji antygenu CD20 ani ekspresją błonowych regulatorów dopełniacza, takich jak CD46, CD55 i CD59, a podatnością komórek na wzmocnienie cytotoksyczności zależnej od dopełniacza. Jednocześnie stwierdzono istotną statystycznie, dodatnią korelację pomiędzy nasileniem limfocytozy a stopniem cytotoksyczności zależnej od dopełniacza obserwowanej po zastosowaniu hiperaktywnego wariantu C2. W celu oceny interferencji innych mechanizmów efektorowych przeprowadzono także eksperymenty w modelu krwi pełnej. Model ten umożliwia analizę działania przeciwciał terapeutycznych w obecności naturalnych populacji komórek efektorowych, takich jak komórki NK, monocyty i granulocyty, co pozwala na jednoczesną ocenę mechanizmów zależnych od receptorów Fc oraz mechanizmów związanych z aktywacją układu dopełniacza.

Przeprowadzone badania wykazały, że skuteczność aktywacji układu dopełniacza w immunoterapii przeciwciałami anti-CD20 nie zależy wyłącznie od charakterystyki etapu inicjacji kaskady, co było dotychczas ugruntowanym poglądem i determinantą podziału przeciwciał anti-CD20 na przeciwciała typu I i II, lecz może być skutecznie modulowana na poziomie konwertaz. Wzmocnienie aktywności tych kompleksów enzymatycznych prowadzi do zwiększenia cytotoksyczności zależnej od dopełniacza indukowanej przez przeciwciała terapeutyczne obydwu typów. Uzyskane wyniki wskazują na potencjalne znaczenie translacyjne przedstawionej strategii. Modulacja aktywności konwertaz dopełniacza może stanowić podejście umożliwiające zwiększenie skuteczności immunoterapii opartej na istniejących już przeciwciałach anti-CD20 bez konieczności ich modyfikacji strukturalnej czy tworzenia nowych generacji ww. leków. W perspektywie klinicznej strategia ta może przyczynić się do poprawy odpowiedzi terapeutycznej u części pacjentów z chorobami limfoproliferacyjnymi. Jednocześnie przedstawione badania mają

charakter mechanistyczny i wymagają dalszej weryfikacji w bardziej złożonych modelach biologicznych oraz w badaniach *in vivo*.

Słowa kluczowe: układ dopełniacza, obinutuzumab, białko C2, rytuksymab, immunoterapia

4. Abstract

Title: Modulation of complement-dependent cytotoxicity of anti-CD20 antibodies in the context of contemporary immunotherapy of lymphoproliferative malignancies

The complement system constitutes a fundamental component of innate immunity and represents a key effector mechanism underlying antibody-based immunotherapy used in the treatment of lymphoproliferative disorders. In the context of antibodies targeting the CD20 antigen, activation of the classical complement pathway leads to the formation of C3 and C5 convertases, followed by the assembly of the membrane attack complex (MAC). This complex forms transmembrane pores, ultimately resulting in lysis of the target cell, a process referred to as complement-dependent cytotoxicity (CDC). The efficacy of this mechanism is determined not only by the intrinsic properties of the antibody but also by the functional status of the complement system and the activity of its regulatory components. The aim of the present study was to evaluate whether complement activation induced by the therapeutic anti-CD20 antibody obinutuzumab can be enhanced through the application of a hyperactive variant of complement component C2 within the classical pathway. Obinutuzumab is classified as a type II anti-CD20 antibody, characterized by a strong ability to induce Fcγ receptor-mediated effector functions, including antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP), as well as direct induction of cell death. At the same time, it exhibits a relatively limited capacity to activate the complement cascade. We hypothesized that modulation of complement cascade activity at the level of convertases could enhance the contribution of complement-dependent cytotoxicity to the overall mechanism of action of this antibody.

The initial phase of the study focused on the optimization of *in vitro* methods for assessing complement-dependent cytotoxicity. Given the rapid kinetics of complement activation and the short half-life of convertase complexes, careful optimization of incubation times and detection techniques was required to ensure accurate and reproducible measurements. Three methodological approaches were compared: a flow cytometry-based assay utilizing propidium iodide, a metabolic assay based on resazurin reduction, and a calcein release assay. Experiments were conducted using the *Raji* and *Ramos* cell lines, which differ in their susceptibility to complement-mediated lysis. Based on the obtained data, the method demonstrating the highest reliability and reproducibility was selected for

further analyses.

In the subsequent phase, the impact of a recombinant gain-of-function variant of complement component C2 on antibody-induced complement-dependent cytotoxicity was investigated. The incorporation of the hyperactive C2 variant resulted in enhanced stability and activity of the classical C3 convertase, leading to increased CDC in cellular models. This effect was observed for both rituximab and obinutuzumab. Importantly, it was demonstrated that potentiation of convertase activity enables the induction of measurable CDC even in the case of type II antibodies, which under standard conditions exhibit limited complement-activating capacity. Further analyses were performed using primary chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells isolated from patients eligible for treatment. These cells displayed heterogeneous sensitivity to complement-dependent cytotoxicity and to its enhancement following supplementation with C2 variants. Phenotypic characterization did not reveal a clear correlation between susceptibility to enhanced CDC and either CD20 expression levels or the expression of membrane-bound complement regulators, including CD46, CD55, and CD59. However, a statistically significant positive correlation was observed between the level of lymphocytosis and the magnitude of CDC following treatment with the hyperactive C2 variant. To evaluate the interplay between different effector mechanisms, additional experiments were conducted in a whole blood model. This methodological approach facilitates the assessment of therapeutic antibody activity in the context of physiological effector cell populations, such as natural killer (NK) cells, monocytes, and granulocytes, thereby enabling the concurrent evaluation of Fc receptor-dependent mechanisms and complement activation.

The findings of this study demonstrate that the efficacy of complement activation in anti-CD20 antibody-based immunotherapy is not solely determined by the initiation phase of the cascade, which has traditionally served as the basis for distinguishing between type I and type II antibodies. Rather, it can be effectively modulated at the level of convertase complexes. Enhancement of convertase activity leads to increased complement-dependent cytotoxicity induced by therapeutic antibodies of both classes. These results highlight the potential translational relevance of the proposed strategy. Modulation of complement convertase activity may represent a viable approach to enhance the efficacy of immunotherapy based on existing anti-CD20 antibodies, without the need for structural modification or the development of novel antibody generations. From a clinical perspective, this strategy may improve therapeutic responses in selected patient populations with lymphoproliferative diseases. Nevertheless, the present findings are primarily mechanistic

and must be validated in more complex biological systems as well as in *in vivo* studies.

Key words: complement system, obinutuzumab, C2 protein, rituximab, immunotherapy

5. Część teoretyczna

5.1 Wprowadzenie do układu dopełniacza

Postęp w technikach biologii molekularnej oraz immunologii, jaki dokonał się w ostatnim dwudziestolecu, zrewolucjonizował postrzeganie układu dopełniacza, przekształcając go z prostego systemu przeciwdrobnoustrojowego w centralny układ regulacji odporności organizmu i homeostazy tkanek i narządów. W ostatnich latach dokonano odkryć, które rzuciły nowe światło na strukturę, funkcje oraz mechanizmy i miejsca działania dopełniacza, ujawniając kolejne poziomy jego biologicznej złożoności. Szerokie spektrum procesów, w których bierze układ dopełniacza od stanów zapalnych, przez choroby reumatoidalne i autodegeneracyjne aż po patofizjologię nowotworzenia czy zmiany metabolizmu na poziomie komórki, wymusza nowe spojrzenie na funkcje układu dopełniacza oraz ich głęboki wpływ na mechanizmy odporności i patogenezę chorób¹. Niniejsza monografia naukowa wpisuje się w aktualne spojrzenie na nowe funkcje i zastosowania układu dopełniacza, badając ich interakcje z terapiami przeciwnowotworowymi i potencjalne możliwości modulacji immunoterapii przy wykorzystaniu technik biotechnologii biologii molekularnej.

Dopełniacz jest jednym z najstarszych elementów układu odpornościowego i współewoluował z filogenetycznie młodszymi szlakami biochemicznymi, stąd wynika jego bardzo wszechstronny udział w procesach regulacji homeostazy^{2,3}. Oprócz swej podstawowej roli w eliminacji drobnoustrojów, układ dopełniacza uczestniczy także w wielu innych fizjologicznych procesach, takich jak: dojrzewanie synaps, usuwanie kompleksów immunologicznych, angiogeneza, mobilizacja hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych, regeneracja tkanek czy metabolizm lipidów, prawidłowe działanie procesów krzepnięcia i wydzielanie gruczołowe. W ostatnich latach opisano wiele działań obejmujących aktywność autokrynną i interkrynną, powodowaną przez endogenną pulę białek dopełniacza syntetyzowanych miejscowo, określaną mianem komplosomu (*ang.* complosome). W przeciwieństwie do klasycznego, osoczowego działania, białka dopełniacza mogą być aktywne także w obrębie komórki, gdzie uczestniczą w regulacji kaskad sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Wykazano, że mechanizmy te są zaangażowane m.in. w kontrolę metabolizmu komórkowego, funkcji mitochondrialnych, autofagii oraz szeroko pojętej ekspresji genów. Tym samym aktywność ta stanowi funkcjonalnie odrębny

aspekt działania układu dopełniacza, niezwiązany bezpośrednio z jego klasyczną rolą w odpowiedzi immunologicznej.⁴⁻⁶ Dysregulacja układu dopełniacza może prowadzić zatem nie tylko do zaburzeń odporności i podywższonej podatności na infekcje, ale także do wielu innych chorób dotyczących różnych tkanek i narządów, w tym do autoagresji i rozwoju chorób autoimmunologicznych, endokrynologicznych i metabolicznych. Takie zróżnicowanie funkcji jest pochodną złożoności budowy - układ dopełniacza składa się z ponad 50 białek rozpuszczalnych oraz związanych z błonami komórkowymi⁷. Podczas gdy główna pula rozpuszczonych białek układu dopełniacza jest syntetyzowana przez hepatocyty, inne składniki są produkowane lokalnie przez ściśle określone, wyspecjalizowane populacje komórek układu odpornościowego ale także przez komórki tkanek niezwiązanych z odpornością. Przykładowo monocyty i makrofagi stanowią główne źródło składowych szlaku klasycznego, takich jak C1q, C1r i C1s, neutrofile wykazują zdolność do syntezy wybranych białek regulatorowych oraz komponentów szlaku alternatywnego, podobnie jak komórki tkanki tłuszczowej żółtej⁸. Wiele typów komórek, w szczególności komórki aktywnie uczestniczące w odpowiedzi immunologicznej, wykazuje zdolność do lokalnej ekspresji wybranych składowych kaskady dopełniacza oraz jej regulatorów, co jest związane z koniecznością kontroli spontanicznej aktywacji ścieżki alternatywnej na ich powierzchni. Dotyczy to nie tylko komórek układu immunologicznego, ale również komórek nienależących do niego, takich jak fibroblasty, komórki nabłonkowe czy śródbłonkowe, które mogą syntetyzować liczne błonowe regulatory dopełniacza, w tym CD46, CD55 i CD59, pełniąc istotną rolę w ochronie tkanek przed niekontrolowaną aktywacją kaskady. W tym kontekście wykazano, że komórki dendrytyczne mogą produkować m.in. C3 i C4, co może wpływać na ich funkcje prezentacji antygeny, natomiast limfocyty B i T w określonych warunkach aktywacyjnych również wykazują zdolność do lokalnej syntezy elementów układu dopełniacza.⁹ Coraz więcej danych wskazuje, że lokalna synteza białek dopełniacza przez określone populacje komórkowe nie stanowi jedynie uzupełnienia puli osoczowej, lecz może pełnić wyspecjalizowane funkcje biologiczne w mikrośrodkowisku tkanek. Przykładem jest miejscowa produkcja C1q przez makrofagi tkankowe, która odgrywa rolę w usuwaniu komórek apoptotycznych i modulacji odpowiedzi zapalnej, niezależnie od klasycznej aktywacji kaskady. Podobnie lokalna ekspresja C3 i jego fragmentów przez komórki prezentujące antygen może wpływać na kształtowanie odpowiedzi adaptacyjnej, a obecność regulatorów dopełniacza na powierzchni komórek efektorowych i strukturalnych warunkuje równowagę pomiędzy skuteczną odpowiedzią immunologiczną a ochroną tkanek gospodarza. Obserwacje te uzasadniają rosnące

zainteresowanie badaniami nad tkankowo-specyficznymi rolami dopełniacza, szczególnie w kontekście chorób zapalnych, autoimmunologicznych oraz nowotworowych.¹⁰

5.1.1. Organizacja i funkcje układu dopełniacza

Choć układ dopełniacza w piśmiennictwie głównie przedstawiany jest jako liniowa kaskada^{2,10,11} składająca się z trzech oddzielnych szlaków, w rzeczywistości stanowi on sieć w formie węzła centralnego ściśle powiązaną z innymi systemami. W zależności od czynnika wyzwalającego, różne mechanizmy inicjacji i regulacji współpracują ze sobą, aby zapewnić amplifikację kaskady oraz pożądane mechanizmy efektorowe.

Omówienie należy zacząć od CP, która jest często określana jako zależna od przeciwciał ze względu na wydatną aktywację przez klastry immunoglobulin klasy M (IgM) i/lub immunoglobulin klasy G (IgG), przede wszystkim IgG1 oraz IgG3. Nie jest to jednak wyłączny sposób aktywacji CP. Pierwszy jej element, białko C1q - cząsteczka rozpoznająca wzorce (*ang. pattern recognition molecule*; PRM), aktywuje dopełniacz poprzez bezpośrednie rozpoznanie określonych struktur na powierzchni komórek apoptotycznych i drobnoustrojów lub pośrednio poprzez endogenne pentraksyny (np. białko C-reaktywne, CRP).¹²⁻¹⁴

W ramach kompleksu C1 (C1qr2s2) proteazy C1r i C1s są aktywowane kolejno po przyłączeniu C1q do powierzchni. C1r aktywuje C1s a następnie C1s dokonuje proteolizy C4 na C4a i C4b, odsłaniając wcześniej ukryty tioester i prowadząc do kowalencyjnego osadzania C4b na pobliskich powierzchniach w procesie opsonizacji. Do C4b przyłącza się kolejna składowa C2 a C1s rozkłada związaną z C4b cząsteczkę C2 na fragmenty C2a i C2b, co prowadzi do powstania konwertazy C3 drogi klasycznej (C4b2a) – kompleksu enzymatycznego zdolnego do rozkładu C3 i inicjowania dalszej amplifikacji oraz propagowania funkcji efektorowych. C3 jest rozszczepiane przez kompleks C4b2a (konwertazę C3) na dwa fragmenty: C3a i C3b¹⁵. C3a działa jako anafilatoksyna, rekrutując inne komórki układu immunologicznego oraz oddziałując z komórkami śródbłonna, komórkami tucznymi oraz komórkami mięśniówki gładkiej. C3b może inicjować powstawanie konwertaz AP poprzez interakcje z czynnikiem B (*ang. factor B*; FB), biorąc tym samym udział w tzw. pętli amplifikacji, której celem jest wzmocnienie kaskady. Drugim scenariuszem dla fragmentu C3b jest wiązanie się z kompleksem C4b2a, tworząc w ten sposób konwertazę klasyczną C5 (C4b2a3b). Konwertaza C5 dokonuje proteolizy C5 na składowe C5a i C5b, gdzie pierwsza działa jako anafilatoksyna, a druga inicjuje

powstawanie kompleksu atakującego błonę (*ang.* membrane attack complex; MAC), który wbudowuje się w błonę komórkową, tworząc pory prowadzące do lizy osmotycznej atakowanej komórki¹⁶. CP może być również inicjowana w mechanizmie niezależnym od przeciwciał przez różne sygnały pojawiające się podczas infekcji i procesów patofizjologicznych, takie jak np. białko C-reaktywne, białka wirusowe, polianiony, komórki apoptotyczne czy amyloid.¹⁷⁻¹⁹

Kolejnym elementem jest droga lektynowa (*ang.* lectin pathway, LP). Zasadniczo funkcjonuje ona w sposób podobny do klasycznej. W tej ścieżce lektyna wiążąca mannozę (*ang.* mannose-binding lectin; MBL) i fikoliny (FCN) pełnią rolę PRM, rozpoznając głównie wzorce węglowodanowe charakterystyczne dla mikroorganizmów. Każda z tych cząsteczek tworzy kompleksy z serynowymi proteazami związanymi z MBL (*ang.* MBL-associated serine proteases; MASP), które strukturalnie przypominają C1r i C1s. Spośród nich MASP-2 jest tą kluczową, ponieważ rozkłada zarówno C4, jak i C2, co prowadzi do powstania konwertazy C3, identycznej jak w CP. MASP-1, z kolei, rozkłada C2, ale nie C4, pełniąc rolę wspomagającą w późniejszych etapach LP, zwiększając efektywność formowania konwertazy. Obie te proteazy działają w ścisłej współpracy, co zapewnia skuteczne rozpoznanie i eliminację patogenów poprzez aktywację C2 i C4 oraz ostateczne generowanie kompleksów konwertazy C3.²⁰⁻²²

W przeciwieństwie do CP i LP, trzeci element - AP obejmuje nie tylko jeden schemat aktywacji ale kilka częściowo nakładających się na siebie procesów. W odróżnieniu od pozostałych ścieżek, AP nie wymaga specyficznego aktywatora. Mechanizm spontanicznego rozpadu białka C3, tzw. „tick-over” utrzymuje układ dopełniacza w stałej gotowości, umożliwiając ciągłe monitorowanie komórek²³. W natywnej formie C3, centralna cząsteczka AP jak i całego układu dopełniacza, jest stosunkowo nieaktywna i posiada niewiele ligandów. Jednak niewielka część cząsteczek C3 ulega spontanicznej hydrolizie, co prowadzi do powstania C3(H₂O), odsłaniającego nowe miejsca wiążące²⁴. Proteaza FB wiąże się z C3(H₂O) i jest rozkładana przez czynnik D (*ang.* factor D; FD), generując początkową, głównie rozpuszczalną konwertazę C3 (C3(H₂O)Bb). Ta konwertaza rozszczepia kolejne cząsteczki C3 na fragmenty aktywne: C3a i C3b. Reaktywne wiązanie tioestrowe w C3b umożliwia jego szybkie przyłączanie do pobliskich powierzchni. Jeśli C3b wiąże się z powierzchnią obcą (np. komórkami bakteryjnymi, grzybowymi lub uszkodzonymi tkankami), która nie jest zdolna do jego inaktywacji, amplifikacja AP następuje poprzez formowanie kolejnych konwertaz C3 (C3bBb)^{25,26}. Z kolei na komórkach ludzkich białka regulatorowe dopełniacza, takie jak CD46, CD55 oraz rozpuszczalny

czynnik H (*ang.* factor H, FH) wiążący się do powierzchni komórek zapobiegają nadmiernej aktywacji, utrzymując równowagę i chroniąc przed autoagresją.^{27,28}

AP obejmuje również mechanizm inicjacji oparty na rozpoznawaniu wzorców przez properdynę, podobnie jak w CP i LP. Properdyna, będąca jednocześnie stabilizatorem konwertazy C3, rozpoznaje wzorce molekularne związane z patogenami (*ang.* pathogen-associated molecular patterns, PAMP) oraz uszkodzeniami (*ang.* damage-associated molecular patterns, DAMP) na powierzchniach komórek obcych i apoptotycznych. Po związaniu z tymi strukturami properdyna inicjuje i wzmacnia odpowiedź dopełniacza, wiążąc rozpuszczalną C3b do tych powierzchni. Stabilizuje również kompleksy konwertazy C3 (C3bBbP), wzmacniając w ten sposób sygnał i ułatwiając formowanie *de novo* kolejnych kompleksów aktywacyjnych^{29,30}. Ten wielowarstwowy mechanizm działania AP, który pomija komponenty C1, C2 i C4, czyni ją wyjątkową spośród pozostałych dróg dopełniacza, pozwalając na skuteczne wykrywanie i eliminację patogenów w sposób niezależny od przeciwciał, czy nawet obecności PAMP.

Amplifikacja AP zwiększa gęstość deponowanych cząsteczek C3b, co stopniowo prowadzi do powstania konwertaz zawierających dodatkową cząsteczkę C3b (np. C4b2b3b lub C3bBb3b). Zmiana ta przesuwaa specyficzność substratową z C3 na C5. Konwertazy C5 rozkładają C5 na anafilatoksynę C5a oraz fragment C5b. Fragment C5b, po połączeniu z C6 i C7, tworzy kompleks, który wbudowuje się w błonę komórkową. Kompleks ten następnie wiąże C8, co indukuje przyłączanie wielu jednostek C9, prowadząc do utworzenia MAC.³¹

5.2 Regulacja układu dopełniacza

Aktywacja CP jest kontrolowana przez białko z rodziny serpin, inhibitor C1 (C1Inh). C1Inh wiąże się z C1r i C1s, co prowadzi do dysocjacji kompleksu C1 i uwolnienia wolnego C1q.^{32,33} Dodatkowo, C1Inh wiąże się z nieaktywowanymi formami C1r i C1s w kompleksie C1, stabilizując je i opóźniając ich spontaniczną aktywację³⁴. C1Inh pełni również dodatkowe funkcje związane ze szlakiem kininowym związanym ze stanem zapalnym, wazodylatacją i percepcją bólu. Jego dysregulacja może prowadzić do rozwoju chorób. Przykładowo, obrzęk naczynioruchowy (angioedema) to schorzenie spowodowane dziedzicznym lub nabytym niedoborem C1Inh. Obrzęki są wywoływane przez zwiększoną przepuszczalność naczyń krwionośnych w odpowiedzi na podwyższony poziom bradykininy wynikający z niedoboru C1Inh. Dokładne poznanie tego mechanizmu umożliwiło zaprojektowanie odpowiedniej terapii. Rekombinowane oraz osoczopochodne

preparaty C1Inh są zatwierdzonymi środkami terapeutycznymi w leczeniu dziedzicznego obrzęku naczynioruchowego³⁵

Inhibitory C1q uwalniane w warunkach fizjologicznych lub patologicznych, takie jak proteoglikan siarczanu chondroityny-4 oraz produkt hemolizy – hem, mogą wiązać się z C1q i hamować CP^{36,37}. Mechanizm działania hemu, podobnie jak wielu syntetycznych inhibitorów C1q, polega na wiązaniu z globularną częścią C1q i zmianie jej właściwości elektrostatycznych³⁸. Kalretikulina, uwalniana podczas śmierci komórek lub syntezowana przez pasożyty może również działać jako inhibitor C1q, zapobiegając aktywacji CP.^{39,40} Inhibicja LP jest regulowana przez białka MASP-3, MAp44 i MAp19, które wykazują wysoką homologiczność sekwencji z MASP-1 i MASP-2 oraz mają podobne powinowactwo do wiązania z MBL i fikoliny⁴¹⁻⁴³. Białka te mogą konkurować z MASP-1 i MASP-2, ale nie są zdolne do rozszczepienia C2 ani C4, co uniemożliwia dalszą aktywację kaskady. Ponadto, C1Inh może kontrolować aktywację LP poprzez hamowanie aktywności MASP-1 i MASP-2, ale nie MASP-3^{44,45}.

Najważniejszą rolę w hamowaniu dopełniacza spełniają inhibitory AP, o czym decyduje jej zdolność do amplifikacji pozostałych ścieżki oraz samej siebie, a także spontaniczne uruchamianie poprzez samoistny rozpad białka C3. Istnieje kilkanaście inhibitorów dopełniacza, głównie skierowanych właśnie przeciwko AP. Inhibitory te często mają nakładające się funkcje oraz zdolności do regulacji wszystkich ścieżek aktywacji. Rodzina białek FH obejmuje siedem białek o podobnej strukturze, które łączy zdolność do wiązania aktywnego fragmentu C3b. Geny kodujące te białka zlokalizowane są na chromosomie 1q32. Najlepiej poznanym przedstawicielem tej grupy jest FH, którego funkcja polega na regulacji aktywacji AP układu dopełniacza oraz działaniu przeciwzapalnym. FH jest zdolny do wspomagania proteolizy fragmentu C3b prowadzącej do inaktywacji białka (aktywność kofaktorowa, *ang.* cofactor activity, CA) oraz do nieodwracalnego rozdysocjowywania komponentów konwertazy alternatywnej (*ang.* decay-acceleratin activity, DAA). Funkcje białka FHL-1 (*ang.* factor H-like protein 1) są zbliżone do FH. Rola pozostałych pięciu białek, określanych jako FHR (*ang.* factor H-related proteins, białka FH: FHR-1, FHR-2, FHR-3, FHR-4, FHR-5), polega na modulowaniu aktywności FH. Białka te, podobnie jak FH, syntetyzowane są głównie w wątrobie^{20,27}. Wszystkie białka tej rodziny są zbudowane z domen określanych mianem Sushi lub SCR (*ang.* short consensus repeat), które cechują się wysoką homologią wobec analogicznych domen budujących FH, jednakże FHR nie posiadają wszystkich domen SCR charakterystycznych dla FH, co powoduje, iż białka te współzawodniczą z FH o wiązanie

do C3b ale nie są zdolne do skutecznego hamowania dalszej propagacji AP.

Podczas gdy FH działa jako rozpuszczalny inhibitor alternatywnej konwertazy C3 i C5, białko CD46 (*ang.* membrane cofactor protein, MCP), CD55 (*ang.* decay-acceleration factor, DAF) oraz receptor dopełniacza 1 (CR1) działają jako inhibitory błonowe. W odróżnieniu od rozpuszczalnego inhibitora AP, FH, białko wiążące C4b (*ang.* C4b-binding protein, C4BP) jest inhibitorem wszystkich ścieżek, wykazując CA oraz DAA w stosunku zarówno do C3b jak i C4b, przy czym dominujące jest powinowactwo do C4b. C4BP jest białkiem złożonym z 6 lub 7 łańcuchów α i pojedynczego łańcucha β . Maksymalnie cztery cząsteczki C4b mogą jednocześnie oddziaływać z łańcuchami α jednej cząsteczki C4BP, podczas gdy łańcuch β wiąże białko S układu krzepnięcia, przyczyniając się do regulacji hemostazy^{46,47}. Błonowym odpowiednikiem C4BP jest CR1, który wykazuje CA i DAA w stosunku do aktywnych składowych konwertaz klasycznej/lektynowej i alternatywnej. Podobnie, CD46/MCP wykazuje aktywność kofaktorową w stosunku do C3b i C4b, lecz nie posiada aktywności DAA, z kolei aktywność DAA bez aktywności CA wykazuje CD55/DAF. Partnerem dla inhibitorów o aktywności CA jest rozpuszczalna w surowicy proteaza serynowa, czynnik I (*ang.* factor I, FI). Aktywność FI prowadzi do powstania produktów degradacji odpowiednio C3b, czyli iC3b oraz C4b, czyli iC4b, które nie mają zdolności tworzenia aktywnych konwertaz⁴⁵. CR 1 wyróżnia się jako kofaktor FI dzięki zdolności do indukowania dalszego rozkładu iC3b, co prowadzi do degradacji C3c i C3dg⁴⁰, podczas gdy FH, MCP i C4BP powodują jedynie rozkład C3b do iC3b. Nie wykryto formy zymogenowej FI. Piśmiennictwo wymienia ponadto białka wzmacniające rozszczepianie C3b przez FI w obecności kofaktorów. Trombomodulina wiąże się z C3b, negatywnie regulując dopełniacz poprzez przyspieszanie inaktywacji C3b przez FI w obecności FH i C4BP⁴⁸. Czynn timer von Willebranda, podstawowe białko dla agregacji i adhezji płytek krwi, również zwiększa skuteczność FH jako kofaktora FI.⁴⁹

Układ dopełniacza jest także regulowany na poziomie formowania MAC. Podstawowe znaczenie ma białko C8, które odgrywa wiodącą, podwójną rolę w tworzeniu i regulacji MAC. W przypadku braku bezpośredniego kontaktu z błoną komórkową wiązanie C8 z kompleksem C5b-7 ulega zmianom konformacyjnym, które prowadzą do utraty zdolności do tworzenia porów, co sprawia, że C8 działa jako inhibitor MAC.⁵⁰ Nieaktywne produkty końcowe, takie jak sC5b-7, sC5b-8 i sC5b-9, które nie wiążą się z błoną, są wychwytywane przez klasterynę i witronektynę. Te dwa regulatory nadają kompleksom wysoką rozpuszczalność w wodzie i zapobiegając ich wiązaniu z błoną.⁵¹⁻⁵³

Białko CD59 zakotwiczone poprzez łańcuch glikozylofosfatydylinozytolowy jest

obecne na większości typów komórek^{54,55} i blokuje perforowanie błony przez kompleksy C5b-8 i C5b-9^{56,57}. CD59 nie wiąże wolnych form białek C8 i C9, ale oddziałuje z ich domeną MACPF (*ang.* Membrane Attack Complex Perforin-like, domena podobna do kompleksu atakującego błonę i perforyny) po zmianach konformacyjnych związanych z tworzeniem kompleksu C5b-9.⁵⁸⁻⁶⁰ Dodatkowo, kompleks końcowy dopełniacza C5b-9 może być usuwany z błony docelowych komórek w ciągu kilku minut po jego osadzeniu. Proces ten odbywa się poprzez uwalnianie za pomocą pęcherzyków błonowych (egzocytoza) lub przez internalizację i degradację.⁶¹⁻⁶⁴

5.3. Przeciwciała monoklonalne anty-CD20

CD20 jest białkiem transbłonowym, które zostało zidentyfikowane i szeroko opisane w piśmiennictwie jako istotny cel terapeutyczny w leczeniu nowotworów wywodzących się z limfocytów B⁶⁵. Ekspresja CD20 pojawia się na stosunkowo późnym etapie różnicowania komórek B i jest charakterystyczna dla większości dojrzałych limfocytów B, natomiast nie występuje na hematopoetycznych komórkach macierzystych, wczesnych komórkach pre-B ani na końcowo zróżnicowanych komórkach plazmatycznych. Dzięki takiemu profilowi ekspresji CD20 stanowi atrakcyjny cel terapeutyczny, umożliwiający selektywną eliminację dojrzałych limfocytów B przy zachowaniu zdolności do ich późniejszej regeneracji z komórek progenitorowych.⁶⁶ Najpowszechniej przyjęty model zakłada, że CD20 występuje głównie w postaci tetrameru na powierzchni komórek. CD20 może być uwalniany z komórki lub internalizowany po związaniu przeciwciała.⁶⁷ Fizjologiczna funkcja CD20 jest nadal nie w pełni poznana, dotychczasowe badania wykazały, że CD20 uczestniczy w sygnalizacji wapniowej zależnej od działania receptora B-komórkowego (*ang.* B-cell receptor, BCR).⁶⁸ Wykazano, że delecja genu *CD20* u myszy nie zaburza ogólnego rozwoju limfocytów B, ich lokacji w tkankach, proliferacji, odpowiedzi na sygnał czy odpowiedzi przeciwciał zależnych od limfocytów T, co sugeruje, że CD20 nie jest niezbędny dla podstawowej funkcjonalności komórek B.⁶⁹

Rytuksymab (RTX) był pierwszym przeciwciałem monoklonalnym anty-CD20 zarejestrowanym w leczeniu chorób limfoproliferacyjnych. Jego wprowadzenie zrewolucjonizowało terapię chłoniaków nieziarniczych (*ang.* non Hodgkin lymphoma, NHL) i przewlekłej białaczki limfocytowej (*ang.* chronic lymphocytic leukemia, CLL)⁷⁰. Nowe protokoły immunochemioterapeutyczne spowodowały poprawę wskaźników odpowiedzi na leczenie oraz przeżywalności w porównaniu z samą chemioterapią, co zostało udowodnione w wielu badaniach klinicznych⁷¹⁻⁷⁵. W kolejnych latach wykazano, że

stosowanie RTX w terapii podtrzymującej dodatkowo poprawia wyniki u pacjentów z chłoniakiem grudkowym (*ang.* follicular lymphoma, FL)⁷⁶⁻⁸¹. Pozytywne dane zebrane w ramach badań klinicznych oraz doświadczenia hematologów z codziennej pracy z pacjentami ugruntowały pozycję RTX jako standardu leczenia NHL i CLL⁸²⁻⁸⁴. Ogromny sukces, jakim było wprowadzenie do użycia RTX dał bodziec do konstruowania kolejnych przeciwciał. Do zastosowania klinicznego wprowadzono również inne przeciwciała anti-CD20, takie jak ofatumumab będący ludzkim przeciwciałem zatwierdzonym do leczenia opornej na leczenie CLL^{85,86} oraz tosytumomab i ibrytumomab tiuksetan, które są przeciwciałami mysimi stosowanymi klinicznie jako radioimmunokoniugaty⁸⁷.

Pomimo poprawy wyników leczenia po wprowadzeniu RTX, część pacjentów doświadczało nawrotu choroby. Kolejne cykle leczenia wiązały się ze skróceniem czasu trwania odpowiedzi na leczenie oraz rozwojowi zjawiska oporności na RTX. Skłoniło to badaczy do poszukiwania nowych przeciwciał monoklonalnych anti-CD20 o cechach strukturalnych i mechanistycznych odróżniających je od RTX, czego rezultatem było stworzenie obinutuzumabu.

Obinutuzumab (GA101) jest humanizowanym, glikoenzymatycznie zmodyfikowanym przeciwciałem anti-CD20, zarejestrowanym przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (*ang.* Food and Drug Administration, FDA) do leczenia CLL w pierwszej linii w skojarzeniu z chlorambucylem, do leczenia FL w pierwszej linii w połączeniu z chemioterapią oraz do leczenia nawrotowego lub opornego (*ang.* relapsed/refractory, r/r) FL w połączeniu z bendamustyną⁸⁸. Został również zatwierdzony do stosowania w CLL w skojarzeniu z wenetoklaksem, ibrutynibem lub akalabrutynibem⁸⁹⁻⁹¹. W Europie obinutuzumab jest zatwierdzony w połączeniu z chlorambucylem, wenetoklaksem lub ibrutynibem do leczenia wcześniej nieleczonej CLL, a także w połączeniu z chemioterapią do leczenia wcześniej nieleczonego FL lub z bendamustyną w opornym FL⁹²⁻⁹⁵.

Obinutuzumab został stworzony poprzez humanizację macierzystego przeciwciała mysiego B-Ly1, a następnie glikoenzymatyczną modyfikację węglowodanów w regionie Fc. Brak reszty cukrowej fukozy w oligosacharydach IgG w regionie Fc zwiększa jego aktywność poprzez wzmocnienie powinowactwa wiązania z receptorami FcγRIIIa na komórkach efektorowych układu odpornościowego zdolnych do przeprowadzenia reakcji ADCC⁹⁶. Ponadto obinutuzumab posiada zmienioną sekwencję aminokwasów w regionie zawiasowego w porównaniu z macierzystym przeciwciałem B-Ly^{97,98}. Analiza struktury krystalicznej wykazała, że obinutuzumab wiąże się z CD20 w orientacji przestrzennej

różniące się od RTX. Kąt regionu zawiasowego w przypadku obinutuzumabu jest większy o 30 stopni, co skutkuje różnicami w układzie przestrzennym par CD20 związanych z pojedynczą cząsteczką każdego z przeciwciał.⁹⁹ Mikroskopia konfokalna wykazała odmienne połączenia kompleksów CD20 oraz różnice w ich rozmieszczeniu w błonie komórkowej. Uważa się, że te różnice konformacyjne są podstawą odmiennych odpowiedzi komórkowych wywoływanych przez przeciwciała typu I i typu II, których reprezentantami są odpowiednio RTX i obinutuzumab.

Przeciwciała monoklonalne anty-CD20 są powszechnie stosowane na oddziałach hematologicznych, onkologicznych oraz reumatologicznych w większości krajów świata.

5.3.1. Mechanizm działania i podział przeciwciał anty-CD20: typ I i typ II

Po związaniu z komórkami CD20-dodatnimi przeciwciała wywołują co najmniej trzy różne funkcje efektorowe: bezpośrednią indukcję śmierci komórki, cytotoksyczność komórkową, zarówno zależną od przeciwciał jak i fagocytozę zależną od przeciwciał oraz cytotoksyczność zależną od dopełniacza^{67,100}. Przeciwciała anty-CD20 klasyfikuje się jako typu I lub II w zależności od ich sposobu wiązania z CD20 oraz podstawowego mechanizmu zabijania komórek CD20-dodatnich.^{101,102} Przeciwciała typu I charakteryzują się zdolnością do indukowania translokacji CD20 do sfingolipidowo-cholesterolowych mikrodomen błonowych (tzw. tratw lipidowych)^{103,104}. Rekrutacja CD20 do tych struktur skutkuje wysoką gęstością kompleksu antygen-przeciwciało i przez to wysoką efektywnością cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (*ang.* complement-dependent cytotoxicity, CDC).^{105,106} Kolejną właściwością przeciwciał typu I jest wyższy stopień nasycenia powierzchni komórek docelowych, wiążą się one z limfocytami B w ilości około dwukrotnie większej niż przeciwciała typu II.¹⁰⁷ Zjawisko to przypisuje się odmiennym konfiguracjom przestrzennym antygen-przeciwciało. Przeciwciała typu I rozpoznają epitopy pomiędzy dimerami lub tetramerami CD20, co umożliwia jednoczesne wiązanie dwóch cząsteczek przeciwciała na pojedynczy kompleks oligomeryczny CD20. Natomiast przeciwciała typu II wiążą epitopy zlokalizowane wewnątrz tetramerów CD20, co ogranicza wiązanie do jednej cząsteczki przeciwciała na tetramer.¹⁰⁸

Zgodnie z danymi eksperymentalnymi, przeciwciała typu II nie indukują translokacji kompleksu CD20 do tratw lipidowych i wykazują ograniczoną aktywność CDC. Równocześnie, przeciwciała typu II wywołują silniejszą odpowiedź w postaci adhezji homotypowej oraz bezpośredniego efektu cytotoksycznego.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ Pierwotnie zjawisko to

klasyfikowano jako apoptozę, jednak dane z badań funkcjonalnych wykazały, iż jest to forma śmierci komórkowej o charakterze niezależnym od kaspaz i pozbawiona klasycznych cech apoptozy, takich jak fragmentacji DNA czy aktywacji szlaku kaspazowego. Mechanizm ten obejmuje reorganizację cytoszkieletu aktynowego, fuzję i destabilizację błon lizosomalnych oraz zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu (*ang.* reactive oxygen species, ROS) prowadzącą do uszkodzenia struktur komórkowych i lizy.^{109,110}

Mechanizmy efektorowe zaangażowane w eliminację komórek docelowych przez przeciwciała anty-CD20, w tym ADCC oraz ADCP (*ang.* antibody-dependent cellular phagocytosis, fagocytoza zależna od przeciwciał), są inicjowane przez oddziaływanie domeny Fc przeciwciała z aktywującymi receptorami Fcγ na komórkach efektorowych. W mechanizmie ADCC kluczową rolę odgrywa receptor FcγRIIIa (CD16a) ekspresowany na komórkach NK (*ang.* natural killers), natomiast ADCP w monocytach i makrofagach jest mediowana przez aktywujące receptory Fcγ zawierające motyw ITAM (*ang.* immunoreceptor tyrosine-based activation motif, motyw aktywacyjny oparty na resztach tyrozynowych), w szczególności FcγRIIa (CD32a) oraz FcγRI (CD64), które po związaniu kompleksów immunologicznych inicjują sygnalizację prowadzącą do fagocytozy opsonizowanych komórek docelowych. Jednocześnie izoforma FcγRIIb (CD32b), zawierająca motyw ITIM, pełni funkcję receptora hamującego i nie uczestniczy bezpośrednio w inicjacji fagocytozy.¹¹¹ Co istotne, aktywność ta jest niezależna od przypisania przeciwciała do typu I czy II. Fc gamma receptor IIIa (FcγRIIIa), wykazujący ekspresję głównie na naturalnych komórkach cytotoksycznych (NK), a także na monocytach i makrofagach, ulega aktywacji w wyniku krzyżowego wiązania fragmentów Fc z kompleksem antygen–przeciwciało. Prowadzi to do aktywacji mechanizmów cytotoksycznych, takich jak uwalnianie mediatorów cytotoksycznych (np. granzymów) przez komórki NK, a także może sprzyjać eliminacji komórek docelowych. Należy jednak podkreślić, że w przypadku fagocytozy kompleksów immunologicznych główną rolę odgrywają Fc gamma receptor I (FcγRI) oraz Fc gamma receptor IIa (FcγRIIa), które stanowią podstawowe receptory fagocytarne monocytów i makrofagów.⁶⁷

Polimorfizm alleliczny FcγRIIIa w pozycji 158 skutkuje obecnością dwóch wariantów: o niższym powinowactwie (158F – fenyloalanina) oraz o wyższym powinowactwie (158V – walina).¹¹²⁻¹¹⁴ Wzajemne oddziaływania glikozyłowanych domen Fc i domen receptorowych regulują efektywność tej interakcji¹¹⁵.

Mimo że przeciwciała typu I i II wykazują porównywalny potencjał ADCC, wybrane przeciwciała, jak np. obinutuzumab (GA101), zostały poddane inżynierii glikozylacyjnej w

celu zwiększenia ich powinowactwa do FcγRIIIa, co przekłada się na skuteczniejsze rekrutowanie efektorowych komórek odpornościowych i wyższą aktywność cytotoksyczną¹¹⁶. Z klinicznego punktu widzenia, wykazano korelację między obecnością wariantu FcγRIIIa-158V a lepszą odpowiedzią na leczenie RTX u pacjentów z chłoniakami nieziarniczymi¹¹⁷.

Badania modelowe z zastosowaniem transgenicznych myszy ekspresujących ludzki CD20 wykazały, że wydajność deplecji komórek B przez przeciwciała anty-CD20 zależy od warunków eksperymentalnych, w tym od masy nowotworu (*ang.* tumor burden). W modelach z niską masą nowotworu zarówno przeciwciała typu I, jak i typu II skutecznie eliminowały komórki nowotworowe, przy czym te pierwsze głównie poprzez aktywację układu dopełniacza. Natomiast przy wysokiej masie nowotworu efektywna deplecja wymagała zaangażowania wielu mechanizmów efektorowych; w tych warunkach przeciwciała typu II, charakteryzujące się słabą zdolnością aktywacji dopełniacza, było nieskuteczne w eliminacji komórek CD20⁺, podczas gdy przeciwciała typu I nadal wykazywały aktywność.¹¹⁸ W celu bezpośredniego porównania przeciwciał typu I i II *in vivo* oraz maksymalizacji funkcji efektorowych związanych z fragmentem Fc, wyselekcjonowano i zmodyfikowano przeciwciała monoklonalne (*ang.* monoclonal antibody, mAb) o identycznym izotypie mysiego IgG2a, a następnie oceniono ich zdolność do deplecji limfocytów B u myszy transgenicznych wyrażających ludzki antygen CD20. Pomimo identycznego izotypu, podobnego powinowactwa, efektywności opsonizacji oraz okresu półtrwania *in vivo*, przeciwciała typu II tositumomab wykazało znacząco dłuższy czas utrzymania deplecji limfocytów B we krwi obwodowej w porównaniu do przeciwciała typu I – RTX. Brak zaangażowania dopełniacza nie tłumaczył skuteczności przeciwciał typu II, ponieważ przeciwciała typu I z mutacją w domenie Fc uniemożliwiającą wiązanie C1q, nadal nie wykazywały porównywalnej efektywności. Mechanizm ten przypisano zdolności przeciwciał typu I do indukcji endocytozy CD20 wraz z kompleksem immunologicznym, co prowadzi do jego degradacji i ogranicza dostępność antygenu dla ADCP. Stopień internalizacji zależy również od typu nowotworu – komórki CLL i chłoniaka z komórek płaszczka (*ang.* mantle cell lymphoma, MCL) wykazują szybki ubytek powierzchniowego CD20, w przeciwieństwie do komórek FL i komórek chłoniaka rozlanego z dużych komórek B (*ang.* diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL), które są bardziej odporne na to zjawisko.^{119,120}

Kluczowym mediatorem procesu internalizacji jest receptor FcγRIIb, którego ekspresja na komórkach B umożliwia powstanie tzw. interakcji „w cis” z RTX, gdzie

kompleks CD20–FcγRIIb formowany jest na tej samej błonie komórkowej. Przeciwciała typu II nie wykazują zdolności do indukowania takich interakcji.¹²¹

Podsumowując, dominujący mechanizm efektorowy stanowi podstawę klasyfikacji monoklonalnych przeciwciał anti-CD20 na dwa typy: typ I (np. RTX, ofatumumab), charakteryzujący się silną aktywacją dopełniacza oraz słabą bezpośrednią indukcją śmierci komórkowej, oraz typ II (np. obinutuzumab) o przeciwnych właściwościach. Parametry takie jak odległość epitopu docelowego od błony komórkowej, segregacja przeciwciał do tratw lipidowych oraz szybkość dysocjacji przeciwciał były uważane dotychczas za dominujące czynniki determinujące mechanizm efektorowy przeciwciał¹²². Jednak w 2020 roku publikacja Kumara i in. w czasopiśmie *Science* przemodelowała spojrzenie na różnice pomiędzy przeciwciałami anti-CD20 typu I i II. Wiązanie przeciwciała typu I z antygenem następuje w sposób umożliwiający rekrutację dodatkowych cząsteczek przeciwciała do kompleksu, co finalnie prowadzi do powstania oligomerów¹²³. Struktura oligomeryczna (a optymalnie heksameryczna) umożliwia wiązanie pierwszego składnika CP, C1q. Z kolei przyłączenie pierwszej cząsteczki przeciwciała typu II do antygeny zapobiega oligomeryzacji i skutkuje słabą aktywacją dopełniacza. Hipotezę tę potwierdzono dodatkowo poprzez wprowadzenie określonych mutacji punktowych w stałej części łańcucha ciężkiego ludzkich przeciwciał IgG, które faworyzowały oligomeryzację przeciwciał. W przeciwieństwie do swych wersji oryginalnych, zmodyfikowane przeciwciała wykazały istotną cytotoksyczność zależną od dopełniacza (CDC).¹²⁴ Uzyskane wyniki zweryfikowały wcześniejsze teorie dotyczące parametrów decydujących o charakterystyce przeciwciał typu I i II, wskazując na strukturę kompleksu antygen–przeciwciała jako na czynnik kluczowy. W swojej pracy oryginalnej *The Acquisition of Complement-Dependent Cytotoxicity by the Type II Anti-CD20 Therapeutic Antibody Obinutuzumab*¹²⁵ wraz ze współautorami eksplloatowałem to zagadnienie. Badano, czy modulacja procesów następujących po powstaniu kompleksu antygen–przeciwciała może przekształcić przeciwciała typu II w silny aktywator dopełniacza oraz czy przeciwciała typu II – obinutuzumab – działające w połączeniu z wariantem powodującym wzrost aktywności (*ang.* gain of function, GoF) białka C2, może wywołać istotną aktywację CDC pomimo suboptymalnej struktury kompleksu antygen–przeciwciała, co dokładniej zostanie omówione w części badawczej niniejszej monografii.

5.4. Interakcje przeciwciał anty-CD20 z układem dopełniacza

Monoklonalne przeciwciała wiążące antygen CD20 mogą wywoływać efekt cytolityczny za pośrednictwem różnych, toczących się równolegle procesów. Do głównych mechanizmów efektorowych należą: CDC, ADCC, ADCP oraz bezpośrednia indukcja apoptozy komórek docelowych.¹²⁶ Mechanizmy CDC oraz ADCC nie wykazują prostego działania synergistycznego, lecz w wielu warunkach eksperymentalnych pozostają względem siebie funkcjonalnie konkurencyjne, ponieważ oba wykorzystują ten sam fragment Fc przeciwciała monoklonalnego do rekrutacji efektorów odpowiedzi immunologicznej. Dane uzyskane zarówno w modelach *in vitro*, jak i *in vivo* jednoznacznie wskazują, że aktywacja jednego z tych mechanizmów może prowadzić do osłabienia drugiego na skutek zajmowania lub maskowania fragmentu Fc przez składniki dopełniacza bądź przez receptory Fcγ na komórkach efektorowych. Kluczowych dowodów eksperymentalnych dostarczyli Wang i wsp., którzy wykazali, że depozycja fragmentu C3b na komórkach docelowych opłaszczonych RTX hamuje aktywację komórek NK oraz ogranicza interakcję fragmentu Fc przeciwciała z receptorem FcγRIIIa (CD16), prowadząc do istotnego obniżenia efektywności ADCC. Podobne wnioski wynikają z badań van Meerten i wsp., wskazujących, że intensywna aktywacja układu dopełniacza może funkcjonalnie upośledzać odpowiedź komórkową zależną od Fc poprzez zmniejszenie dostępności przeciwciała dla receptorów Fcγ oraz bezpośrednią modulację aktywności komórek NK. W konsekwencji obserwowana w niektórych modelach pozorna „komplementarność” CDC i ADCC nie wynika z ich równoczesnej kooperacji na poziomie pojedynczej komórki docelowej, lecz raczej z odmiennych progów aktywacji obu mechanizmów w heterogennej pod względem ekspresji celu molekularnego populacji komórek nowotworowych. W warunkach wysokiej ekspresji antygeny docelowe oraz odpowiedniej dostępności dopełniacza dominującą rolę w eliminacji komórek nowotworowych odgrywa CDC, natomiast ADCC staje się istotnym mechanizmem efektorowym w sytuacjach, w których gęstość antygeny jest niewystarczająca do efektywnej aktywacji kaskady dopełniacza, lecz umożliwia rekrutację komórek efektorowych poprzez receptory Fcγ. Takie zależne działanie mechanizmów efektorowych, a nie ich równoczesna synergia, trafniej oddaje złożoność odpowiedzi immunologicznej indukowanej przez terapeutyczne przeciwciała monoklonalne.^{122,127-129} Poniższy rozdział monografii charakteryzuje pokrótce powyższe mechanizmy.

5.4.1. Cytotoksyczność zależna od dopełniacza (*ang.* complement-dependent cytotoxicity, CDC)

CDC stanowi element wrodzonego mechanizmu efektorowego odpowiedzialnego za eliminację patogenów zewnątrzkomórkowych oraz zakażonych wirusem lub transformowanych nowotworowo komórek gospodarza. Może być inicjowana spontanicznie, w ramach AP, lub wskutek rozpoznania komórek docelowych przez opsoniny, takie jak lektyny czy przeciwciała. Klasyczna, przeciwciało-zależna aktywacja dopełniacza rozpoczyna się od wiązania składnika C1q do fragmentów Fc immunoglobulin (IgG lub IgM) związanych z antygenem, co uruchamia kaskadę reakcji proteolitycznych i rearanżacji konformacyjnych prowadzących do utworzenia MAC.¹³⁰ Dodatkowo procesy CDC indukują szereg mechanizmów immunomodulacyjnych. Produkty pośrednie tej aktywacji, takie jak C1q, C3b, iC3b oraz C4b, pełnią funkcję opsonin, ułatwiając usuwanie kompleksów immunologicznych oraz pozostałości po martwych komórkach nowotworowych przez komórki fagocytarne. W szczególności, opsonizacja przez C3b wzmacnia fagocytozę komórek opłaszczonych IgG przez makrofagi i neutrofile, poprzez jednoczesną aktywację receptorów dla dopełniacza (CR) i Fcγ.¹³¹

Fragmenty dopełniacza powstające w trakcie aktywacji: C3a, C4a i C5a, określane zbiorczo jako anafilatoksyny, pełnią funkcję silnych chemoatraktantów dla leukocytów. Ponadto, mogą one indukować degranulację bazofili i komórek tucznych, zwiększać przepuszczalność naczyń oraz wywoływać skurcz mięśni gładkich. Dodatkowo, C5a może również modulować funkcję makrofagów poprzez zwiększanie ekspresji aktywującego receptora FcγRIII oraz obniżanie ekspresji hamującego FcγRIIb, co potencjalnie wpływa na ich profil efektorowy.^{132,133}

Stopień aktywacji układu dopełniacza jest uwarunkowany wieloma czynnikami, takimi jak typ komórki nowotworowej, poziom ekspresji antygeny docelowego dla swoistych przeciwciał, obecność regulatorowych białek dopełniacza oraz klasa lub typ zastosowanego przeciwciała.¹³⁴ Przykładowo, różnice w zależności od komórki docelowej zostały przedstawione w badaniach z pierwotnymi i ustalonymi liniami komórek B, które podlegają szybkiej lizie po koinkubacji z przeciwciałami typu I i składnikami dopełniacza zawartymi w surowicy. Komórki FL oraz MCL są bardziej podatne na lizę niż komórki DLBCL lub CLL.¹³⁵ Zależność pomiędzy poziomem ekspresji CD20 a skutecznością zabijania komórek przez RTX w mechanizmie CDC, której nie obserwowano w odniesieniu do ADCC, została udokumentowana w badaniach potwierdzających, że efektywność CDC

w terapii z użyciem przeciwciał anti-CD20 koreluje z poziomem ekspresji CD20.¹³⁶⁻¹³⁸

Obserwacje prowadzone w warunkach klinicznych pośrednio potwierdzają udział aktywacji układu dopełniacza w odpowiedzi na leczenie RTX. Podanie RTX pacjentom z CLL wiąże się z istotnym obniżeniem aktywności układu dopełniacza i spadkiem stężenia jego kluczowych składników, takich jak C2, C3 i C4, co odzwierciedla zużycie dopełniacza.^{139,140} Aktywacja układu dopełniacza może wywierać zarówno efekty przeciwnowotworowe, jak i sprzyjające progresji nowotworu. Z jednej strony, aktywacja dopełniacza prowadzi do eliminacji komórek nowotworowych poprzez CDC, z drugiej strony, niektóre produkty kaskady dopełniacza, takie jak C3a i C5a, uczestniczą w inicjacji i podtrzymywaniu stanu zapalnego oraz promują procesy angiogenezy, wspierając w ten sposób rozwój nowotworów i selekcję klonów opornych.^{141,142} Aby zapobiec uszkodzeniom tkanek gospodarza, funkcjonowanie układu dopełniacza jest ściśle regulowane przez szereg inhibitorów, spośród których kluczową rolę odgrywają glikozylofosfatidyloinozytolowo (GPI) zakotwiczone białka powierzchniowe: CD55 oraz CD59. CD55 (*ang.* decay-accelerating factor, DAF, czynnik przyspieszający rozpad konwertaz) przyspiesza nieodwracalną dysocjację konwertaz C3 i C5. CD59 blokuje tworzenie porów przez MAC. Zmienione nowotworowo komórki B wykazują podwyższoną ekspresję ww. białek regulatorowych,^{143,144} co może umożliwiać im unikanie odpowiedzi zależnej od dopełniacza. Chociaż w niektórych pracach wykazano związek między poziomem ekspresji CD20 a aktywnością CDC, zależność pomiędzy ekspresją CD20 a skutecznością CDC indukowanej RTX pozostaje niejednoznaczna, a korelacja z odpowiedzią kliniczną wciąż nie została w pełni potwierdzona¹⁴⁵. W pracy Manches i wsp. wykazano, że skuteczność CDC *in vitro* koreluje z ilorazem intensywności ekspresji CD20 do białek regulatorowych dopełniacza (CtRP, *ang.* complement regulatory proteins: CD46, CD55, CD59).¹⁴⁶ Neutralizacja CD59, CD55 i CD46 za pomocą swoistych przeciwciał blokujących może wzmacniać efekt CDC,^{147,148} co potencjalnie otwiera strategię równoczesnego ukierunkowania na CD20 i neutralizacji CD59 przy pomocy przeciwciała bispecyficznego w terapii chłoniaków B-komórkowych opornych na RTX¹¹².

Innym podejściem do zwiększenia skuteczności CDC może być modyfikacja domeny Fc przeciwciała w celu poprawy wiązania C1q. Miejsce wiązania C1q na ludzkim IgG1 zostało zmapowane, a także opracowano wariant IgG1 o zwiększonym powinowactwie do C1q. Przeciwciało to wykazuje wyraźnie nasilone działanie cytotoksyczne zależne od dopełniacza, lecz jednocześnie osłabioną aktywność ADCC *in vitro*.^{149,150} U pacjentów z NHL leczenie RTX prowadzi do wzrostu osoczowych stężeń produktów aktywacji

dopełniacza, takich jak C3b/c i C4b/c.¹⁵¹ Co więcej, terapia RTX może prowadzić do selekcji komórek wykazujących wysoką ekspresję CD59 w populacji komórek nowotworowych u niektórych chorych z CLL.¹⁵² Zjawisko to zostało również potwierdzone w modelach przedklinicznych z wykorzystaniem myszy.¹⁵³ Zdolność poszczególnych przeciwciał anti-CD20 do inicjowania lizy komórek przez dopełniacz koreluje z ich potencjałem do translokacji kompleksów CD20 do tratw lipidowych¹⁰⁵. Obserwowany wzrost stężenia produktów aktywacji dopełniacza w trakcie terapii RTX, jak również jego korelacja z działaniami niepożądanymi występującymi po pierwszej infuzji¹⁵⁴, potwierdzają, że aktywacja układu dopełniacza zachodzi *in vivo*. Badania przedkliniczne wykazały, że udział poszczególnych mechanizmów efektorowych, w tym aktywacji dopełniacza, w terapeutycznej aktywności przeciwciał anti-CD20 w modelach *in vivo* jest zależny od specyfiki zastosowanego modelu badawczego. W jednym z klasycznych modeli z transdukowaną ludzkim CD20 mysią linią chłoniaka EL4 (*ang.* mouse lymphoma cell line), RTX okazał się nieskuteczny w zwalczaniu nowotworu u myszy z deficytem C1q, co wskazuje na fundamentalną rolę CP w tym kontekście. W innych badaniach nad wpływem aktywacji dopełniacza na mechanizmy efektorowe RTX wykazano, że deplecja C3 może zwiększać aktywację komórek NK i poprawiać skuteczność terapeutyczną przeciwciała, co sugeruje, że rola komponentów dopełniacza w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej wobec komórek chłoniaka może być bardziej złożona niż klasyczna funkcja CDC.^{138,155}

5.4.2. Cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał (*ang.* antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) i inne mechanizmy z udziałem komórek odpornościowych

CD20 charakteryzuje się stosunkowo wysoką stabilnością powierzchniową i po związaniu z przeciwciałem zasadniczo nie ulega intensywnej internalizacji ani proteolitycznemu złuszczeniu. Zjawiska te mogą występować jedynie w ograniczonym zakresie. Mimo to, względna stabilność ekspresji antygeny sprzyja utrzymaniu dostępności miejsca wiązania przeciwciała, co czyni CD20 odpowiednim celem terapeutycznym do aktywacji mechanizmów efektorowych zależnych od receptorów Fcγ (FcγRs). Jednym z kluczowych mechanizmów efektorowych w kontekście eliminacji komórek nowotworowych oraz zakażonych patogenem jest ADCC. Proces ten inicjowany jest poprzez wiązanie IgG z antygenem na komórce docelowej, co umożliwia zaangażowanie efektorowych komórek układu odpornościowego, głównie komórek NK i makrofagów ekspresujących receptory Fcγ. Dzięki interakcji fragmentu Fc przeciwciała z FcγR na

powierzchni komórek efektorowych, dochodzi do aktywacji szlaków prowadzących do fagocytozy lub degranulacji cytotoksycznej, skutkującej śmiercią komórek docelowych.¹¹²

Ekspresja receptorów Fcγ w zależności od typu komórki została podsumowana zbiorczo w poniższej **Tab. 1**.

Typ komórki	FcγRI	FcγRIIa	FcγRIIb	FcγRIIc	FcγRIIIa	FcγRIIIb
Monocyty / makrofagi	✓	✓	✓	—	✓	—
Komórki NK	—	—	—	✓	✓	—
Neutrofile	✓ / ±	✓	—	—	—	✓
Limfocyty B	—	—	✓	—	—	—
Komórki dendrytyczne	✓	✓	✓	—	✓	—
Komórki tuczne (mastocyty)	✓ / ±	✓	✓	—	—	—
Płytki krwi	—	✓	—	—	—	—

Legenda:

- ✓ – ekspresja obecna
- ✓ / ± – ekspresja zmienna lub zależna od stanu aktywacji
- — – brak ekspresji

Tab. 1.
Ekspresja receptorów Fcγ w zależności od typu komórki

Źródło: Opracowano na podstawie: Cartron G, Watier H, Golay J, Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood*. 2004;104(9):2635–2642. doi:10.1182/blood-2004-03-1110. PMID:15226177.

Związanie receptorów aktywujących przez kompleksy immunologiczne IgG prowadzi do fosforylacji motywów ITAM przez kinazy tyrozynowe z rodziny Src, co inicjuje kaskadę sygnalizacyjną skutkującą odpowiedzią efektorową, taką jak fagocytoza, ADCC, degranulacja lub produkcja cytokin. Receptor FcγRIIb, w przeciwieństwie do pozostałych, pełni funkcję hamującą, zawiera w domenie cytoplazmatycznej motyw ITIM (*ang.* immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif, motyw hamujący oparty na resztach tyrozynowych). Jednoczesne związanie FcγRIIb oraz BCR przez kompleks antygen–IgG prowadzi do aktywacji fosfataz i tłumienia sygnalizacji przez BCR, co przekłada się na hamowanie aktywacji limfocytów B. Makrofagi ekspresują zarówno aktywujące, jak i hamujące receptory Fcγ, co umożliwia precyzyjną regulację odpowiedzi efektorowej. Komórki NK wykazują ekspresję wyłącznie aktywujących FcγRIIIa i FcγRIIc, natomiast granulocyty obojętnochłonne posiadają receptory FcγRIIa oraz FcγRIIb, które współdziałają w mechanizmach fagocytozy.¹²⁷

Dokładne poznanie interakcji pomiędzy fragmentem Fc przeciwciała a receptorami Fcγ (FcγR) stworzyło podstawę do opracowania strategii mających na celu zwiększenie skuteczności RTX. Inżynieria molekularna ukierunkowana na modyfikację regionu Fc umożliwia zwiększenie powinowactwa przeciwciała do FcγRIIIa, co może prowadzić do nasilonej aktywacji mechanizmu ADCC.¹⁵⁶ Efektorowa aktywność przeciwciał IgG silnie zależy od ich glikozylacji, szczególnie od składu i struktury łańcuchów oligosacharydowych przyłączonych do fragmentu Fc.¹⁵⁷ Zmiany w glikozylacji przeciwciał mogą istotnie modulować ich zdolność do rekrutowania komórek efektorowych i indukowania ADCC. Przykładowo, obecność bisekcyjnej N-acetyloglukozaminy lub brak fukozy w łańcuchu N-glikanowym Fc IgG1 skutkuje znacznym zwiększeniem efektywności ADCC.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰

Cytokiny, takie jak IL-2, IL-12 (interleukina-2; interleukina-12), IFN-γ (interferon gamma), czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów (*ang.* Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF) oraz czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (*ang.* Granulocyte Colony-Stimulating Factor G-CSF), mogą wzmacniać procesy ADCC i fagocytozy poprzez pobudzanie lub ekspansję komórek NK i makrofagów^{161,162}. Przykładowo, IL-2 zwiększa ADCC poprzez aktywację i namnażanie komórek NK¹⁶³, co wykorzystano w badaniach klinicznych łączących IL-2 z RTX u pacjentów z NHL. Zaobserwowano w nich zależność pomiędzy liczbą komórek NK a skutecznością terapii¹⁶⁴. IL-12 wzmacnia cytotoksyczność komórek NK i stymuluje produkcję IFN-γ. IL-12 również zastosowano w badaniach klinicznych wraz z RTX u osób z nawrotowym NHL, osiągając pozytywne wyniki kliniczne¹⁶⁵. Podawanie IFN-γ w

połączeniu z RTX również wykazało podobne wskaźniki odpowiedzi jak sam RTX, choć IFN- γ wydłużył czas do nawrotu choroby u pacjentów reagujących na leczenie. GM-CSF sprzyja różnicowaniu monocytów oraz aktywacji neutrofilii wielojądrzastych. Terapia skojarzona RTX i GM-CSF u pacjentów z nawrotem lub opornością na leczenie NHL dała wstępne wyniki wskazujące na wyższą częstość remisji całkowitej niż w przypadku samego RTX.¹⁶⁶ W świetle tych danych rola ADCC w klinicznym działaniu RTX jest dobrze potwierdzona i uzasadnia prowadzenie dalszych badań mających na celu optymalizację tego mechanizmu w terapii przeciwciałami anti-CD20.

5.4.3. Wpływ aktywacji dopełniacza na komórki nowotworowe

Działanie układu dopełniacza nie ogranicza się wyłącznie do powierzchni komórek, lecz pełni również istotną rolę regulatorową wewnątrzkomórkowo. Obecność składników dopełniacza, takich jak C3 i C5 oraz ich aktywnych produktów, została wykazana w różnych typach komórek układu odpornościowego, w tym w neutrofilach, monocytach, limfocytach T i B, gdzie współwystępują z odpowiadającymi im receptorami¹⁶⁷. Zlokalizowane są one w cytoplazmie, lizosomach, retikulum endoplazmatycznym, zewnętrznej błonie mitochondriów oraz jądrze komórkowym.¹⁶⁸ Równocześnie, białka regulatorowe układu dopełniacza są obecne w tych samych strukturach, co sugeruje istnienie mechanizmów precyzyjnie modulujących odpowiedź immunologiczną także na poziomie komórkowym. Endogenna pula białek dopełniacza określana jest jako komplosom (*ang.complosome*) i pochodzi z dwóch źródeł: syntezy składników dopełniacza przez samą komórkę oraz internalizacji zewnątrzkomórkowych białek dopełniacza poprzez endocytozę.¹⁶⁹ Komplosom bierze udział w szeregu kluczowych procesów fizjologicznych, takich jak regulacja metabolizmu komórkowego¹⁷⁰⁻¹⁷² autofagia czy kontrola ekspresji genów.¹⁷³ Prace Kremlitzka i wsp. wykazały, że C3 pochodzenia osocznego, internalizowane przez ludzkie limfocyty B, wiąże się z jądrem komórkowym i oddziałuje z DNA, co może modulować transkrypcję genów.¹⁷⁴ Badania Arbore i wsp. dowodzą, że autokrynne pobudzenie CYT-1 (cytoplazmatycznej domeny 1) białka CD46 jest niezbędne do indukcji ekspresji LAT1 (transporter aminokwasów typu L) oraz zwiększenia ekspresji GLUT1 (transportera glukozy typu 1), odpowiedzialnego za transport glukozy. Ponadto wykazano, że CD46 wpływa na funkcje cytotoksyczne limfocytów T CD8⁺ (komórki T cytotoksyczne) poprzez regulację szlaków metabolicznych opartych na metabolizmie kwasów tłuszczowych,¹⁷⁵ co podkreśla wielopłaszczyznową rolę wewnątrzkomórkowego dopełniacza w regulacji funkcji

efektorowych komórek odpornościowych.

Układ dopełniacza odgrywa dwojaką rolę w odpowiedzi immunologicznej na nowotwory. Oprócz bezpośredniego działania przeciwnowotworowego, bierze również udział w ustanawianiu tolerancji immunologicznej wobec nowotworu. Tolerancja ta oznacza zdolność komórek nowotworowych do adaptacji i oporu wobec odpowiedzi immunologicznej, zarówno poprzez bezpośrednie mechanizmy, jak i poprzez modyfikacje mikrośrodowiska nowotworu. Proces ten sprzyja progresji choroby i wzrostowi masy guza. Wszystkie składniki układu dopełniacza, w tym białka efektorowe, produkty aktywacji, receptory oraz regulatory, współuczestniczą w kreowaniu stanu tolerancji. Komórki nowotworowe mogą syntetyzować własne elementy dopełniacza, co umożliwia im unikanie immunologicznej eliminacji oraz samopromocję, między innymi poprzez hamowanie funkcji komórek układu odpornościowego lub blokowanie prawidłowego przebiegu kaskady dopełniacza.¹⁷⁶

Układ dopełniacza uczestniczy w tworzeniu tolerancji immunologicznej na nowotwory poprzez hamowanie funkcji limfocytów T na dwa sposoby. Pierwszy to bezpośrednie działanie aktywnych fragmentów dopełniacza na limfocyty T, drugi to hamowanie funkcji limfocytów T przez białka regulujące dopełniacz, które są ekspresjonowane przez komórki nowotworowe. Produkty rozkładu dopełniacza C3a i C5a oddziałują na limfocyty T regulatorowe (Treg), wpływając na ich aktywację i funkcję. Mechanizm ten ma kluczowe znaczenie dla utrzymania tolerancji immunologicznej i zapobiegania reakcjom autoimmunologicznym. C3a i C5a wiążą się z odpowiednimi receptorami, co stymuluje proliferację i aktywację Treg oraz wzmacnia ich funkcję supresyjną, w tym indukcję wydzielania przeciwzapalnej interleukiny-10 (IL-10).¹⁷⁷ Torok i wsp. wykazali, że aktywacja receptora dopełniacza 1 (CD35, CR1) na powierzchni limfocytów CD4⁺ powoduje ich przekształcenie w Treg, co zwiększa produkcję IL-10 i jednocześnie istotnie zmniejsza wydzielanie prozapalnego interferonu gamma (IFN- γ).¹⁷⁸ W badaniach na modelu raka płuca zaobserwowano, że myszy C57BL/6J pozbawione dopełniacza C3 miały wyraźnie zmniejszony wzrost guzów pierwotnych i przerzutów. Zjawisku temu towarzyszył wzrost liczby limfocytów CD4⁺ produkujących IFN- γ , TNF- α (*ang.* tumor necrosis factor, czynnik martwicy nowotworu) oraz IL-10, jak również limfocytów CD8⁺. Odwrócenie zahamowania wzrostu nowotworu, spowodowane brakiem dopełniacza C3, wynikające z wyczerpania immunologicznego limfocytów CD4⁺, stanowi dowód na to, że nowotwory mogą wymykać się kontroli układu odpornościowego poprzez szlaki zależne od C3/C5.¹⁷⁹ Układ dopełniacza moduluje odpowiedź immunologiczną

limfocytów T oraz limfocytów B. Aby chemioterapia była skuteczna, musi ona indukować powstanie specyficznej subpopulacji limfocytów B – komórek ICOS-L⁺ (*ang.* Inducible T-cell Co-Stimulator Ligand) które wykazują również ekspresję receptora dopełniacza 2 (CR2). Interakcja fragmentów C3 z CR2 sprzyja tworzeniu komórek ICOS-L⁺. Z drugiej strony, nadekspresja CD55 (regulatora dopełniacza) hamuje aktywację układu dopełniacza i zapobiega tworzeniu komórek ICOS-L⁺.¹⁸⁰

Białko C1q jest wielofunkcyjnym składnikiem układu dopełniacza, który wywiera bezpośredni wpływ na komórki nowotworowe, zarówno pozytywny, jak i negatywny, w zależności od typu nowotworu. W raku prostaty, piersi, neuroblastomie oraz innych typach nowotworów opisano jego działanie przeciwnowotworowe, polegające na indukcji apoptozy. C1q aktywuje gen supresorowy *WWOX* (*ang.* WW domain-containing oxidoreductase, gen kodujący oksydoreduktazę zawierającą domenę WW), w wyniku czego fosforylowana forma białka WOX1 gromadzi się w jądrze komórkowym i wysyła sygnały hamujące proliferację oraz indukujące apoptozę.^{181,182} Podobny mechanizm opisano w raku jajnika – domeny globularne C1q indukują apoptozę poprzez TNF-β oraz receptor Fas.¹⁸³ Z drugiej strony, w czerniaku C1q promuje proliferację i migrację komórek nowotworowych, przyspiesza tworzenie przerzutów oraz obniża przeżywalność pacjentów¹⁸⁴. Dane te wskazują na możliwość działania C1q zależnie od kontekstu biologicznego danego typu nowotworu. FH jest najczęściej badany w kontekście nowotworów płuc oraz cSCC (*ang.* cutaneous squamous cell carcinoma, rak kolczystokomórkowy skóry)¹⁸⁵. Poza ochroną komórek nowotworowych przed cytotoksycznością zależną od dopełniacza, FH promuje także migrację komórek. Myszy pozbawione FH spontanicznie rozwijają guzy wątroby, co sugeruje, że FH odgrywa kluczową rolę w kontrolowaniu niepożądanego aktywacji dopełniacza w wątrobie i zapobieganiu przewlekłemu stanowi zapalnemu indukowanemu przez ten układ.¹⁸⁶ W cSCC wyciszenie ekspresji białek C1s, C1r, FB, FH i FI daje podobne efekty: ogranicza wzrost guza. Białka te biorą udział w promowaniu proliferacji, migracji i przeżywalności komórek nowotworowych poprzez aktywację szlaków sygnałowych PI3K (*ang.* phosphoinositide 3-kinase, kinaza 3-fosfatydylinozytolu) oraz Erk 1 i 2 (*ang.* extracellular signal-regulated kinase, kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym).¹⁸⁷ Wiele typów guzów nowotworowych wykazuje ekspresję białek dopełniacza produkowanych przez same komórki guza,. Białka dopełniacza są wydzielane do mikrośrodowiska guza, gdzie mogą aktywować kaskadę dopełniacza, rekrutując C1q pochodzący głównie z makrofagów.^{188,189}

Zmiana ekspresji białek układu dopełniacza ma istotny wpływ na procesy

nowotworzenia, modulując proliferację, migrację i inwazyjność komórek nowotworowych oraz kształtując odpowiedź immunologiczną gospodarza. Nadmierna aktywacja lub nadekspresja wybranych składników może sprzyjać mikrośrodowisku prozapalnemu oraz wspierać mechanizmy unikania odpowiedzi immunologicznej przez komórki nowotworowe. Z kolei obniżona ekspresja lub funkcjonalny niedobór białek dopełniacza ogranicza opsonizację i cytotoksyczność zależną od dopełniacza, co wpływa na progresję guza i odpowiedź na terapię. Wyniki te podkreślają istotną rolę układu dopełniacza w patogenezie nowotworów. Szczegółowe dane dotyczące nadekspresji i niedoborów białek dopełniacza przedstawiono w **Tab. 2.** i **3.**

Tab. 2. prezentuje białka dopełniacza, których nadekspresję odnotowano w różnych typach nowotworów. Wzmoczona ekspresja tych cząsteczek obejmuje wszystkie etapy aktywacji kaskady dopełniacza, zarówno CP, LP i AP, jak również komponenty odpowiadające za powstawanie anafilatoksyn, MAC oraz czynniki regulatorowe. **Tab. 3.** przedstawia przypadki obniżonej ekspresji białek dopełniacza, opisywane w literaturze. Zmniejszona aktywność tych składników dotyczy przede wszystkim elementów CP i AP oraz wybranych regulatorów układu dopełniacza.

Cząsteczka	Typ nowotworu	Obserwacja	Źródło
C1q	Glejak	Osocze: podwyższony poziom C1q w surowicy pacjentów w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej.	190
C1s	Rak płuca	Osocze: podwyższone poziomy C1s w osoczu pacjentów z rakiem płuca w porównaniu do grupy kontrolnej.	191
C1s	Rak prostaty	Guz: nadekspresja C1s w guzach prostaty w porównaniu ze zdrową tkanką prostaty.	192
C4	Rak płuca	Osocze: podwyższone poziomy C4 u pacjentów z rakiem w porównaniu do grupy kontrolnej.	193
C4a	Rak brodawkowy tarczycy	Osocze: podwyższony poziom C4a w surowicy pacjentów w porównaniu do grupy kontrolnej	194
C4d	Rak płuca	Płyn oskrzelowy: wyższy poziom C4d u pacjentów z rakiem niż w grupie kontrolnej.	195
C4d	Rak płuca	Osocze: wyższy poziom C4d u pacjentów z rakiem niż u pacjentów z łagodnymi guzkami.	196
C3	Rak płuca	Osocze: podwyższony poziom C3 u pacjentów z rakiem w porównaniu do grupy kontrolnej.	193
C3	Neuroblastoma	Osocze: podwyższony poziom C3 u pacjentów w porównaniu do zdrowych dawców.	197
C3	Gruczolakorak przewodowy trzustki	Guz: wyższy poziom białka C3 w tkance nowotworowej w porównaniu do przylegającej zdrowej tkanki trzustki.	198

C3	Rak trzustki	Guz: wyższy poziom białka C3 w tkance nowotworowej w porównaniu do zdrowej tkanki trzustki.	199
C3a	Rak przełyku	Osocze: wyższy poziom C3a u pacjentów niż u zdrowych dawców.	200
C3a desArg	Rak piersi	Osocze: wyższy poziom C3a desArg u pacjentów niż u zdrowych dawców.	201
C5a	Niedrobnokomórkowy rak płuca	Osocze: wyższy poziom C5a u pacjentów niż u zdrowych dawców.	202
C5aR1	Rak żołądka	Guz: wyższa ekspresja C5aR1 w tkankach nowotworowych niż w przyległych zdrowych tkankach.	203
FH	Płaskonabłonkowy rak płuca	Osocze: nadekspresja FH u górników narażonych na uran w porównaniu z górnikami bez choroby płuc.	204
FH	Rak płuca	Popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe: wyższe stężenie FH u pacjentów z rakiem płuca niż w grupie kontrolnej.	205
FH	Rak kolczystokomórkowy skóry (cSCC)	Guz: wyższa ekspresja FH w inwazyjnych cSCC w porównaniu do skóry normalnej lub cSCC <i>in situ</i> .	188
FH	Rak pęcherza	Mocz: FH i pokrewne białka FH jako markery raka pęcherza.	206
C9	Płaskonabłonkowy rak płuca	Osocze: poziom C9 i jego fukozylowana forma wyższe u pacjentów z SQLC (<i>ang.</i> squamous cell lung cancer, rak płaskonabłonkowy płuca) w porównaniu do grupy kontrolnej.	207
CD46	Rak okrężnicy	Guz: wyższy poziom CD46 w tkankach raka okrężnicy w porównaniu z przyległymi zdrowymi tkankami.	208

CD55	Rak okrężnicy	Guz: wyższy poziom CD55 w tkankach raka okrężnicy w porównaniu z przyległymi zdrowymi tkankami.	208
CD59	Rak okrężnicy	Guz: wyższy poziom CD59 w tkankach raka okrężnicy w porównaniu z przyległymi zdrowymi tkankami.	208
MASP2	Rak jajnika	Guz: wyższa ekspresja genu <i>MASP2</i> w raku jajnika w porównaniu do grupy kontrolnej.	209
MBL	Rak okrężnicy	Osocze: poziom MBL2 podwyższony u pacjentów w porównaniu do zdrowych dawców krwi.	210
MBL	Rak jajnika	Guz: wyższa ekspresja genu <i>MBL2</i> w raku jajnika w porównaniu do grupy kontrolnej	209

Tab. 2.

Nadekspresja białek układu dopełniacza w nowotworach

Źródło: Opracowano na podstawie: Revel M, Daugan MV, Sautés-Fridman C, Fridman WH, Roumenina LT. Complement System: Promoter or Suppressor of Cancer Progression?. *Antibodies (Basel)*. 2020;9(4):57. Published 2020 Oct 25. doi:10.3390/antib9040057.

Cząsteczka	Typ nowotworu	Mechanizm działania	Źródło
C1s	Rak jajnika	Nowotwór: obniżona regulacja mRNA C1s w raku jajnika w porównaniu ze zdrową tkanką	211
C1s	Rak jajnika	Nowotwór: obniżona ekspresja C1s w raku surowiczym jajnika (stadium III) w porównaniu z tkanką zdrową	212
C1s	Rak płuca	Nowotwór: zmniejszona ekspresja C1s w tkankach nowotworowych w porównaniu z tkankami okołonowotworowymi	191
C4BP	Rak jajnika	Nowotwór: obniżona regulacja mRNA C4BPA w raku jajnika w porównaniu ze zdrową tkanką	211
C7	Rak jajnika	Nowotwór: obniżona regulacja mRNA C7 w raku jajnika w porównaniu ze zdrową tkanką	211
FB	Glejak	Osocze: obniżony poziom FB w glejaku	190
FI	Rak żołądka	Osocze: znacząco niższy poziom FI w surowicy pacjentów z rakiem żołądka niż w grupie kontrolnej; spadek ekspresji w miarę postępu zaawansowania klinicznego (pTNM I–IV)	213
FH	Rak jelita grubego	Osocze: spadek poziomu białka FH w surowicy pacjentów z rakiem jelita grubego w porównaniu z grupą kontrolną	214
FH	Rak jajnika	Nowotwór: obniżona regulacja mRNA FH w raku jajnika w porównaniu ze zdrową tkanką	223
CD55	Rak jajnika	Nowotwór: niższa ekspresja CD55 w raku jajnika niż w grupie kontrolnej	211

Tab. 3.

Obniżona ekspresja białek układu dopełniacza w nowotworach

Źródło: Opracowano na podstawie: Revel M, Daugan MV, Sautés-Fridman C, Fridman WH, Roumenina LT. Complement System: Promoter or Suppressor of Cancer Progression?. *Antibodies (Basel)*. 2020;9(4):57. Published 2020 Oct 25. doi:10.3390/antib9040057.

5.4.4. Modulacja dopełniacza w eksperymentalnej terapii nowotworów limfoproliferacyjnych

Liczba pacjentów z nowotworami hematologicznymi stale rośnie. U wielu chorych stwierdza się nieprawidłowe stężenia składników układu dopełniacza, co prawdopodobnie odzwierciedla mechanizmy dysregulacji tego systemu towarzyszące limfoproliferacjom. Najczęstszymi podtypami NHL są DLBCL oraz FL. Dane z piśmiennictwa wskazują, że mutacje germinalne w genach dopełniacza korelują z podwyższoną podatnością na zakażenia i choroby autoimmunologiczne, stanami, które wiążą się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia NHL.²¹⁵ Warianty genetyczne w genach dopełniacza, takich jak *MASP2*, *C5* i *C9*, korelują ze skłonnością do rozwoju NHL.^{215,216} Analiza prowadzona przez Charbonneau i wsp. wykazała ponadto, że polimorfizmy w genie *C9* i w genach regulatorowych białek dopełniacza m.in. *FH*, *CD46*, *CD55*, *CFHR1*, *CFHR5* (*ang.* complement factor H-related protein, gen kodujący białko pokrewne czynnikowi H układu dopełniacza) korelują z dłuższym przeżyciem wolnym od zdarzeń (*ang.* event free survival, EFS) u chorych z FL, natomiast warianty *C7* związane były z dłuższym EFS w DLBCL.²¹⁷ W praktyce klinicznej sugeruje to, iż pacjenci o odmiennych genotypach elementów układu dopełniacza różnie reagują zarówno na bezpośrednie działanie dopełniacza, jak i na terapię opartą na przeciwciałach. Polimorfizmy w genach *FH*, *CFHR1* i *CFHR5* wykazują szczególnie silny wpływ na EFS u pacjentów z FL leczonych przeciwciałami anti-CD20. Ponadto polimorfizm *C1qA* ma wpływ na skuteczność leczenia schematem R-CHOP (rytuksymab, cyklofosfamid, doksorubicyna, winkrystyna, prednizon) u pacjentów z DLBCL: retrospektywna analiza wykazała, że pacjenci homozygotyczni dla allelu A *C1qA* osiągnęli wyższe wskaźniki całkowitej remisji oraz dłuższe przeżycie ogólne po terapii R-CHOP, choć mechanizm tej zależności pozostaje nierozstrzygnięty.²¹⁸ Jednym z głównych mechanizmów unikania nadzoru dopełniaczowego przez linie komórkowe NHL jest nadekspresja regulatorów dopełniacza, w szczególności *CD46*, *CD55* i *CD59*.²¹⁹ W oparciu o dostępne dane porównawcze profili współekspresji genów dopełniacza pomiędzy nowotworami hematologicznymi a guzami litymi stwierdzono, że zarówno DLBCL, jak i AML (*ang.* acute myeloid leukemia, ostra białaczka szpikowa) wykazują podwyższoną ekspresję genu *CFD* (*ang.* complement factor D, gen czynnika D dopełniacza). Ponadto DLBCL, podobnie jak większość nowotworów litych, charakteryzuje się podwyższoną ekspresją *C3*, *ITGB2* (*ang.* integrin subunit beta 2, gen podjednostki beta-2 integryny) oraz genów szlaku klasycznego (*C1QA*, *C1QB*, *C1QC*, *C1R*, *C1S* i *C2*), natomiast geny takie jak *C4BP*, elementy szlaku lektynowego (*MBL2*, *FCN*, *MASP2*) oraz geny końcowego etapu

kaskady (*C6*, *C8*, *C9*) wykazują niską ekspresję. Dla AML obserwuje się odmienny profil transkrypcyjny: poza *CFD* silnie eksprymowane są *FCN1*, *C1RL*, *C3AR1* oraz *C5AR1*, natomiast pozostałe, w tym *C3*, wykazują relatywnie niską ekspresję.²²⁰

Powyższe zagadnienia teoretyczne przekładają się na możliwe zastosowanie w praktyce klinicznej. Układ dopełniacza pełni kluczową rolę w immunoterapii opartej na mAb²²¹. Większość zatwierdzonych terapii mAb stosowanych w leczeniu nowotworów hematologicznych wykorzystuje dopełniacz jako jeden z podstawowych mechanizmów działania. W celu uzyskania optymalnej skuteczności klinicznej, drogi aktywacji dopełniacza muszą być w pełni funkcjonalne. Niemniej jednak, deficyty składników dopełniacza, nadekspresja błonowych regulatorów dopełniacza (takich jak *CD55*, *CD59* oraz *CD46*) oraz inhibitory (m.in. *CFH*, *C4BP*) w mikrośrodowisku guza stanowią przyczynę oporności oraz braku odpowiedzi na terapię mAb.²¹⁹ W pracach Di Gaetano i współpracowników badano myszy z niedoborem *C1q*, które to wykazywały upośledzoną odpowiedź na RTX w modelu chłoniaka, co podkreśla znaczenie CDC jako kluczowego mechanizmu efektorowego immunoterapii, w odróżnieniu od ADCC, która nie była obserwowana po deplecji komórek NK ani granulocytów.²²² Ponadto u pacjentów z CLL, u których stwierdzono deficyty w zakresie białek dopełniacza, podejrzewa się ograniczenie skuteczności przeciwciał anti-CD20 *in vivo*.²²³ W innych pracach po podaniu RTX lub ofatumumabu u chorych na CLL obserwowano szybkie zużycie dopełniacza^{224,225}, ponadto poziomy *C1* i *C4* były obniżone u ponad połowy badanych pacjentów z CLL.²²⁶ a przy jednoczesnym podaniu świeżo mrożonego osocza możliwe było przywrócenie całkowitej terapeutycznej aktywności RTX u tych pacjentów.

Polimorfizmy genów *C1qA*, *C5* oraz *C9* wykrywano u chorych z FL i DLBCL. Opisywana zmienność może ograniczać aktywację dopełniacza i wpływać na kliniczną odpowiedź na RTX²²⁷. Ponadto regulatory dopełniacza (*CD55*, *CD59* oraz *FH*) ograniczają skuteczność RTX u pacjentów z CLL poprzez hamowanie CDC.²²⁸ Funkcjonalne zablokowanie tych regulatorów znacząco zwiększa podatność pierwotnych komórek CLL na działanie przeciwciał anti-CD20. W przypadku FL oraz DLBCL ekspresja genów *CD46*, *CD55*, *CD59*, *CFH*, *CFHR1* i *CFHR5* prawdopodobnie wpływa na odpowiedź kliniczną oraz czas trwania odpowiedzi na terapię RTX.¹⁵⁷ Podobnie jak w CLL i NHL, komórki szpiczaka mnogiego (ang. multiple myeloma, MM) wykorzystują regulatory dopełniacza (*CD55*, *CD59*, *CFH*) do hamowania CDC, co skutkuje opornością na immunoterapię anti-CD38²²⁹. Zróżnicowanie poziomów ekspresji poszczególnych regulatorów i inhibitorów u pacjentów warunkuje zmienność skuteczności terapii mAb.

Podsumowując, liczne badania *in vitro*, modele mysie oraz analizy kliniczne jednoznacznie wskazują, że funkcjonalny układ dopełniacza odgrywa kluczową rolę w efektach przeciwnowotworowych terapii opartych na przeciwciałach monoklonalnych w nowotworach hematologicznych. Modulacja aktywacji dopełniacza przez nowotwory hematologiczne stanowi istotne wyzwanie dla skuteczności immunoterapii mAb.

5.5. Rola przeciwciał anti-CD20 w nowoczesnych terapiach przeciwnowotworowych

Wieloletnie dobre doświadczenia lekarzy praktyków z mAb anti-CD20 wynikają z korzystnego bilansu potencjalnych korzyści klinicznych do możliwych działań niepożądanych. Profil ryzyka dla wszystkich mAb anti-CD20 jest bardzo zbliżony. Toksyczność przeciwciał monoklonalnych anti-CD20 jest stosunkowo niska, a najczęściej obserwowanymi działaniami niepożądanymi są reakcje związane z infuzją (*ang.* infusion related reactions, IRRs), reakcje nadwrażliwości, mielosupresja (toksyczność dla szpiku kostnego) oraz immunosupresja. Inne często występujące, choć niespecyficzne, objawy odnotowywane w badaniach klinicznych oraz raportowane jako działania niepożądane obejmują ból w klatce piersiowej, arytmie, parestezje, nudności, biegunkę, bóle brzucha oraz bóle mięśniowe. Rzadziej mogą pojawić się poważniejsze powikłania, takie jak infekcje (dominują infekcje układu oddechowego i moczowego), zespół lizy guza czy postępująca wieloogniskowa leukoencefalopatia (*ang.* progressive multifocal leukoencephalopathy, PML).²³⁰ Do najczęściej stosowanych strategii zmniejszających częstość reakcji nadwrażliwości należą podanie leków sterydowych lub przeciwhistaminowych oraz powolna prędkość pierwszej infuzji.²³¹ Dane kliniczne dotyczące dokładnych przyczyn występowania IRRs po podaniu przeciwciał anti-CD20 u pacjentów z nowotworami komórek B są stale zbierane i poddawane analizie. Zazwyczaj IRRs obserwuje się po pierwszej infuzji i ich częstość występowania koreluje z podwyższonym poziomem prozapalnych cytokin uwalnianych w trakcie terapii, co sugeruje aktywację wrodzonej odpowiedzi immunologicznej w wyniku masowej eliminacji komórek docelowych.²³² RTX wykazuje zdolność do eliminacji nawet do 75% komórek CLL po podaniu zaledwie 30 mg leku. Niska dawka RTX może jednak niecałkowicie wysycić wszystkie epitopy CD20 na komórkach. Z kolei długotrwała ekspozycja na RTX niesie ze sobą ryzyko utraty epitopu poprzez internalizację lub trogocytozę, co czyni pozostałe komórki nowotworowe opornymi na terapię anti-CD20. W związku z tym należy rozważyć kompromis między ryzykiem niedostatecznej saturacji CD20 a ryzykiem IRRs i utraty epitopu w wyniku nadmiernego

dawkowania.²³³

Obinutuzumab reprezentuje przeciwciała typu II, które są mniej podatne na internalizację i różnią się od RTX mechanizmem efektorowym. Eliminacja komórek docelowych następuje poprzez mechanizm pośredniczony przez receptory Fc (FcR, receptor fragmentu Fc immunoglobulin) lub bezpośrednio indukowanie śmierci komórki, a nie przez system dopełniacza, mechanizm charakterystyczny dla przeciwciał typu I. Liczba cząsteczek CD20 wymagana do skutecznej reakcji ADCC pośredniczonej przez FcR jest istotnie niższa niż liczba potrzebna do cytotoksyczności zależnej od dopełniacza. Obinutuzumab, podobnie jak inne przeciwciała przeciwnowotworowe, często wiąże się z IRRs, jednak właściwości przeciwciał typu II pozwalają osiągnąć kompromis między skutecznością a bezpieczeństwem. Doświadczenia z badania klinicznego z udziałem obinutuzumabu, w którym IRRs były główną przyczyną przerwania terapii,²³⁴ pozwoliły opracować wytyczne dotyczące minimalizacji ryzyka tych reakcji. Do najważniejszych zaleceń należą (Tam i wsp.,)²³⁵: (i) podział pierwszej dawki na 2 dni, 100 mg w dniu 0 oraz 900 mg w dniu 1.; (ii) odpowiednie nawodnienie pacjenta oraz założenie drugiej kaniuli dożylniej; (iii) premedykacja pacjentów metyloprednizolonem lub deksametazonem, lekami przeciwhistaminowymi i paracetamolem; (iv) w przypadku wystąpienia IRRs zmniejszenie szybkości infuzji.

U pacjentów z CLL i wysoką liczbą limfocytów ($>25 \times G/L$) zaleca się podanie dożylnie prednizonu lub prednizolonu przed infuzją RTX w celu zmniejszenia ryzyka ostrej reakcji po podaniu leku oraz zespołu uwalniania cytokin (*ang.* cytokine release syndrome, CRS).²³⁰ Dodatkowo, dane kliniczne potwierdziły, że obinutuzumab, humanizowane i potencjalnie mniej immunogenne przeciwciało, może stanowić alternatywę dla RTX w przypadku wystąpienia reakcji nadwrażliwości i skutecznie zastępować go w schematach immunochemioterapeutycznych.²³⁶ W przypadku hipogammaglobulinemii zaleca się rozważenie dożylniej terapii immunoglobulinowej (IVIG), aby ograniczyć ryzyko infekcji.²³⁷ Przeciwciała znakowane radioizotopami wiążą się z dodatkowymi toksycznościami wynikającymi z emisji promieniowania, w tym w perspektywie wieloletniej zwiększonym ryzykiem zespołu mielodysplastycznego (*ang.* myelodysplastic syndrome, MDS) oraz ostrej białaczki szpikowej (AML).²³⁸ Ponadto stosowanie ^{131}I -Tositumomabu może prowadzić do niedoczynności tarczycy, dlatego rutynowo stosuje się doustne formy jodku potasu w celu zahamowania wychwytu jodu-131 przez gruczoł tarczowy.²³⁹

Właściwe poznanie profilu bezpieczeństwa modelowego przeciwciała – RTX i jego sukces w badaniach klinicznych, a potem w codziennym stosowaniu, utorowały drogę do

rozwoju kolejnych generacji mAb anti-CD20.

W poniższej **Tab. 4.** zebrano syntetycznie informacje o stosowanych klinicznie mAb anti-CD20, wraz z ich najważniejszymi cechami.

Nazwa	Struktura	Pochodzenie	Charakterystyka epitopu CD20	Domena Fc	Data zatwierdzenia *	Wskaźniki	Typowe dawki w praktyce klinicznej
Rytuksymab	IgG1κ	chimeryczne	obszar A(170)NPS(173) na dużej pętli zewnątrzkomórkowej	niemodyfikowana	1997	CLL, DLBCL, FL	375 mg/m ² na wlew
Ofatumumab	IgG1	ludzkie	region FLKMESLNFIHAHT na dużej pętli zewnątrzkomórkowej oraz reszty A74T, I76A, Y77S na małej pętli zewnątrzkomórkowej	niemodyfikowana	2009	CLL	300–2000 mg na wlew
Obinutuzumab	gliko-modyfikowana IgG1κ	humanizowane	reszty 172–176 na dużej pętli zewnątrzkomórkowej	obniżona fukozylacja regionu Fc	2013	CLL, r/r FL	100–1000 mg na wlew
Ublituximab	gliko-modyfikowana IgG1κ	chimeryczne	reszty 168–171 i 158–159 na dużej pętli zewnątrzkomórkowej	obniżona fukozylacja regionu Fc	nie zatwierdzono	CLL	≤150–900 mg na wlew
Ocaratuzumab	gliko-modyfikowana IgG1	humanizowane	obszar A(170)NPS(173) na dużej pętli zewnątrzkomórkowej; zwiększone powinowactwo do CD20	obniżona fukozylacja regionu Fc; inżynieria białka w celu poprawy powinowactwa u nosicieli FcγRIIIa 158-F	nie zatwierdzono	r/r FL	375 mg/m ² na wlew
90Y-Ibritumomab Tiuxetan	IgG1κ znakowana 90-Ytr	mysie	obszar A(170)NPS(173) na dużej pętli zewnątrzkomórkowej	niemodyfikowana sekwencja Fc, koniugacja z 90Y	2002	FL, r/r NHL	14,8 MBq/kg
131I-Tositumomab	IgG2aλ sprzężona z 131-jodem	mysie	obszar A(170)NPS(173) na dużej pętli zewnątrzkomórkowej	niemodyfikowana sekwencja Fc, koniugacja z 90Y	2003 (wycofano)	r/r NHL	75 cGy

Tab. 4.

Klinicznie zatwierdzone i testowane przeciwciała monoklonalne anti-CD20 oraz ich radioimmunokoniugaty

*Źródło:*²⁴⁰ Opracowano na podstawie: Dabkowska A, Domka K, Firczuk M. Advancements in cancer immunotherapies targeting CD20: from pioneering monoclonal antibodies to chimeric antigen receptor-modified T cells. Front Immunol. 2024;15:1363102. doi:10.3389/fimmu.2024.1363102

5.6. Nowe kierunki rozwoju przeciwciał terapeutycznych anty-CD20

Jednym z współczesnych kierunków dalszego rozwoju przeciwciał terapeutycznych anty-CD20 są przeciwciała bispecyficzne (*ang.* bispecific antibodies, BsAbs). Potrzeba ich stworzenia wynika z nadal niezadowolających wyników leczenia r/r nowotworów z komórek B.^{241,242} W roku 2023 kilka konstruktów BsAbs anty-CD20 uzyskało już rejestrację kliniczną, a kolejne preparaty przedstawiają obiecującą skuteczność na etapie trwających badań klinicznych²⁴³. Białka te, mogą jednocześnie rozpoznawać dwa różne antygeny lub dwa różne epitopy tego samego antygeny, o ile znajdują się w odpowiedniej konformacji przestrzennej. Dzięki tej dualnej swoistości BsAbs pełnią często funkcję „mostu” między komórkami efektorowymi układu odpornościowego (np. limfocytami T) a komórkami nowotworowymi, ułatwiając ich interakcję i inicjowanie cytotoksyczności przeciwnowotworowej.

W ostatnich latach technologia ta rozwija się niezwykle dynamicznie, prowadząc do powstania licznych konstruktów BsAbs, obejmujących zarówno platformy o architekturze zbliżonej do IgG, jak i formaty nie-IgG.^{244,245} BsAbs o budowie IgG-podobnej naśladują strukturę immunoglobuliny G i zachowują fragment Fc, co umożliwia aktywację mechanizmów efektorowych zależnych od FcγR oraz dopełniacza, takich jak ADCC i CDC. Obecność fragmentu Fc oraz masa cząsteczkowa zbliżona do konwencjonalnych immunoglobulin (~150 kDa lub większa) warunkują wysoką stabilność strukturalną, korzystne właściwości farmakokinetyczne oraz wydłużony okres półtrwania w surowicy, związany m.in. z recyrkulacją zależną od receptora FcRn (receptor noworodkowy dla fragmentu Fc immunoglobulin). Właściwości te umożliwiają stosowanie elastycznych schematów dawkowania, od podań cotygodniowych po rzadsze, zarówno drogą dożylną, jak i podskórną. W przeciwieństwie do nich, bispecyficzne konstrukty nie-IgG pozbawione fragmentu Fc cechują się znacznie mniejszą masą cząsteczkową, krótszym okresem półtrwania oraz brakiem klasycznych mechanizmów efektorowych zależnych od Fc, a ich aktywność terapeutyczna wynika przede wszystkim z bezpośredniego, jednoczesnego wiązania antygenów docelowych.²⁴⁶ Do tej kategorii należy blinatumomab, pierwsze

klinicznie zarejestrowane przeciwciała bispecyficzne. Jest to konstrukcja typu T-cell engager (CD3×CD19), zbudowana z dwóch fragmentów scFv (*ang.* single-chain variable fragment, jednołańcuchowy fragment zmienny przeciwciała) połączonych linkerem, co przekłada się na bardzo krótki okres półtrwania i konieczność podawania leku w postaci ciągłej infuzji dożylniej.²⁴⁷ Spośród wielu konstrukcji najbardziej intensywnie rozwijaną platformą pozostaje format anty-CD20×CD3, którego celem jest rekrutacja cytotoksycznych limfocytów T. Szczególną uwagę poświęca się obecnie BsAbs o budowie IgG-podobnej skierowanych przeciwko CD20, jako nowej opcji terapeutycznej u pacjentów z nowotworami komórek B, którzy przeszli już kilka linii terapii przeciwciałami monoklonalnymi i leczenie komórkami CAR-T (*ang.* chimeric antigen receptor T cells, limfocyty T z chimerycznym receptorem antygenowym) ukierunkowanymi na CD19.^{248,249}

Profil bezpieczeństwa przeciwciał bispecyficznych w badaniach klinicznych okazał się stosunkowo jednorodny, a większość działań niepożądanych (*ang.* adverse events, AEs) była możliwa do opanowania, rzadko prowadząc do istotnych powikłań, konieczności przerwania lub zakończenia terapii. W dwóch badaniach, w których łącznie wzięło udział 415 pacjentów, odnotowano łącznie pięć zgonów uznanych za bezpośrednio związane z toksycznością leku.^{250,251} Najczęściej obserwowane powikłania wynikały z nadmiernej aktywacji limfocytów T. Spośród nich najistotniejsze klinicznie było występowanie CRS odnotowywanego u 15–80% pacjentów, w zależności od rodzaju preparatu, drogi podania oraz schematu dawkowania.²⁵² Klinicznie CRS manifestował się gorączką, dreszczami, wysypką, hipotensją, hipoksją i zaburzeniami świadomości, zwykle rozpoczynając się w ciągu 12–36 godzin od podania BsAb i ustępując w ciągu 36–72 godzin. Największe nasilenie i częstość występowały podczas pierwszego cyklu terapii, natomiast objawy rzadko utrzymywały się po cyklu drugim, co wskazuje na warunkową, zależną od antygeny aktywację limfocytów T. Stopnie nasilenia CRS oceniano według kryteriów opracowanych pierwotnie dla terapii CAR-T.^{253,254} Większość przypadków miała charakter łagodny lub umiarkowany (stopień 1–2) i ustępowała samoistnie lub po zastosowaniu leczenia wspomagającego (nawodnienie, paracetamol, glikokortykosteroidy). Jedynie u niewielkiej grupy pacjentów wystąpiły cięższe objawy wymagające podania tocilizumabu (przeciwciała anty-IL-6) oraz, sporadycznie, hospitalizacji w oddziale intensywnej terapii z koniecznością monitorowania i stosowania amin presyjnych. Rzadziej obserwowano toksyczność neurologiczną potencjalnie związaną z nadmierną aktywacją limfocytów T. Obejmowała ona m.in. delirium, zaburzenia mowy, drżenie, ospałość, zaburzenia koncentracji, pobudzenie, stany splątania, afazję, encefalopatię, drgawki oraz obrzęk mózgu. Terapie komórkowe

oparte na limfocytach T, takie jak terapie CAR-T, oraz przeciwciała bispecyficzne w tym konstrukty typu CD3 × CD20/CD19, wykazują zbliżony mechanizm aktywacji limfocytów T, co w konsekwencji może prowadzić do powstania podobnych działań niepożądanych. W obu przypadkach dochodzi do ścisłego kontaktu T-komórek z komórkami docelowymi, indukując cytotoksyczność i uwalnianie cytokin prozapalnych.

Dotychczas działania niepożądane po CAR-T były dokładniej opisywane w piśmiennictwie i lepiej poznane, dlatego też w literaturze hematologiczno-onkologicznej coraz częściej pojawia się zestawienie toksyczności terapii CAR-T z bispecyficznymi przeciwciałami. Jednym z najczęściej obserwowanych powikłań jest CRS, którego objawy obejmują gorączkę, hipotensję, zaburzenia czynności narządów i uogólnioną reakcję zapalną. Ponadto zarówno CAR-T, jak i BsAbs mogą wywoływać neurotoksyczność związaną z efektorową aktywnością limfocytów T (*ang.* immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome, ICANS) objawiającą się m.in. zaburzeniami świadomości, zaburzeniami mowy i napadami drgawkowymi. Intensywność i czas trwania działań niepożądanych różnią się między tymi strategiami – ekspansja adoptowanych limfocytów T w terapii CAR-T jest zazwyczaj bardziej masywna i długotrwała, co skutkuje cięższym przebiegiem CRS i ICANS, podczas gdy w przypadku terapii bispecyficznych toksyczność jest zwykle łagodniejsza i krótkotrwała, zależna od obecności przeciwciała w krążeniu. Stosowanie tych samych skal oceny toksyczności, takich jak konsensus ASTCT (*ang.* American Society for Transplantation and Cellular Therapy, Amerykańskie Towarzystwo ds. Transplantacji i Terapii Komórkowej), pozwala na bezpośrednie porównanie profilu bezpieczeństwa obu terapii, co jest kluczowe w podejmowaniu decyzji terapeutycznych i planowaniu strategii leczenia pacjentów z nowotworami limfoproliferacyjnymi. Komórki CAR-T są zdolne do penetracji płynu mózgowo-rdzeniowego, powodując wzrost stężeń białka i cytokin, a także potencjalnie oddziałując na komórki okołonaczyniowe w mózgu eksprymujące ich cel molekularny, CD19.²⁵⁵ Z kolei BsAbs o budowie IgG nie powinny przekraczać bariery krew-mózg, a dane na temat obecności aktywowanych limfocytów T i cytokin prozapalnych w płynie mózgowo - rdzeniowym pacjentów leczonych BsAbs są skąpe. Dotychczasowe obserwacje wskazują, że neurotoksyczność w badaniach BsAbs jest rzadka, zwykle łagodna i samoograniczająca się w ciągu kilku godzin^{256,257}

W celu ograniczenia toksyczności związanej z nadmierną aktywacją limfocytów T opracowano kilka strategii profilaktycznych. Najczęściej stosowaną metodą jest tzw. dawkowanie eskalacyjne (*ang.* step-up dosing), w którym pacjent otrzymuje początkową, niewielką dawkę primingową, następnie dawkę pośrednią, a dopiero potem dawkę pełną. W

modelach przedklinicznych wykazano, że takie podejście zmniejsza szczytowy wyrzut cytokin bez osłabienia aktywności przeciwnowotworowej.²⁵⁸ W badaniach klinicznych stosowano zarówno szybkie (2-stopniowe)²⁵⁹ jak i wydłużone (4-stopniowe)²⁶⁰ schematy eskalacji dawki. Inne działania obejmowały wolniejsze wlewy dożylnie, profilaktyczne podawanie kortykosteroidów w pierwszych tygodniach terapii, hospitalizację w okresie najwyższego ryzyka CRS, a w badaniach glofitamabu – wstępne podanie pojedynczej dawki obinutuzumabu, co zgodnie z danymi przedklinicznymi redukuje liczbę krążących limfocytów B i tym samym zmniejsza aktywację limfocytów T, wyrzut cytokin oraz aktywację komórek śródbłonna.²⁶¹ Inne obserwacje sugerowały, że modyfikacja powinowactwa do CD3 może ograniczać nasilenie CRS przy zachowaniu skuteczności BsAbs,²⁶² choć mechanizm ten nie został dotąd zweryfikowany klinicznie.

Poza zdarzeniami niepożądanymi związanymi z aktywacją limfocytów T, toksyczność BsAbs obejmuje także zaburzenia hematologiczne i metaboliczne, takie jak neutropenia, hipofosfatemia, niedokrwistość, zmęczenie czy biegunka.^{263,264} Należy podkreślić, że dane dotyczące bezpieczeństwa długoterminowego nie są jeszcze dostępne, a potencjalne ryzyko związane z opóźnioną regeneracją limfocytów B wymaga dalszych badań.

W poniższej **Tab. 5.** zebrano syntetycznie informacje o stosowanych klinicznie BsAbs typu CD3 × CD20 wraz z ich najważniejszymi cechami.

Nazwa	Struktura	Domena wiążąca antygen	Domena Fc	Data zatwierdzenia	Wskazania	Typowe dawki w praktyce klinicznej	Badania kliniczne
Epcoritamab	pełnowymiarowa IgG1	1 Fab anty-CD20, 1 Fab anty-CD3	zniesione wiązanie FcγR i C1q; zachowane wiązanie z FcRn	2023	r/r DLB CL	0,16–48 mg s.c. w 28-dniowych cyklach ze stopniowym zwiększaniem dawki	NCT03625037
Mosunetuzumab	pełnowymiarowa IgG1	1 Fab anty-CD20, 1 Fab anty-CD3	zniesione wiązanie FcγR; zachowane wiązanie z FcRn	2023	r/r FL	1–60 mg i.v. w 21-dniowych cyklach	NCT02500407
Glofitamab	pełnowymiarowa IgG1	2 Fab anty-CD20, 1 Fab anty-CD3	zniesione wiązanie FcγR i C1q; zachowane wiązanie z FcRn	2023	r/r DLB CL	2,5–30 mg i.v. w 21-dniowych cyklach ze stopniowym zwiększaniem dawki i pre-treatment obinutuzumabem	NCT03075696
Odronextamab	pełnowymiarowa IgG4	1 Fab anty-CD20, 1 Fab anty-CD3	zniesione wiązanie FcγRIII; zachowane wiązanie z FcRn	w trakcie oceny	r/r DLB CL, r/r FL	0,1–320 mg i.v. w 21-dniowych cyklach ze stopniowym zwiększaniem dawki	NCT02290951; NCT03888105
Imvotamab	IgM	10 Fab anty-CD20, 1 scFv anty-CD3	niemodyfikowana	nie zatwierdzono	r/r DLB CL, r/r FL	15–300 mg i.v. w 21-dniowych cyklach ze stopniowym zwiększaniem dawki	NCT04082936
Plamotamab	IgG1	1 Fab anty-CD20, 1 scFv anty-CD3	zniesione wiązanie FcγR; zachowane wiązanie z FcRn	nie zatwierdzono	r/r DLB CL, r/r FL	badanie eskalacji dawki	NCT02924402

Tab. 5. Klinicznie zatwierdzone i testowane przeciwciała bispecyficzne typu CD20xCD3

*Źródło:*²⁴⁰ Opracowano na podstawie: Dabkowska A, Domka K, Firczuk M. Advancements in cancer immunotherapies targeting CD20: from pioneering monoclonal antibodies to chimeric antigen receptor-modified T cells. Front Immunol. 2024;15:1363102. doi:10.3389/fimmu.2024.1363102

CAR-T to limfocyty T modyfikowane genetycznie w taki sposób, aby ekspresjonowały syntetyczny receptor rozpoznający antygen nowotworowy niezależnie od MHC (*ang.* major histocompatibility complex, główny układ zgodności tkankowej). Receptor CAR łączy zewnątrzkomórkową domenę pochodzącą z przeciwciała monoklonalnego (scFv) z wewnątrzkomórkową domeną aktywacyjną kompleksu CD3ζ oraz jedną lub więcej domen kostymulacyjnych (np. CD28, 4-1BB). Dzięki temu CAR-T mogą swoście rozpoznawać i eliminować komórki nowotworowe. W ostatnich latach terapia CAR-T zrewolucjonizowała leczenie wybranych nowotworów hematologicznych, prowadząc do uzyskania długotrwałych remisji u pacjentów opornych na leczenie standardowe.^{265,266} CD20 jest aktualnie badany jako alternatywny cel dla terapii komórkowych. Zarejestrowane dotąd terapie CAR-T opierają się na autologicznych komórkach pacjenta modyfikowanych genetycznie do eliminacji komórek nowotworowych. W praktyce klinicznej stosuje się cztery produkty celowane w CD19, które są przeznaczone do leczenia pacjentów z r/r ostrą białaczką limfoblastyczną z komórek B (*ang.* B-cell acute lymphoblastic leukemia, B-ALL) oraz r/r NHL. Mimo wysokiej skuteczności, nawrót choroby występuje u około 60% chorych, głównie w wyniku utraty ekspresji CD19. Dane wstępne wskazują, że komórki CAR-T skierowane przeciwko CD20 mogą być skuteczne u pacjentów z r/r NHL, także w przypadku nawrotów CD19-ujemnych po wcześniejszej terapii CAR-T anty-CD19.²⁶⁷

Klasyfikacja limfocytów CAR-T opiera się przede wszystkim na budowie domeny wewnątrzkomórkowej receptora oraz liczbie przekazywanych sygnałów kostymulujących, co znajduje odzwierciedlenie w podziale na kolejne generacje.

Limfocyty CAR-T pierwszej generacji zawierały wyłącznie domenę sygnałową CD3ζ, która stanowiła element kompleksu receptora limfocyty T i była odpowiedzialna za inicjację aktywacji limfocyty T. Pomimo wykazanej zdolności do swoistego rozpoznawania komórek docelowych *in vitro*, konstrukty te charakteryzowały się ograniczoną proliferacją, niską persystencją *in vivo* oraz niewystarczającą aktywnością przeciwnowotworową, co przypisuje się brakowi wtórnych sygnałów kostymulujących niezbędnych do pełnej aktywacji funkcjonalnej limfocytów T.²⁶⁸

Limfocyty CAR-T drugiej generacji zostały zaprojektowane poprzez włączenie pojedynczej domeny kostymulującej, najczęściej pochodzącej z cząsteczek CD28 lub 4-1BB (CD137), zlokalizowanej w tandemie z domeną CD3ζ. Dodanie sygnału kostymulującego skutkowało istotną poprawą zdolności proliferacyjnych, zwiększoną sekrecją cytokin efektorowych oraz wydłużoną przeżywalnością limfocytów CAR-T po podaniu *in vivo*, co

przełożyło się na znaczącą poprawę skuteczności klinicznej tej platformy terapeutycznej w leczeniu nowotworów hematologicznych, w szczególności chłoniaków i ostrych białaczek limfoblastycznych z linii B.^{269,270}

Konstrukty trzeciej generacji CAR-T zawierają dwie domeny kostymulujące, najczęściej CD28 w połączeniu z 4-1BB lub OX40 (CD134), co ma na celu synergistyczne wzmocnienie sygnalizacji aktywacyjnej oraz dalsze zwiększenie proliferacji i persystencji komórek efektorowych. Nasilenie aktywności efektorowej może potencjalnie wiązać się ze zwiększonym ryzykiem toksyczności immunologicznej, w tym CRS oraz ICANS.²⁷¹

Badania fazy pierwszej i drugiej z zastosowaniem konstrukcji drugiej i trzeciej generacji potwierdziły, że autologiczne CAR-T anty-CD20 są wykonalne i skuteczne u pacjentów z r/r CD20+ NHL. Szczególnie istotne jest to, że terapia ta działa również u osób, które nie uzyskały odpowiedzi na chemioterapię, w tym szerokostosowaną w pierwszej linii R-CHOP, oraz u pacjentów z obniżoną ekspresją CD20. Sugeruje to, że komórki CAR-T celujące w CD20 mogą być opcją terapeutyczną u chorych, którzy stali się oporni na przeciwciała monoklonalne anty-CD20^{272,273}.

Ze względu na ryzyko ucieczki antygenowej, CD20 jest włączane do strategii obejmujących jednocześnie kilka antygenów – tzw. wielocelowych. Obejmują one m.in. tandemowe lub bispecyficzne konstrukty CAR, podawanie sekwencyjne CAR-T anty-CD19 i anty-CD20 lub jednoczesną infuzję obu rodzajów komórek. Dobrym przykładem są komórki TanCAR7 (limfocyty T zmodyfikowane genetycznie do ekspresji tandemu receptorów CAR), w których w jednym łańcuchu połączono domeny rozpoznające CD19 i CD20. Zastosowanie tych komórek u chorych na r/r NHL prowadziło do uzyskania długotrwałych remisji, przy czym dominującym powikłaniem był CRS, głównie o niższym stopniu nasilenia.²⁷⁴⁻²⁷⁶ W innym badaniu pierwszej fazy, w którym zastosowano bispecyficzne komórki CAR-T anty-CD19/CD20 odnotowano wysoki odsetek odpowiedzi [ORR (*ang.* overall response rate, całkowity odsetek odpowiedzi na leczenie) 90%, CR (*ang.* complete response, odpowiedź całkowita) 70%] przy korzystnym profilu bezpieczeństwa.²⁷⁷

Równolegle prowadzone są badania nad strategią sekwencyjnego podawania CAR-T anty-CD20 po CAR-T anty-CD19, jak również nad jednoczesną infuzją obu populacji. Wyniki badania drugiej fazy z zastosowaniem kombinacji CAR-T anty-CD19 i anty-CD20 w r/r DLBCL wykazały jednak ograniczony czas trwania remisji.²⁷⁸ Najnowsze podejścia obejmują konstrukty trójcelowe rozpoznające CD19, CD20 i CD22, które w badaniach przedklinicznych były skuteczne również wobec komórek pozbawionych CD19. Strategia ta jest obecnie oceniana w badaniu klinicznym (NCT05418088), stanowiąc potencjalne

rozwiązanie dla pacjentów z nawrotem CD19-ujemnym.²⁷⁹ Pierwsze doświadczenia z terapiami CAR-T identyfikują zmiany genetyczne w obrębie szlaków sygnałowych jako główny mechanizm oporności na terapię ukierunkowane na CD20, zwłaszcza w kontekście aktywacji limfocytów T, która odgrywa kluczową rolę w skuteczności BsAbs oraz terapii komórkami CAR-T. Dodatkowo mikrośrodowisko guza może odgrywać rolę w rozwoju oporności poprzez wytwarzanie środowiska immunosupresyjnego. Komórki nowotworowe oraz immunosupresyjne populacje obecne w mikrośrodowisku guza, takie jak komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego, makrofagi związane z guzem czy Treg, mogą wydzielać cytokiny o działaniu hamującym, które tłumią aktywność komórek efektorowych (limfocytów T, komórek NK, fagocytów), a tym samym ograniczają skuteczność immunoterapii.²⁸⁰⁻²⁸³

W poniższej **Tab. 6.** zebrano syntetycznie informacje o terapiach CAR-T ukierunkowanych na CD20 w trakcie badań klinicznych wraz z ich najważniejszymi cechami.

Nazwa	Komórki efektorowe	Struktura	Wskazania	Faza badania klinicznego	Identyfikator badania klinicznego
CD20 CAR-T	autologiczne limfocyty T	CD20 scFv z domenami CD8α H/TM, 4-1BB, CD3ζ	nawrotowy/oporny (r/r) NHL	faza I	NCT04036019
CD19/CD20 CAR-T	autologiczne limfocyty T	CD20 i CD19 scFv z domenami CD8α H/TM, 4-1BB, CD3ζ	r/r nowotwory z komórek B	faza I/II	NCT03097770
CD20/CD22 CAR-T	allogeniczne limfocyty T	CD20 i CD22 scFv z domenami CD8α H/TM, 4-1BB, CD3ζ	r/r NHL	faza I/II	NCT05607420
CD19/CD20/CD22 CAR-T	autologiczne limfocyty T	CD19, CD20 i CD22 scFv z domenami CD8α H/TM, 4-1BB, CD3ζ	r/r NHL	faza I	NCT05418088

Tab. 6.

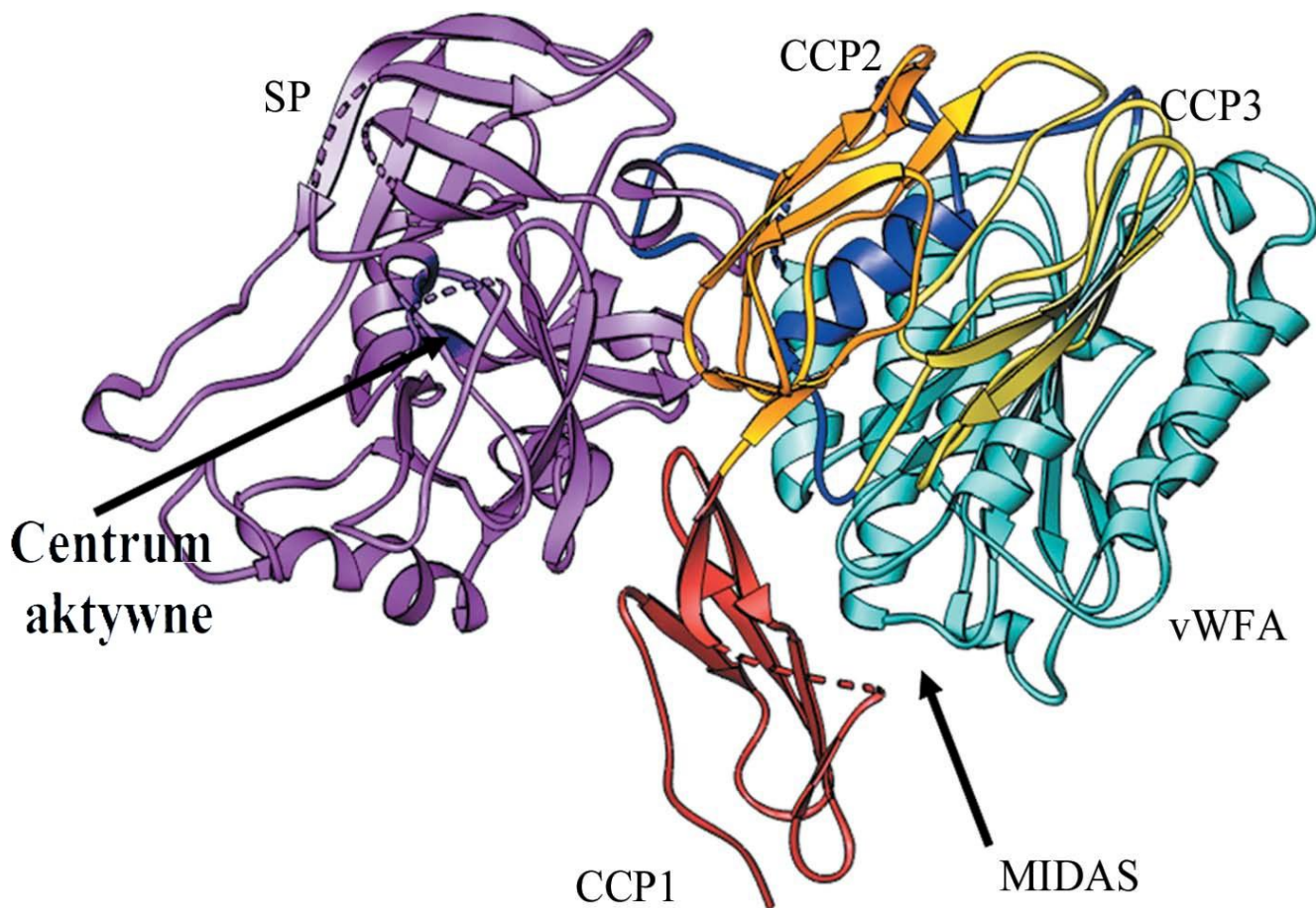
Terapie CAR-T ukierunkowane na CD20 w trakcie badań klinicznych

*Źródło:*²⁵¹ Opracowano na podstawie: Dabkowska A, Domka K, Firczuk M. Advancements in cancer immunotherapies targeting CD20: from pioneering monoclonal antibodies to chimeric antigen receptor-modified T cells. Front Immunol. 2024;15:1363102. doi:10.3389/fimmu.2024.1363102

5.7. Białko C2 w układzie dopełniacza

Białko C2 układu dopełniacza (C2) jest glikoproteiną o masie około 100 kDa, pełniącą kluczową rolę w CP i LP. W tych szlakach C2 łączy się z C4b, tworząc konwertazę C3 (C4b2a), która katalizuje proteolityczne rozszczepienie C3 do C3a i C3b. Następnie uczestniczy w tworzeniu konwertazy C5 (C4b2a3b), prowadzącej do aktywacji MAC. Dzięki temu C2 uczestniczy w tworzeniu konwertazy C3 (C4b2a), która inicjuje kaskadę reakcji prowadzących do opsonizacji, rekrutacji komórek efektorowych oraz lizy komórek patogennych lub nieprawidłowych. C2 zawiera domenę proteazy serynowej, co odzwierciedla jego przynależność do rodziny modularnych białek proteazowych układu dopełniacza. Ewolucyjnie białko C2 jest szeroko zachowane u kręgowców, przy czym sekwencje domen odpowiedzialnych za aktywność enzymatyczną i wiązanie C4b są najbardziej konserwatywne, co podkreśla fundamentalne znaczenie tych regionów dla prawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego. Analizy filogenetyczne wskazują ponadto, że C2 i FB wyewoluowały z wspólnego genu przodka, przy czym C2 wyspecjalizowało się w CP i LP, a FB w AP. Mutacje w genie C2 u ludzi prowadzą do dziedzicznych niedoborów dopełniacza, objawiających się zwiększoną podatnością na infekcje bakteryjne oraz zaburzeniami autoimmunologicznymi, co dodatkowo podkreśla jego kluczowe znaczenie dla utrzymania homeostazy odpornościowej.²⁸⁴⁻²⁸⁶

W strukturze C2 można wyróżnić trzy fragmenty: N-końcowy, zawierający trzy domeny SCR, zwane także CCP (*ang.* complement control protein, moduł kontrolujący dopełniacz); środkowego, stanowiącego domenę typu A czynnika von Willebranda (*ang.* von Willebrand factor A, vWFA) z miejscem adhezji zależnym od wiązania jonów metali (*ang.* metal ion-dependent adhesion site, MIDAS)²⁸⁷; oraz C-końcowego, który jest proteazą serynową (*ang.* serine protease, SP) podobną do chymotrypsyny, wykazującą specyficzność trypsynopodobną.²⁸⁸ Budowę białka C2 przedstawia **Ryc. 1**.



Ryc. 1.

Model struktury białka C2 w formie diagramu wstęgowego

[przedstawiono: N-końcowe domeny CCP1 (czerwona), CCP2 (żółta), CCP3 (żółta), łącznik CCP3–vWFA (niebieski), domenę vWFA (niebieskozielona), domenę SP (fioletowa), MIDAS (krótka strzałka) oraz centrum aktywne SP (długa strzałka)]

Źródło: Opracowano na podstawie: Krishnan V, Xu Y, Macon K, Volanakis JE, Narayana SV. The structure of C2b, a fragment of complement component C2 produced during C3 convertase formation. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2009;65(Pt 3):266-274.
doi:10.1107/S0907444909000389

C2 wiąże się z powierzchnią zawierającą aktywowane C4b w obecności jonów Mg^{2+} , tworząc kompleks C4bC2, który następnie jest cięty przez aktywowany enzym C1s w CP lub przez proteazę serynową związaną z lektyną wiążącą mannozę (MASP2) w LP. Cięcie C2 przez C1s lub MASP2 prowadzi do powstania dwóch fragmentów: większego fragmentu C2a (70 kDa), który pozostaje związany z C4b i tworzy konwertazę C3 (C4bC2a), oraz mniejszego fragmentu C2b (30 kDa), który uwalnia się do fazy płynnej^{289,290}. C2a zawiera domeny vWFA i SP, natomiast C2b składa się z domen CCP1–3. Strukturalnie i funkcjonalnie C2 przypomina FB alternatywnej drogi dopełniacza, który dostarcza podjednostkę katalityczną konwertazy C3bBb.

Domeny CCP są powszechnymi strukturami występującymi w receptorach, enzymach i białkach regulacyjnych układu dopełniacza. Każdy z tych modułów składa się z około 60 reszt aminokwasowych przyjmujących strukturę β -harmonijki z czterema mostkami disiarczkowymi (Cys1–Cys3 oraz Cys2–Cys4).^{291–293} Poszczególne domeny są połączone krótkimi, słabo konserwowanymi filogenetycznie linkerami, a ich wzajemna orientacja może się różnić pomiędzy kolejnymi parami domen. Pomimo tej elastyczności białko zazwyczaj przyjmuje wydłużoną konformację liniową, opisywaną jako struktura typu „sznur pereł”.^{295,295} Wykazano, że kluczową rolę w formowaniu konwertazy C3 odgrywa konserwowane miejsce wiązania C4b zlokalizowane w N-kończym regionie fragmentu C2b, które inicjuje i stabilizuje kompleks C4b–C2. Dodatkowo miejsce MIDAS w domenie vWFA fragmentu C2a uczestniczy w wiązaniu jonu Mg^{2+} i wzmacnia wiązanie z C4b, warunkując stabilność i aktywność katalityczną konwertazy C3 CP i LP.²⁹⁶

Miejsce wiązania w C2b jest niezależne od obecności Mg^{2+} wolno i stabilnie wchodzi w interakcję. Natomiast wiązanie przez MIDAS w C2a wymaga Mg^{2+} , przebiega szybko, ale jest mniej stabilne.²⁹⁷

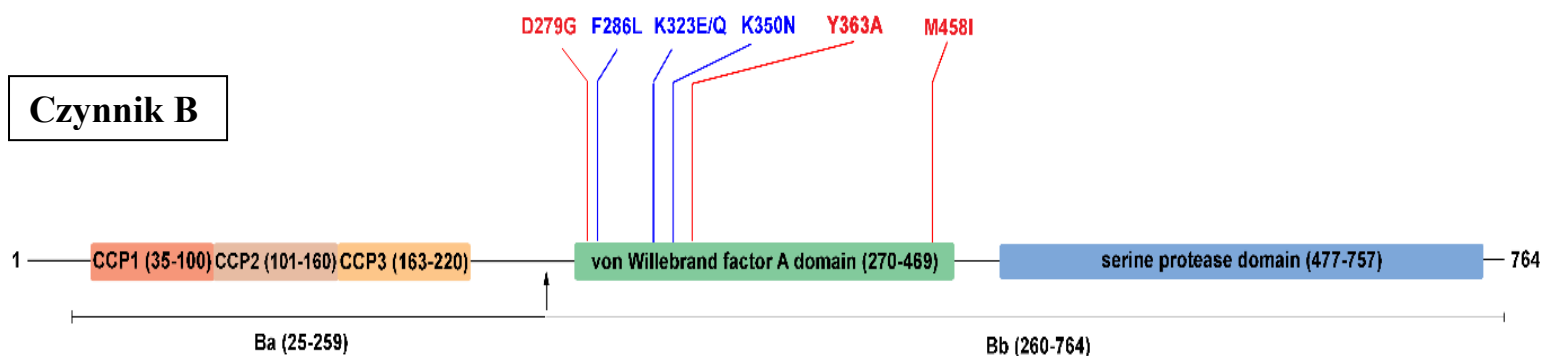
Cytowane powyżej badania *Krishnan i wsp.* przedstawiają strukturę krystaliczną C2b z rozdzielczością 1,8 Å wraz z sugestiami dotyczącymi zmian konformacyjnych, jakie mogą zachodzić podczas formowania kompleksu C4bC2a. Dzięki analizom krystalograficznym poznano dokładną strukturę C2a oraz fragmentów Ba i Bb czynnika B, co umożliwiło odwzorowanie zmian konformacyjnych podczas tworzenia konwertaz C3.²⁹⁸

5.7.1. Warianty GoF białka C2

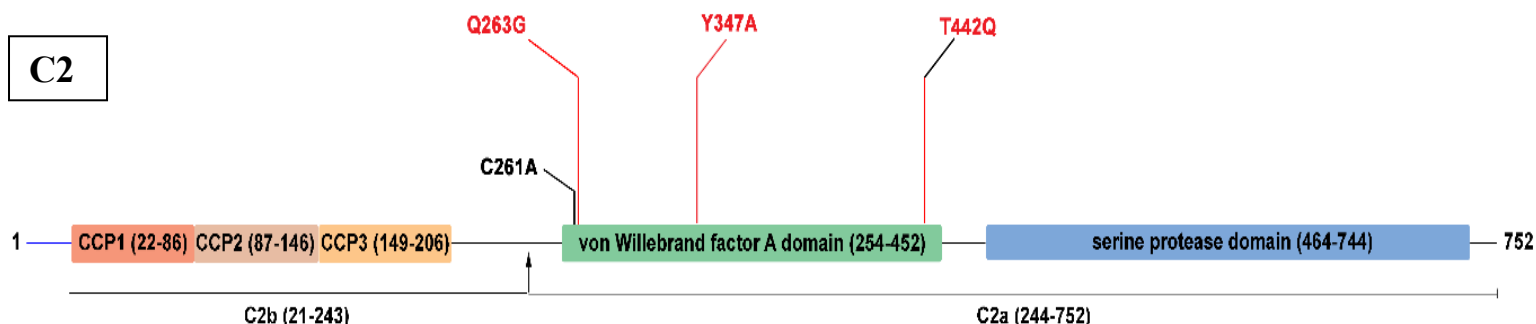
Wprowadzenie do zagadnienia wariantów GoF białka C2 ma kluczowe znaczenie dla wyjaśnienia celów niniejszej pracy doktorskiej i ich realizacji.

Punktem wyjścia w badaniach naukowych w tym zakresie były prace nad genami kodującymi białka C2 oraz FB.^{299,300} Kolejne prace udowadniały znaczną homologię C2 i FB. Cechuje je wysoki stopień podobieństwa sekwencji aminokwasowej i niemal identyczna organizacja strukturalna.²⁹⁸ Analogia w budowie ma odzwierciedlenie w pełnieniu analogicznych ról w swoich szlakach, gdzie działają jako składniki enzymatyczne konwertaz zapewniające aktywność proteazy serynowej. Wśród pacjentów z rzadkimi chorobami nerek zidentyfikowano kilka mutacji zmiany sensu zmieniających sekwencję aminokwasów w FB (np. p. D279G, p. M458I), które prowadzą do fenotypu GoF.^{301,302} Piśmiennictwo opisuje także mutacje zaprojektowane *in silico*³⁰³. Bazując na powyższych badaniach, w pracy naukowej *In Silico Designed Gain-of-Function Variants of Complement C2 Support Cytocidal Activity of Anticancer Monoclonal Antibodies*,³⁰⁴ której jestem współautorem, dokonano transpozycji niektórych z tych mutacji genu kodującego FB na odpowiadające im podstawienia w białku C2 (**Ryc. 2.** i **Ryc. 3.**). Następnie, aby uzyskać warianty C2 zapewniające kilka niezależnych sposobów wzmocnienia konwertazy klasycznej, połączono te mutacje w jeden konstrukt. Celem naszej pracy było dostarczenie dowodów na to, że zaprojektowane *in silico*, domniemane mutacje GoF w białku C2 poprawiają cytotoksyczność zależną od układu dopełniacza przeciwciał monoklonalnych stosowanych w terapii przeciwnowotworowej.

Czynnik B



C2



Ryc. 2.

Homologia białek: czynnika B i C2

Schemat przedstawia rozmieszczenie domen w strukturze pierwotnej paralogów: FB (górny wykres) oraz C2 (dolny wykres). Czarne strzałki oznaczają miejsca cięcia w cząsteczkach FB i C2. Zaznaczone zostały mutacje gain-of-function w FB potwierdzone badaniami funkcjonalnymi, a mutacje wytypowane do translacji na odpowiadające podstawienia w C2 oznaczono czerwoną czcionką. Mutacja C261A, oznaczona czarną czcionką, która nie była zgłaszana w przypadku FB, lecz jest uznawana za poprawiającą wewnętrzną stabilność klasycznej konwertazy, została również uwzględniona.³⁰⁵

Źródło: Urban A, Majeranowski A, Stasiłojć G, et al. In Silico Designed Gain-of-Function Variants of Complement C2 Support Cytocidal Activity of Anticancer Monoclonal Antibodies. *Cancers (Basel)*. 2022;14(5):1270. Published 2022 Mar 1. doi:10.3390/cancers14051270

C2	251	GHLNLYLLLD	CSQSVSE	ND	FLIFKESASLMVDRIFSFEINVSV	VAIITFASEP	PKVLM	SVLN	310
		G +N+YL+LD	S S+ ++F	K+	+++++	S+ +	++T+A+	PK+ + V	
FB	267	GSMNIYLVLD	GS	DSIGAS	NFTGAKKCLVNLIEK	VASYGVKPRYGLVTYATYPKI	WVK	VSE	326
C2	311	DNSRDMTEVISSLE	NANYKDHEN	GTGTNTYAALNSV	Y	LMMNNQMRLLGMETMAWQEIRHA			370
		+S + V L	NY+DH+	+GTNT	AL +VY	MM+	+ W RH		
FB	327	ADSSNADWVT	KQLNEINYEDHKL	KSGTNTKKALQAV	Y	SMMSWPD	- - -DVPPEGWNRTRHV		383
C2	371	IILLTDGKSNMGGSPKTAVDHIREILNINQKRN	- - - -DYLDIYAIGVGKLDVDWRELNEL						426
		IIL+TDG NMGG P T +D IR++L I + R	DYLD+Y GVG L V+ +N L						
FB	384	IILMTDGLHNMGGDPITVIDEIRDLLYIGKDRKNPREDYLDVYVFGVGPL	-VNQVNINAL						442
C2	427	GSKKDGERHAFILQDT	KALHQVFEHMLDVSKLTD	TICGVGNMSANASDQERTPWHV	- - -T				483
		SKKD E+H F ++D + L VF M+D S+ + ++CG+	+D + PW						
FB	443	ASKKDNEQHVFKVKD	MENLEDVFYQMIDESQ	-SLSLCGMVWEHRKGT	DYHKQPWQAKISV				501

Ryc. 3.

Dopasowanie sekwencji aminokwasowych domen A czynnika von Willebrand białka C2 (górną część) i czynnika B (dolną część)

Źródło: Urban A, Majeranowski A, Stasiłojć G, et al. In Silico Designed Gain-of-Function Variants of Complement C2 Support Cytocidal Activity of Anticancer Monoclonal Antibodies. *Cancers (Basel)*. 2022;14(5):1270. Published 2022 Mar 1. doi:10.3390/cancers14051270

Legenda:

-  Czerwone oznaczenia na sekwencji to miejsca udanej transpozycji mutacji w genie *CFB* do genu *C2*, w wyniku których uzyskano warianty GoF białka C2.
-  Niebieskie oznaczenia na sekwencji to miejsca w czynniku B, dla których takiej transpozycji nie udało się uzyskać.

Używając tego samego kodu kolorów co na **Ryc. 2.**, **Ryc. 3.** przedstawia aminokwasy, których podstawienie prowadzi do uzyskania fenotypu GoF w FB. Trzy z tych podstawień w pozycjach oznaczonych czerwonymi ramkami zostały przetransponowane z FB do C2. Wspólna litera aminokwasu w środkowej linii wskazuje identyczność aminokwasów, a symbol „+” oznacza podobieństwo wynikające z właściwości fizykochemicznych. Oryginalna mutacja GoF w FB w pozycji 279 zmienia kwasowy aminokwas z łańcuchem bocznym (Asp) na glicynę (Gly). W związku z tym, odpowiadająca reszta Gln w C2 została również zamieniona na Gly. Pomimo identyczności aminokwasów w pozycji 286 (FB), wariant GoF z Leu zamiast Phe okazał się niemożliwy do ekspresji w naszym systemie eukariotycznym. Podobny problem wykazano już wcześniej w wykonywanych i opublikowanych doświadczeniach.³⁰⁶ W sekwencji C2 nie znaleziono aminokwasu funkcjonalnie odpowiadającego Lys w pozycji 323 w FB. Wyprodukowano wariant C2 p.S307E (ponieważ substytucja K->E w FB prowadzi do wariantu GoF, jednak nie wykazał on fenotypu GoF. Region pozycji 350 w FB różnił się od C2, dlatego zrezygnowano z konstrukcji homologicznego wariantu C2. Z kolei substytucja Tyr na Ala w pozycji 363 w FB, prowadząca do fenotypu GoF, mogła zostać odtworzona w C2 z uwagi na znaczne podobieństwo klastra aminokwasów. Region wokół reszty 458 w FB jest zachowany w C2, jednak reszta 442 (hydrofobowa Met w FB, polarna Thr w C2) i pierwotnie zgłaszany fenotyp GoF w FB obejmował substytucję jednego hydrofobowego aminokwasu na inny hydrofobowy aminokwas (Ile). W związku z tym zbadano konstrukt C2 z substytucją polarnej reszty (Thr) na aminokwas tej samej kategorii, lecz o innej geometrii łańcucha bocznego (Gln), co skutkowało uzyskaniem hiperaktywnego wariantu C2.

Nadaktywne konwertazy AP mogą być potencjalnie chorobotwórcze, ponieważ AP spontanicznie deponuje C3b na komórkach i tkankach gospodarza. Pacjenci z mutacjami GoF w składnikach konwertazy AP rozwijają choroby nerek w młodym wieku znacznie częściej, niż wynika to z ryzyka populacyjnego.³⁰⁷ Zidentyfikowano także pacjentów z naturalnymi mutacjami GoF w genie *C2*. U pacjentów tych rozwijały się glomerulopatie i mikroangiopatie zakrzepowe w wieku powyżej 50 lat, bez historii innych chorób, mimo obecności autoprzeciwciał przeciwwądrowych i haplotypów ryzyka w innych genach dopełniacza (*MCP*, *CFH*).³⁰⁸ Sugeruje to, że obecność nadaktywnych konwertaz CP nie prowadzi automatycznie do uszkodzeń narządów i tkanek, a rozwój specyficznej patologii wymaga dziesięcioleci ciągłej obecności wariantu C2 GoF.

Dzięki skonstruowanemu wariantowi zawierającemu skumulowane mutacje GoF w genie kodującym białko C2, możliwe było zaplanowanie dalszych badań naukowych,

którym poświęcony jest ten doktorat, i które zostały opisane w części badawczej niniejszej monografii. W szczególności przedmiotem moich doświadczeń było zastosowanie wariantów GoF białka C2 w połączeniu z przeciwciałami monoklonalnymi anty-CD20 i ocena modulacji mechanizmów efektorowych oraz skuteczności ich działania przeciwnowotworowego.

6. Część badawcza I

Pierwszym celem pracy było określenie optymalnej metody oceny aktywności CDC indukowanej przez przeciwciało anty-CD20. Obszerne fragmenty tej części badawczej zostały opublikowane w pracy oryginalnej *Selection of laboratory assays for reliable assessment of complement-dependent cytotoxicity: impact of assay choice on CDC quantification*.³⁰⁹

6.1. Omówienie celu I

Niezależnie od szlaku aktywacji i bodźca inicjującego, końcowym rezultatem funkcjonowania kaskady dopełniacza jest powstanie MAC na powierzchni komórki docelowej. MAC, złożony z fragmentu C5b połączonego kolejno z C6, C7, C8 oraz wieloma cząsteczkami C9, tworzy funkcjonalny por prowadzący do osmotycznej lizy komórki. Ten mechanizm CDC jest uchwytany eksperymentalnie i stanowi kluczowy parametr przy analizie *in vitro* skuteczności leków działających poprzez aktywację dopełniacza^{310,311}, ocenie aktywności przeciwciał anty-HLA (*ang.* anti-human leukocyte antigen, przeciwciała skierowane przeciwko ludzkim antygenom leukocytarnym) u biorców przeszczepów,^{312,313} a także w diagnostycznej ocenie funkcji dopełniacza w surowicy pacjentów³¹⁴.

Dotychczas opisano wiele protokołów oznaczania CDC. Wykorzystują one różne strategie detekcji. Część z nich pokrywa się z metodami stosowanymi w klasycznych testach cytotoksyczności, jednak w przypadku kaskady dopełniacza kluczowym problemem jest jej szybka kinetyka. Cook i wsp.³¹⁵ wykazali, że w modelu chłoniaka z komórek B pełną lizę komórek można uzyskać w warunkach wysokiego stężenia surowicy (25–50%) w czasie zaledwie 60–90 s, zależnie od zdolności przeciwciała do aktywacji dopełniacza. Wyniki prac badawczych Blom i wsp.³¹⁶ wskazują, że w modelu erytrocytów owczych opłaszczonych przeciwciałami i ekspozowanych na niskie stężenia surowicy (0,25–1%) aktywność konwertaz, kluczowych kompleksów enzymatycznych wzmacniających kaskadę i bezpośrednio prowadzących do powstania MAC, pojawia się już po 15–30 s, osiąga maksimum w ciągu kolejnych 1–5 min i ulega wygaszeniu po 20–30 min, zależnie od dostępności dopełniacza (wyższe stężenia skracają czas do osiągnięcia szczytu). W pracach Okroja i wsp.^{125, 317} na modelu komórek chłoniaka *Ramos* (bardziej opornych na działanie dopełniacza niż erytrocyty) opłaszczonych przeciwciałem anty-CD20 i inkubowanych w 10% surowicy, aktywność konwertaz jest wykrywalna po ok. 30 s, następnie utrzymuje się przez kilka minut, po czym wraca do wyjściowych wartości po około 20 min. Wobec

powyższego, wiarygodne oznaczanie CDC wymaga starannie dobranego okna czasowego. Wydłużona inkubacja komórek z aktywnym dopełniaczem prowadzi bowiem do zjawisk wtórnych związanych z sublitycznym stężeniem MAC. Obejmują one gwałtowny napływ jonów Ca^{2+} , uszkodzenie mitochondriów, aktywację inflamasomu, uwolnienie cytochromu c i aktywację kaspaz, co ostatecznie inicjuje programowaną śmierć komórki.³¹⁸ Co więcej, niektóre terapeutyczne przeciwciała stosowane rutynowo w testach CDC mogą niezależnie wywoływać apoptozę w ciągu kilkunastu minut.³¹⁹ Dlatego, jeśli celem jest ocena wyłącznie efektu CDC, konieczne jest albo skrócenie czasu inkubacji adekwatnie do dostępnej puli dopełniacza, albo użycie metody zapewniającej szybki, jednoczesny odczyt dużej liczby próbek, co minimalizuje artefakty wynikające z upływu czasu podczas analizy oraz różnego czasu analizy poszczególnych próbek. W testach oznaczających CDC dominują trzy strategie: testy przenikania barwnika do komórek permeabilizowanych przez MAC, testy oparte na aktywności metabolicznej komórek, oraz testy uwalniania barwnika. Najczęściej stosowanym testem opartym na przenikaniu barwnika jest metoda z jodkiem propidyny (PI), zwykle łączona z barwieniem aneksyną V umożliwiającą rozpoznanie wczesnej apoptozy. Komórki uszkodzone przez MAC przepuszczają PI, który wiąże DNA i po wzbudzeniu światłem emituje fluorescencję. Cytometria przepływowa pozwala ustawić bramki selekcjonujące obiekty o odpowiedniej wielkości i ziarnistości, co stanowi przewagę nad prostą fluorescencją odczytywaną spektrofotometrycznie, która nie rozróżnia komórek od fragmentów komórkowych i może zawyżać sygnał, rejestrując więcej zdarzeń niż liczba żywych komórek wyjściowych. Komórki całkowicie zniszczone przez dopełniacz nie są wykrywane w odczycie cytometrycznym, co obok niesynchronicznego odczytu, stanowi istotne ograniczenie tej metody.

Testy metaboliczne były historycznie zdominowane przez test metylotiazolotetrazoliowy (MTT) i jego kolejne warianty, np. XTT (2,3-bis(2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenilo)-2H-tetrazolium-5-karboksanilid, sól tetrazoliowa), jednak reakcja ta jest podatna na interferencję albuminy ludzkiej będącej składnikiem surowicy, a sama procedura wymaga czasochłonnego rozpuszczania kryształów formazanu, które dodatkowo wykazują toksyczność wobec komórek.³²⁰ Z tego względu, jako test bazujący na aktywności metabolicznej komórek wytypowano test PrestoBlue HS®, oparty na redukcji rezazuryny przez enzymy mitochondrialne, wytwarzający nietoksyczne produkty i pozwalający na szybki odczyt w czasie ok. 10 min³²¹. Z grupy testów opartych na uwalnianiu barwnika wybrano metodę z kalceiną-AM. Żywe komórki aktywnie pobierają kalceinę-AM i przetwarzają ją w cytoplazmie do fluorescencyjnej formy, która uwalnia się do supernatantu

w wyniku powstania MAC, co można precyzyjnie mierzyć.³²² Skuteczność poszczególnych metod oceniano na liniach *Raji* i *Ramos*, reprezentujących komórki chłoniaka ludzkiego o różnej wrażliwości na przeciwciała anty-CD20³¹⁷. Dodatkowa walidacja metody cytometrycznej polegała na zliczaniu komórek we wszystkich bramkach cytometrycznych. W wyniku prowadzonych doświadczeń wyłoniono najdokładniejszą metodę, którą następnie zastosowano do oceny wariantu gain-of-function białka C2 jako potencjalnego wzmacniacza działania terapeutycznych przeciwciał anty-CD20 stosowanych u chorych na chłoniaki z komórek B: RTX i obinutuzumabu, w kolejnej części badawczej.

6.2. Metodologia części badawczej I

6.2.1. Linie komórkowe

Linie komórkowe *Raji* i *Ramos* pochodzą z ludzkich chłoniaków Burkitta i należą do najlepiej scharakteryzowanych oraz najczęściej wykorzystywanych modeli nowotworowych limfocytów B w badaniach immunologicznych i onkologicznych.^{323,324} Linia *Raji*, wyprowadzona w 1963 roku od 11-letniego pacjenta z chłoniakiem Burkitta, była pierwszą ustabilizowaną ludzką linią komórkową pochodzenia hematopoetycznego i odegrała fundamentalną rolę w badaniach nad biologią limfocytów B oraz transformacją EBV-zależną (*ang.* Epstein–Barr virus, wirus Epsteina–Barr)^{324,325}. Linia *Ramos* została wyizolowana w 1974 roku od 6-letniego chłopca z chłoniakiem Burkitta, jest EBV-ujemną linią komórek B i stanowi klasyczny model do badań sygnalizacji receptora B-komórkowego, ekspresji IgM oraz odpowiedzi komórkowej na immunoterapie.^{326,327} Obie linie wykazują stabilną ekspresję antygeny CD20 oraz immunofenotyp dojrzałych nowotworowych limfocytów B, obejmujący obecność markerów CD19 i CD22. Linia *Ramos* ekspresjuje głównie powierzchnię IgM z łańcuchami lekkimi typu κ , natomiast linia *Raji* wykazuje ekspresję IgM i IgD z łańcuchami lekkimi κ i λ . W szczególności komórki *Ramos* charakteryzują się wysoką ekspresją IgM oraz funkcjonalnie aktywnym kompleksem BCR, co czyni je klasycznym modelem do analiz sygnalizacji zależnej od CD79A/CD79B, kinazy Src oraz osi PI3K–AKT (kinazy 3-fosfatydoinozytolu - kinazy białkowej B). Linia *Raji*, dzięki obecności latentnego genomu EBV, wykazuje konstytutywną aktywację elementów szlaku NF- κ B oraz modulację odpowiedzi komórkowej na bodźce immunologiczne, obejmującą zwiększoną proliferację, oporność na apoptozę indukowaną receptorami śmierci, wytwarzanie cytokin prozapalnych (IL-6, IL-10) oraz zmianę ekspresji ligandów kostymulacyjnych, co wpływa na interakcje z komórkami T

i NK.³²⁸ Na poziomie regulacji układu dopełniacza komórki *Raji* i *Ramos* wykazują ekspresję błonowych inhibitorów dopełniacza, w szczególności CD55 i CD59, przy czym poziom ich ekspresji jest zróżnicowany i funkcjonalnie istotny dla podatności na dopełniaczowo-zależną cytotoksyczność³²⁷. Wykazano, że różnice w ekspresji tych regulatorów przekładają się bezpośrednio na odmienną skuteczność lizy komórek indukowanej przez przeciwciała anti-CD20.³¹⁷ Ponadto związanie CD20 może w obu liniach inicjować mechanizmy śmierci komórkowej niezależne od kaspaz, obejmujące zaburzenia potencjału mitochondrialnego, generację reaktywnych form tlenu oraz zmiany metaboliczne, które mogą współistnieć z CDC lub ujawniać się w warunkach ograniczonej aktywności dopełniacza.³²⁶

Podsumowując, połączenie wysokiej i stabilnej ekspresji CD20, zachowanej sygnalizacji B-komórkowej oraz zróżnicowanej regulacji mechanizmów ochronnych przed dopełniaczem sprawia, że linie *Raji* i *Ramos* stanowią komplementarne i powszechnie akceptowane modele do badań mechanizmów działania przeciwciał terapeutycznych anti-CD20, w tym CDC oraz bezpośredniej indukcji śmierci komórkowej. Opisywanie linie posłużyły także do badań na potrzeby niniejszego doktoratu.

Linie *Ramos* i *Raji* zostały zakupione w American Type Culture Collection (ATCC). Komórki hodowano w pożywce RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium) z dodatkiem L-glutaminy (HyCult, Holandia), oraz w 10% surowicy płodowej bydlęcej (*ang.* fetal bovine serum, FBS) (ATCC), w temperaturze 37 stopni Celsjusza i atmosferze z 5% stężeniem dwutlenku węgla (CO₂) oraz kontrolowaną wilgotnością powietrza w celu zapobiegania odparowaniu pożywki. Komórki wykorzystywano w eksperymentach do dziesiątego pasażu, przy zachowaniu >95% żywotności, ocenianej metodą barwienia żywych komórek z użyciem błękitu trypanu.

6.2.2. Ludzka surowica

Surowicę ludzką (*ang.* normal human serum, NHS) przygotowywano z krwi żyłnej pobranej od zdrowych ochotników po uzyskaniu ich pisemnej świadomej zgody. Badania przeprowadzono zgodnie z zasadami Deklaracji Helsińskiej, a protokół badania został zatwierdzony przez Lokalną Komisję Bioetyczną przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (numer decyzji: NKBBN/138/2018). Krew pobierano do probówek typu Vacutainer zawierających aktywator krzepnięcia w postaci mikronizowanej krzemionki (BD Biosciences, USA), który przyspiesza proces krzepnięcia poprzez aktywację wewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia. Następnie próbki krwi inkubowano przez 20

minut w temperaturze pokojowej do momentu pełnego wytworzenia skrzepu, po czym wirowano przy $700 \times g$ przez 12 minut w temperaturze $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Surowicę uzyskaną od różnych dawców łączono, następnie poddawano ponownemu wirowaniu w celu usunięcia resztkowych elementów komórkowych. Surowicę porcjowano i przechowywano w temperaturze $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do momentu wykorzystania w dalszych eksperymentach. Surowicę ludzką z inaktywowanym układem dopełniacza (ΔNHS) otrzymywano poprzez inkubację surowicy ludzkiej w temperaturze $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 30 minut, a następnie wirowanie przy $5\,000 \times g$ przez 3 minuty w celu eliminacji ewentualnego precypitatu białkowego. Po wirowaniu zbierano supernatant i przechowywano w temperaturze $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do momentu wykorzystania w dalszych doświadczeniach jako źródło surowicy pozbawionej aktywności dopełniacza.

6.2.3. Testy CDC

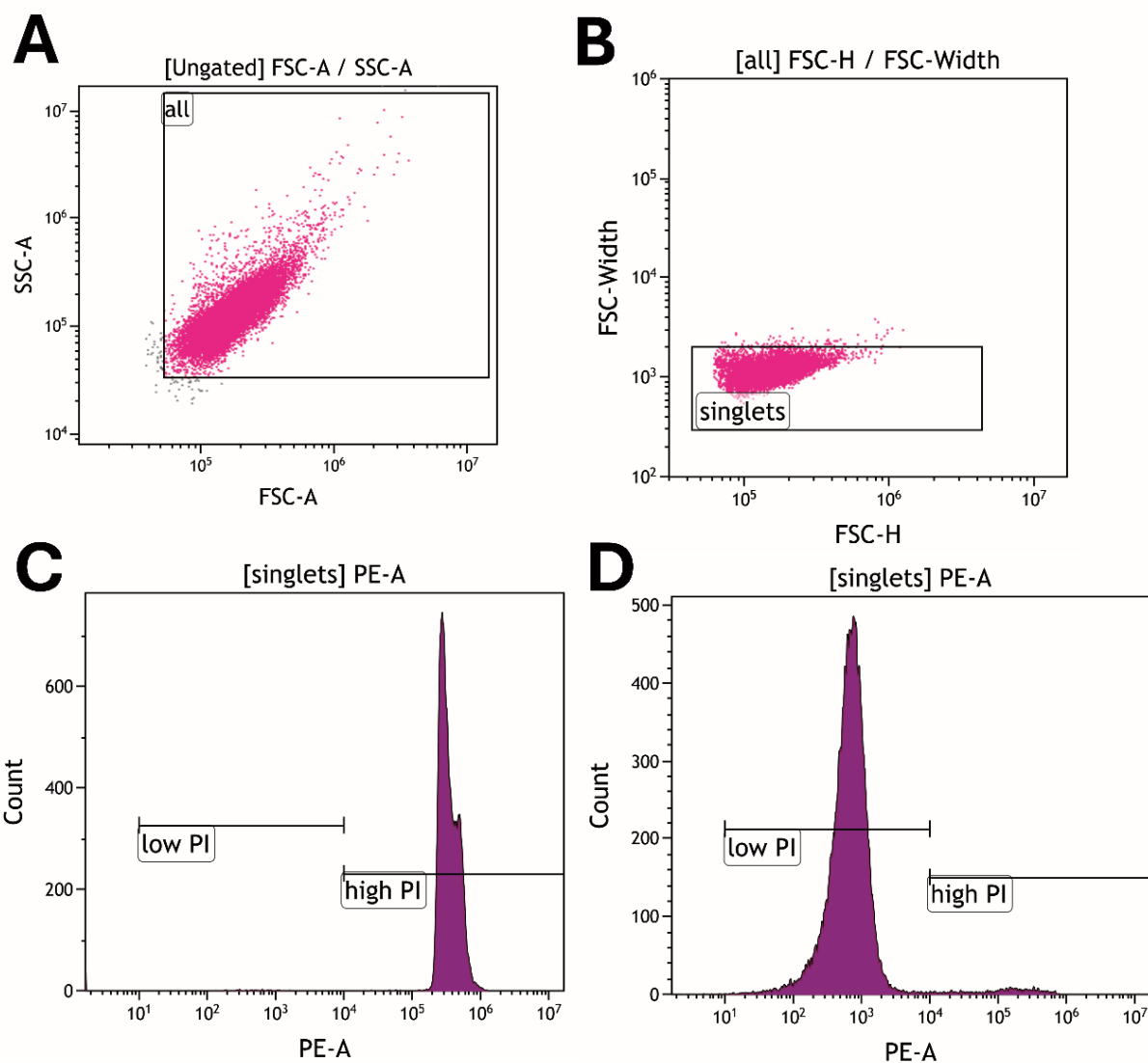
W celu oceny CDC indukowanej przez przeciwciała anti-CD20, zastosowano trzy komplementarne testy *in vitro*, różniące się zasadą detekcji i typem sygnału: (i) test uwalniania kalceiny (*ang.* calcein release assay), mierzący przenikanie barwnika z wnętrza komórek do supernatantu po perforacji błony³²², (ii) test metaboliczny z odczynnikiem PrestoBlue, oceniający utratę aktywności metabolicznej komórek^{329,330} oraz (iii) analiza pobierania PI za pomocą cytometrii przepływowej, wykrywająca komórki z naruszoną integralnością błony^{331,332}. Poniżej opisano szczegółowo przygotowanie i przebieg każdego z tych testów.

Test uwalniania kalceiny przeprowadzono w następujący sposób: komórki rozcieńczono do stężenia 1×10^6 komórek/ml w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (*ang.* phosphate buffered saline, PBS) z jonami wapnia (Ca^{2+}) i magnezu (Mg^{2+}) od producenta HyCult (Holandia). Komórki inkubowano następnie z $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ kalceiny-AM (acetoksymetylowy ester kalceiny, Sigma-Aldrich, USA) przez 15 minut w standardowych warunkach hodowli komórkowej ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\%\text{ CO}_2$). Pozostałości kalceiny usuwano poprzez płukanie PBS, a następnie 2×10^5 komórek osadzano poprzez wirowanie na dołkach płytki mikropłytkowej typu V i nakładano $50\text{ }\mu\text{l}$ odpowiednich próbek eksperymentalnych, składających się z kombinacji: $10\%\text{ NHS}$ lub ΔNHS z $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ RTX lub samego PBS. Po okresie inkubacji wynoszącym 30 lub 90 minut, dodawano dodatkowo $50\text{ }\mu\text{l}$ PBS, a komórki wirowano przy $500 \times g$ przez 3 minuty. Następnie $80\text{ }\mu\text{l}$ supernatantu przenoszono do czarnej płytki 96-dołkowej, a fluorescencję mierzono przy $\lambda_{\text{ex}} = 490\text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}} = 520\text{ nm}$ za pomocą czytnika Synergy H1 (Biotek, USA). Sygnał uzyskany po lizie komórek z użyciem $30\%\text{ dimetylosulfotlenku (DMSO)}$ traktowano jako 100% (pełną) lizę.

Test metaboliczny z zastosowaniem odczynnika PrestoBlue HS® przeprowadzano w analogiczny sposób, z tym że przed testem komórki nie były barwione kalceiną-AM. Odczynnik PrestoBlue (7,5 µl) dodawano 5 minut przed zakończeniem inkubacji, a fluorescencję odczytywano przy $\lambda_{\text{ex}} = 560 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$.

Do analizy cytometrycznej pobierania propidium jodku (PI,) używano komórek niebarwionych kalceiną-AM. Po zakończeniu inkubacji, komórki w próbie pozytywnej (*ang.* positive control) zamiast DMSO traktowano przez 5 minut z 2,5 µl buforu T z zestawu ADAM AccuStain Solution Kit (NanoEnTek, Korea Południowa), który zawiera detergent niejonowy oraz PI. We wszystkich pozostałych próbkach dodawano 2,5 µl buforu N z tego samego zestawu, zawierającego PI bez detergentu, po czym komórki barwiono przez co najmniej 5 minut przed pomiarem cytometrycznym (CytoFlex3, Beckman Coulter, USA). Strategia bramkowania (gating strategy) obejmowała wykluczenie resztek, obiektów niekomórkowych, dupletów i multipletów komórkowych, oraz klasyfikację populacji PI-niskiej (PI-low) i PI-wysokiej (PI-high), co przedstawiono na rycinie nr 4. Dodatkowo rejestrowano łączną liczbę komórek w bramce w ciągu 80 sekund, odpowiadającą objętości 40 µl.

Podsumowując, w celu oceny CDC zastosowano trzy uzupełniające się testy, reprezentujące odmienne podejścia metodologiczne, w dwóch liniach komórkowych znanych z wysokiej wrażliwości na terapeutyczne przeciwciało anty-CD20 – RTX, będący silnym aktywatorem CP.



Ryc. 4.

Strategia bramkowania zastosowana w analizie cytometrii przepływowej

Opisy paneli:

(A) Wstępne bramkowanie wszystkich zarejestrowanych obiektów (ungated) na podstawie parametrów FSC-A i SSC-A w celu wykluczenia resztek komórkowych oraz obiektów niekomórkowych

(B) Eliminacja dupletów i multiplotów z populacji „all” poprzez analizę zależności FSC-H/FSC-Width, umożliwiającą selekcję pojedynczych komórek (singlets)

(C,D) Reprezentatywne histogramy intensywności fluorescencji w populacji pojedynczych komórek; identyfikacja populacji o niskiej (PI-low) oraz (D) wysokiej (PI-high) intensywności sygnału

Legenda:

FSC (*ang.* forward scatter) – rozpraszanie światła w kierunku przednim, korelujące z wielkością komórki

SSC (*ang.* side scatter) – rozpraszanie boczne, korelujące z ziarnistością i złożonością wewnętrzną komórki

A (*ang.* area) – pole impulsu sygnału

FSC-A – pole impulsu sygnału FSC

SSC-A - pole impulsu sygnału SSC

H (*ang.* height) – wysokość impulsu sygnału

FSC-Width – szerokość impulsu FSC

PE (*ang.* phycoerythrin) – kanał fluorescencji

PE-A – pole impulsu sygnału w kanale fluorescencji

PI (*ang.* propidium iodide) – jodek propidyny

PI-low / PI-high – populacje o odpowiednio niskiej i wysokiej intensywności fluorescencji PI

Ungated – zbiór wszystkich zarejestrowanych obiektów przed zastosowaniem bramkowania

All – populacja obiektów ujęta w pierwotnym bramkowaniu

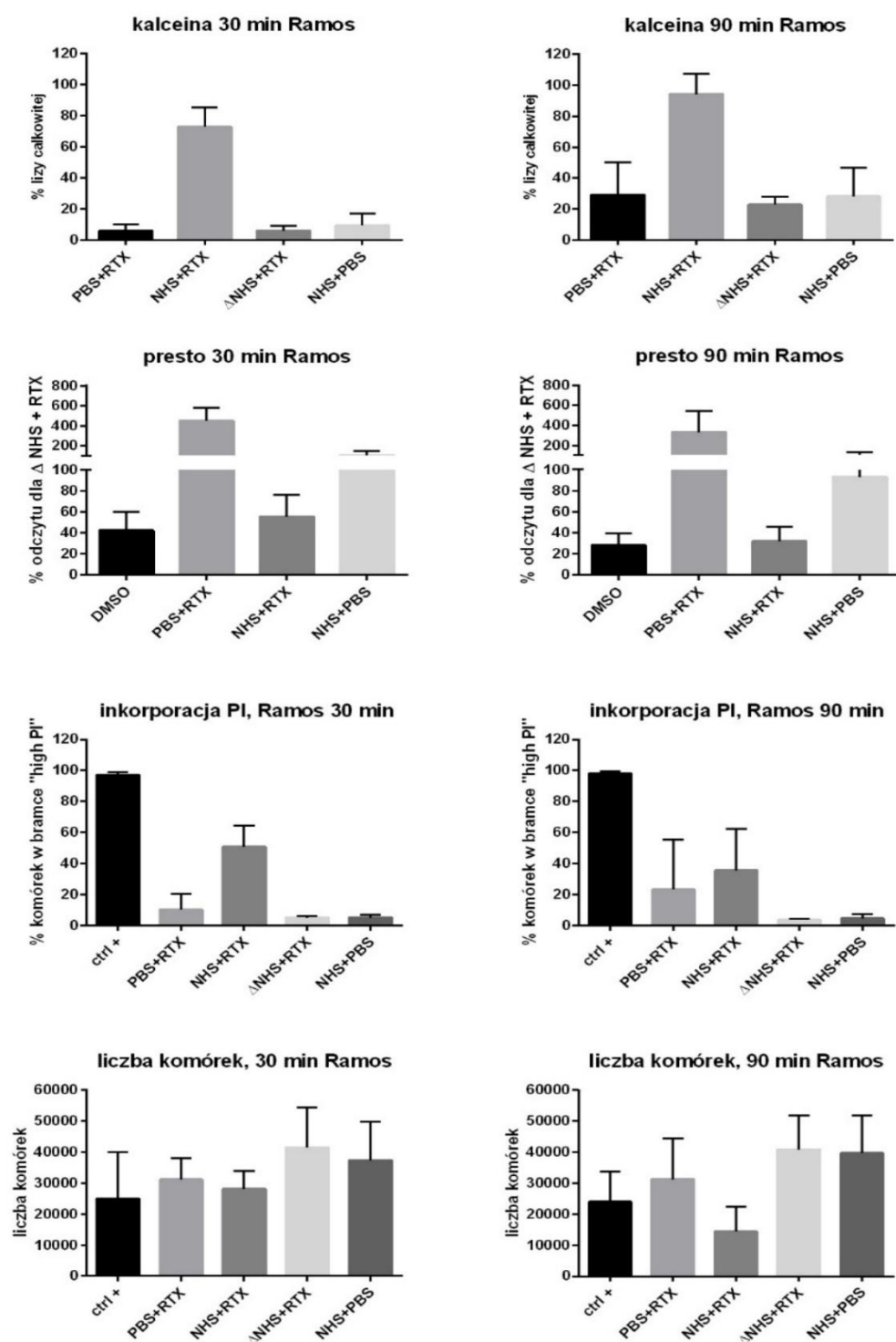
Singlets – populacja pojedynczych komórek po eliminacji dupletów i multipletów

Count – liczba zarejestrowanych obiektów (komórek)

Źródło: opracowanie własne

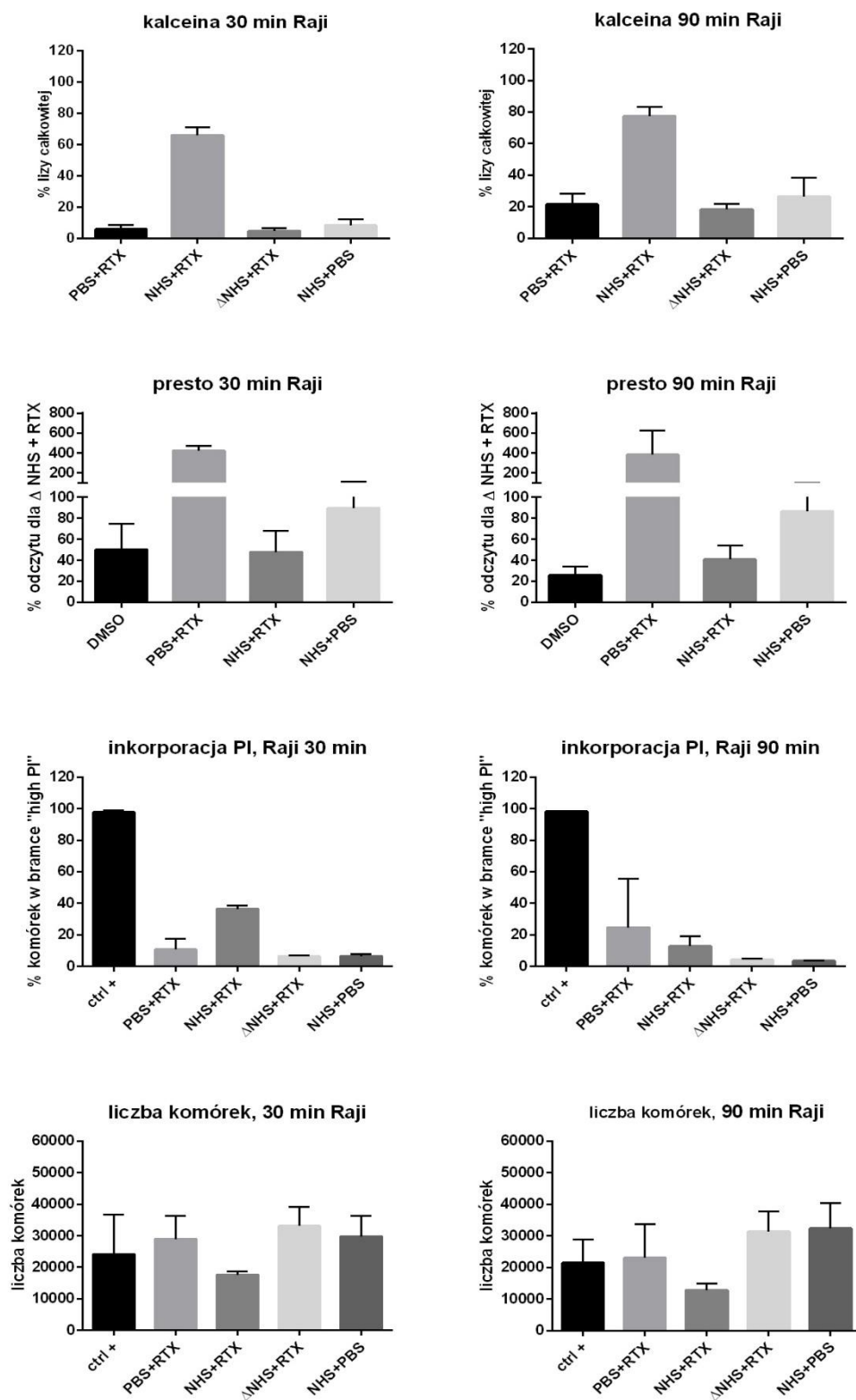
6.3. Wyniki części badawczej I

Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiają zbiorczo poniższe **Ryc. 5.** oraz **6.**



Ryc. 5. Ocena cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (CDC) indukowanej przez rytuksymab (RTX) w komórkach linii *Ramos* z wykorzystaniem trzech komplementarnych metod analitycznych*

Źródło: opracowanie własne



Ryc. 6. Ocena cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (CDC) indukowanej przez rytuksymab (RTX) w komórkach linii *Raji* z wykorzystaniem trzech komplementarnych metod analitycznych*

Źródło: opracowanie własne

Układ paneli i objaśnienia (tożsame dla Ryc. 5. i Ryc. 6.):

Panele górne – test uwalniania kalceiny, liza komórek wyrażona jako % pełnej lizy

Panele środkowe – test PrestoBlue HS (Presto), aktywność metaboliczna komórek wyrażona jako % sygnału względem warunku referencyjnego Δ NHS + RTX

Panele dolne środkowe – test inkorporacji jodku propidyny, odsetek komórek o zwiększonej przepuszczalności błony dla jodku propidyny (PI), wyrażony jako % komórek w bramce PI-high

Panele dolne – całkowita liczba komórek wyrażona jako liczba zarejestrowanych w cytometrze obiektów po eliminacji dupleksów i multipleksów

PBS – (*ang.* phosphate buffered saline) sól fizjologiczna buforowana fosforanami

NHS – (*ang.* normal human serum) normalna (referencyjna) surowica ludzka

Δ NHS – normalna surowica ludzka inaktywowana termicznie

DMSO – dimetylosulfotlenek

ctrl+ - kontrola pozytywna.

*Dane przedstawiono jako średnia z trzech niezależnych powtórzeń, słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe (*ang.* standard deviation, SD).

Komórki *Ramos* i *Raji* załadowane kalceiną uwalniały około 70% barwnika po 30-minutowej inkubacji z RTX i NHS (**Ryc. 5.**), podczas gdy poziom uwalniania z komórek kontrolnych nie przekraczał 10%. Wydłużenie czasu inkubacji do 90 minut skutkowało istotnym wzrostem sygnału tła, sięgającym około 30% maksymalnej lizy, czemu towarzyszył jednocześnie wzrost poziomu CDC do niemal 100% w komórkach *Ramos* oraz około 80% w komórkach *Raji*.

Zastosowanie odczynnika PrestoBlue HS wymagało modyfikacji strategii oznaczania wyniku. W przeciwieństwie do testu uwalniania kalceiny, metoda ta opiera się na założeniu, że rejestrowany sygnał pochodzi wyłącznie od komórek żywych, wykazujących aktywność metaboliczną. W związku z tym jako wartość referencyjną przyjęto odmienny warunek eksperymentalny, obejmujący komórki inkubowane z RTX w obecności Δ NHS (Δ NHS + RTX). Poziom CDC obliczano następnie jako różnicę pomiędzy tym warunkiem referencyjnym a komórkami inkubowanymi z RTX i NHS.

W tych warunkach komórki *Ramos* zachowywały około 45% sygnału referencyjnego po 30 minutach inkubacji oraz około 30% po 90 minutach, co odpowiadało odpowiednio 55% i 70% CDC. Należy jednak uwzględnić znaczną bezwładność odczytu w teście PrestoBlue, co zilustrowano sygnałem dla komórek traktowanych DMSO. Pomimo że DMSO powodowało fizyczną dezintegrację komórek, potwierdzoną brakiem wykrywalnego osadu komórkowego po wirowaniu w płytce V-kształtnej, po 30 minutach inkubacji nadal rejestrowano około 30–45% sygnału referencyjnego, który obniżał się do około 25% po 90 minutach.

Obserwacje te wskazują na opóźnioną utratę sygnału metabolicznego po zniszczeniu komórek oraz sugerują obecność komponentu fałszywie ujemnego w warunku NHS + RTX, efektu szczególnie wyraźnego przy krótszych czasach inkubacji. W konsekwencji wartość CDC w tym układzie eksperymentalnym jest najprawdopodobniej niedoszacowana, jeśli wnioskowany jest wyłącznie na podstawie testu PrestoBlue.

Dodatkowym ograniczeniem testu PrestoBlue jest jego podatność na interferencję ze strony surowicy ludzkiej, co było wyraźnie widoczne w przypadku próbek inkubowanych z PBS + RTX, charakteryzującym się kilkukrotnie wyższym sygnałem w porównaniu z pozostałymi kontrolami negatywnymi. Biorąc pod uwagę znany mechanizm działania CDC oraz potwierdzoną aktywność biologiczną RTX, brak jest mechanistycznych podstaw dla takiego efektu. Najbardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem jest częściowe hamowanie lub wygaszanie sygnału PrestoBlue przez składniki surowicy, prowadzące do pozornej różnicy w odniesieniu do pozostałych warunków kontrolnych. Podobne zjawisko zostało opisane dla

testu metabolicznego z wykorzystaniem MTT, którego zasada działania opiera się na redukcji soli tetrazoliowej do nierozpuszczalnych kryształów formazanu przez komórkowe enzymy oksydoredukcyjne, głównie mitochondrialne dehydrogenazy. Wykazano jednak, iż proces ten nie jest w pełni swoisty dla żywych komórek i może zachodzić również w sposób częściowo niezależny od aktywności metabolicznej, przy udziale czynników redukujących obecnych w środowisku hodowlanym. W szczególności składniki surowicy, w tym białka o właściwościach redoks (np. albumina) oraz białka układu dopełniacza, mogą wpływać na kinetykę redukcji soli tetrazoliowych lub bezpośrednio uczestniczyć w generowaniu produktu reakcji w warunkach bezkomórkowych. W konsekwencji obecność surowicy ludzkiej może prowadzić do artefaktualnych zmian sygnału testu MTT, skutkujących jego zawyżeniem bądź wygaszeniem niezależnie od rzeczywistej liczby żywych komórek. Zjawisko to ma szczególne znaczenie w układach eksperymentalnych wykorzystujących przeciwciała monoklonalne aktywujące cytotoksyczność zależną od dopełniacza, gdzie aktywacja kaskady dopełniacza oraz towarzyszące jej zmiany środowiska redoks mogą dodatkowo modulować przebieg reakcji redukcji MTT. W rezultacie uzyskany sygnał może nie odzwierciedlać rzeczywistej żywotności komórek, lecz stanowić wypadkową reakcji chemicznych zachodzących w medium hodowlanym, co ogranicza interpretowalność wyników w kontekście oceny cytotoksyczności zależnej od dopełniacza.³³³⁻³³⁶

Analiza testu wychwytu barwnika, oparta na odsetku komórek PI-dodatnich, wykazała, że poziom CDC w komórkach *Ramos* i *Raji* wynosił odpowiednio około 45% i 35% po 30 minutach inkubacji. Wydłużenie czasu inkubacji do 90 minut paradoksalnie skutkowało zmniejszeniem odsetka komórek PI-dodatnich w obu liniach komórkowych. Mało prawdopodobne jest, aby w obecności wysokich stężeń RTX i surowicy dochodziło do odzyskiwania integralności błon komórkowych po ich rozległym uszkodzeniu przez tworzenie kompleksu MAC, zwłaszcza że żaden z pozostałych zastosowanych testów nie wskazywał na taki mechanizm. Bardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem obserwowanego zjawiska jest fakt, iż zaawansowana fizyczna dezintegracja komórek prowadziła do ich niewykrywalności w analizie cytometrycznej. Zgodnie z tą interpretacją, komórki traktowane detergentem w teście wychwytu PI były niemal wyłącznie rejestrowane w bramce PI-high, w przeciwieństwie do komórek inkubowanych z RTX i surowicą. W próbkach kontrolnych dodatnich traktowanych detergentem (ctrl +) całkowita liczba wykrywalnych zdarzeń była niższa niż w warunkach kontroli negatywnej (Δ NHS+RTX oraz NHS + PBS), co świadczy o utracie istotnej liczby komórek przepuszczalnych dla PI jeszcze przed analizowanymi punktami czasowymi. Dodatkowych informacji dostarczyła analiza

całkowitej liczby obiektów rejestrowanych przez cytometr przepływowy we wszystkich bramkach, obejmujących zarówno populacje PI-low, jak i PI-high. Podczas gdy oba warunki kontroli negatywnej charakteryzowały się porównywalną liczbą zdarzeń, w próbkach inkubowanych z RTX i NHS (NHS+RTX) obserwowano systematyczną utratę wykrywalnych komórek. Przykładowo, po 90 minutach inkubacji w warunku NHS+RTX zarejestrowano jedynie około 40% komórek *Raji* w porównaniu z warunkiem Δ NHS+RTX. Uwzględniając fakt, że około 60% komórek nie było już wykrywalnych, a około 15% spośród pozostałych komórek wykazywało dodatni sygnał PI, całkowity poziom CDC można oszacować na około 66%. Wartość ta mieści się pomiędzy oszacowaniami uzyskanymi przy zastosowaniu testu uwalniania kalceiny oraz testu PrestoBlue.

Analiza całkowitej liczby zdarzeń rejestrowanych przez cytometr przepływowy we wszystkich bramkach (all), obejmujących zarówno populacje PI-low, jak i PI-high wykazała wyraźne zmniejszenie liczby wykrywalnych komórek nie tylko w próbach traktowanych detergentem (kontrola pozytywna), lecz również w warunku inkubacji z RTX w PBS (RTX + PBS). W przeciwieństwie do tego, obie kontrole negatywne zawierające surowicę (Δ NHS+RTX oraz NHS+PBS) charakteryzowały się porównywalną liczbą rejestrowanych zdarzeń. Obserwowany spadek całkowitej liczby wykrywalnych komórek w warunkach bezsurowiczych był powtarzalny w eksperymentach ukierunkowanych na oznaczenie liczby komórek ogółem i nie był związany z istotnymi różnicami w odsetku zdarzeń wykluczanych jako dublety lub multipletów pomiędzy analizowanymi warunkami (dane niepokazane).

6.4. Dyskusja części badawczej I

Przeprowadzone analizy jednoznacznie wskazują, że pomimo powszechnego zastosowania oraz istotnych benefitów takich jak możliwość jednoczesnej analizy markerów powierzchniowych oraz rozróżniania populacji docelowych i niedocelowych, cytometryczna ocena CDC na podstawie wychwytu PI nie zapewnia wiarygodnego odczytu. W określonych warunkach eksperymentalnych stosowanie tego podejścia prowadzi do istotnego niedoszacowania lizy zależnej od dopełniacza. Ograniczenie to zostało wykazane poprzez obserwowany spadek odsetka komórek PI-dodatnich po 90 minutach inkubacji w porównaniu z 30 minutami, któremu towarzyszyło równoczesne obniżenie całkowitej liczby wykrywalnych zdarzeń we wszystkich bramkach cytometrycznych.

Zaobserwowane zmniejszenie liczby wykrywalnych zdarzeń w warunku RTX + PBS najprawdopodobniej nie wynikało z agregacji komórek, lecz z obniżonej efektywności ich odzysku na etapie przygotowania próbek do analizy cytometrycznej w warunkach pozbawionych surowicy. Możliwym wyjaśnieniem tego efektu jest zwiększona adhezja komórek do powierzchni płytek hodowlanych lub mniejsza kompaktowość peletu komórkowego po odwirowaniu, co mogło utrudniać efektywny transfer materiału do probówek cytometrycznych. W konsekwencji warunek RTX + PBS mógł charakteryzować się obniżonym odczytem ilości komórek w porównaniu z kontrolami negatywnymi zawierającymi surowicę, niezależnie od rzeczywistej żywotności komórek w trakcie trwania inkubacji.

Uzyskane wyniki wskazują, że pomiary CDC realizowane metodą cytometrii przepływowej są podatne na dodatkowe czynniki zakłócające o charakterze technicznym, w szczególności na zmienną efektywność odzyskiwania komórek zależną od warunków inkubacji. Czynniki te, jeśli nie zostaną rygorystycznie kontrolowane, mogą prowadzić do istotnych zniekształceń wyników końcowych.

Równolegle wykazano, że testy żywotności metabolicznej, reprezentowane w niniejszym badaniu przez test PrestoBlue, podlegają wygaszaniu sygnału przez składniki surowicy. Stanowi to zasadnicze ograniczenie w badaniach CDC, w których surowica pełni jednocześnie funkcję źródła aktywności dopełniacza oraz potencjalnego czynnika interferującego z odczytem testu. Ponieważ testy PrestoBlue, MTT oraz z XTT odzwierciedlają aktywność metaboliczną komórek, a nie integralność ich błon, sygnał testu może utrzymywać się po wystąpieniu nieodwracalnych uszkodzeń strukturalnych. Zjawisko to potwierdzono obecnością resztkowego sygnału w komórkach lizowanych DMSO, który

nie ulegał całkowitemu wygaszeniu nawet po 90 minutach inkubacji.

Spośród ocenianych metod oceny CDC, test uwalniania kalceiny wykazał najwyższy sygnał w porównaniu z odpowiednimi kontrolami negatywnymi. Jednocześnie wydłużenie czasu inkubacji prowadziło do stopniowego wzrostu nieswoistego wycieku barwnika, co należy uznać za nieodłączne ograniczenie tej metody. Niezależnie od zastosowanej techniki, prawidłowa interpretacja wyników CDC wymaga ścisłej kontroli czasu inkubacji oraz włączenia adekwatnych warunków kontrolnych, obejmujących próby bez przeciwciała, bez dopełniacza oraz pełną lizę komórek. W eksperymentach ukierunkowanych na określenie całkowitej liczby komórek zaobserwowano istotną utratę wykrywalnych zdarzeń nie tylko w próbkach traktowanych detergentem (kontrola pozytywna), lecz także w próbkach inkubowanych z RTX w PBS (RTX + PBS).

Podsumowując, przedstawione powyżej wyniki jednoznacznie wskazują, że wiarygodna i ilościowa ocena cytotoksyczności zależnej od dopełniacza wymaga zastosowania metody charakteryzującej się bezpośrednim odzwierciedleniem integralności błony komórkowej oraz odpornością na kluczowe czynniki zakłócające obecne w układach opartych na surowicy. W świetle wykazanych ograniczeń testów opartych na wychwycie PI oraz na pomiarach aktywności metabolicznej, test uwalniania kalceiny stanowi najbardziej adekwatne narzędzie do ilościowej analizy CDC w warunkach modulowanej aktywności układu dopełniacza. Pomimo inherentnych ograniczeń związanych z nieswoistą utratą barwnika przy wydłużonych czasach inkubacji, metoda ta zapewnia bezpośredni, stabilny i porównywalny odczyt lizy komórkowej w szerokim zakresie warunków eksperymentalnych. Z tego względu test uwalniania kalceiny został przyjęty jako podstawowa metoda oceny CDC na potrzeby dalszych doświadczeń niniejszej rozprawy doktorskiej.

7. Część badawcza II

Drugim celem niniejszego doktoratu było zweryfikowanie hipotezy, czy suplementacja surowicy wariantem typu GoF białka C2 prowadzi do zwiększenia aktywności układu dopełniacza, co przekłada się na wzrost cytotoksyczności zależnej od dopełniacza indukowanej przez przeciwciała anty-CD20 wobec komórek CLL.

7.1. Omówienie celu II

Zasadnicze aspekty teoretyczne oraz literaturę przedmiotu omówiono szeroko w **Części teoretycznej** niniejszej monografii. (patrz. **Rozdział 5.**) Niniejszy rozdział stanowi ich bezpośrednie, praktyczne rozwinięcie i koncentruje się na funkcjonalnych uwarunkowaniach CDC indukowanej przez terapeutyczne przeciwciała monoklonalne, ze szczególnym uwzględnieniem czynników ograniczających efektywność tego mechanizmu oraz strategii ich przewyżczenia. Istotny przełom w terapeutycznym wykorzystaniu układu dopełniacza nastąpił wraz z wprowadzeniem przeciwciał monoklonalnych zdolnych do efektywnej aktywacji CP po związaniu antygenu docelowego. Przeciwciała anty-CD20 typu I, takie jak RTX, charakteryzują się wysoką zdolnością do inicjowania CDC przy jednocześnie ograniczonej indukcji bezpośredniej śmierci komórkowej, w przeciwieństwie do przeciwciał typu II, takich jak obinutuzumab. Mechanistycznie skuteczna aktywacja CP wymaga odpowiedniego uporządkowania przestrzennego fragmentów Fc przeciwciał na powierzchni komórki docelowej, prowadzącego do ich oligomeryzacji, a następnie do efektywnego wiązania C1q oraz formowania funkcjonalnego kompleksu inicjującego kaskadę. Zaburzenia ilościowe oraz jakościowe składników dopełniacza mogą sprzyjać klonalnej ekspansji nowotworowych limfocytów B w wyniku osłabienia nadzoru immunologicznego oraz stanowić potencjalne predyktory niekorzystnego przebiegu klinicznego.^{337,338} Obserwacje te wskazują, że zarówno niedobór, jak i nieefektywna regulacja aktywacji dopełniacza mogą istotnie wpływać na przebieg odpowiedzi przeciwnowotworowej. Pomimo wysokiego potencjału aktywacji dopełniacza przez przeciwciała terapeutyczne, efektywność CDC pozostaje zmienna. Jednym z postulowanych mechanizmów ograniczających jest przejściowe wyczerpanie wczesnych składników CP w następstwie intensywnej aktywacji.³³⁹ Znaczenie tego zjawiska potwierdzają badania wykazujące zwiększoną skuteczność przeciwciał monoklonalnych po suplementacji świeżo mrożonym osoczem lub wybranymi składnikami dopełniacza, w szczególności składnikiem C2, stanowiącym funkcjonalne wąskie gardło CP.²²⁷

Wcześniejsze badania naszego zespołu zawarte w publikacji *Monitoring of the Complement System Status in Patients With B-Cell Malignancies Treated With Rituximab*, wykazały, że stopień aktywacji dopełniacza *in vivo* nie koreluje bezpośrednio z potencjałem CDC ocenianym *in vitro*. Analiza markerów aktywacji dopełniacza wskazywała, że silne zaangażowanie kaskady obserwowano jedynie przejściowo, w początkowej fazie leczenia, co korelowało z wczesnym usuwaniem krążących komórek nowotworowych. Jednocześnie stwierdzono, że RTX kumuluje się w trakcie kolejnych podań, a u części badanych nie obserwowano wzrostu markerów aktywacji dopełniacza mimo wysokiej aktywności CDC ich surowic pobranych przed infuzją, mierzonej w modelowych komórkach CD20-dodatnich. Obserwacje te wskazują, że efektywność CDC *in vivo* jest determinowana nie tylko przez dostępność przeciwciała i składników dopełniacza, lecz również przez mechanizmy regulacyjne działające na poziomie aktywacji i stabilności kompleksów enzymatycznych. Jednocześnie dostępne dane wskazują, że sama dostępność składników dopełniacza nie jest jedynym czynnikiem limitującym CDC. Kluczową rolę odgrywa regulacja aktywności konwertaz dopełniacza, centralnych kompleksów enzymatycznych odpowiedzialnych za amplifikację kaskady poprzez proteolityczne rozszczepienie C3 i C5. Konwertazy te są obiektami ścisłej kontroli przez endogenne inhibitory, które destabilizują kompleksy enzymatyczne, skracają czas ich półtrwania i ograniczają generowanie efektorowych produktów kaskady. Nadekspresja tych inhibitorów na powierzchni komórek nowotworowych stanowi istotną barierę dla skutecznej CDC. W odpowiedzi na te ograniczenia zaproponowano strategię polegającą na wzmocnieniu aktywności konwertaz dopełniacza poprzez modyfikację ich składników w kierunku zwiększonej stabilności i oporności na inhibicję. Wstępne potwierdzenie zasadności tego podejścia pochodzi z badań nad wariantami typu gain-of-function czynnika B (FB), opisanymi pierwotnie w rzadkich chorobach nerek.³⁰⁶ FB uczestniczy w tworzeniu konwertaz AP, które pełnią także funkcję amplifikującą wobec aktywacji zapoczątkowanej przez CP. Zastosowanie hiperaktywnych wariantów FB prowadziło do istotnego nasilenia CDC indukowanej przez przeciwciała monoklonalne w modelach komórkowych. Ze względu na konstytutywną, niskopoziomową aktywność AP, obejmującą nieselektywne sondowanie powierzchni biologicznych poprzez depozycję C3b, globalne nasilenie aktywności jej konwertaz wiąże się jednak z ryzykiem autoagresji. W celu ograniczenia tego ryzyka przeniesiono *in silico* znane substytucje aminokwasowe typu gain-of-function z FB na jego funkcjonalny odpowiednik w CP, składnik C2, i wytworzono rekombinowane, hiperaktywne białko C2 zdolne do selektywnego wzmocnienia zależnej od obecności specyficznych przeciwciał. W

niniejszym rozdziale przedstawiono ocenę działania rekombinowanego, hiperaktywnego składnika C2 w modelach cytotoksyczności zależnej od dopełniacza, z wykorzystaniem terapeutycznych przeciwciał monoklonalnych oraz różnych źródeł surowicy na modelu komórek CLL, stanowiącą rozwinięcie i funkcjonalną weryfikację wcześniej sformułowanych założeń badawczych.

Dodatkowo przeprowadzono eksperyment, w którym zastosowano model krwi pełnej, który umożliwia ocenę aktywności przeciwciał terapeutycznych w bardziej fizjologicznych warunkach niż układy oparte wyłącznie na surowicy. Oprócz białek dopełniacza obecnych w osoczu model ten zachowuje naturalne populacje komórek efektorowych, w tym komórki NK, monocyty oraz granulocyty, które mogą współuczestniczyć w eliminacji komórek docelowych poprzez ADCC oraz wchodzić w interakcje z aktywowanym układem dopełniacza, zarówno o charakterze antagonistycznym jak i addytywnym. W szczególności komórki NK, stanowiące około 5–15% limfocytów krwi obwodowej, pełnią istotną rolę w eliminacji komórek nowotworowych poprzez mechanizmy cytotoksyczne zależne od receptorów Fc oraz wydzielanie mediatorów prozapalnych, co sprawia, że ich obecność w modelu krwi pełnej zwiększa biologiczną adekwatność oceny aktywności immunoterapeutyków. Wcześniejsze wyniki badań *in vivo* na modelu mysim wykazały, że aktywacja układu dopełniacza oraz mechanizmy efektorowe zależne od receptorów Fc, jak ADCC, mogą ze sobą konkurować o wiązanie ligandu, jakim jest fragment Fc przeciwciała¹⁵⁵. Badania *in vitro* sugerują ponadto, że na poziomie pojedynczej komórki docelowej odkładanie wczesnych składników dopełniacza może stanowić zawadę przestrzenną, która utrudnia przyleganie komórek NK do komórki docelowej za pośrednictwem receptora CD16/FcγRIII¹²⁹. W związku z tym podjęto próbę oceny, czy wzmocnienie CDC indukowane przez obinutuzumab w obecności hiperaktywnego wariantu białka C2 będzie utrzymywało się również w środowisku krwi pełnej, w którym obecne są komórki posiadające receptory Fc.

Obecność komórek krwi pełnej pozwala dokładniej odtworzyć warunki mikrośrodowiska krążenia, w których przeciwciała terapeutyczne aktywują równolegle kilka mechanizmów efektorowych odpowiedzi immunologicznej. Ma to szczególne znaczenie w sytuacji, gdy populacja komórek nowotworowych wykazuje heterogeniczność pod względem ekspresji antygeny docelowego lub gdy liczba komórek efektorowych jest niewystarczająca w stosunku do masy guza. Van Meerten i wsp. wykazali, że próg ekspresji CD20 niezbędny do aktywacji CDC jest istotnie niższy niż próg wymagany do skutecznego zaangażowania komórek NK.¹³⁶

7.2. Metodologia części badawczej II

7.2.1. Komórki CLL i surowica

Przewlekła białaczka limfocytowa stanowi szczególnie adekwatny model badawczy do analizy mechanizmów cytotoksyczności zależnej od dopełniacza indukowanej przez przeciwciała terapeutyczne.^{340,341} Wynika to przede wszystkim z lokalizacji komórek CLL, które bytują zarówno w przedziale naczyniowym, jak i w szpiku kostnym, pozostając w stałym i bezpośrednim kontakcie z pełnym zestawem składników układu dopełniacza. W odróżnieniu od nowotworów litych eliminuje to istotne ograniczenia związane z dostępnością surowicy i umożliwia bezpośrednią ocenę mechanizmów efektorowych zależnych od dopełniacza. Jednocześnie komórki CLL wykazują znaczną heterogeniczność fenotypową, zarówno pod względem poziomu ekspresji antygenu CD20, jak i obecności błonowych regulatorów aktywacji dopełniacza, w tym CD55 oraz CD59, co w sposób bezpośredni determinuje ich podatność na mechanizmy cytotoksyczne zależne od surowicy. Zmienność ta pozwala na analizę relacji pomiędzy dostępnością celu molekularnego a efektywnością aktywacji kaskady dopełniacza w warunkach fizjologicznie relewantnych. Dodatkowym, istotnym aspektem biologii CLL jest utrzymująca się aktywacja CP, wnioskowana na podstawie obniżonych stężeń składników C1 oraz C4.³⁴² Zjawisko to odzwierciedla przewlekłe podwyższony obrót dopełniacza, a nie epizody masywnej, ostrej aktywacji kaskady. Jednym z mechanistycznie uzasadnionych wyjaśnień jest obecność agregatów immunoglobulin IgG, zdolnych do efektywnej inicjacji CP zarówno w fazie rozpuszczonej, jak i w formie związanej z powierzchnią komórkową, gdzie uporządkowana organizacja fragmentów Fc sprzyja wydajnemu wiązaniu C1q i nasilonej aktywacji kaskady³⁴³. W procesie powstawania i stabilizacji takich struktur uczestniczy α 2-makroglobulina, wielofunkcyjne białko osocza o właściwościach chaperonowych, zdolne do wiązania kompleksów immunoglobulinowych i utrzymywania ich konformacji sprzyjającej aktywacji dopełniacza.³⁴⁴ Suma tych cech: stałej ekspozycji na dopełniacz, heterogeniczności fenotypowej komórek nowotworowych oraz przewlekłe modulowanej aktywności kaskady czyni CLL układem szczególnie predysponowanym do precyzyjnej analizy zależności pomiędzy funkcjonalną wydolnością układu dopełniacza a skutecznością działania terapeutycznych przeciwciał monoklonalnych anti-CD20. Metodologicznym atutem wykorzystanego modelu jest możliwość izolacji pierwotnych komórek białaczkowych bezpośrednio od pacjentów, przy jednoczesnym zachowaniu ich natywnego fenotypu oraz kluczowych właściwości biologicznych. Pozwala to na prowadzenie analiz

eksperymentalnych w warunkach istotnie bliższych rzeczywistej sytuacji klinicznej niż klasyczne modele oparte na liniach komórkowych, które często nie odzwierciedlają złożoności i zmienności obserwowanej *in vivo*. Aspekt ten ma szczególne znaczenie w kontekście badań nad mechanizmami oporności na immunoterapię oraz czynnikami ograniczającymi skuteczność aktywacji dopełniacza u chorych na CLL. Co dodatkowo uzasadnia wybór tego materiału do badań, to że zarówno RTX, jak i obinutuzumab, przeciwciała monoklonalne anty-CD20 różniące się budową, powinowactwem do antygeny oraz profilem aktywacji mechanizmów efektorowych, są zarejestrowane w leczeniu CLL i pozostają powszechnie stosowanymi elementami standardowych schematów terapeutycznych. Fakt ten dodatkowo podkreśla translacyjny charakter badań prowadzonych w tym modelu, umożliwiając bezpośrednie odniesienie uzyskanych wyników do praktyki klinicznej oraz ocenę potencjalnych strategii mających na celu optymalizację działania przeciwciał poprzez modulację aktywności układu dopełniacza. W konsekwencji CLL stanowi nie tylko klinicznie relewantny, lecz również metodologicznie wymagający układ eksperymentalny do badań nad mechanizmami zwiększania skuteczności terapii przeciwciałami anty-CD20. W związku z powyższym komórki CLL zostały świadomie wykorzystane jako model badawczy umożliwiający analizę mechanizmów determinujących skuteczność przeciwciał monoklonalnych anty-CD20 w warunkach bezpośrednio odzwierciedlających sytuację kliniczną, z uwzględnieniem zarówno właściwości pierwotnych komórek nowotworowych pacjentów, jak i charakterystyki leków rutynowo stosowanych w leczeniu CLL. Komórki CLL wraz z odpowiadającą im surowicą autologiczną pozyskano od pacjentów wcześniej nieleczonych, hospitalizowanych w Klinice Hematologii i Transplantologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Od wszystkich pacjentów uzyskano pisemną, świadomą zgodę na udział w badaniu naukowym. Charakterystykę demograficzną i kliniczną badanej grupy przedstawiono w **Tab. 7**. Badanie przeprowadzono zgodnie z zasadami Deklaracji Helsińskiej, po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (nr zgody: KB/245/2025). Izolację komórek CLL z krwi obwodowej oraz ich hodowlę *in vitro* przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną wcześniej (**Rozdział 6.2.1**). Surowicę ludzką od zdrowych dawców pozyskano na podstawie odrębnej zgody Komisji Bioetycznej (nr NKBBN/500/2016) zgodnie z procedurą opisaną wcześniej (**Rozdział 6.2.2**).

Nr	Wiek (lata)	Płeć	Limfocyty (G/l)	WBC (G/l)	Płytki (G/l)	Hb (g/dl)	RAI	CD20	CD38	Mutacje (<i>IGHV</i> , <i>ATM</i> , <i>TP53</i>)
1	78	M	24.0	40.0	191	14.3	0	+	—	<i>IGHV</i> , <i>ATM</i>
2	73	M	40.4	62.0	3	12.1	0	+	—	—
3	79	M	33.7	44.0	3	11.2	4	+	—	—
4	64	K	28.9	34.0	180	12.1	2	+	—	—
5	75	M	20.1	29.0	160	14.6	1	+	—	<i>IGHV</i>
6	77	M	32.6	40.7	—	—	0	+	—	<i>IGHV</i> , <i>TP53</i>
7	86	M	35.9	39.0	145	13.7	0	+	—	—
8	67	K	8.4	26.0	281	14.8	1	+	—	<i>IGHV</i>
9	72	M	14.5	20.0	158	16.0	1	+	—	—
10	63	K	118.0	139.0	211	12.9	1	+	—	<i>IGHV</i>
11	84	M	28.7	35.6	229	13.5	1	+	—	—
12	73	K	87.7	112.0	509	10.9	0	+	—	<i>TP53</i>
13	—	—	—	—	—	—	1	+	+	—
14	73	M	45.0	62.0	167	14.3	1	+	+	<i>IGHV</i> , <i>TP53</i>
15	75	K	139.2	190.0	74	7.5	1	+	+	<i>TP53</i>
16	60	K	35.2	42.0	145	13.4	0	+	—	—
17	74	M	6.6	11.0	212	15.3	0	+	—	—
18	59	M	13.0	21.0	190	15.8	0	+	—	<i>ATM</i>
19	67	K	9.4	13.0	210	13.3	0	+	+	—
20	46	M	28.3	56.0	152	14.5	2	+	+	<i>IGHV</i>

Tab. 7.

Charakterystyka kliniczna i laboratoryjna pacjentów z CLL włączonych do badania

Źródło: opracowanie własne

Legenda:

Wiek – wiek pacjenta (lata) w momencie pobrania materiału biologicznego.

WBC (*ang.* white blood cells) – całkowita liczba leukocytów we krwi obwodowej (G/l).

Limfocyty – liczba limfocytów we krwi obwodowej (G/l).

Płytki – liczba płytek krwi (G/l).

Hb – stężenie hemoglobiny (g/dl).

RAI – stopień zaawansowania klinicznego przewlekłej białaczki limfocytowej według klasyfikacji Raia.

CD20 – ekspresja antygenu CD20 na powierzchni limfocytów B oceniana metodą cytometrii przepływowej.

CD38 – ekspresja antygenu CD38 na powierzchni limfocytów B oceniana metodą cytometrii przepływowej.

„+” – obecność ekspresji danego antygenu.

„—” – brak danych.

K – kobieta

M – mężczyzna

IGHV (*ang.* Immunoglobulin Heavy Chain Variable region) – status niezmutowany genów regionu zmiennego łańcucha ciężkiego immunoglobulin (niekorzystny rokowniczo)

ATM (*ang.* Ataxia Telangiectasia Mutated) – obecność aberracji genetycznych w genie *ATM*, kodującym kinazę serynowo-treoninową zaangażowaną w odpowiedź komórkową na uszkodzenia DNA (niekorzystny rokowniczo)

TP53 (*ang.* Tumor Protein p53) – obecność mutacji lub delecji genu TP53, kodującego białko supresorowe p53, kluczowe dla kontroli cyklu komórkowego, odpowiedzi na uszkodzenia DNA oraz indukcji apoptozy (niekorzystny rokowniczo)

Do badania włączono 20 pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową, w tym 12 mężczyzn i 7 kobiet (u jednego pacjenta płeć nieokreślona), o medianie wieku 73 lata (zakres: 46–86 lat). Większość chorych znajdowała się w niskich stadiach zaawansowania klinicznego według klasyfikacji wg Raia (0–I). Ekspresja CD20 była obecna u wszystkich ocenianych przypadków, natomiast ekspresja CD38 uznawana za niekorzystny czynnik prognostyczny wykazywała zmienność osobniczą i stwierdzono ją jedynie u części pacjentów. U wybranych chorych wykazano aberracje genetyczne obejmujące geny *IGHV*, *ATM* oraz *TP53*, które stanowią istotne molekularne markery rokownicze w CLL. Status mutacji *IGHV* jest uznawany za kluczowy marker prognostyczny w CLL, jego brak (unmutated *IGHV*) wiąże się z krótszym przeżyciem całkowitym i czasem do rozpoczęcia leczenia wg badań kohortowych³⁴⁵. Mutacje genu *TP53* są silnym, niezależnym czynnikiem niekorzystnym prognostycznie i są związane ze skróconym przeżyciem wolnym od progresji oraz ogólnym w analizach retrospektywnych i kohortowych³⁴⁶. Meta-analiza wskazała również, że mutacje *ATM* towarzyszą gorszym wynikom klinicznym w CLL³⁴⁷. Ponadto wielkoskalowe analizy prognostyczne podkreślają rolę statusu *IGHV* i *TP53* jako istotnych składowych zintegrowanego modelu ryzyka CLL-IPI (*ang.* chronic lymphocytic leukemia international prognostic index, międzynarodowy indeks prognostyczny w przewlekłej białaczce limfocytowej) dla oceny przeżycia pacjentów z CLL.³⁴⁸ Aberracje genetyczne w CLL, w szczególności mutacje *IGHV*, *TP53* i *ATM*, nie tylko wpływają na przebieg kliniczny choroby, ale mają również znaczenie funkcjonalne w kontekście odpowiedzi immunologicznej i wrażliwości na terapię zależną od dopełniacza. Niezmutowany *IGHV* wiąże się z nasileniem sygnalizacji BCR, co sprzyja proliferacji i przeżyciu klonu nowotworowego oraz zwiększa odporność komórek na mechanizmy cytotoksyczności indukowanej przeciwciałami monoklonalnymi. Mutacje *TP53* prowadzą do utraty kontroli nad cyklem komórkowym i mechanizmami naprawy DNA, co skutkuje niestabilnością genomową i zwiększoną opornością na eliminację komórek poprzez apoptotyczne i immunologiczne mechanizmy. Z kolei zaburzenia *ATM* ograniczają detekcję i naprawę uszkodzeń DNA, sprzyjając agresywnemu fenotypowi i obniżonej wrażliwości na cytotoksyczność zależną od dopełniacza. Dodatkowo zmienna ekspresja CD38 wśród pacjentów może modulować aktywację BCR i interakcje komórka-mikrośrodowisko, modyfikując skuteczność efektorowych mechanizmów immunologicznych. W konsekwencji fenotyp genetyczny i ekspresja markerów powierzchniowych mogą bezpośrednio wpływać na wrażliwość komórek CLL na terapię anty-CD20, w tym na aktywność dopełniacza i efektywność cytotoksyczności zależnej od tego układu. Należy

jednak wyraźnie zaznaczyć, że grupa pacjentów nie została zaprojektowana na podstawie cech klinicznych, ani wyselekcjonowana pod względem parametrów biologicznych lub prognostycznych. Włączone 20 osób reprezentuje typową populację pacjentów leczonych w danym ośrodku, a nie wybraną na potrzeby niniejszej pracy.

7.2.2. Analiza cytotoksyczności zależnej od dopełniacza

Na podstawie **Części badawczej I** wytypowano test uwalniania kalceiny jako podstawową metodą oceny CDC na potrzeby **Części badawczej II**. Badania przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną wcześniej w **Rozdziale 6.2.3**. We wszystkich analizowanych warunkach eksperymentalnych inkubowano 2×10^5 komórek CLL w obecności 20% surowicy autologicznej lub referencyjnej NHS, suplementowanej RTX lub obinutuzumabem w stężeniu 50 µg/ml. Sygnał uzyskany z komórek traktowanych 30% DMSO przyjęto jako 100% lizy.

7.2.2.1. Cytometria przepływowa

Analizę ekspresji antygenów CD20, CD46, CD55 oraz CD59 przeprowadzono metodą cytometrii przepływowej. We wszystkich warunkach eksperymentalnych inkubowano 2×10^5 komórek przez 30 min w temperaturze pokojowej z przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko CD46 (klon MEM-258), CD55 (klon MEM-118) lub CD59 (klon MEM-43) (wszystkie firmy ImmunoTools), stosowanymi w końcowym stężeniu 15 µg/ml, lub z odpowiadającymi im kontrolami izotypowymi o zgodnej klasie. Po zakończeniu inkubacji komórki dokładnie płukano w PBS w celu usunięcia niezwiązanego przeciwciała pierwszorzędowego, a następnie znakowano drugorzędowym przeciwciałem kozim przeciwko immunoglobulinom myszy, w postaci fragmentu F(ab')₂, sprzężonym z izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC; Dako; rozcieńczenie 1:75). Zastosowanie fragmentów F(ab')₂ pozwalało na ograniczenie nieswoistego wiązania zależnego od receptorów Fc. Po kolejnym etapie płukania komórki analizowano przy użyciu cytometru przepływowego CytoFLEX3 (Beckman Coulter), przy zachowaniu identycznych ustawień aparatu dla wszystkich próbek w danej serii eksperymentalnej. Ekspresję CD20 oznaczano z wykorzystaniem RTX w stężeniu 10 µg/ml, stosowanego jako przeciwciała pierwszorzędowe, po którym następowała inkubacja z drugorzędowym przeciwciałem kozim anty-mysim F(ab')₂ sprzężonym z FITC (Dako; 1:75). Pomiar kontrolny dla CD20 wykonywano z użyciem wyłącznie przeciwciała drugorzędowego w celu oceny tła

fluorescencji. Analizę danych prowadzono po wykluczeniu zanieczyszczeń i resztek komórkowych na podstawie parametrów FSC/SSC. Wyniki przedstawiano jako medianę intensywności fluorescencji (MFI) dla poszczególnych antygenów CD, po odjęciu sygnału odpowiadającego odpowiedniej kontroli izotypowej lub fluorescencji próby kontrolnej. Uzyskane wartości MFI traktowano jako miarę względnej ekspresji analizowanych antygenów na powierzchni komórek.

7.2.2.2. Test CDC w środowisku pełnej krwi

Od trzech zdrowych ochotników pobrano próbki krwi o objętości 4 mL, które następnie natychmiast mieszano z hirudyną/lepirudyną (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) do końcowego stężenia 30 U/mL. Lepirudyna została zastosowana jako antykoagulant w modelu krwi pełnej ze względu na jej minimalny wpływ na aktywność układu dopełniacza. W przeciwieństwie do powszechnie stosowanych antykoagulantów, takich jak heparyna, wersenian czy cytrynian, które mogą hamować lub nieswoiście modulować aktywację dopełniacza poprzez chelatowanie jonów wapnia i magnezu bądź oddziaływanie z białkami osocza, lepirudyna działa selektywnie jako bezpośredni inhibitor trombiny i nie zaburza przebiegu kaskady dopełniacza. Z tego względu została ona uznana za preferowany antykoagulant w modelach krwi pełnej przeznaczonych do badania mechanizmów zależnych od dopełniacza, umożliwiając zachowanie fizjologicznej aktywności tej kaskady oraz wiarygodną CDC³⁴⁹. Do czasu rozpoczęcia eksperymentu próbki krwi przechowywano w temperaturze lodu. Dalsze etapy procedury eksperymentalnej prowadzono zasadniczo zgodnie z protokołem testu CDC na komórkach *Raji*.

Zastosowanie próbek od zdrowych dawców zamiast od pacjentów z CLL można rozpatrywać jako jedno z ograniczeń przedstawionego modelu, gdyż parametry morfologiczne krwi osób zdrowych i chorych mogą się istotnie różnić. Z jednej strony wybór materiału pobranego od zdrowych dawców był pokłosiem limitowanego dostępu do krwi chorych, określonego na wstępie badania poprzez zgody odpowiedniej komisji bioetycznej. Z drugiej strony, przeprowadzenie tego typu doświadczeń z wykorzystaniem krwi od zdrowych ochotników umożliwiło określenie wpływu naturalnych populacji komórek efektorowych, w szczególności komórek NK, monocytów i granulocytów, które mogą współuczestniczyć w eliminacji komórek docelowych poprzez ADCC oraz wchodzić w interakcje o charakterze zarówno antagonistycznym jak i addytywnym z aktywowanym układem dopełniacza. Spójne wyniki otrzymane dla próbek od wszystkich trzech dawców

utwierdzają w przekonaniu, iż co do zasady obecność innych efektorów układu immunologicznego nie zaburza istotnie obserwowanego w surowicy efektu hiperaktywacji układu dopełniacza poprzez suplementację wariantem GoF białka C2.

7.2.3. Wariant typu GoF białka C2

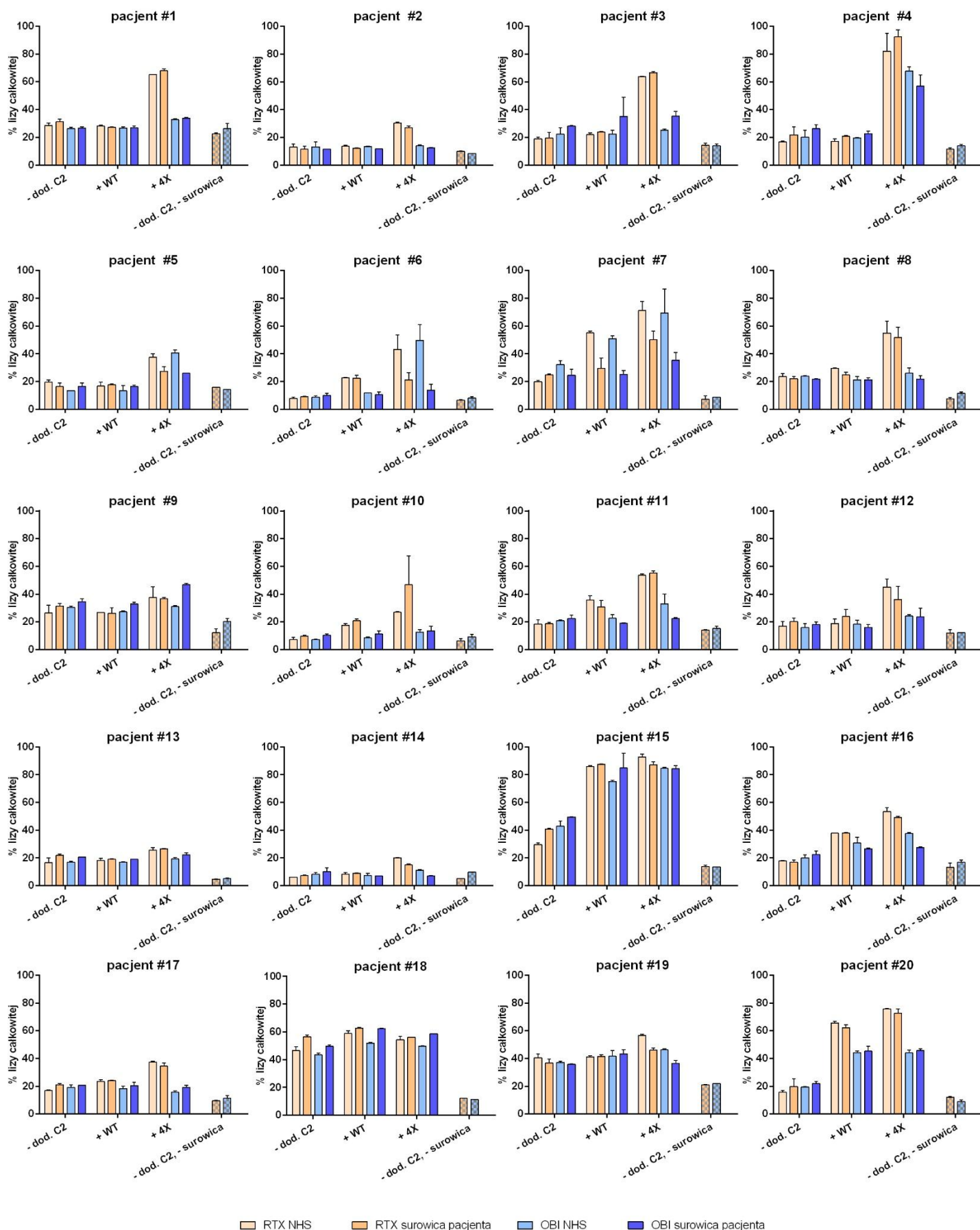
Zasadnicze aspekty teoretyczne oraz literaturę przedmiotu omówiono szeroko we **Wstępie** niniejszej monografii. (patrz. **Rozdział 5.2.1**). Sekwencja cDNA wild-type C2 (numer dostępu NM_000063.5), rozszerzona o sekwencję sześciu reszt histydynowych na C-końcu, a także sekwencje wariantów poczwórnie zmutowanych, zostały zoptymalizowane pod względem użycia kodonów, zsyntetyzowane i sklonowane do wektora ekspresyjnego pCEP4 w ramach usługi GeneArt Gene Synthesis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Uzyskane konstrukty plazmidowe transfekowano do komórek HEK293 FreeStyle (Thermo Fisher Scientific, USA) z wykorzystaniem odczynnika FreeStyle MAX, zgodnie z zaleceniami producenta. Pożywkę hodowlaną FreeStyle 293 Expression Medium (Thermo Fisher Scientific, USA) zbierano w 2., 4. oraz 7. dniu po transfekcji, a następnie przechowywano w temperaturze -80°C do momentu dalszego oczyszczania białek. Rekombinowane białka oczyszczano metodą chromatografii powinowactwa z użyciem kolumny HisTrap FF (GE Healthcare, USA). Elucję prowadzono przy zastosowaniu gradientu imidazolu o maksymalnym stężeniu 0,7 M. Po etapie oczyszczania bufor wymieniano na PBS. Czystość otrzymanych preparatów oceniano metodą elektroforezy SDS-PAGE (*ang.* sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności dodecylosiarczanu sodu) z następczym barwieniem błękitem Coomassie.

7.3. Wyniki części badawczej II

Wyniki testów CDC indukowanej przez przeciwciała anti-CD20 wobec komórek CLL izolowanych od pacjentów zostały zbiorczo przedstawione na **Ryc. 7**. Komórki CLL wykazywały niską podstawową wrażliwość na CDC. Inkubacja komórek CLL z przeciwciałami monoklonalnymi anti-CD20 (RTX lub obinutuzumab) rozcieńczonymi w PBS zawierającym 20% surowicy autologicznej prowadziła do zwiększonej eliminacji komórek w porównaniu z inkubacją w PBS bez dodatku surowicy, przyjętym jako warunek kontrolny i punkt odniesienia dla oceny aktywności CDC, jedynie u sześciu pacjentów (#7, #8, #9, #15, #18, #19). W żadnym z tych przypadków aktywność CDC surowicy autologicznej nie była niższa niż aktywność NHS. Po dodaniu hiperaktywnego składnika C2

zaobserwowano natomiast osłabioną aktywność CDC surowicy autologicznej w porównaniu z NHS w próbkach pochodzących od trzech pacjentów (#5, #6, #7). Wyniki te wskazują, że potencjalny funkcjonalny niedobór dopełniacza u pacjentów z CLL nie wpływa istotnie na podstawową aktywność CDC indukowaną przez same komórki CLL, lecz może ujawniać się dopiero w warunkach celowego wzmocnienia CP i jedynie w ograniczonej podgrupie przypadków.

Aktywność CDC w komórkach CLL charakteryzowała się znaczną zmiennością osobniczą, zarówno w warunkach bazowych, jak i po modulacji hiperaktywnym białkiem C2. W większości badanych próbek obserwowano niską podatność komórek CLL na CDC indukowaną przeciwciałami anti-CD20 w obecności surowicy autologicznej, co potwierdza ograniczoną efektywność endogennego układu dopełniacza w tej jednostce chorobowej. Jedynie w sześciu przypadkach dodanie surowicy autologicznej prowadziło do wyraźnego zwiększenia lizy komórek w porównaniu z warunkami bezsurowiczymi. Suplementacja rekombinowanym składnikiem C2 istotnie modyfikowała odpowiedź CDC w znacznej części próbek, jednak efekt ten nie był jednorodny. W 16 z 20 przypadków zastosowanie wariantu 4X C2 w połączeniu z RTX skutkowało co najmniej dwukrotnym wzrostem aktywności cytotoksycznej względem warunków bez dodatku C2. W części tych próbek porównywalny efekt uzyskiwano również po dodaniu rekombinowanego białka C2 typu dzikiego (wild-type C2), co wskazuje, że w tej podgrupie skuteczność CDC była ograniczana głównie dostępnością funkcjonalnego składnika C2, a nie jego aktywnością biologiczną. Odmiennie, w kilku próbkach istotne wzmocnienie CDC obserwowano wyłącznie po zastosowaniu wariantu 4X C2, co sugeruje istnienie dodatkowych ograniczeń w aktywacji CP, niwelowanych dopiero przez silniejsze wzmocnienie tworzenia i stabilności konwertazy C3. Analogiczne tendencje zaobserwowano w eksperymentach z obinutuzumabem, jednak liczba próbek reagujących na suplementację C2 oraz zakres uzyskanego wzmocnienia CDC były mniejsze niż w przypadku RTX, co pozostaje zgodne z odmiennym profilem aktywacji efektorów immunologicznych przez przeciwciała anti-CD20 typu II.



Ryc. 7.

Analiza (CDC) indukowanej przez przeciwciała anti-CD20 wobec komórek CLL izolowanych od pacjentów

Źródło: opracowanie własne

Legenda:

-dod. C2 – warunek eksperymentalny bez dodatku składnika C2 układu dopełniacza

+WT – warunek eksperymentalny z dodatkiem składnika C2 typu dzikiego (*wild type*)

+4X – warunek eksperymentalny z dodatkiem poczwórnego wariantu typu gain-of-function (GoF) białka C2

-dod. C2, -surowica – warunek kontrolny bez dodatku surowicy ani składnika C2 układu dopełniacza (wyłącznie PBS oraz przeciwciała terapeutyczne)

% pełnej lizy – odsetek komórek ulegających lizie (gdzie sygnał uzyskany z komórek poddanych działaniu 30% DMSO przyjęto jako 100% lizy)

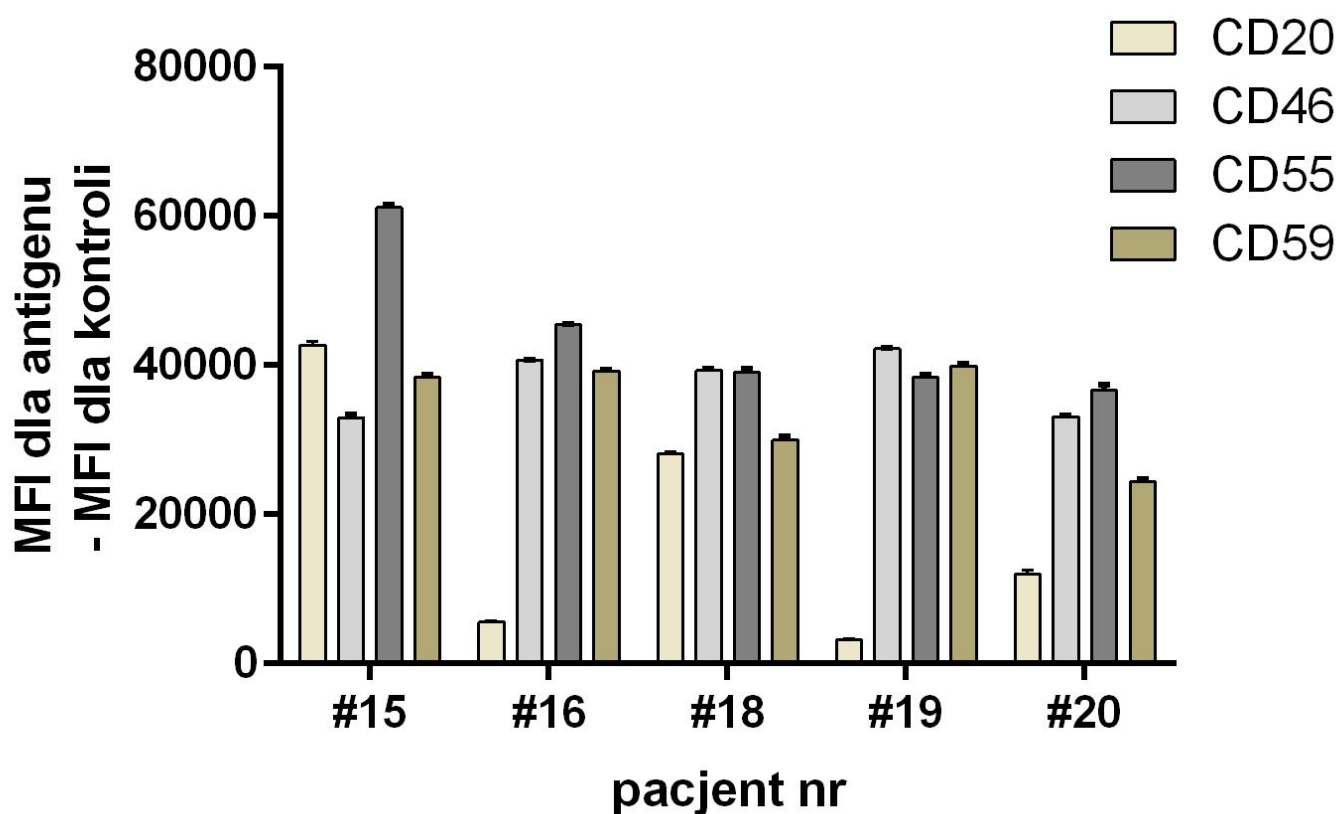
RTX NHS - rytuksymab inkubowany z referencyjną surowicą ludzką

RTS surowica pacjenta - rytuksymab inkubowany z surowicą autologiczną pacjenta

OBI NHS - obinutuzumab inkubowany z referencyjną surowicą ludzką

OBI surowica pacjenta - obiunutuzumab inkubowany z surowicą autologiczną pacjenta

W celu identyfikacji potencjalnych determinant odpowiedzi na suplementację C2 przeanalizowano ekspresję CD20 oraz błonowych regulatorów dopełniacza CD46, CD55 i CD59 w wybranych próbkach CLL. Badanie miało charakter pilotażowy, stąd jego ograniczony zakres. Wyniki zostały przedstawione na **Ryc. 8**. Analiza ta nie wykazała jednoznacznej zależności pomiędzy poziomem ekspresji badanych antygenów ani ich wzajemnymi proporcjami a podatnością komórek na wzmocnienie CDC. Próbki charakteryzujące się podobnym profilem ekspresji inhibitorów dopełniacza wykazywały odmienne odpowiedzi funkcjonalne, natomiast różnice w ekspresji CD20 nie korelowały w sposób spójny z efektem suplementacji C2. Wyniki te wskazują, że prosta ocena fenotypowa komórek CLL, ograniczona jedynie do ekspresji celu terapeutycznego i głównych regulatorów dopełniacza, nie pozwala na wiarygodną predykcję skuteczności farmakologicznego wzmocnienia CDC w warunkach fizjologicznego stężenia surowicy. Na podstawie wyników badania pilotażowego postanowiono nie kontynuować analiz na pozostałych próbkach.



Ryc. 8.

Ekspresja antygenów CD20, CD46, CD55 i CD59 u pacjentów z CLL – badanie pilotażowe*

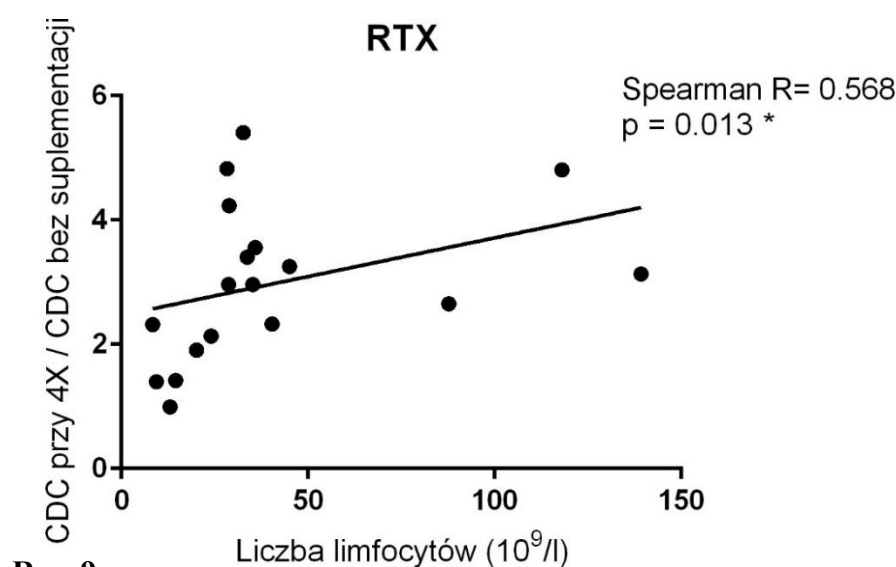
Legenda:

MFI dla antygenu CD - MFI dla kontroli izotypowej - różnica między średnią intensywnością fluorescencji (MFI) antygenu CD a średnią intensywnością fluorescencji kontroli izotypowej lub kontroli bez przeciwciała pierwszorzędowego (dla CD20)

*(Zaprezentowane dane stanowią średnie wartości uzyskane z dwóch powtórzeń technicznych. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe.)

Źródło: opracowanie własne

Analiza korelacji z parametrami klinicznymi wykazała istotną dodatnią zależność pomiędzy poziomem limfocytozy a nasileniem CDC indukowanej RTX po suplementacji wariantem 4X C2 (Spearman $R = 0,568$; $p = 0,013$; **Ryc. 9.**). Analogiczna analiza przeprowadzona dla CDC indukowanego obinutuzumabem nie wykazała istotnej statystycznie korelacji. Podobnie, pozostałe analizowane parametry kliniczne i biologiczne nie wykazywały istotnych korelacji ani nie pozwalały na wyodrębnienie podgrup pacjentów różniących się podatnością na wzmocnienie CDC. Uzyskany wynik wskazuje, że całkowite obciążenie chorobą, odzwierciedlone liczbą krążących limfocytów, może stanowić czynnik współistniejący z podatnością na intensyfikację aktywacji dopełniacza, jednak nie pozwala na jednoznaczne wnioskowanie przyczynowo-skutkowe. Podsumowując, przedstawione dane wskazują, że skuteczność wzmocnienia CDC w CLL poprzez suplementację składnika C2 jest zjawiskiem heterogennym i nie może być przewidywana na podstawie pojedynczych parametrów fenotypowych ani standardowych cech klinicznych. Wyniki te uzasadniają dalsze badania nad funkcjonalnymi ograniczeniami aktywacji dopełniacza w CLL oraz nad identyfikacją markerów predykcyjnych odpowiedzi na strategię ukierunkowane na farmakologiczne nasilenie aktywności CP.



Ryc. 9.

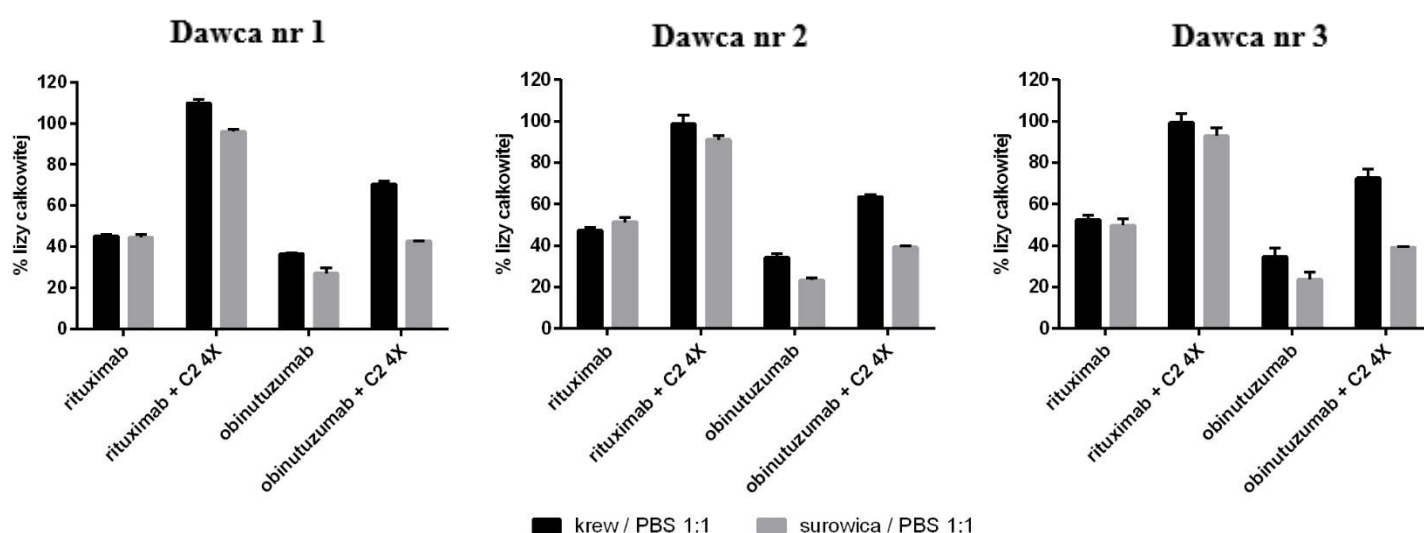
Korelacja pomiędzy liczbą limfocytów a nasileniem cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (CDC) indukowanej rytuksymabem (RTX) po suplementacji wariantem 4X C2

Legenda:

CDC przy 4X / CDC bez suplementacji – stosunek CDC po suplementacji wariantem 4XC2 do CDC bez dodatku białka C2

Źródło: opracowanie własne

Eksperyment przeprowadzony na komórkach linii *Raji* w warunkach pełnej krwi wykazał, że dodanie wariantu GoF białka C2 prowadziło do wyraźnego nasilenia CDC indukowanej przez obinutuzumab. Efekt ten był silniejszy niż analogiczne nasilenie obserwowane w warunkach surowicy, podczas gdy w przypadku komórek traktowanych RTX aktywność CDC była zbliżona zarówno we krwi pełnej, jak i w surowicy. Wyniki te, przedstawione zbiorczo na **Ryc. 10.** sugerują, że w kontekście krótkoterminowej cytotoksyczności obinutuzumab może efektywnie wykorzystywać aktywację układu dopełniacza jako dodatkowy mechanizm efektorowy w fizjologicznym środowisku krwi pełnej.



Ryc. 10.

Ocena cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (CDC) w modelu krwi pełnej pochodzącej od zdrowych dawców w komórkach linii *Raji**

*(Zaprezentowane dane stanowią średnie wartości uzyskane z dwóch powtórzeń technicznych. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe.)

Źródło: opracowanie własne

Legenda:

% lizy całkowitej – odsetek komórek ulegających lizie (sygnał uzyskany z komórek poddanych pełnej lizie po zastosowaniu 30% DMSO przyjęto jako 100% lizy)

+C2 4X – warunek eksperymentalny z dodatkiem poczwórnego wariantu typu gain-of-function (GoF) białka C2

krew/PBS 1:1 (słupki czarne) – warunek eksperymentalny przeprowadzony w mieszaninie krwi pełnej zdrowych dawców i PBS w stosunku 1:1

surowica/PBS 1:1 (słupki szare) – warunek eksperymentalny przeprowadzony w mieszaninie surowicy zdrowych dawców i PBS w stosunku 1:1

7.4. Dyskusja części badawczej II

Wśród chorób limfoproliferacyjnych wywodzących się z komórek CD20-dodatnich, komórki CLL wykazują niższą podatność na immunoterapię przeciwciałami monoklonalnymi niż komórki chłoniaków nieziarniczych, co wynika zarówno z ich właściwości molekularnych¹⁴⁸, jak i z niekorzystnej farmakokinetyki terapeutycznych przeciwciał prowadzącej do ich przyspieszonego klirensu³²⁹. Jednym z głównych ograniczeń skuteczności przeciwciał anti-CD20 typu I, takich jak RTX, pozostaje względnie niska efektywność CDC, pomimo zachowanej zdolności do rekrutacji C1q. Ograniczenia te stały się bodźcem do opracowania kolejnych generacji przeciwciał anti-CD20. Obinutuzumab, jako przeciwciało typu II, charakteryzuje się niską zdolnością do indukcji CDC, przy jednoczesnym nasileniu bezpośredniej cytotoksyczności oraz efektywnej aktywacji ADCC, co wynika z odmiennej topologii wiązania do CD20 i mniejszego sprzyjania oligomeryzacji kompleksów immunologicznych.²³⁵ Mechanizmy oporności na CDC w CLL mają charakter wieloczynnikowy. Badania na komórkach CLL pacjentów wykazały, że po ekspozycji na ofatumumab (przeciwciało typu I, cechujące się jeszcze silniejszym od RTX potencjałem aktywacji dopełniacza) dochodzi do istotnej redukcji ekspresji CD20 oraz spadku stężenia dopełniacza w surowicy, co koreluje z narastającą opornością na CDC pomimo początkowej odpowiedzi terapeutycznej.³³⁰ Mechanizm ten wskazuje, że obniżenie ekspresji antygenu CD20 w czasie terapii jest klinicznie relewantnym czynnikiem oporności i że ta nie może być w pełni wytłumaczona jedynie różnicami w ekspresji regulatorów dopełniacza, takich jak CD46, CD55 czy CD59. Ponadto, regulatory błonowe dopełniacza ułatwiają degradację

czynników kaskady, zwłaszcza konwertazy C3 co ogranicza efektywne tworzenie MAC. Badania molekularne wykazały, że regiony C3b podatne na inaktywację przez FI stanowią istotny punkt ograniczający skuteczność CDC w komórkach opornych. Ograniczenie tej degradacji prowadzi do zwiększenia efektywności CDC w układach zawierających przeciwciało oraz prawidłową surowicę zdrowych dawców.³³¹ Wyniki te pozostają w zgodzie z doniesieniami, że wyciszenie lub blokowanie błonowych regulatorów dopełniacza, takich jak CD46, CD55 i CD59, wyraźnie zwiększa skuteczność CDC, także w modelach komórkowych chłoniaków i innych nowotworów.^{332,333} Nasze dane eksperymentalne wskazują, że ograniczona aktywacja dopełniacza na etapie inicjacji może być przewyżczona dzięki modyfikacjom na dalszych etapach kaskady. Wykazano, że suplementacja surowicy wariantem gain-of-function białka C2 umożliwia zwiększenie CDC również w modelu z zastosowaniem obinutuzumabu, mimo suboptymalnej rekrutacji C1q.¹³⁹ W niniejszej części badawczej doktoratu wariant 4X białka C2 zwiększał CDC indukowaną przez obinutuzumab w części analizowanych próbek CLL (pacjenci #4, #6 i #7), jednak efekt ten był słabszy niż obserwowany w przypadku RTX. Największy wzrost cytotoksyczności obserwowano w próbkach traktowanych RTX, co wskazuje, że skuteczność tego przeciwciała może być modulowana na poziomie dostępności lub wydajności konwertaz dopełniacza, a nie wyłącznie na etapie inicjacji kaskady. Strategie kliniczne wzmacniania efektów CDC obejmują projektowanie przeciwciał z substytucjami w domenie Fc w celu promowania oligomeryzacji na powierzchni komórek („hexamer-enhancing”), co doprowadziło do znacząco wyższej efektywności CDC wobec komórek CLL niż wersje dzikie przeciwciał²³⁸. Zwiększenie CDC po suplementacji wariantem 4X C2 było częstsze w próbkach pochodzących od pacjentów z wysoką limfocytozą (**Ryc. 9.**), przy braku jednoznacznej zależności od poziomu ekspresji CD20 oraz błonowych regulatorów dopełniacza CD46, CD55 i CD59 (**Ryc. 8.**). Wyniki te korespondują z literaturą pokazującą, że ekspresja CD20 i regulatorów dopełniacza nie koreluje liniowo z wrażliwością na CDC w komórkach pierwotnych, co może wynikać z różnic w receptorach Fcγ i redystrybucji antygenów w błonie.³³⁴ Wysoka całkowita masa komórek nowotworowych, charakterystyczna dla pacjentów z nasiloną limfocytozą, koreluje z przyspieszonym klirensiem RTX ³²⁹, co ogranicza dostępność przeciwciała w krążeniu i podkreśla konieczność wzmacniania wydajności mechanizmów efektorowych. W tym kontekście produkty rozszczepienia dopełniacza, w szczególności C5a, odgrywają istotną rolę w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej poprzez rekrutację komórek efektorowych układu odpornościowego do bezpośredniego kontaktu z komórkami docelowymi. C5a działa

jako silny chemoatraktant, przyciągając neutrofile, monocyty oraz komórki NK, co umożliwia wzmocnienie ADCC w obrębie miejsc kontaktu między komórkami nowotworowymi a komórkami efektorowymi. W rezultacie aktywacja kaskady dopełniacza i funkcje komórek efektorowych współdziałają synergicznie, wzmacniając odpowiedź immunoterapeutyczną nawet przy ograniczonej dostępności przeciwciała terapeutycznego. Mechanizm ten podkreśla translacyjną wartość ukierunkowanej modulacji dopełniacza jako strategii zwiększania efektywności terapii przeciwciałami anti-CD20 w CLL.³³⁵ Generowanie produktów rozszczepienia białek dopełniacza, takich jak C5a, wykazuje potencjalne korzyści w rekrutowaniu efektorowych komórek układu odpornościowego i wzmacnianiu ADCC, co sugeruje synergiczny efekt dopełniacza i komórek efektorowych w odpowiedzi immunoterapeutycznej.

Uzyskane w tej części badawczej wyniki nie potwierdzają obecności głębokich funkcjonalnych niedoborów układu dopełniacza u chorych na CLL, postulowanych we wcześniejszych pracach^{323,324,235}. Rozbieżności te mogą wynikać z odmiennych podejść metodologicznych, obejmujących zastosowanie przez mnie wyższych, zbliżonych do fizjologicznych stężeń surowicy oraz bezpośredni pomiar lizy komórek nowotworowych jako punktu końcowego analizy zamiast pomiarów markerów aktywacji dopełniacza metodami immunoenzymatycznymi w układzie wymuszonej aktywacji na powierzchni mikropłytek lub zastosowania testów z odczynnikami erytrocytami, które operują na bardzo niskich stężeniach surowicy. Takie podejście umożliwia ocenę wydolności dopełniacza w warunkach bliższych rzeczywistemu kontekstowi terapeutycznemu i uwypukla, że zasadniczym determinantem CDC w CLL jest zarówno funkcjonalność komponentów dopełniacza, jak i strukturalne uwarunkowania kompleksów immunologicznych na powierzchni komórek. Przedstawione dane eksperymentalne oraz najnowsze doniesienia literaturowe wskazują, że układ dopełniacza u pacjentów z CLL pozostaje funkcjonalnie aktywny, a jego celowana modulacja na poziomie konwertazy oraz inżynierskie ulepszenia przeciwciał stanowią obiecującą strategię zwiększania skuteczności przeciwciał anti-CD20, szczególnie w kontekście terapii skojarzonych, precyzyjnego projektowania mAb oraz manipulacji regulatorami dopełniacza.

8. Wnioski końcowe

Przedstawione w niniejszej monografii badania potwierdzają kluczową rolę układu dopełniacza jako mechanizmu efektorowego immunoterapii opartej na przeciwciałach monoklonalnych skierowanych przeciwko antygenowi CD20 w chorobach limfoproliferacyjnych. Aktywacja CP prowadzi do powstania konwertaz C3 oraz formowania MAC, co umożliwia eliminację komórek docelowych w mechanizmie CDC. Zaprezentowane wyniki wskazują, że skuteczność aktywacji kaskady dopełniacza nie jest determinowana wyłącznie przez etap inicjacji związany z rekrutacją składnika C1q przez kompleks antygen–przeciwciało, lecz może być modulowana również na dalszych etapach kaskady poprzez wpływ na aktywność konwertaz dopełniacza. Ten konkretny aspekt pracy stanowi novum w dziedzinach hematologii i immunoterapii i stwarza przesłanki do rozwinięcia strategii terapeutycznych opartych nie na tworzeniu nowych wariantów przeciwciał antynowotworowych ale na wykorzystaniu istniejących już leków i maksymalizacji ich efektywności poprzez jednoczesną suplementację surowicy pacjenta odpowiednimi składowymi dopełniacza. Nasze wcześniejsze prace wykazały, że zastosowanie wariantów GoF składnika C2 w modelach ludzkich linii immortalizowanych komórek chłoniaka ekspresujących CD20 prowadzi do zwiększenia stabilności oraz aktywności klasycznej konwertazy C3 (C4b2a), co przekłada się na nasilenie CDC indukowanej przez przeciwciała terapeutyczne. Wzmocnienie aktywności konwertazy umożliwiało zwiększenie efektywności eliminacji komórek nowotworowych w zaprezentowanych modelach eksperymentalnych oraz pozwalało na uzyskanie wysokiej aktywności CDC również w przypadku przeciwciał anty-CD20 typu II, takich jak obinutuzumab, które w warunkach standardowych wykazują ograniczoną zdolność do aktywacji dopełniacza ze względu na odmienny sposób wiązania antygenu CD20 i brak zdolności do tworzenia wyższych struktur oligomerycznych sprzyjających rekrutacji C1q. W niniejszej pracy udowodniono, że zaproponowane podejście przynosi pożądany efekt w warunkach *ex vivo*, gdzie jako model używamy komórek CLL o wysokim stopniu oporności na terapię anty-CD20 oraz autologiczną surowicę pacjentów pobraną przez rozpoczęciem leczenia. Należy zauważyć, że w opisywanych warunkach znacznie korzystniejsze wyniki suplementacji wariantem GoF białka C2 uzyskano przy zastosowaniu rytuksymabu, gdzie znacznie podniesienie wydajności CDC uzyskano w próbkach od ponad połowy badanych pacjentów, natomiast w przypadku zastosowania obinutuzumabu efekt był zauważalny jedynie w kilku przypadkach. Zwazwszy jednak na dodatkowe mechanizmy efektorowe

przeciwciał typu II, opisywany efekt może addytywnie przełożyć się na ogólne zwiększenie efektywności obinutuzumabu w warunkach *in vivo*. Z drugiej strony, testowane białko C2 może doczekać się w przyszłości jeszcze bardziej wydajnych wariantów, podobnie jak inna składowa CP – białko C4. Uzyskane wyniki wskazują również na znaczną heterogenność odpowiedzi komórek nowotworowych na wzmocnienie aktywności dopełniacza. W badaniach przeprowadzonych z wykorzystaniem pierwotnych komórek CLL wykazano ich zróżnicowaną podatność na CDC oraz na jej wzmocnienie poprzez suplementację wariantem GoF białka C2. Analiza fenotypowa komórek nie wykazała jednoznacznej zależności pomiędzy poziomem ekspresji antygeny CD20 ani ekspresją błonowych regulatorów dopełniacza (CD46, CD55 i CD59) a podatnością komórek na wzmocnienie CDC, co wskazuje na bardziej złożony charakter regulacji odpowiedzi komórek CLL na aktywację dopełniacza. Analiza parametrów klinicznych wykazała dodatnią korelację pomiędzy stopniem limfocytozy a nasileniem cytotoksyczności zależnej od dopełniacza po zastosowaniu wariantu C2 o zwiększonej aktywności, co sugeruje związek pomiędzy obciążeniem chorobą a podatnością komórek nowotworowych na modulację aktywności kaskady dopełniacza. Jednocześnie uzyskane wyniki nie potwierdzają obecności powszechnych, głębokich niedoborów funkcjonalnych układu dopełniacza u chorych na CLL. Dane te wskazują, że układ dopełniacza u większości pacjentów pozostaje funkcjonalnie aktywny i może stanowić skuteczny mechanizm efektorowy immunoterapii.

Wyniki i wnioski zawarte w niniejszej monografii mają potencjalny wymiar translacyjny. Zastosowane podejście polegające na wzmacnianiu aktywności konwertaz dopełniacza stanowi strategię, która może zostać wykorzystana jako element terapii w leczeniu chorób limfoproliferacyjnych, zwiększając skuteczność stosowanych obecnie przeciwciał monoklonalnych bez konieczności ich modyfikacji strukturalnej. W kontekście klinicznym mogłoby to przyczynić się do poprawy odpowiedzi terapeutycznej u pacjentów wykazujących ograniczoną wrażliwość na standardową immunoterapię przeciwciałami anty-CD20. Jednocześnie należy podkreślić oczywiste ograniczenia zaprezentowanych badań. Eksperymenty mają charakter w dużej mierze mechanistyczny. W kolejnym etapie wymagają one rozszerzenia o badania na bardziej złożonych modelach zwierzęcych, a w dalszej perspektywie w badaniach translacyjnych. Monografia prezentuje spójną koncepcję badawczą modulacji mechanizmu działania przeciwciał anty-CD20 typu II oraz kierunki jej dalszego rozwoju.

9. Bibliografia

1. Hajishengallis G, Reis ES, Mastellos DC, Ricklin D, Lambris JD. Novel mechanisms and functions of complement. *Nat Immunol.* 2017;18(12):1288-1298. doi:10.1038/ni.3858.
2. Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., & Lambris, J. D. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature immunology*, 11(9), 785–797. doi.org/10.1038/ni.1923.
3. Leslie M. Immunology. The new view of complement [published correction appears in Science. 2012 Nov 9;338(6108):742]. *Science.* 2012;337(6098):1034-1037. doi:10.1126/science.337.6098.1034.
4. Chen X, Zhao Z, Jiang X, Li J, Miao F, Yu H, et al. The complement component 4 binding protein alpha gene: A versatile immune gene that influences lipid metabolism in bovine mammary epithelial cell lines. *Int J Mol Sci.* 2024;25:2375. doi:10.3390/ijms25042375.
5. Kolev M, Dimeloe S, Le Friec G, Navarini A, Arbore G, Povoleri GA, et al. Complement regulates nutrient influx and metabolic reprogramming during Th1 cell responses. *Immunity.* 2015;42:1033–1047. doi:10.1016/j.immuni.2015.05.024.
6. Ratajczak MZ, Adamiak M, Abdelbaset-Ismail A, Bujko K, Thapa A, Chumak V, et al. Intracellular complement (complosome) is expressed in hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) and regulates cell trafficking, metabolism and proliferation in an intracrine Nlrp3 inflammasome-dependent manner. *Leukemia.* 2023;37:1401–1405. doi:10.1038/s41375-023-01894-0.
7. Nesargikar PN, Spiller B, Chavez R. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* 2012;2(2):103-111. doi:10.1556/EuJMI.2.2012.2.2.
8. Saleh J, Al-Maqbali M, Abdel-Hadi D. Role of complement and complement-related adipokines in regulation of energy metabolism and fat storage. *Compr Physiol.* 2019;9(4):1411-1429. doi:10.1002/cphy.c170037.
9. Kolev M, Kemper C. Complement—tapping into new sites and effector systems. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(9):533-546. doi:10.1038/nri.2017.66.
10. Lubbers R, van Essen MF, van Kooten C, Trouw LA. Production of complement components by cells of the immune system. *Clin Exp Immunol.* 2017;188(2):183-194. doi:10.1111/cei.12952.
11. Warwick CA, Keyes AL, Woodruff TM, Usachev YM. The complement cascade in the regulation of neuroinflammation, nociceptive sensitization, and pain. *J Biol Chem.*

- 2021;297(3):101085. doi:10.1016/j.jbc.2021.101085.
12. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol.* 2015;6:262. Published 2015 Jun 2. doi:10.3389/fimmu.2015.00262.
 13. Diebold CA, Beurskens FJ, de Jong RN, et al. Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science.* 2014;343(6176):1260-1263. doi:10.1126/science.1248943.
 14. Ugurlar D, Howes SC, de Kreuk BJ, et al. Structures of C1-IgG1 provide insights into how danger pattern recognition activates complement. *Science.* 2018;359(6377):794-797. doi:10.1126/science.aao4988.
 15. Arumugam TV, Magnus T, Woodruff TM, Proctor LM, Shiels IA, Taylor SM. Complement mediators in ischemia-reperfusion injury. *Clin Chim Acta.* 2006;374(1-2):33-45. doi:10.1016/j.cca.2006.06.010.
 16. Morgan BP. Regulation of the complement membrane attack pathway. *Crit Rev Immunol.* 1999;19(3):173-198.
 17. Barrington R, Zhang M, Fischer M, Carroll MC. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2001;180:5-15. doi:10.1034/j.1600-065x.2001.1800101.x.
 18. Gasque P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol.* 2004;41(11):1089-1098. doi:10.1016/j.molimm.2004.06.011.
 19. Ehrnthaller C, Ignatius A, Gebhard F, Huber-Lang M. New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system. *Mol Med.* 2011;17(3-4):317-329. doi:10.2119/molmed.2010.00149.
 20. Rodríguez de Córdoba S, Esparza-Gordillo J, Goicoechea de Jorge E, Lopez-Trascasa M, Sánchez-Corral P. The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol Immunol.* 2004;41(4):355-367. doi:10.1016/j.molimm.2004.02.005.
 21. Chen CB, Wallis R. Two mechanisms for mannose-binding protein modulation of the activity of its associated serine proteases. *J Biol Chem.* 2004;279(25):26058-26065. doi:10.1074/jbc.M401318200.
 22. Dobó J, Harmat V, Beinrohr L, Sebestyén E, Závorszky P, Gál P. MASP-1, a promiscuous complement protease: structure of its catalytic region reveals the basis of its broad specificity. *J Immunol.* 2009;183(2):1207-1214. doi:10.4049/jimmunol.0901141.
 23. Bexborn F, Andersson PO, Chen H, Nilsson B, Ekdahl KN. The tick-over theory revisited:

- formation and regulation of the soluble alternative complement C3 convertase (C3(H₂O)Bb). *Mol Immunol.* 2008;45(8):2370-2379. doi:10.1016/j.molimm.2007.11.003.
24. Pangburn MK, Schreiber RD, Müller-Eberhard HJ. Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med.* 1981;154(3):856-867. doi:10.1084/jem.154.3.856.
 25. Pangburn MK, Ferreira VP, Cortes C. Discrimination between host and pathogens by the complement system. *Vaccine.* 2008;26 Suppl 8(Suppl 8):I15-I21. doi:10.1016/j.vaccine.2008.11.023.
 26. Sahu A, Kozel TR, Pangburn MK. Specificity of the thioester-containing reactive site of human C3 and its significance to complement activation. *Biochem. J* 1994;302(Pt 2):429–436. [PubMed: 8092994].
 27. Lucientes-Continente L, Márquez-Tirado B, Goicoechea de Jorge E. The Factor H protein family: The switchers of the complement alternative pathway. *Immunol Rev.* 2023;313(1):25-45. doi:10.1111/imr.13166.
 28. Lachmann PJ. The story of complement factor I. *Immunobiology.* 2019;224(4):511-517. doi:10.1016/j.imbio.2019.05.003.
 29. Spitzer D, Mitchell LM, Atkinson JP, Hourcade DE. Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. *J Immunol.* 2007;179(4):2600-2608. doi:10.4049/jimmunol.179.4.2600.
 30. Leshner AM, Nilsson B, Song WC. Properdin in complement activation and tissue injury. *Mol Immunol.* 2013;56(3):191-198. doi:10.1016/j.molimm.2013.06.002.
 31. Müller-Eberhard HJ. The killer molecule of complement. *J Invest Dermatol.* 1985;85(1 Suppl):47s-52s. doi:10.1111/1523-1747.ep12275445.
 32. Dobó J, Major B, Kékesi KA, et al. Cleavage of kininogen and subsequent bradykinin release by the complement component: mannose-binding lectin-associated serine protease(MASP)-1. *PLoSOne.* 2011;6(5):e20036. doi:10.1371/journal.pone.0020036.
 33. Davis AE 3rd, Lu F, Mejia P. C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. *Thromb Haemost.* 2010;104(5):886-893. doi:10.1160/TH10-01-0073
 34. Ziccardi RJ. A new role for C-1-inhibitor in homeostasis: control of activation of the first component of human complement. *J Immunol.* 1982;128(6):2505-2508.
 35. Longhurst H, Cicardi M. Hereditary angio-oedema. *Lancet.* 2012;379(9814):474-481. doi:10.1016/S0140-6736(11)60935-5.

36. Roumenina LT, Radanova M, Atanasov BP, et al. Heme interacts with C1q and inhibits the classical complement pathway. *J Biol Chem.* 2011;286(18):16459-16469. doi:10.1074/jbc.M110.206136.
37. Galanakis DK, Ghebrehiwet B. A unique property of a plasma proteoglycan, the C1q inhibitor. An anticoagulant state resulting from its binding to fibrinogen. *J Clin Invest.* 1994;93(1):303-310. doi:10.1172/JCI116960.
38. Roumenina L, Bureeva S, Kantardjiev A, et al. Complement C1q-target proteins recognition is inhibited by electric moment effectors. *J Mol Recognit.* 2007;20(5):405-415. doi:10.1002/jmr.853.
39. Iwaki D, Kanno K, Takahashi M, et al. Small mannose-binding lectin-associated protein plays a regulatory role in the lectin complement pathway. *J Immunol.* 2006;177(12):8626-8632. doi:10.4049/jimmunol.177.12.8626.
40. Degn SE, Hansen AG, Steffensen R, Jacobsen C, Jensenius JC, Thiel S. MAp44, a human protein associated with pattern recognition molecules of the complement system and regulating the lectin pathway of complement activation. *J Immunol.* 2009;183(11):7371-7378. doi:10.4049/jimmunol.0902388.
41. Gaboriaud C, Gupta RK, Martin L, et al. The serine protease domain of MASP-3: enzymatic properties and crystal structure in complex with ecotin. *PLoS One.* 2013;8(7):e67962. Published 2013 Jul 4. doi:10.1371/journal.pone.0067962.
42. Mayilyan KR, Krarup A, Soghoyan AF, Jensenius JC, Sim RB. I-ficolin-MASP arm of the complement system in schizophrenia. *Immunobiology.* 2023;228(2):152349. doi:10.1016/j.imbio.2023.152349.
43. Paréj K, Dobó J, Závodszy P, Gál P. The control of the complement lectin pathway activation revisited: both C1-inhibitor and antithrombin are likely physiological inhibitors, while α 2-macroglobulin is not. *Mol Immunol.* 2013;54(3-4):415-422. doi:10.1016/j.molimm.2013.01.009.
44. Lachmann PJ. The amplification loop of the complement pathways. *Adv Immunol.* 2009;104:115-149. doi:10.1016/S0065-2776(08)04004-2.
45. Lambris JD, Lao Z, Oglesby TJ, Atkinson JP, Hack CE, Becherer JD. Dissection of CR1, factor H, membrane cofactor protein, and factor B binding and functional sites in the third complement component. *J Immunol.* 1996;156(12):4821-4832.
46. Ziccardi RJ, Dahlback B, Müller-Eberhard HJ. Characterization of the interaction of human C4b-binding protein with physiological ligands. *J Biol Chem.* 1984;259(22):13674-13679.
47. Dahlbäck B, Smith CA, Müller-Eberhard HJ. Visualization of human C4b-binding protein

- and its complexes with vitamin K-dependent protein S and complement protein C4b. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(11):3461-3465. doi:10.1073/pnas.80.11.3461.
48. Delvaeye M, Noris M, De Vriese A, et al. Thrombomodulin mutations in atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*. 2009;361(4):345-357. doi:10.1056/NEJMoa0810739.
 49. Rayes J, Roumenina LT, Dimitrov JD, et al. The interaction between factor H and VWF increases factor H cofactor activity and regulates VWF prothrombotic status. *Blood*. 2014;123(1):121-125. doi:10.1182/blood-2013-04-495853.
 50. Nemerow GR, Yamamoto KI, Lint TF. Restriction of complement-mediated membrane damage by the eighth component of complement: a dual role for C8 in the complement attack sequence. *J Immunol*. 1979;123(3):1245-1252.
 51. Hadders MA, Bubeck D, Roversi P, et al. Assembly and regulation of the membrane attack complex based on structures of C5b6 and sC5b9. *Cell Rep*. 2012;1(3):200-207. doi:10.1016/j.celrep.2012.02.003.
 52. Preissner KP, Podack ER, Müller-Eberhard HJ. SC5b-7, SC5b-8 and SC5b-9 complexes of complement: ultrastructure and localization of the S-protein (vitronectin) within the macromolecules. *Eur J Immunol*. 1989;19(1):69-75. doi:10.1002/eji.1830190112.
 53. Tschopp J, Chonn A, Hertig S, French LE. Clusterin, the human apolipoprotein and complement inhibitor, binds to complement C7, C8 beta, and the b domain of C9. *J Immunol*. 1993;151(4):2159-2165.
 54. Fletcher CM, Harrison RA, Lachmann PJ, Neuhaus D. Structure of a soluble, glycosylated form of the human complement regulatory protein CD59. *Structure*. 1994;2(3):185-199. doi:10.1016/s0969-2126(00)00020-4.
 55. Leath KJ, Johnson S, Roversi P, et al. High-resolution structures of bacterially expressed soluble human CD59. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2007;63(Pt 8):648-652. doi:10.1107/S1744309107033477.
 56. Farkas I, Baranyi L, Ishikawa Y, et al. CD59 blocks not only the insertion of C9 into MAC but inhibits ion channel formation by homologous C5b-8 as well as C5b-9. *J Physiol*. 2002;539(Pt 2):537-545. doi:10.1113/jphysiol.2001.013381.
 57. Meri S, Morgan BP, Davies A, et al. Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunology*. 1990;71(1):1-9.
 58. Huang Y, Qiao F, Abagyan R, Hazard S, Tomlinson S. Defining the CD59-C9 binding interaction. *J Biol Chem*. 2006;281(37):27398-27404. doi:10.1074/jbc.M603690200.
 59. Lovelace LL, Cooper CL, Sodetz JM, Lebioda L. Structure of human C8 protein provides

- mechanistic insight into membrane pore formation by complement. *J Biol Chem*. 2011;286(20):17585-17592. doi:10.1074/jbc.M111.219766.
60. Wickham SE, Hotze EM, Farrand AJ, et al. Mapping the intermedilysin-human CD59 receptor interface reveals a deep correspondence with the binding site on CD59 for complement binding proteins C8alpha and C9. *J Biol Chem*. 2011;286(23):20952-20962. doi:10.1074/jbc.M111.237446.
 61. Scolding NJ, Morgan BP, Houston WA, Linington C, Campbell AK, Compston DA. Vesicular removal by oligodendrocytes of membrane attack complexes formed by activated complement. *Nature*. 1989;339(6226):620-622. doi:10.1038/339620a0.
 62. Moskovich O, Fishelson Z. Live cell imaging of outward and inward vesiculation induced by the complement c5b-9 complex. *J Biol Chem*. 2007;282(41):29977-29986. doi:10.1074/jbc.M703742200.
 63. Morgan BP, Dankert JR, Esser AF. Recovery of human neutrophils from complement attack: removal of the membrane attack complex by endocytosis and exocytosis. *J Immunol* (1987) 1950(138):246–53.
 64. Bossi F, Fischetti F, Pellis V, Bulla R, Ferrero E, Mollnes TE, et al. Platelet-activating factor and kinin-dependent vascular leakage as a novel functional activity of the soluble terminal complement complex. *J Immunol* (2004) 1950(173):6921–7. doi:10.4049/jimmunol.173.11.6921.
 65. Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, Glennie MJ. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr Dir Autoimmun*. 2005;8:140-174. doi:10.1159/000082102.
 66. Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, Schlossman SF. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J Immunol*. 1980;125(4):1678-1685.
 67. Glennie MJ, French RR, Cragg MS, Taylor RP. Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol Immunol*. 2007;44(16):3823-3837. doi:10.1016/j.molimm.2007.06.151.
 68. Polyak MJ, Li H, Shariat N, Deans JP. CD20 homo-oligomers physically associate with the B cell antigen receptor. Dissociation upon receptor engagement and recruitment of phosphoproteins and calmodulin-binding proteins. *J Biol Chem*. 2008;283(27):18545-18552. doi:10.1074/jbc.M800784200.
 69. Uchida J, Lee Y, Hasegawa M, et al. Mouse CD20 expression and function. *Int Immunol*. 2004;16(1):119-129. doi:10.1093/intimm/dxh009.
 70. Plosker GL, Figgitt DP. Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs*. 2003;63(8):803-843. doi:10.2165/00003495-

200363080-00005.

71. Herold M, Haas A, Srock S, et al. Rituximab added to first-line mitoxantrone, chlorambucil, and prednisolone chemotherapy followed by interferon maintenance prolongs survival in patients with advanced follicular lymphoma: an East German Study Group Hematology and Oncology Study. *J Clin Oncol*. 2007;25(15):1986-1992. doi:10.1200/JCO.2006.06.4618.
72. Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood*. 2005;106(12):3725-3732. doi:10.1182/blood-2005-01-0016.
73. van Oers MH, Klasa R, Marcus RE, et al. Rituximab maintenance improves clinical outcome of relapsed/resistant follicular non-Hodgkin lymphoma in patients both with and without rituximab during induction: results of a prospective randomized phase 3 intergroup trial. *Blood*. 2006;108(10):3295-3301. doi:10.1182/blood-2006-05-021113.
74. Forstpointner R, Dreyling M, Repp R, et al. The addition of rituximab to a combination of fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone (FCM) significantly increases the response rate and prolongs survival as compared with FCM alone in patients with relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood*. 2004;104(10):3064-3071. doi:10.1182/blood-2004-04-1323.
75. Marcus R, Imrie K, Belch A, et al. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood*. 2005;105(4):1417-1423. doi:10.1182/blood-2004-08-3175.
76. Fowler NH. Role of maintenance rituximab (rituxan) therapy in the treatment of follicular lymphoma. *P T*. 2011;36(9):590-598.
77. Vidal L, Gafter-Gvili A, Leibovici L, Shpilberg O. Rituximab as maintenance therapy for patients with follicular lymphoma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;(2):CD006552. Published 2009 Apr 15. doi:10.1002/14651858.CD006552.pub2.
78. Salles G, Seymour JF, Offner F, et al. Rituximab maintenance for 2 years in patients with high tumour burden follicular lymphoma responding to rituximab plus chemotherapy (PRIMA): a phase 3, randomised controlled trial [published correction appears in *Lancet*. 2011 Apr 2;377(9772):1154]. *Lancet*. 2011;377(9759):42-51. doi:10.1016/S0140-6736(10)62175-7.

79. Martinelli G, Schmitz SF, Utiger U, et al. Long-term follow-up of patients with follicular lymphoma receiving single-agent rituximab at two different schedules in trial SAKK 35/98. *J Clin Oncol.* 2010;28(29):4480-4484. doi:10.1200/JCO.2010.28.4786.
80. van Oers MH, Van Glabbeke M, Giurgea L, et al. Rituximab maintenance treatment of relapsed/resistant follicular non-Hodgkin's lymphoma: long-term outcome of the EORTC 20981 phase III randomized intergroup study. *J Clin Oncol.* 2010;28(17):2853-2858. doi:10.1200/JCO.2009.26.5827.
81. Forstpointner R, Unterhalt M, Dreyling M, et al. Maintenance therapy with rituximab leads to a significant prolongation of response duration after salvage therapy with a combination of rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone (R-FCM) in patients with recurring and refractory follicular and mantle cell lymphomas: Results of a prospective randomized study of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Blood.* 2006;108(13):4003-4008. doi:10.1182/blood-2006-04-016725.
82. Tilly H, Dreyling M; ESMO Guidelines Working Group. Diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2010;21 Suppl 5:v172-v174. doi:10.1093/annonc/mdq203.
83. Eichhorst B, Dreyling M, Robak T, Montserrat E, Hallek M; ESMO Guidelines Working Group. Chronic lymphocytic leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2011;22 Suppl 6:vi50-vi54. doi:10.1093/annonc/mdr377.
84. Dreyling M, Ghielmini M, Rule S, et al. Newly diagnosed and relapsed follicular lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2021;32(3):298-308. doi:10.1016/j.annonc.2020.11.008.
85. Wierda WG, Kipps TJ, Mayer J, et al. Ofatumumab as single-agent CD20 immunotherapy in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia [published correction appears in *J Clin Oncol.* 2010 Aug 1;28(22):3670]. *J Clin Oncol.* 2010;28(10):1749-1755. doi:10.1200/JCO.2009.25.3187.
86. Lemery SJ, Zhang J, Rothmann MD, et al. U.S. Food and Drug Administration approval: ofatumumab for the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia refractory to fludarabine and alemtuzumab. *Clin Cancer Res.* 2010;16(17):4331-4338. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0570.
87. Illidge T, Morschhauser F. Radioimmunotherapy in follicular lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011;24(2):279-293. doi:10.1016/j.beha.2011.03.005
88. Genentech, Inc. Highlights of prescribing information. GAZYVA® (obinutuzumab)

- injection, for intravenous use. Initial US approval: 2013. South San Francisco, CA: Genentech, Inc; 2017. dostęp [18.01.2025] : https://www.gene.com/download/pdf/gazyva_prescribing.pdf.
89. AbbVie Inc. AbbVie announces US FDA approval of Imbruvica (ibrutinib) plus obinutuzumab (Gazyva) - first chemotherapy-free, anti-CD20 combination regimen approved for chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic leukemia (CLL/SLL) in previously untreated patients. North Chicago, IL: AbbVie Inc; 2019. Accessed [18.01.2025]. Available from: <https://news.abbvie.com/news/abbvie-announces-us-fda-approval-imbruvica-ibrutinib-plus-obinutuzumab-gazyva-first-chemotherapy-free-anti-cd20-combination-regimen-approved-for-chronic-lymphocytic-leukemia-small-lymphocytic-lymphoma-cllsll-in-previously-untreated-pati.htm>.
 90. Sharman JP, Egyed M, Jurczak W, et al. Acalabrutinib with or without obinutuzumab versus chlorambucil and obinutuzumab for treatment-naïve chronic lymphocytic leukaemia (ELEVATE TN): a randomised, controlled, phase 3 trial [published correction appears in *Lancet*. 2020 May 30;395(10238):1694. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31018-7]. *Lancet*. 2020;395(10232):1278-1291. doi:10.1016/S0140-6736(20)30262-2.
 91. Woyach JA, Blachly JS, Rogers KA, et al. Acalabrutinib plus Obinutuzumab in Treatment-Naïve and Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Discov*. 2020;10(3):394-405. doi:10.1158/2159-8290.CD-19-1130.
 92. Cheson BD, Sharman JP. Current Approaches and Novel Agents in the Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia. *JCO Oncol Pract*. 2024;20(10):1360-1366. doi:10.1200/OP.23.00770.
 93. Janssen Biotech Inc. Highlights of prescribing information. IMBRUVICA® (ibrutinib). Horsham, PA: Janssen Biotech Inc; 2019. Accessed [18.01.2025]. Available from: <https://imbruvica.com/files/prescribing-information.pdf>.
 94. European Medicines Agency. Gazyvaro (obinutuzumab) summary of product characteristics. Amsterdam, The Netherlands: European Medicines Agency; 2019. dostęp [18.01.2025]: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/gazyvaro>.
 95. F. Hoffmann-La Roche Ltd. European Commission approves Venclyxto plus Gazyvaro for adults with previously untreated chronic lymphocytic leukaemia. Basel, Switzerland: F. Hoffmann-La Roche Ltd; 2020. dostęp [18.01.2025]: <https://www.roche.com/media/releases/med-cor-2020-03-12.htm>.
 96. Goede V, Klein C, Stilgenbauer S. Obinutuzumab (GA101) for the treatment of chronic lymphocytic leukemia and other B-cell non-hodgkin's lymphomas: a glycoengineered type

- II CD20 antibody. *Oncol Res Treat.* 2015;38(4):185-192. doi:10.1159/000381524.
97. Mössner E, Brünker P, Moser S, et al. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood.* 2010;115(22):4393-4402. doi:10.1182/blood-2009-06-225979.
 98. Niederfellner G, Lammens A, Mundigl O, et al. Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies. *Blood.* 2011;118(2):358-367. doi:10.1182/blood-2010-09-305847.
 99. Klein C, Lammens A, Schäfer W, et al. Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties. *MAbs.* 2013;5(1):22-33. doi:10.4161/mabs.22771.
 100. Lim SH, Beers SA, French RR, Johnson PW, Glennie MJ, Cragg MS. Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives. *Haematologica.* 2010;95(1):135–143. doi:10.3324/haematol.2008.001628. PMID:19773256.
 101. v Alduaij W, Ivanov A, Honeychurch J, Cheadle EJ, Potluri S, Lim SH, et al. Novel type II anti-CD20 monoclonal antibody (GA101) evokes homotypic adhesion and actin-dependent, lysosome-mediated cell death in B-cell malignancies. *Blood.* 2011;117(17):4519–4529. doi:10.1182/blood-2010-07-296913. PMID:21378274increasing.
 102. Chan HT, Hughes D, French RR, Tutt AL, Walshe CA, Teeling JL, et al. CD20-induced lymphoma cell death is independent of both caspases and its redistribution into Triton X-100 insoluble membrane rafts. *Cancer Res.* 2003;63(17):5480–5489. PMID:14500384.
 103. Deans JP, Robbins SM, Polyak MJ, Savage JA. Rapid redistribution of CD20 to a low density detergent-insoluble membrane compartment. *J Biol Chem.* 1998;273(1):344–348. doi:10.1074/jbc.273.1.344. PMID:9417086.
 104. Polyak MJ, Deans JP. Alanine-170 and proline-172 are critical determinants for extracellular CD20 epitopes; heterogeneity in the fine specificity of CD20 monoclonal antibodies is defined by additional requirements imposed by both amino acid sequence and quaternary structure. *Blood.* 2002;99(9):3256–3262. doi:10.1182/blood.V99.9.3256. PMID:11964291.
 105. Cragg MS, Morgan SM, Chan HT, Morgan BP, Filatov AV, Johnson PW, et al. Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood.* 2003;101(3):1045–1052. doi:10.1182/blood-2002-06-1761. PMID:12393541.
 106. Cragg MS, Glennie MJ. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood.* 2004;103(7):2738–2743. doi:10.1182/blood-2003-06-2031.

PMID:14551143.

107. Teeling JL, French RR, Cragg MS, van den Brakel J, Pluyter M, Huang H, et al. Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 2004;104(6):1793–1800. doi:10.1182/blood-2004-01-0039. PMID:15172969.
108. Cragg MS. CD20 antibodies: doing the time warp. *Blood*. 2011;118(2):219–220. doi:10.1182/blood-2011-04-346700. PMID:21757627.
109. Ivanov A, Beers SA, Walshe CA, Honeychurch J, Alduaij W, Cox KL, et al. Monoclonal antibodies directed to CD20 and HLA-DR can elicit homotypic adhesion followed by lysosome-mediated cell death in human lymphoma and leukemia cells. *J Clin Invest*. 2009;119(8):2143–2159. PMID:19620786.
110. Jak M, van Bochove G, Klein C, Umana P, Eldering E, Van Oers MHJ. CD40 stimulation sensitizes CLL cells to CD20-triggered cell death by rituximab and GA101 via a different mechanism. *Blood*. 2011;118(19):5178–5188.
111. Gogesch P, Dudek S, van Zandbergen G, Waibler Z, Anzaghe M. The Role of Fc Receptors on the Effectiveness of Therapeutic Monoclonal Antibodies. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16):8947. Published 2021 Aug 19. doi:10.3390/ijms22168947.
112. Cartron G, Watier H, Golay J, Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood*. 2004;104(9):2635–2642. doi:10.1182/blood-2004-03-1110. PMID:15226177.
113. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*. 2002;99(3):754–758. doi:10.1182/blood.V99.3.754. PMID:11806974.
114. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M. Fc γRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc γRIIIa, independently of the Fc γRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood*. 1997;90(3):1109–1114. PMID:9242542.
115. Ferrara C, Stuart F, Sondermann P, Brünker P, Umaña P. The carbohydrate at FcγRIIIa Asn-162: an element required for high affinity binding to non-fucosylated IgG glycoforms. *J Biol Chem*. 2006;281(8):5032–5036. doi:10.1074/jbc.M510171200. PMID:16330541.
116. Bowles JA, Wang SY, Link BK, Allan B, Beuerlein G, Campbell MA, et al. Anti-CD20 monoclonal antibody with enhanced affinity for CD16 activates NK cells at lower

- concentrations and more effectively than rituximab. *Blood*. 2006;108(8):2648–2654. doi:10.1182/blood-2006-04-020057. PMID:16825493.
117. Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2003;21(21):3940–3947. doi:10.1200/JCO.2003.05.013. PMID:12975461.
 118. Campbell MJ, Pound JD, Morgan BP, et al. Mechanisms of action of anti-CD20 antibodies in B-cell lymphoma: tumor burden dictates the contribution of complement-dependent cytotoxicity. *Blood*. 2011;118(26):7279–7288. doi:10.1182/blood-2011-06-358614.
 119. Beers SA, Chan CHT, James S, et al. Type II (tositumomab) anti-CD20 monoclonal antibody outperforms type I (rituximab-like) reagents in B-cell depletion regardless of complement activation. *Blood*. 2008;112(10):4170–4177.
 120. Beers SA, French RR, Chan HT, Lim SH, Jarrett TC, Vidal RM, et al. Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection. *Blood*. 2010;115(25):5191–5201. doi:10.1182/blood-2010-01-263533. PMID:20223920.
 121. Lim SH, Vaughan AT, Ashton-Key M, Williams EL, Dixon SV, Chan HT, et al. Fc gamma receptor IIb on target B cells promotes rituximab internalization and reduces clinical efficacy. *Blood*. 2011;118(9):2530–2540. doi:10.1182/blood-2011-01-330357. PMID:21768293.
 122. Okrój M, Österborg A, Blom AM. Effector mechanisms of anti-CD20 monoclonal antibodies in B cell malignancies. *Cancer Treat Rev*. 2013;39(6):632–639.
 123. Kumar A, Planchais C, Fronzes R, Mouquet H, Reyes N. Binding mechanisms of therapeutic antibodies to human CD20. *Science*. 2020;369(6506):793–799.
 124. Oostindie SC, Van Der Horst HJ, Kil LP, Strumane K, Overdijk MB, van den Brink EN, van den Brakel JHN, Rademaker HJ, Van Kessel B, van den Noort J, 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.
 125. Kuźniewska A, Majeranowski A, Henry S, et al. The Acquisition of Complement-Dependent Cytotoxicity by the Type II Anti-CD20 Therapeutic Antibody Obinutuzumab. *Cancers (Basel)*. 2023;16(1):49. Published 2023 Dec 21. doi:10.3390/cancers16010049.
 126. Winiarska M, Głodkowska-Mrowka E, Bil J, et al. Molecular mechanisms of the antitumor effects of anti-CD20 antibodies. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011;16:277–306.

127. Li Y, Huang K, Liu L, et al. Effects of complement and serum IgG on rituximab-dependent natural killer cell-mediated cytotoxicity against Raji cells. *Oncol Lett.* 2019;17(1):339–347.
128. van Meerten T, van Rijn RS, Hol S, et al. Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin Cancer Res.* 2006;12(13):4027–4035. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0066.
129. Wang SY, Racila E, Taylor RP, Weiner GJ. NK-cell activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity induced by rituximab-coated target cells is inhibited by the C3b component of complement. *Blood.* 2008;111(3):1456–1463. doi:10.1182/blood-2007-09-114934.
130. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 2010;20(1):34–50.
131. Ehlenberger AG, Nussenzweig V. The role of membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis. *J Exp Med.* 1977;145(2):357–371.
132. Shushakova N, Skokowa J, Schulman J, Baumann U, Zwirner J, Schmidt RE, Gessner JE. C5a anaphylatoxin is a major regulator of activating versus inhibitory FcγR in immune complex-induced lung disease. *J Clin Invest.* 2002;110(12):1823–1830.
133. Sacks SH. Complement fragments C3a and C5a: the salt and pepper of the immune response. *Eur J Immunol.* 2010;40(3):668–670.
134. Flieger D, Renoth S, Beier I, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf I. Mechanism of cytotoxicity induced by chimeric mouse-human monoclonal antibody IDEC-C2B8 in CD20-expressing lymphoma cell lines. *Cell Immunol.* 2000;204(1):55–63.
135. Ryan J, Letai A. Apoptotic Blocks in Primary Non-Hodgkin B Cell Lymphomas Identified by BH3 Profiling. *Front Oncol.* 2021;11:641317. doi:10.3389/fonc.2021.641317.
136. van Meerten T, van Rijn RS, Hol S, Hagenbeek A, Ebeling SB. Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin Cancer Res.* 2006;12(13):4027–4035.
137. van Meerten T, van Rijn RS, Hol S, et al. Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin Cancer Res.* 2006;12(13):4027–4035. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0066.
138. Di Gaetano N, Cittera E, Nota R, et al. Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J Immunol.* 2003;171(3):1581–1587.

doi:10.4049/jimmunol.171.3.1581.

139. Winkler U, Jensen M, Manzke O, Schulz H, Diehl V, Engert A. Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab, IDEC-C2B8). *Blood*. 1999;94(7):2217–2224.
140. Kennedy AD, Beum PV, Solga MD, DiLillo DJ, Lindorfer MA, Hess CE, Densmore JJ, Williams ME, Taylor RP. Rituximab infusion promotes rapid complement depletion and acute CD20 loss in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol*. 2004;172(5):3280–3288.
141. Afshar-Kharghan V. The role of the complement system in cancer. *J Clin Invest*. 2017;127(3):780–789.
142. Jeon H, Han S, Lee S, et al. Activation of the complement system in an osteosarcoma cell line promotes angiogenesis through enhanced production of growth factors. *Sci Rep*. 2018;8:5415.
143. Bellosillo B, Villamor N, Lopez-Guillermo A, Marce S, Esteve J, Campo E, Colomer D, Montserrat E. Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated in vitro by a caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species. *Blood*. 2001;98(9):2771–2777.
144. Golay J, Lazzari M, Facchinetti V, Bernasconi S, Borleri G, Barbui T, Rambaldi A, Introna M. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood*. 2001;98(11):3383–3389.
145. Weng WK, Levy R. Expression of complement inhibitors CD46, CD55, and CD59 on tumor cells does not predict clinical outcome after rituximab treatment in follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2001;98(5):1352–1357.
146. Manches O, Lui G, Chaperot L, et al. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 2003;101(3):949–954.
147. Harjunpää A, Junnikkala S, Meri S. Rituximab (anti-CD20) therapy of B-cell lymphomas: direct complement killing is superior to cellular effector mechanisms. *Scand J Immunol*. 2000;51(6):634–641.
148. Treon SP, Mitsiades C, Mitsiades N, et al. Tumor cell expression of CD59 is associated with resistance to CD20 serotherapy in patients with B-cell malignancies. *J Immunother*. 2001;24(3):263–271.
149. Idusogie EE, Wong PY, Presta LG, et al. Engineered antibodies with increased activity to recruit complement. *J Immunol*. 2001;166(4):2571–2575.

150. Idusogie EE, Presta LG, Gazzano-Santoro H, et al. Mapping of the C1q binding site on Rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J Immunol.* 2000;164(8):4178–4184.
151. van der Kolk LE, Grillo-Lopez AJ, Baars JW, Hack CE, van Oers MH. Complement activation plays a key role in the side-effects of rituximab treatment. *Br J Haematol.* 2001;115(4):807-811.
152. Bannerji R, Kitada S, Flinn IW, et al. Apoptotic-regulatory and complement-protecting protein expression in chronic lymphocytic leukemia: relationship to in vivo rituximab resistance. *J Clin Oncol.* 2003;21(8):1466-1471.
153. Dalle S, Dupire S, Brunet-Manquat S, Reslan L, Plesa A, Dumontet C. In vivo model of follicular lymphoma resistant to rituximab. *Clin Cancer Res.* 2009;15(3):851-857.
154. van der Kolk LE, Grillo-Lopez AJ, Baars JW, Hack CE, van Oers MH. Complement activation plays a key role in the side-effects of rituximab treatment. *Br J Haematol.* 2001;115(4):807-811.
155. Wang SY, Veeramani S, Racila E, et al. Depletion of the C3 component of complement enhances the ability of rituximab-coated target cells to activate human NK cells and improves the efficacy of monoclonal antibody therapy in an in vivo model. *Blood.* 2009;114(26):5322-5330. doi:10.1182/blood-2009-01-200469
156. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, et al. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγR. *J Biol Chem.* 2001;276(9):6591–6604. doi:10.1074/jbc.M009483200.
157. Wright A, Morrison SL. Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering. *Trends Biotechnol.* 1997;15:26–32.
158. Davies J, Jiang L, Pan LZ, LaBarre MJ, Anderson D, Reff M. Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FcγRIII. *Biotechnol Bioeng.* 2001;74:288–294.
159. Umana P, Jean-Mairet J, Moudry R, Amstutz H, Bailey JE. Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat Biotechnol.* 1999;17:176–180.
160. Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, et al. The absence of fucose, but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine, on human IgG1 complex-type oligosaccharides is critical for enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem.* 2003;278:3466-3473

161. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:133–146.
162. Wing EJ, Magee DM, Whiteside TL, Kaplan SS, Shadduck RK. Recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor enhances monocyte cytotoxicity and secretion of tumor necrosis factor alpha and interferon in cancer patients. *Blood*. 1989;73:643–646.
163. Herberman RB, Ortaldo JR, Mantovani A, Hobbs DS, Kung HF, Pestka S. Effect of human recombinant interferon on cytotoxic activity of natural killer (NK) cells and monocytes. *Cell Immunol*. 1982;67:160–167.
164. Wilson S, Hurst D, Yuen A, et al. IL-2 mediated NK cell expansion correlates with clinical response to rituximab: results of two phase I trials of the combination of IL-2 and rituximab [abstract]. *Blood*. 2001;98:602a.
165. Ansell SM, Witzig TE, Kurtin PJ, et al. Phase 1 study of interleukin-12 in combination with rituximab in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2002;99:67–74.
166. Rossi JF, Yang LZ, Quittet P, et al. Rituximab and GM-CSF, an effective therapy for relapsed/refractory patients with low-grade B-cell lymphoma: correlation between response and dendritic cell subpopulation mobilized [abstract]. *Blood*. 2001;98:607a.
167. Yang R, Fu D, Liao A. The role of complement in tumor immune tolerance and drug resistance: a double-edged sword. *Front Immunol*. 2025;16:1529184. doi:10.3389/fimmu.2025.1529184.
168. West EE, Kemper C. Complosome – the intracellular complement system. *Nat Rev Nephrol*. 2023;19:426–439. doi:10.1038/s41581-023-00704-1.
169. Bujko K, Brzenziakiewicz-Janus K, Kucia M, Ratajczak MZ. Intracellular complement (Complosome) is expressed in several types of human adult bone marrow-derived stem cells. *Stem Cell Rev Rep*. 2024;20:437–439. doi:10.1007/s12015-023-10650-x.
170. Chen X, Zhao Z, Jiang X, Li J, Miao F, Yu H, et al. The complement component 4 binding protein alpha gene: A versatile immune gene that influences lipid metabolism in bovine mammary epithelial cell lines. *Int J Mol Sci*. 2024;25:2375. doi:10.3390/ijms25042375.
171. Kolev M, Dimeloe S, Le Friec G, Navarini A, Arbore G, Povoleri GA, et al. Complement regulates nutrient influx and metabolic reprogramming during Th1 cell responses. *Immunity*. 2015;42:1033–1047. doi:10.1016/j.immuni.2015.05.024.
172. Ratajczak MZ, Adamiak M, Abdelbaset-Ismail A, Bujko K, Thapa A, Chumak V, et al.

- Intracellular complement (complosome) is expressed in hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) and regulates cell trafficking, metabolism and proliferation in an intracrine Nlrp3 inflammasome-dependent manner. *Leukemia*. 2023;37:1401–1405. doi:10.1038/s41375-023-01894-0.
173. King BC, Kulak K, Krus U, Rosberg R, Golec E, Wozniak K, et al. Complement component C3 is highly expressed in human pancreatic islets and prevents beta cell death via ATG16L1 interaction and autophagy regulation. *Cell Metab*. 2019;29:202–210. doi:10.1016/j.cmet.2018.09.009.
 174. Kremlitzka M, Nowacka AA, Mohlin FC, Bompada P, De Marinis Y, Blom AM. Interaction of serum-derived and internalized C3 with DNA in human B cells: a potential involvement in regulation of gene transcription. *Front Immunol*. 2019;10:493. doi:10.3389/fimmu.2019.00493.
 175. Arbore G, West EE, Rahman J, Le Friec G, Niyonzima N, Pirooznia M, et al. Complement receptor CD46 co-stimulates optimal human CD8(+) T cell effector function via fatty acid metabolism. *Nat Commun*. 2018;9:4186. doi:10.1038/s41467-018-06706-z
 176. Yang R, Fu D, Liao A. The role of complement in tumor immune tolerance and drug resistance: a double-edged sword. *Front Immunol*. 2025;16:1529184. doi:10.3389/fimmu.2025.1529184.
 177. van der Touw W, Cravedi P, Kwan WH, Paz-Artal E, Merad M, Heeger PS. Cutting edge: Receptors for C3a and C5a modulate stability of alloantigen-reactive induced regulatory T cells. *J Immunol*. 2013;190(12):5921–5925. doi:10.4049/jimmunol.1300847.
 178. Torok K, Dezso B, Bencsik A, Uzonyi B, Erdei A. Complement receptor type 1 (CR1/CD35) expressed on activated human CD4⁺ T cells contributes to generation of regulatory T cells. *Immunol Lett*. 2015;164(2):117–124. doi:10.1016/j.imlet.2015.02.009.
 179. Kwak JW, Laskowski J, Li HY, McSharry MV, Sippel TR, Bullock BL, et al. Complement activation via a C3a receptor pathway alters CD4⁺ T lymphocytes and mediates lung cancer progression. *Cancer Res*. 2018;78(1):143–156. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-0240.
 180. Lu Y, Zhao Q, Liao JY, Song E, Xia Q, Pan J, et al. Complement signals determine opposite effects of B cells in chemotherapy-induced immunity. *Cell*. 2020;180(6):1081–1097. doi:10.1016/j.cell.2020.02.018.
 181. Bandini S, Macagno M, Hysi A, Lanzardo S, Conti L, Bello A, Riccardo F, Rui R, Merighi IF, Forni G, et al. The non-inflammatory role of C1q during Her2/neu-driven mammary carcinogenesis. *Oncoimmunology*. 2016;5:e1253653.

doi:10.1080/2162402X.2016.1253653.

182. Hong Q, Sze CI, Lin SR, et al. Complement C1q activates tumor suppressor WWOX to induce apoptosis in prostate cancer cells. *PLoS One*. 2009;4(5):e5755. doi:10.1371/journal.pone.0005755.
183. Kaur A, Sultan SHA, Murugaiah V, et al. Human C1q induces apoptosis in an ovarian cancer cell line via tumor necrosis factor pathway. *Front Immunol*. 2016;7:599. doi:10.3389/fimmu.2016.00599.
184. Bulla R, Tripodo C, Rami D, et al. C1q acts in the tumour microenvironment as a cancer-promoting factor independently of complement activation. *Nat Commun*. 2016;7:10346.
185. Jackson WD, Gulino A, Fossati-Jimack L, et al. C3 drives inflammatory skin carcinogenesis independently of C5. *J Invest Dermatol*. 2020;140(10):e251–e253. doi:10.1016/j.jid.2020.02.042.
186. Laskowski J, Renner B, Pickering MC, Serkova NJ, Smith-Jones PM, Clambey ET, Nemenoff RA, Thurman JM. Complement factor H-deficient mice develop spontaneous hepatic tumors. *J Clin Invest*. 2020.
187. Riihilä P, Nissinen L, Farshchian M, et al. Complement factor I promotes progression of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol*. 2015;135(2):579–588. doi:10.1038/jid.2014.363.
188. Riihilä PM, Nissinen LM, Ala-Aho R, et al. Complement factor H: A biomarker for progression of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol*. 2014;134(2):498–506. doi:10.1038/jid.2013.352.
189. Arbore G, Kemper C, Kolev M. Intracellular complement — The complosome—In immune cell regulation. *Mol Immunol*. 2017;89:2–9. doi:10.1016/j.molimm.2017.05.017
190. Bouwens TAM, Trouw LA, Veerhuis R, Dirven CMF, Lamfers MLM, Al-Khawaja H. Complement activation in Glioblastoma multiforme pathophysiology: Evidence from serum levels and presence of complement activation products in tumor tissue. *J Neuroimmunol*. 2015;278:271–276.
191. Zhao P, Wu J, Lu F, Peng X, Liu C, Zhou N, Ying M. The imbalance in the complement system and its possible physiological mechanisms in patients with lung cancer. *BMC Cancer*. 2019;19:201.
192. Grzmil M, Voigt S, Thelen P, Hemmerlein B, Helmke K, Burfeind P. Up-regulated expression of the MAT-8 gene in prostate cancer and its siRNA-mediated inhibition of expression induces a decrease in proliferation of human prostate carcinoma cells. *Int J*

Oncol. 2004;24:97–105.

193. Oner F, Savaş I, Numanoğlu N. Immunoglobulins and complement components in patients with lung cancer. *Tuberk Toraks.* 2004;52:19–23.
194. Lu ZL, Chen YJ, Jing XY, Wang NN, Zhang T, Hu CJ. Detection and Identification of Serum Peptides Biomarker in Papillary Thyroid Cancer. *Med Sci Monit.* 2018;24:1581–1587.
195. Ajona D, Razquin C, Pastor MD, Pajares MJ, Garcia J, Cardenal F, et al. Elevated levels of the complement activation product C4d in bronchial fluids for the diagnosis of lung cancer. *PLoS One.* 2015;10:e0119878.
196. Ajona D, Okrój M, Pajares MJ, et al. Complement C4d-specific antibodies for the diagnosis of lung cancer. *Oncotarget.* 2018;9:6346–6355. doi:10.18632/oncotarget.23217
197. Kim PY, Tan O, Diakiw SM, Carter D, Sekerye EO, Wasinger VC, et al. Identification of plasma complement C3 as a potential biomarker for neuroblastoma using a quantitative proteomic approach. *J Proteom.* 2014;96:1–12.
198. Chen J, Wu W, Chen L, Ma X, Zhao Y, Zhou H, et al. Expression and clinical significance of AHSR and complement C3 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *National Medical Journal of China.* 2014;94:2175–2179.
199. Chen J, Wu W, Zhen C, Zhou H, Yang R, Chen L, et al. Expression and clinical significance of complement C3, complement C4b1 and apolipoprotein E in pancreatic cancer. *Oncol Lett.* 2013;6:43–48.
200. Zhang X, Sun L. Anaphylatoxin C3a: A potential biomarker for esophageal cancer diagnosis. *Mol Clin Oncol.* 2018;8:315–319.
201. Chung L, Moore K, Phillips L, Boyle FM, Marsh DJ, Baxter RC. Novel serum protein biomarker panel revealed by mass spectrometry and its prognostic value in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2014;16:R63.
202. Corrales L, Ajona D, Rafail S, Lasarte JJ, Riezu-Boj JI, Lambris JD, et al. Anaphylatoxin C5a creates a favorable microenvironment for lung cancer progression. *J Immunol.* 2012;189:4674–4683.
203. Chen J, Li GQ, Zhang L, Tang M, Cao X, Xu GL, Wu YZ. Complement C5a/C5aR pathway potentiates the pathogenesis of gastric cancer by down-regulating p21 expression. *Cancer Lett.* 2018;412:30–36.
204. Helmig S, Lochnit G, Schneider J. Comparative proteomic analysis in serum of former uranium miners with and without radon induced squamous lung cancer. *J Occup Med Toxicol.* 2019;14:9.

205. Pio R, Garcia J, Corrales L, Ajona D, Fleischhacker M, Pajares MJ, et al. Complement factor H is elevated in bronchoalveolar lavage fluid and sputum from patients with lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19:2665–2672.
206. Heicappell R, Müller M, Fimmers R, Miller K. Qualitative determination of urinary human complement factor H-related protein (hcfHrp) in patients with bladder cancer, healthy controls, and patients with benign urologic disease. *Urol Int.* 2000;65:181–184.
207. Narayanasamy A, Ahn JM, Sung HJ, Kong DH, Ha KS, Lee SY, et al. Fucosylated glycoproteomic approach to identify a complement component 9 associated with squamous cell lung cancer (SQLC). *J Proteom.* 2011;74:2948–2958.
208. Shang Y, Chai N, Gu Y, Ding L, Yang Y, Zhou J, et al. Systematic immunohistochemical analysis of the expression of CD46, CD55, and CD59 in colon cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138:910–919.
209. Swierzko AS, Szala A, Sawicki S, Szemraj J, Sniadecki M, Sokolowska A, et al. Mannose-Binding Lectin (MBL) and MBL-associated serine protease-2 (MASP-2) in women with malignant and benign ovarian tumours. *Cancer Immunol Immunother.* 2014;63:1129–1140.
210. Ytting H, Jensenius JC, Christensen IJ, Thiel S, Nielsen HJ. Increased activity of the mannan-binding lectin complement activation pathway in patients with colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol.* 2004;39:674–679.
211. Li W, Liu Z, Liang B, Chen S, Zhang X, Tong X, et al. Identification of core genes in ovarian cancer by an integrative meta-analysis. *J Ovarian Res.* 2018;11:94.
212. Kim YS, Hwan JD, Bae S, Bae DH, Shick WA. Identification of differentially expressed genes using an annealing control primer system in stage III serous ovarian carcinoma. *BMC Cancer.* 2010;10:576.
213. Liu W, Liu B, Xin L, et al. Down-regulated expression of complement factor I: A potential suppressive protein for gastric cancer identified by serum proteome analysis. *Clin Chim Acta.* 2007;377(1-2):119-126. doi:10.1016/j.cca.2006.09.010.
214. Lim LC, Looi ML, Zakaria SZS, et al. Identification of differentially expressed proteins in the serum of colorectal cancer patients using 2D-DIGE proteomics analysis. *Pathol Oncol Res.* 2016;22(2):169-177. doi:10.1007/s12253-015-9904-z.
215. Cerhan JR, Novak AJ, Fredericksen ZS, Wang AH, Liebow M, Call TG, et al. Risk of non-Hodgkin lymphoma in association with germline variation in complement genes. *Br J Haematol.* 2009;145(5):614-623. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07675.x.
216. Hu W, Bassig BA, Xu J, Zheng T, Zhang Y, Berndt SI, et al. Polymorphisms in pattern-

- recognition genes in the innate immunity system and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Environ Mol Mutagen*. 2013;54(1):72-77. doi:10.1002/em.21739.
217. Charbonneau B, Maurer MJ, Fredericksen ZS, Zent CS, Link BK, Novak AJ, et al. Germline variation in complement genes and event-free survival in follicular and diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Hematol*. 2012;87(9):880-885. doi:10.1002/ajh.23273.
 218. Racila E, Link BK, Weng WK, Witzig TE, Ansell S, Maurer MJ, et al. A polymorphism in the complement component C1qA correlates with prolonged response following rituximab therapy of follicular lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2008;14(20):6697–703. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0745.
 219. Dzietczenia J, Wrobel T, Mazur G, Poreba R, Jazwiec B, Kuliczkowski K. Expression of complement regulatory proteins: CD46, CD55, and CD59 and response to rituximab in patients with CD20+ non-Hodgkin's lymphoma. *Med Oncol*. 2010;27(3):743–6. doi:10.1007/s12032-009-9278-9.
 220. Roumenina LT, Daugan MV, Petitprez F, Sautès-Fridman C, Fridman WH. Context-dependent roles of complement in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(12):698–715. doi:10.1038/s41568-019-0210-0.
 221. Lee CH, Romain G, Yan W, Watanabe M, Charab W, Todorova B, et al. IgG Fc domains that bind C1q but not effector Fcγ receptors delineate the importance of complement-mediated effector functions. *Nat Immunol*. 2017;18(8):889–898. doi:10.1155/2019/6084012.
 222. Di Gaetano N, Cittera E, Nota R, Vecchi A, Grieco V, Scanziani E, et al. Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab *in vivo*. *J Immunol (Baltimore, Md: 1950)*. 2003;171(3):1581–1587. doi:10.1007/s12016-019-08741-0.
 223. Middleton O, Cosimo E, Dobbin E, McCaig AM, Clarke C, Brant AM, et al. Complement deficiencies limit CD20 monoclonal antibody treatment efficacy in CLL. *Leukemia* (2015) 29(1):107–14. doi: 10.1034/j.1600-0609.2000.80097.x.
 224. Tempescul A, Bagacean C, Riou C, Bendaoud B, Hillion S, Debant M, et al. Ofatumumab capacity to deplete B cells from chronic lymphocytic leukaemia is affected by C4 complement exhaustion. *Eur J Haematol* (2016) 96(3):229–35. doi: 10.4049/jimmunol.172.5.3280.
 225. Kennedy AD, Beum PV, Solga MD, DiLillo DJ, Lindorfer MA, Hess CE, et al. Rituximab infusion promotes rapid complement depletion and acute CD20 loss in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol (Baltimore Md 1950)* (2004) 172(5):3280–8. doi: 10.4049/jimmunol.172.5.3280.

226. Füst G, Czink E, Minh D, Miszlay Z, Varga L, Hollán SR. Depressed classical complement pathway activities in chronic lymphocytic leukaemia. *Clin Exp Immunol* (1985) 60(3):489–95.
227. Klepfish A, Gilles L, Ioannis K, Rachmilewitz EA, Schattner A. Enhancing the action of rituximab in chronic lymphocytic leukemia by adding fresh frozen plasma: complement/rituximab interactions & clinical results in refractory CLL. *Ann N Y Acad Sci* (2009) 1173:865–73. doi:10.1111/ejh.12573.
228. Golay J, Lazzari M, Facchinetti V, Bernasconi S, Borleri G, Barbui T, et al. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood* (2001) 98(12):3383–9. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04803.x.
229. Nijhof IS, Casneuf T, van Velzen J, van Kessel B, Axel AE, Syed K, et al. CD38 expression and complement inhibitors affect response and resistance to daratumumab therapy in myeloma. *Blood* (2016) 128(7):959–70. doi:10.1182/blood.V98.5.1352
230. MabThera | European Medicines Agency. 2023. dostęp [18.01.2025] <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/mabthera>
231. Lang DSP, Hagger C, Pearson A. Safety of rapid rituximab infusion in adult cancer patients: a systematic review. *Int J Nurs Pract*. 2011;17:357–69. doi: 10.1111/j.1440-172X.2011.01950.x.
232. Said R, Tsimberidou AM. Obinutuzumab for the treatment of chronic lymphocytic leukemia and other B-cell lymphoproliferative disorders. *Expert Opin Biol Ther*. 2017;17.
233. Majeranowski, A., Okrój, M. Regarding: A global anti-B cell strategy combining obinutuzumab and daratumumab in severe pediatric nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 36, 1651–1652 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00467-021-04981-5>.
234. Dossier C, Prim B, Moreau C, et al. A global antiB cell strategy combining obinutuzumab and daratumumab in severe pediatric nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2021;36(5):1175-1182. doi:10.1007/s00467-020-04811-0.
235. Tam C, Kuss B, Opat S, Boulos J, Marlton P. Management of patients with previously untreated chronic lymphocytic leukaemia with obinutuzumab and chlorambucil. *Intern Med J*. 2017;47(Suppl 4):5–10.
236. Schieber T, Li A, Lundberg J, Wiczer T, Voorhees T. Successful obinutuzumab administration after rituximab discontinuation due to intolerance in patients with hematologic disorders. *Blood Adv*. 2023;7:3431–4. doi:10.1182/bloodadvances.2022009548.

237. Makatsori M, Kiani-Alikhan S, Manson AL, Verma N, Leandro M, Gurugama NP, et al. Hypogammaglobulinaemia after rituximab treatment—incidence and outcomes. *QJM*. 2014;107(10):821–8. doi:10.1093/qjmed/hcu094.
238. Bennett JM, Kaminski MS, Leonard JP, et al. Assessment of treatment-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia in patients with non-Hodgkin lymphoma treated with tositumomab and iodine I 131 tositumomab. *Blood*. 2005;105(12):4576–4582
239. BEXXAR (tositumomab and iodine I 131 tositumomab) prescribing information. U.S. Food and Drug Administration; 2012. dostęp [18.01.2025] https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/125011s102lbl.pdf
240. Dabkowska A, Domka K, Firczuk M. Advancements in cancer immunotherapies targeting CD20: from pioneering monoclonal antibodies to chimeric antigen receptor-modified T cells. *Front Immunol*. 2024;15:1363102. doi:10.3389/fimmu.2024.1363102.
241. Ma J, Mo Y, Tang M, Shen J, Qi Y, Zhao W, et al. Bispecific antibodies: from research to clinical application. *Front Immunol*. 2021;12:626616. doi:10.3389/fimmu.2021.626616
242. Brinkmann U, Kontermann RE. The making of bispecific antibodies. *mAbs*. 2017;9:182–212.
243. Sun Y, Yu X, Wang X, Yuan K, Wang G, Hu L, et al. Bispecific antibodies in cancer therapy: target selection and regulatory requirements. *Acta Pharm Sin B*. 2023;13:3583–97. doi:10.1016/j.apsb.2023.05.023.
244. Atwell S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P. Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library. *J Mol Biol*. 1997;270(1):26–35. doi:10.1006/jmbi.1997.1116.
245. Schaefer W, Regula JT, Böhner M, et al. Immunoglobulin domain crossover as a generic approach for the production of bispecific IgG antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(27):11187–92. doi:10.1073/pnas.1019002108.
246. Klein C, Schaefer W, Regula JT. The use of CrossMAb technology for the generation of bi- and multispecific antibodies. *mAbs*. 2016;8(6):1010–20. doi:10.1080/19420862.2016.1198797.
247. Wu J, Fu J, Zhang M, Liu D. Blinatumomab: a bispecific T cell engager (BiTE) antibody against CD19/CD3 for refractory acute lymphoid leukemia. *J Hematol Oncol*. 2015;8:104. doi:10.1186/s13045-015-0195-4.
248. Tomarchio V, Rigacci L, Annibali O. CD20 × CD3 bispecific antibodies for large B cell lymphoma: latest updates from 2024 ASH annual meeting. *J Hematol Oncol*.

2025;18:46. doi:10.1186/s13045-025-01695-1.

249. Falchi L, Vardhana SA, Salles G. Bispecific antibodies: a new era of treatment for B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2023;141(5):467–477. doi:10.1182/blood.2021011994.
250. Budde LE, Assouline S, Sehn LH, et al. Single-agent mosunetuzumab shows durable complete responses in patients with relapsed or refractory B-cell lymphomas: phase I dose-escalation trial. *Blood*. 2022;139(3):337-349. doi:10.1182/blood.2021011818.
251. Bannerji R, Allan JN, Arnason JE, et al. Odronextamab, a human CD20×CD3 bispecific antibody in patients with CD20-positive B-cell malignancies (ELM-1): results from the phase 1 dose-escalation and expansion study. *Lancet Haematol*. 2022;9(11):e830-e842. doi:10.1016/S2352-3026(22)00237-0.
252. Falchi L, Vardhana SA, Salles GA. Bispecific antibodies for the treatment of B-cell lymphoma: promises, unknowns, and opportunities. *Blood*. 2023;141(5):467-480. doi:10.1182/blood.2021011994.
253. Lee DW, Santomasso BD, Locke FL, et al. ASTCT consensus grading for cytokine release syndrome and neurologic toxicity associated with immune effector cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25(4):625-638. doi:10.1016/j.bbmt.2018.12.758.
254. Lee DW, Gardner R, Porter DL, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood*. 2014;124(2):188-195. doi:10.1182/blood-2014-05-552729.
255. Parker KR, Migliorini D, Perkey E, et al. Single-cell analyses identify brain mural cells expressing CD19 as potential off-tumor targets for CAR-T immunotherapies. *Cell*. 2020;183(1):126-142.e17.
256. Hutchings M, Mous R, Clausen MR, et al. Dose escalation of subcutaneous epcoritamab in patients with relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma: an open-label, phase 1/2 study. *Lancet*. 2021;398(10306):1157-1169.
257. Hutchings M, Morschhauser F, Iacoboni G, et al. Glofitamab, a novel, bivalent CD20-targeting T-cell-engaging bispecific antibody, induces durable complete remissions in relapsed or refractory B-cell lymphoma: a phase I trial. *J Clin Oncol*. 2021;39(18):1959-1970.
258. Hosseini I, Gadkar K, Stefanich E, et al. Mitigating the risk of cytokine release syndrome in a phase I trial of CD20/CD3 bispecific antibody mosunetuzumab in NHL: impact of translational system modeling. *NPJ Syst Biol Appl*. 2020;6(1):28
259. Bartlett NL, Giri P, Budde LE, et al. Subcutaneous (SC) administration of

mosunetuzumab with cycle 1 step-up dosing is tolerable and active in patients with relapsed/refractory B-cell non-Hodgkin lymphomas (R/R B-NHL): initial results from a phase I/II study. *Blood*. 2021;138(suppl 1):3573.

260. Morschhauser F, Carlo-Stella C, Dickinson M, et al. Glofitamab as monotherapy and in combination with obinutuzumab induces high complete response rates in patients (pts) with multiple relapsed or refractory (R/R) follicular lymphoma (FL). *Blood*. 2021;138(suppl 1):128.
261. Bacac M, Colombetti S, Herter S, et al. CD20-TCB with Obinutuzumab Pretreatment as Next-Generation Treatment of Hematologic Malignancies. *Clin Cancer Res*. 2018;24(19):4785-4797. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0455.
262. Bacac M, Colombetti S, Herter S, et al. CD20-TCB with obinutuzumab pretreatment as next-generation treatment of hematologic malignancies. *Clin Cancer Res*. 2018;24(19):4785-4797.
263. Patel K, Michot J-M, Chanan-Khan A, et al. Safety and anti-tumor activity of plamotamab (XmAb13676), an anti-CD20 × anti-CD3 bispecific antibody, in subjects with relapsed/refractory non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 2021;138(suppl 1):2494.
264. Bannerji R, Arnason JE, Advani RH, et al. Odronextamab, a human CD20×CD3 bispecific antibody in patients with CD20-positive B-cell malignancies (ELM-1): results from the relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma cohort in a single-arm, multicentre, phase 1 trial. *Lancet Haematol*. 2022;9(5):e327-e339.
265. June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC. *CAR T cell immunotherapy for human cancer*. *Science*. 2018;359(6382):1361-1365. doi:10.1126/science.aar6711.
266. Lim WA, June CH. The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer. *Cell*. 2017;168(4):724-740. doi:10.1016/j.cell.2017.01.016.
267. Till BG, Jensen MC, Wang J, Qian X, Gopal AK, Maloney DG, et al. CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. *Blood*. 2012;119(17):3940-3950. doi:10.1182/blood-2011-10-387969.
268. Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov*. 2013;3(4):388-398.
269. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(5):439-448.
270. Ying Z, Huang XF, Xiang X, et al. A safe and potent anti-CD19 CAR T cell therapy. *J*

Hematol Oncol. 2019;12(1):1-13.

271. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, et al. Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy. *N Engl J Med.* 2017;377(26):2531-2544.
272. Ang Z, Paruzzo L, Hayer KE, Schmidt C, Torres Diz M, Xu F, et al. Alternative splicing of its 5'-UTR limits CD20 mRNA translation and enables resistance to CD20-directed immunotherapies. *Blood.* 2023;142(17):1724-1739. doi:10.1182/blood.2023020400.
273. Majzner RG, Mackall CL. Tumor antigen escape from CAR T-cell therapy. *Cancer Discovery.* 2018;8(10):1219-1226. doi:10.1158/2159-8290.CD-18-0442.
274. Zhang Y, Wang Y, Liu Y, Tong C, Wang C, Guo Y, et al. Long-term activity of tandem CD19/CD20 CAR therapy in refractory/relapsed B-cell lymphoma: a single-arm, phase 1-2 trial. *Leukemia.* 2022;36(1):189-196. doi:10.1038/s41375-021-01345-8.
275. Schneider D, Xiong Y, Wu D, Nölle V, Schmitz S, Haso W, et al. A tandem CD19/CD20 CAR lentiviral vector drives on-target and off-target antigen modulation in leukemia cell lines. *J Immunother Cancer.* 2017;5:42. doi:10.1186/s40425-017-0246-1.
276. Tong C, Zhang Y, Liu Y, Ji X, Zhang W, Guo Y, et al. Optimized tandem CD19/CD20 CAR-engineered T cells in refractory/relapsed B-cell lymphoma. *Blood.* 2020;136(14):1632-1644. doi:10.1182/blood.2020005278.
277. Larson SM, Walthers CM, Ji B, Ghafouri SN, Naparstek J, Trent J, et al. CD19/CD20 bispecific chimeric antigen receptor (CAR) in naive/memory T cells for the treatment of relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Discovery.* 2023;13(3):580-597. doi:10.1158/2159-8290.CD-22-0964.
278. Sang W, Shi M, Yang J, Cao J, Xu L, Yan D, et al. Phase II trial of coadministration of CD19- and CD20-targeted chimeric antigen receptor T cells for relapsed and refractory diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Med.* 2020;9(16):5827-5838. doi:10.1002/cam4.3259.
279. Fousek K, Watanabe J, Joseph SK, George A, An X, Byrd TT, et al. CAR T-cells that target acute B-lineage leukemia irrespective of CD19 expression. *Leukemia.* 2021;35(1):75-89. doi:10.1038/s41375-020-0792-2.
280. Tie Y, Tang F, Wei YQ, Wei XW. Immunosuppressive cells in cancer: mechanisms and potential therapeutic targets. *J Hematol Oncol.* 2022;15:61. doi:10.1186/s13045-022-01282-8.
281. Silveira CRF, Corveloni AC, Caruso SR, Macêdo NA, Brussolo NM, Haddad F, et al. Cytokines as an important player in the context of CAR-T cell therapy for cancer: their role

- in tumor immunomodulation, manufacture, and clinical implications. *Front Immunol.* 2022;13:947648. doi:10.3389/fimmu.2022.947648.
282. Martínez-Sabadell A, Morancho B, Rius Ruiz I, Román Alonso M, Ovejero Romero P, Escorihuela M, et al. The target antigen determines the mechanism of acquired resistance to T-cell-based therapies. *Cell Rep.* 2022;41:111430. doi:10.1016/j.celrep.2022.111430.
 283. Stasiłojć G, Österborg A, Blom AM, Okrój M. New perspectives on complement mediated immunotherapy. *Cancer Treat Rev.* 2016;45:68-75.
 284. Dodds AW, Law SK. The phylogeny and evolution of the complement system. *Immunol Rev.* 1998;166:1–19.
 285. Fishelson Z, Kirschfink M. Complement C2: structure, function, and genetics. In: *Molecular Aspects of the Complement System.* Springer; 2019:45–62.
 286. Fujita T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:346–353
 287. Kamata T, Liddington RC, Takada Y. Interaction between collagen and the alpha(2) I-domain of integrin alpha(2)beta(1). Critical role of conserved residues in the metal ion-dependent adhesion site (MIDAS) region. *J Biol Chem.* 1999;274(45):32108-32111. doi:10.1074/jbc.274.45.32108.
 288. Arlaud GJ, Volanakis JE, Thielens NM, Narayana SV, Rossi V, Xu Y. The atypical serine proteases of the complement system. *Adv Immunol.* 1998;69:249-307.
 289. Nagasawa S, Stroud RM. Cleavage of C2 by C1s into the antigenically distinct fragments C2a and C2b: demonstration of binding of C2b to C4b. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(7):2998-3001. doi:10.1073/pnas.74.7.2998.
 290. Xu Y, Volanakis JE. Contribution of the complement control protein modules of C2 in C4b binding assessed by analysis of C2/factor B chimeras. *J Immunol.* 1997;158(12):5958-5965.
 291. Norman DG, Barlow PN, Baron M, Day AJ, Sim RB, Campbell ID. Three-dimensional structure of a complement control protein module in solution. *J Mol Biol.* 1991;219(4):717-725. doi:10.1016/0022-2836(91)90666-t.
 292. Barlow PN, Steinkasserer A, Norman DG, et al. Solution structure of a pair of complement modules by nuclear magnetic resonance. *J Mol Biol.* 1993;232(1):268-284. doi:10.1006/jmbi.1993.1381.
 293. Soares DC, Barlow PN. Complement control protein modules in the regulators of complement activation. In: Morikis D, Lambris JD, eds. *Structural Biology of the Complement System.* Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2005:19-62.

294. Gilbert HE, Eaton JT, Hannan JP, Holers VM, Perkins SJ. Solution structure of the complex between CR2 SCR 1-2 and C3d of human complement: an X-ray scattering and sedimentation modelling study. *J Mol Biol.* 2005;346(3):859-873. doi:10.1016/j.jmb.2004.12.006.
295. Gilbert HE, Aslam M, Guthridge JM, Holers VM, Perkins SJ. Extended flexible linker structures in the complement chimaeric conjugate CR2-Ig by scattering, analytical ultracentrifugation and constrained modelling: implications for function and therapy. *J Mol Biol.* 2006;356(2):397-412. doi:10.1016/j.jmb.2005.11.050.
296. Horiuchi T, Macon KJ, Engler JA, Volanakis JE. Site-directed mutagenesis of the region around Cys-241 of complement component C2. Evidence for a C4b binding site. *J Immunol.* 1991;147(2):584-589.
297. Laich A, Sim RB. Complement C4bC2 complex formation: an investigation by surface plasmon resonance. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1544(1-2):96-112. doi:10.1016/s0167-4838(00)00208-9.
298. Krishnan V, Xu Y, Macon K, Volanakis JE, Narayana SV. The crystal structure of C2a, the catalytic fragment of classical pathway C3 and C5 convertase of human complement. *J Mol Biol.* 2007;367(1):224-233. doi:10.1016/j.jmb.2006.12.039.
299. Campbell RD, Bentley DR, Morley BJ. The factor B and C2 genes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1984;306(1129):367-378. doi:10.1098/rstb.1984.0097.
300. Bentley DR, Campbell RD. C2 and factor B: structure and genetics. *Biochem Soc Symp.* 1986;51:7-18.
301. Marinozzi MC, Vergoz L, Rybkine T, et al. Complement factor B mutations in atypical hemolytic uremic syndrome-disease-relevant or benign?. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(9):2053-2065. doi:10.1681/ASN.2013070796.
302. Hourcade DE, Mitchell LM, Oglesby TJ. Mutations of the type A domain of complement factor B that promote high-affinity C3b-binding. *J Immunol.* 1999;162(5):2906-2911.
303. Kuttner-Kondo LA, Dybvig MP, Mitchell LM, et al. A corresponding tyrosine residue in the C2/factor B type A domain is a hot spot in the decay acceleration of the complement C3 convertases. *J Biol Chem.* 2003;278(52):52386-52391. doi:10.1074/jbc.M304620200.
304. Urban A, Majeranowski A, Stasiłojć G, et al. In Silico Designed Gain-of-Function Variants of Complement C2 Support Cytocidal Activity of Anticancer Monoclonal Antibodies. *Cancers (Basel).* 2022;14(5):1270. Published 2022 Mar 1. doi:10.3390/cancers14051270.

305. Mortensen S, Jensen JK, Andersen GR. Solution Structures of Complement C2 and Its C4 Complexes Propose Pathway-specific Mechanisms for Control and Activation of the Complement Proconvertases. *J Biol Chem.* 2016;291(32):16494-16507. doi:10.1074/jbc.M116.722017.
306. Felberg A, Urban A, Borowska A, et al. Mutations resulting in the formation of hyperactive complement convertases support cytotoxic effect of anti-CD20 immunotherapeutics. *Cancer Immunol Immunother.* 2019;68(4):587-598. doi:10.1007/s00262-019-02304-0.
307. Loirat C, Frémeaux-Bacchi V. Atypical hemolytic uremic syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6:60. Published 2011 Sep 8. doi:10.1186/1750-1172-6-60.
308. Urban A, Kowalska D, Stasiłojć G, et al. Gain-of-Function Mutations R249C and S250C in Complement C2 Protein Increase C3 Deposition in the Presence of C-Reactive Protein. *Front Immunol.* 2021;12:724361. Published 2021 Nov 25. doi:10.3389/fimmu.2021.724361.
309. Majeranowski A, Stasiłojć G, Panasiuk N and Okrój M (2026) Selection of laboratory assays for reliable assessment of complement-dependent cytotoxicity: impact of assay choice on CDC quantification. *Front. Immunol.* 17:1786368. doi: 10.3389/fimmu.2026.1786368
310. Stasiłojć G, Österborg A, Blom AM, Okrój M. New perspectives on complement mediated immunotherapy. *Cancer Treat Rev.* 2016;45:68-75.
311. Ajona D, Cragg MS, Pio R. The complement system in clinical oncology: applications, limitations and challenges. *Semin Immunol.* 2024;77:101921.
312. Putheti P, Liwski RS, Jindra PT. Reducing number of laboratories performing complement dependent cytotoxicity crossmatching: reasons and conclusions. *Hum Immunol.* 2022;83(5):467-475.
313. Wong ZE, Downing J, De Santis D, et al. C3d-binding assay for the detection of complement activating HLA antibodies: a useful tool for allocation to highly sensitised recipients in the post-CDC era? *HLA.* 2023;102(1):13-27. doi:10.1111/tan.15010.
314. Felberg A, Taszner M, Urban A, et al. Monitoring of the Complement System Status in Patients With B-Cell Malignancies Treated With Rituximab. *Front Immunol.* 2020;11:584509. Published 2020 Nov 19. doi:10.3389/fimmu.2020.584509.
315. Cook EM, Lindorfer MA, van der Horst H, et al. Antibodies That Efficiently Form Hexamers upon Antigen Binding Can Induce Complement-Dependent Cytotoxicity under Complement-Limiting Conditions. *J Immunol.* 2016;197(5):1762-1775.

doi:10.4049/jimmunol.1600648.

316. Blom AM, Volokhina EB, Fransson V, et al. A novel method for direct measurement of complement convertases activity in human serum. *Clin Exp Immunol*. 2014;178(1):142-153. doi:10.1111/cei.12388.
317. Okroj M, Eriksson I, Österborg A, Blom AM. Killing of CLL and NHL cells by rituximab and ofatumumab under limited availability of complement. *Med Oncol*. 2013;30(4):759. doi:10.1007/s12032-013-0759-5.
318. Triantafilou K, Hughes TR, Triantafilou M, Morgan BP. The complement membrane attack complex triggers intracellular Ca²⁺ fluxes leading to NLRP3 inflammasome activation. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 13):2903-2913. doi:10.1242/jcs.124388.
319. Edelmann, J. et al. Rituximab and Obinutuzumab Induce Direct B-Cell Death Via B-Cell Receptor (BCR) Signaling, but Rituximab Elicits Stronger BCR-Derived Pro-Survival Signals Diminishing Apoptosis. *Blood* 134, 1579 (2021).
320. Lü L, Zhang L, Wai MS, Yew DT, Xu J. Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. *Toxicol In Vitro*. 2012;26(4):636-644. doi:10.1016/j.tiv.2012.02.006.
321. Luzak B, Siarkiewicz P, Boncler M. An evaluation of a new high-sensitivity PrestoBlue assay for measuring cell viability and drug cytotoxicity using EA.hy926 endothelial cells. *Toxicol In Vitro*. 2022;83:105407. doi:10.1016/j.tiv.2022.105407.
322. Stasiłojć G, Felberg A, Urban A, et al. Calcein release assay as a method for monitoring serum complement activity during monoclonal antibody therapy in patients with B-cell malignancies. *J Immunol Methods*. 2020;476:112675. doi:10.1016/j.jim.2019.11267.
323. Pulvertaft RJV. Cytology of Burkitt's tumour (African lymphoma). *Lancet*. 1964;1:238–241. doi:10.1016/S0140-6736(64)91190-3.
324. Nilsson K, Klein G. Phenotypic and cytogenetic characteristics of human B-lymphoid cell lines and their relevance for the etiology of Burkitt's lymphoma. *Adv Cancer Res*. 1982;36:103–150. doi:10.1016/S0065-230X(08)60178-5.
325. Golay J, Lazzari M, Facchinetti V, et al. Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood*. 2000;95(12):3900–3908. doi:10.1182/blood.V95.12.3900.011k14_3900_3908.
326. Klein G, Nilsson K, Henle W, Henle G. Studies on human Burkitt lymphoma cell lines: BCR signaling and IgM expression. *Int J Cancer*. 1975;16(1):1–12. doi:10.1002/ijc.2910160102.
327. Bellosillo B, Villamor N, López-Guillermo A, et al. Complement-mediated cell death

- induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders. *Blood*. 2001;98(9):2771–2777. doi:10.1182/blood.v98.9.2771.
328. Samanta M, Takada K. Modulation of innate immunity system by Epstein–Barr virus-encoded non-coding RNA and oncogenesis. *Cancer Sci*. 2009;101(1):29–35. doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01096.x.
 329. Kokkinos P, Chang CM, et al. Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2015;71:1–7. doi:10.1016/j.vascn.2014.10.005.
 330. Funk D, Schrenk HH, Frei E. Serum albumin leads to false-positive results in the XTT and the MTT assay. *Biotechniques*. 2007;43:178–182. doi:10.2144/000112512.
 331. Jacobs DB, Pipho C. Use of propidium iodide staining and flow cytometry to measure antibody-mediated cytotoxicity: resolution of complement-sensitive and resistant target cells. *J Immunol Methods*. 1983;62:101–108.
 332. Miller ML, Finn OJ. Flow cytometry-based assessment of direct-targeting anti-cancer antibody immune effector functions. *Methods Enzymol*. 2020;632:431–456.
 333. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*. 2005;11:127-152.
 334. Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva Á. MTT assay for cell viability: intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem*. 2012;114(8):785-796.
 335. van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. In: Cree IA, ed. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. Methods Mol Biol. 2011;731:237-245.
 336. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of MTT and neutral red uptake assays. *Toxicol Lett*. 2006;160(2):171-177.
 337. Varga L, Czink E, Mislai Z, Pálóczi K, Bányai A, Szegedi G, et al. Low activity of the classical complement pathway predicts short survival of patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Clin Exp Immunol*. 1995;99:112-116. doi:10.1111/j.1365-2249.1995.tb03480.x.
 338. Schlesinger M, Broman I, Lugassy G. The complement system is defective in chronic lymphatic leukemia patients and in their healthy relatives. *Leukemia*. 1996;10:1509-1513.
 339. Beurskens FJ, Lindorfer MA, Farooqui M, Beum PV, Engelberts P, Mackus WJM, et al. Exhaustion of cytotoxic effector systems may limit monoclonal antibody-based immunotherapy in cancer patients. *J Immunol*. 2012;188(7):3532-3541. doi:10.4049/jimmunol.1103693.

340. Baig NA, Taylor RP, Lindorfer MA, Church AK, LaPlant BR, Pavey ES, Nowakowski GS, Zent CS. Complement-dependent cytotoxicity in chronic lymphocytic leukemia: Ofatumumab enhances alemtuzumab complement-dependent cytotoxicity and reveals cells resistant to activated complement. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(11):2218-2227. doi:10.3109/10428194.2012.681657
341. Hallek M, Shanafelt TD, Eichhorst B. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 2018;391(10129):1524-1537. doi:10.1016/S0140-6736(18)30648-8
342. Füst G, Miszlay Z, Czink E, Varga L, Pálóczi K, Szegedi G, et al. C1 and C4 abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia and their significance. *Immunol Lett*. 1987;14:255-259. doi:10.1016/0165-2478(87)90110-6
343. Michelis R, Tadmor T, Aviv A, Stermer G, Majdob R, Shvidel L, et al. Cell-free IgG aggregates in plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia cause chronic activation of the classical complement pathway. *PLoS One*. 2020;15(3):e0230033. doi:10.1371/journal.pone.0230033
344. Naseraldeen N, Michelis R, Barhoum M, Chezar J, Tadmor T, Aviv A, et al. The role of alpha-2-macroglobulin in IgG aggregation and chronic activation of the complement system in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Front Immunol*. 2020;11:603569. doi:10.3389/fimmu.2020.603569
345. Condoluci A, Rossi D, Zucchetto A, et al. IGHV mutational status and clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia: a nationwide cohort study. *Haematologica*. 2020;105(6):1507-1515. doi:10.3324/haematol.2019.220194
346. EHA Abstract / retrospective analysis presented at 2024 EHA Congress. TP53 mutations are associated with inferior progression-free and overall survival in CLL. *OncLive*. Published June 18, 2024.
347. Gu J, Wang Y, Zhang X, et al. Prognostic significance of ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis. *Leuk Res*. 2021;111:106729. doi:10.1016/j.leukres.2021.106729.
348. Langerbeins P, Kondoluci A, Terzi di Bergamo L, et al. Reassessing the chronic lymphocytic leukemia International Prognostic Index in the era of targeted therapies. *Blood*. 2024;143(25):2588-2598. doi:10.1182/blood.2023023647.
349. Mollnes TE, Brekke OL, Fung M, et al. Essential role of the C5a receptor in E coli-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. *Blood*. 2002;100(5):1869-1877.

10. Spis tabel i rycin

Tab. 1. Ekspresja receptorów Fcy w zależności od typu komórki.....	37
Tab. 2. Nadekspresja białek układu dopełniacza w nowotworach.....	43
Tab. 3. Obniżona ekspresja białek układu dopełniacza w nowotworach.....	46
Tab. 4. Klinicznie zatwierdzone i testowane przeciwciała monoklonalne anty-CD20 oraz ich radioimmunokoniugaty.....	51
Tab. 5. Klinicznie zatwierdzone i testowane przeciwciała bispecyficzne typu CD20xCD3.....	56
Tab. 6. Terapie CAR-T ukierunkowane na CD20 w trakcie badań klinicznych.....	60
Tab. 7. Charakterystyka kliniczna i laboratoryjna pacjentów z CLL włączonych do badania.....	90
Ryc. 1. Model struktury białka C2 w formie diagramu wstęgowego.....	62
Ryc. 2. Homologia białek: czynnika B i C2.....	65
Ryc. 3. Dopasowanie sekwencji aminokwasowych domen A czynnika von Willebranda białka C2 (górna część) i czynnika B (dolna część).....	66
Ryc. 4. Strategia bramkowania zastosowana w analizie cytometrii przepływowej.....	75
Ryc. 5. Ocena cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (CDC) indukowanej przez rytuksymab (RTX) w komórkach linii <i>Ramos</i> z wykorzystaniem trzech komplementarnych metod analitycznych.....	77
Ryc. 6. Ocena cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (CDC) indukowanej przez rytuksymab (RTX) w komórkach linii <i>Raji</i> z wykorzystaniem trzech komplementarnych metod analitycznych.....	78

Ryc. 7. Analiza cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (CDC) indukowanej przez przeciwciała anti-CD20 wobec komórek CLL izolowanych od pacjentów.....	97
Ryc. 8. Ekspresja antygenów CD20, CD46, CD55 i CD59 u pacjentów z CLL – badanie pilotażowe.....	104
Ryc. 9. Korelacja pomiędzy liczbą limfocytów a nasileniem CDC indukowanej rytuksymabem (RTX) po suplementacji wariantem 4X C2.....	101
Ryc. 10. Ocena cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (CDC) w modelu krwi pełnej pochodzącej od zdrowych dawców w komórkach linii <i>Raji</i>	102