

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Petra Votavová

Potenciace biologické aktivity IL-2 a IL-15 *in vivo*.
Potentiation of the biological activity of IL-2 and IL-15 *in vivo*

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Marek Kovář, Ph.D.

Laboratoř nádorové imunologie
Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně s použitím citované literatury a pod vedením RNDr. Marka Kováře, Ph.D. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 2.5 2012

Petra Votavová

Ráda bych poděkovala zejména svému školiteli RNDr. Marku Kovářovi, Ph.D. za odborné vedení mé vědecké činnosti a také za cenné rady a připomínky, které mi pomohly při vypracování této diplomové práce. Dále patří můj dík celé Laboratoři nádorové imunologie na Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v. v. i., a to nejen za poskytnutý materiál a praktickou pomoc, ale také za vytvoření velmi příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě patří velký dík také mé rodině za podporu při studiu a vytvoření potřebného zázemí. Děkuji také příteli za jeho podporu a velkou trpělivost se mnou při práci na tomto tématu.

Abstrakt

Díky své významné schopnosti stimulovat aktivované T lymfocyty a NK buňky je interleukin-2 již dlouhou dobu atraktivní molekulou pro imunoterapii. Avšak jeho velkým nedostatkem jsou nepříznivé farmakologické vlastnosti, mezi něž patří velmi krátký biologický poločas a závažná toxicita spojená s vysokými léčebnými dávkami. Pro mnoho imunoterapeutických využití je dále limitující role IL-2 coby esenciálního růstového faktoru pro T regulační buňky.

Doposud bylo studováno několik přístupů, jak u IL-2 dosáhnout lepšího terapeutického potenciálu. Nejvýznamnějším z nich jsou pravděpodobně nedávno popsány IL-2/anti-IL-2 mAb imunokomplexy, které vykazují o mnoho vyšší a selektivní biologickou aktivitu oproti volnému IL-2 *in vivo*. V této diplomové práci jsme se snažili ukázat a zdůraznit výhody IL-2/anti-IL-2 mAb imunokomplexů nad volným IL-2 tím, že jsme porovnali jejich biologickou aktivitu. Dále jsme na dvou syngenních myších nádorových modelech (EL4 T lymfomu a B16F10 melanomu) prokázali, že mají IL-2/anti-IL-2 mAb imunokomplexy nespornou protinádorovou aktivitu. Tím jsme zdůvodnili potenciální využití IL-2/anti-IL-2 mAb imunokomplexů v nádorové imunoterapii.

My sami jsme také uplatnili jeden ze způsobů, jak zvýšit stabilitu a poločas IL-2 *in vivo*. Proto jsme IL-2 kovalentně konjugovali k syntetickému semitelehelickému polymernímu nosiči na bázi *N*-(2-Hydroxypropyl) methacrylamidu (HPMA) za vzniku IL-2-pHPMA konjugátu, obsahujícího průměrně 2-3 polymerní řetězce na IL-2 molekulu. Ve srovnání s volným IL-2 jsme charakterizovali biologickou aktivitu tohoto IL-2-pHPMA konjugátu a určili jeho maximální tolerovanou dávku a poločas v cirkulaci po intravenózním podání. Důležité je, že IL-2-pHPMA konjugát prokázal mnohem vyšší biologický poločas (~ 4h oproti < 15 min) a značně vyšší biologickou aktivitu než volný IL-2 *in vivo*.

Nakonec jsme se zaměřili na solubilní rekombinantní IL-15/IL-15R α -Fc komplexy, které byly popsány jako IL-15 superagonista. Ve snaze popsat IL-15/IL-15R α -Fc komplexy jako zvláště slibnou formu imunoterapie jsme srovnali biologickou aktivitu IL-15/IL-15R α -Fc komplexů s volným IL-15. Prokázali jsme, že IL-15/IL-15R α -Fc komplexy mají vysokou biologickou aktivitu a lepší vlastnosti než solubilní IL-15 sám o sobě. Navíc jsme na myším EL4 T lymfomu prokázali, že IL-15/IL-15R α -Fc komplexy jsou efektivní formou nádorové imunoterapie.

Klíčová slova

interleukin-2, interleukin-15, IL-2/S4B6 imunokomplex, IL-2/JES6-1 imunokomplex, IL-15/IL-15R α komplex, IL-2-pHPMA konjugát, imunoterapie, CD8⁺ T lymfocyty, NK buňky, T regulační buňky

Abstract

Interleukin-2 possesses strong stimulatory activity for activated T and NK cells and thus it is an attractive molecule for immunotherapy. However, its unfavourable pharmacological properties, extremely short half-life and severe toxicities associated with high-dose IL-2 are the most serious and limiting drawbacks. Moreover, IL-2 has been also implicated in the homeostasis of T regulatory cells where it plays a decisive role as an essential growth factor of these cells.

Several different approaches to improve the therapeutic potential of IL-2 have been studied. Recently described IL-2/anti-IL-2 mAb immunocomplexes which show much higher and selective biological activity in contrast with free IL-2 *in vivo* are probably the most promising of them. In this study, we compared the biological activity of free IL-2 with IL-2/anti-IL-2 mAb immunocomplexes in order to demonstrate their benefits over free IL-2. We also demonstrated that IL-2/anti-IL-2 mAb immunocomplexes possess noticeable antitumor activity in two syngeneic mouse tumor models, namely EL4 T lymphoma and B16F10 melanoma, if administered early in tumor progression. Therefore, we justified potential use of IL-2/anti-IL-2 mAb immunocomplexes in tumor immunotherapy.

We covalently conjugated IL-2 to synthetic semitelechelic polymeric carrier based on *N*-(2-Hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA) with the aim to increase IL-2 half-life and stability *in vivo*. Thus we synthesized IL-2-pHPMA conjugate containing an average 2-3 polymer chains per IL-2 molecule. We characterized the biological activity of IL-2-pHPMA conjugate and determined its maximal tolerated dose and half-life in circulation upon intravenous administration. Importantly, IL-2-pHPMA conjugate showed much longer biological half-time (~ 4h versus < 15 min) and superior biological activity than free IL-2 *in vivo*.

Finally, we focused on soluble recombinant IL-15/IL-15R α -Fc complexes, described as IL-15 superagonist. We compared the biological activity of IL-15/IL-15R α -Fc complexes with free IL-15 in order to describe IL-15/IL-15R α -Fc complexes as particularly promising molecular targets for future application in immunotherapy. We demonstrated that IL-15/IL-15R α -Fc complexes possess important biological activities and better qualities than soluble IL-15 alone. Furthermore, IL-15/IL-15R α -Fc complexes proved to be effective form of tumor immunotherapy of established EL4 T lymphoma in mice.

Keywords

interleukin-2, interleukin-15, IL-2/S4B6 immunocomplex, IL-2/JES6-1 immunocomplex, IL-2-pHPMA conjugate, IL-15/IL-15R α complex, immunotherapy, CD8⁺ T cells, NK cells, T regulatory cells

Seznam zkratek

AICD	aktivací-indukovaná buněčná smrt
AKT	proteinová kináza B
APC	antigen prezentující buňka
Bcl-xL	anti-apoptický protein, člen rodiny Bcl-2 proteinů
Bcl-2	anti-apoptický protein
Bfl-1	lidský člen rodiny Bcl-2 proteinů
CCR7	c-c chemokinový receptor typu 7
CD40	kostimulační molekula antigen prezentujících buněk
CD44	povrchový adhezivní glykoprotein
CD69	časný aktivační antigen
CD83	maturační znak lidských dendritických buněk
CD86	kostimulační molekula antigen prezentujících buněk
CD122	β řetězec receptoru pro interleukin-2 a interleukin-15
CD132	společný cytokinový receptorový řetězec γ_c
CFSE	karboxyfluorescein sukcinimidyl ester
CH (2/3) region	konstantní část těžkého řetězce imunoglobulinu
CTL	cytotoxický T lymfocyt
CTLA-4	negativní regulátor kostimulace
DC	dendritická buňka
E2F	skupina genů kódujících rodinu transkripčních faktorů
ERK	extracelulárně regulované kinázy
Fc	Fc fragment protilátky
FcRn	neonatální Fc receptor
FDA	Správa potravin a léčiv USA
FKBP	FK506-vazebný protein
FoxP3	forkhead box P3, specifický znak T regulačních buněk
G-CSF	faktor stimulující růst granulocytů
GM-CSF	faktor stimulující růst granulocytů a makrofágů
GvHD	reakce štěpu proti hostiteli
$\gamma\delta$ T lymfocyty	subpopulace T lymfocytů s $\gamma\delta$ receptorem
HPMA	poly[N-(2-hydroxypropyl)metakrylamid]
kDa	kilodalton
IEL	intestinální intraepiteliální lymfocyt
IFN-I	interferony typu I (α a β)
IFN- γ	interferon- γ
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
IL-2R	receptor pro interleukin-2
IL-15R	receptor pro interleukin-15
Jak	Janusova tyrosin kináza
LAK	lymfokiny-aktivovaný zabíječ
LPS	lipopolysacharid
mAb	monoklonální protilátka
mTOR	mammalian target of rapamycin, kináza skupiny PI3K
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MP	paměťového fenotypu
NF- κ B	jaderný faktor κ B
NK	přirozený zabíječ

NKT	subpopulace T-lymfocytů s vlastnostmi T i NK buněk
p38	MAP kináza
PBMC	mononukleární buňky z periferní krve
PC-3	lidská buněčná linie nádoru prostaty
PDK1	pyruvát dehydrogenáza lipoamid kináza izozym 1
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
Ras	protein patřící mezi malé GTPázy, proto-onkogen
Raf	serin/threonin protein kináza, proto-onkogen
STAT	protein signální transdukce a aktivace transkripce
Syk	tyrosin kináza
TACE/ADAM17	TNF- α konvertující enzym, metalloproteáza
TCR	T buněčný antigenní receptor
T _H	pomocný T lymfocyt
TLR	toll-like receptor
TNF- α	faktor nekrotizující nádory
Treg	T regulační buňka

Obsah

I. ÚVOD	11
II. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	14
II.1 Biologie IL-2 a IL-15	14
II.1.1 Interleukin-2 a interleukin-15	14
II.1.2 Kontrastní role IL-2 a IL-15	14
II.1.3 Složení receptorů pro IL-2 a IL-15.....	15
II.1.4 Zdroje IL-2 a IL-15	18
II.1.5 Signalizace indukovaná IL-2 a IL-15.....	19
II.2 Imunoterapie	21
II.2.1 Imunoterapie pomocí cytokinů	21
II.2.1.1 Současná IL-2 terapie	22
II.2.1.2 Současný stav klinických studií IL-15.....	23
II.2.2 Úskalí cytokinové imunoterapie – nízký poločas, vysoká toxicita	23
II.2.2.1 Omezení IL-2 léčby – toxicita, stimulace Treg buněk	24
II.2.3 Experimentální přístupy k překonání vysoké toxicity a nízké účinnosti cytokinové imunoterapie.....	25
II.3 Cytokinové komplexy (superagonistická forma volného cytokinu)	27
II.3.1 Komplexy cytokinu a specifické monoklonální protilátky.....	28
II.3.1.1 Komplexy IL-2/mAb	28
II.3.1.1.1 Komplexy IL-2/S4B6.....	30
II.3.1.1.2 Komplexy IL-2/JES6-1	31
II.3.1.1.3 Nastínění využití IL-2 komplexů.....	32
II.3.2 Komplexy cytokinu a solubilního receptoru.....	33
II.3.2.1 Solubilní IL-15/IL-15R α komplexy	33
II.3.2.2 IL-15/IL-15R α -Fc komplexy jako superagonistická forma IL-15	33
III. MATERIÁL A METODY	36
III.1 Roztoky	36
III.2 Buňky	37
III.2.1 Používané buněčné linie	37
III.2.2 Propagace buněk <i>in vitro</i> , zamrazení a rozmrazení buněk	38
III.3 Protilátky a cytokiny	38
III.3.1 Cytokiny	38
III.3.2 Konjugát IL-2-pHPMA	38
III.3.3 Příprava imunokomplexů	39
III.3.4 Stimulační a inhibiční protilátky.....	39
III.3.5 Protilátky použité v ELISA	39
III.3.6 Protilátky využívané při průtokové cytometrii	39
III.4 Experimentální zvířata	40
III.4.1 Izolace splenocytů.....	40
III.4.2 Izolace splenocytů pomocí Histopaque 1083	40
III.4.3 Purifikace (OT-I) CD8 ⁺ T buněk	41
III.4.4 CFSE značení buněk	41
III.4.5 Purifikace NK buněk	41
III.5 Detekce proliferační aktivity	42
III.5.1 Proliferace OT-I CD8 ⁺ T buněk <i>in vitro</i>	42
III.5.2 Proliferace CD8 ⁺ T buněk <i>in vitro</i>	42
III.5.3 Proliferace NK buněk <i>in vitro</i>	42

III.6	Průtoková cytometrie (FACS).....	43
III.6.1	Expanze OT-I CD8 ⁺ T lymfocytů a dalších buněčných populací <i>in vivo</i> ..	43
III.6.2	Značení buněčných populací na FACS analýzu	43
III.6.3	Restimulace CD8 ⁺ T lymfocytů <i>ex vivo</i> - indukce exprese IFN-γ.....	44
III.7	Stanovení maximální tolerované dávky (MTD).....	44
III.7.1	MTD IL-2-pHPMA konjugátu a IL-2/S4B6 imunokomplexu	44
III.8	Stanovení poločasu v oběhu	45
III.8.1	Získání vzorků	45
III.8.2	ELISA stanovení koncentrace IL-2-pHPMA ve vzorcích séra	45
III.8.3	ELISA stanovení koncentrace IL-2/JES6-1 ve vzorcích séra	46
III.9	Test NK aktivity	46
III.10	Teplotní denaturace cytokinů	46
III.11	Léčba nádorů <i>in vivo</i>	47
III.11.1	Inokulace nádorových buněk	47
III.11.1.1	EL4 T lymfom.....	47
III.11.1.2	B16F10 melanom	47
III.11.2	Podávání léčiv	47
III.11.2.1	Polymerní konjugát B-737.....	47
III.11.2.2	Modulace imunitního systému	48
III.11.2.3	Sledování terapeutického efektu	48
IV.	VÝSLEDKY	49
IV.1	Potenciace biologické aktivity IL-2: αIL-2 mAb	49
IV.1.1	Vliv IL-2/mAb imunokomplexů na proliferaci NK buněk <i>in vitro</i>	49
IV.1.2	Charakterizace biologické aktivity IL-2/JES6-1 imunokomplexů <i>in vivo</i> ..	50
IV.1.2.1	<i>In vivo</i> expanze aktivovaných naivních OT-I CD8 ⁺ T lymfocytů pomocí IL-2/JES6-1 imunokomplexů	50
IV.1.2.2	Expanze Treg buněk pomocí IL-2/JES6-1 imunokomplexů <i>in vivo</i> ..	52
IV.1.2.3	Určení biologického poločasu IL-2/JES6-1 imunokomplexů	53
IV.1.3	Charakterizace biologické aktivity IL-2/S4B6 imunokomplexů <i>in vivo</i> ...	54
IV.1.3.1	<i>In vivo</i> expanze aktivovaných naivních OT-I CD8 ⁺ T lymfocytů pomocí IL-2/S4B6 imunokomplexů	54
IV.1.3.2	Expanze paměťových CD8 ⁺ T buněk mediovaná IL-2/S4B6 imunokomplexy <i>in vivo</i>	56
IV.1.3.3	Expanze NK buněk pomocí IL-2/S4B6 imunokomplexů <i>in vivo</i>	56
IV.1.3.4	Vliv IL-2/S4B6 imunokomplexů na aktivitu NK buněk	57
IV.1.3.5	Stimulační poměr IL-2/S4B6 imunokomplexů pro efektorové buňky vůči buňkám supresorovým	58
IV.1.4	Protinádorový potenciál IL-2/mAb imunokomplexů.....	61
IV.2	Potenciace biologické aktivity IL-2: p(PHPMA).....	65
IV.2.1	Experimenty <i>in vitro</i>	65
IV.2.1	Experimenty <i>in vivo</i>	66
IV.2.1.1	Expanze aktivovaných OT-I CD8 ⁺ T buněk.....	66
IV.2.1.2	Expanze paměťových CD8 ⁺ T buněk.....	68
IV.2.1.3	Expanze NK buněk.....	69
IV.2.1.4	Vliv IL-2-pHPMA na aktivitu NK buněk (NK cytotoxicita)	70
IV.2.1.5	Expanze T regulačních buněk.....	71
IV.2.1.6	Protinádorová aktivita IL-2-pHPMA	71
IV.2.1.7	Vytvoření stabilní a funkční populace paměťových CD8 ⁺ T buněk	74
IV.2.1.8	Určení biologického poločasu IL-2-pHPMA	76

IV.2.1.9	Určení maximální tolerované dávky	77
IV.3	Potenciace biologické aktivity IL-15: IL-15/IL-15R α -Fc	80
IV.3.1	Experimenty <i>in vitro</i>	80
IV.3.2	Experimenty <i>in vivo</i>	81
IV.3.2.1	Expanze aktivovaných OT-I CD8 ⁺ T buněk	81
IV.3.2.2	Expanze paměťových CD8 ⁺ T buněk	83
IV.3.2.3	Expanze NK buněk	83
IV.3.2.4	Vliv IL-15/IL-15R α -Fc komplexů na aktivitu NK buněk (NK cytotoxicita)	84
IV.3.2.5	Expanze T regulačních buněk	85
IV.3.2.6	Protinádorová aktivita	87
V.	DISKUZE	90
VI.	SOUHRN	97
	Hlavní výsledky diplomové práce lze v souladu s jejími cíli shrnout takto:	97
VII.	SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	99

I. ÚVOD

V některých oblastech medicíny je imunoterapie pro svou snahu vyvolat, posílit či naopak utlumit imunitní odpověď vhodným typem léčby. Takovou oblastí je například léčba nádorů, ve které má imunoterapie oproti radioterapii či chemoterapii mnoho výhod. Nespornou výhodou nádorové imunoterapie je schopnost indukovat vysoce selektivní ničení nádorových buněk, a to navíc obvykle nezávisle na jejich buněčném cyklu. A pokud nejsou nádorové buňky příliš početné, mohou být totálně eradikovány, čímž může být zajištěno trvalé vyléčení pacienta. Zvláště účinná by mohla být imunoterapie k odstranění tzv. zbytkové nemoci po chirurgickém odstranění nádoru či radio/chemoterapii.

V současné době je jedním z léčebných imunoterapeutických přístupů podávání (rekombinantních) interleukinů, tj. cytokinů regulujících adaptivní a vrozené imunitní odpovědi. Klinické použití cytokinové imunoterapie je nejlépe popsáno pro interleukin-2 (IL-2) u pacientů s nádorovým onemocněním. IL-2 se s úspěchem využívá pro *ex vivo* aktivaci a expanzi nádorově specifických CTL a LAK buněk, které se po navrácení do oběhu pacienta podílí na specifické eliminaci nádoru. Avšak systémová léčba nádorů pomocí IL-2 se potýká s mnoha nedostatky. Jedním z nich je vysoká schopnost T regulačních (Treg) buněk využívat IL-2, která je u aktivovaných a efektorových T lymfocytů nižší, nebo maximálně srovnatelná. Podávání IL-2 tak vede přednostně k homeostazi a tvorbě Treg buněk, což může kolidovat s/ inhibovat indukci specifické imunitní odpovědi a je pravděpodobně také důvodem limitované efektivity léčby. Další nedostatky aplikace IL-2 v klinické praxi jsou pro použití cytokinů v imunoterapii zobecnitelné a vychází z několika biologických problémů. Jedním z nich je extrémně krátký biologický poločas cytokinů v organismu a s ním spojená nízká terapeutická aktivita. Pro dosažení terapeutického efektu, který je podmíněn dostatečným zvýšením systémové koncentrace cytokinu v oběhu, je proto nutné podávat vysoké léčebné dávky. Ty jsou ale bohužel spojené se závažnými toxickými účinky, vyplývajícími z dalších biologických aktivit daného cytokinu. Ačkoli je tedy systémová IL-2 terapie poměrně efektivní formou léčby melanomů a karcinomů, je doprovázena až život-ohrožující toxicitou.

Systémová léčba cytokiny je tedy i přes své nesporné přínosy stále problematická. Pro efektivní využití cytokinů v imunoterapii je v budoucnu nutné optimalizovat stávající terapii či najít nové léčebné přístupy, které by byly co nejšetrnější k pacientovi, a přitom by bylo dosaženo vysoké terapeutické aktivity. Elegantní náhradu za problematickou IL-2 terapii by mohly představovat nedávno popsané IL-2/anti-IL-2mAb imunokomplexy. Ty vykazují oproti volnému IL-2 mnohonásobně vyšší biologickou aktivitu *in vivo* a navíc i

schopnost selektivně ovlivňovat imunitní reakce. V závislosti na povaze požadované polarizace imunitní odpovědi by použitím IL-2/anti-IL-2mAb imunokomplexů bylo možno dosáhnout vysoké efektivity při rapidním snížení dávky a počtu léčebných cyklů, čímž by se podařilo minimalizovat či zcela obejít vedlejší účinky systémově podaného IL-2.

Nejen jako alternativa IL-2 byl pro imunoterapii navržen interleukin-15 (IL-15). Ten s IL-2 sdílí mnohé biologické vlastnosti, avšak vykazuje oproti němu vyšší bezpečnost a při ovlivňování některých složek imunitního systému také vyšší účinnost. Nicméně použití IL-15 v imunoterapii se opět potýká s problémem nízkého poločasu v oběhu a tedy nízkou terapeutickou účinností. Při hledání alternativ byly v nedávné době popsány solubilní IL-15/IL-15R α -Fc komplexy, které oproti volnému IL-15 vykázaly vysokou biologickou aktivitu.

V této diplomové práci jsme se věnovali jednotlivým způsobům, jak potencovat biologickou aktivitu IL-2 a IL-15. Popsali jsme vlastnosti IL-2/anti-IL-2 mAb imunokomplexů a IL-15/IL-15R α -Fc komplexů s ohledem na zdůraznění jejich kvalit oproti příslušnému volnému interleukinu. Dále jsme se aktivně pokusili o potenciaci aktivity IL-2 syntézou IL-2-pHPMA konjugátu, tj. molekuly IL-2 s vyšší molekulovou hmotností, a tak omezenou renální filtrací oproti volnému IL-2. Při syntéze tohoto konjugátu jsme vycházeli z popsaných přístupů uplatněných pro prodloužení biologického poločasu a zvýšení stability cytokinů *in vivo*. U dosud nepopsaného konjugátu IL-2-pHPMA jsme určili biologický poločas a věnovali se charakterizaci jeho biologické aktivity v kontrastu s aktivitou volného IL-2.

Hlavní cíle diplomové práce lze shrnout takto:

- charakterizovat IL-2/anti-IL-2 mAb komplexy
 - o biologická aktivita IL-2/JES6-1 imunokomplexů *in vitro* a *in vivo*
 - o biologická aktivita IL-2/S4B6 imunokomplexů *in vitro* a *in vivo*
 - o porovnat s volným IL-2
- charakterizovat IL-2-pHPMA konjugát
 - o biologická aktivita *in vitro* a *in vivo*
 - o poločas v cirkulaci
 - o maximální tolerovaná dávka
 - o porovnat s volným IL-2
- charakterizovat IL-15/IL-15R α -Fc komplexy

- biologická aktivita *in vitro* a *in vivo*
- porovnat s volným IL-15
- otestovat protinádorový potenciál IL-2/anti-IL-2 mAb komplexů, IL-2-pHPMA konjugátu a IL-15/IL-15R α -Fc komplexů na experimentálním modelu *in vivo*

II. LITERÁRNÍ PŘEHLED

II.1 Biologie IL-2 a IL-15

II.1.1 Interleukin-2 a interleukin-15

Funkcí imunitního systému je vyvinout imunitní odpověď nejen proti cizorodým patogenním organismům a jejich toxickým produktům, ale i potenciálně škodlivým vlastním strukturám. Následně pak vytvoření a udržování paměťových T a B lymfocytů, schopných rychlé a efektivní imunitní odpovědi na opětovně potkaný antigen. Zároveň je ale nutné ustanovit a udržovat toleranci k vlastním tkáním – antigenům, a to eliminací autoreaktivních T lymfocytů. Tyto procesy jsou do jisté míry regulovány cytokiny, malými signalizačními glykoproteinovými molekulami, sekretovanými mnoha druhy buněk. Cytokiny, které zprostředkovávají mezibuněčnou komunikaci, jsou ve svém charakteru pleiotropní a značně redundantní. Pro rodinu γ_c cytokinů je redundance účinků pochopitelná – receptory pro interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 a IL-21 všechny sdílejí signalizační receptový řetězec γ_c (CD132) na cílových buňkách [1].

Dva členy této γ_c rodiny - IL-2 a IL-15, hrají stěžejní roli v kontrole života a smrti lymfocytů. Oba interleukiny sdílejí také β receptorový řetězec (CD122), který spolu s γ_c vytváří heterodimerní receptor IL-2/15R, vážící IL-2 a IL-15 se střední afinitou [2]. V souvislosti se sdílenými receptorovými komponentami, a tím i společnými signalizačními drahami, mají IL-2 a IL-15 řadu překryvných imunoregulačních účinků. Příkladem může být stimulace proliferace aktivovaných T lymfocytů a indukce cytotoxických efektorových buněk (CTL). Dále kostimulace proliferace a imunoglobulinové syntézy B lymfocytů stimulovaných IgM-specifickou protilátkou či CD40 ligandem [3]. A konečně stimulace vývoje, proliferace a aktivace NK a NKT buněk [4].

II.1.2 Kontrastní role IL-2 a IL-15

IL-2 a IL-15 však mají při regulaci imunitní odpovědi také některé odlišné či kontrastní role. IL-2 hraje nezastupitelnou roli v prevenci autoimunity: je důležitý pro vytvoření FoxP3-exprimující populace $CD4^+ CD25^+$ T regulačních (Treg) buněk v thymu a na periférii a dále pro jejich přežívání, expanzi i funkci [5]. Dále se IL-2 podílí na zachování periferní tolerance a T-buněčné homeostaze indukcí aktivací-indukované buněčné smrti (AICD), vedoucí k eliminaci (nejen self-reaktivních) T lymfocytů. Oproti tomu má IL-15 na T regulační buňky zanedbatelný vliv, působí antiapopticky a je schopen

IL-2-indukovanou AICD potlačit [6]. Kromě toho je IL-15 esenciální pro vytvoření a udržení stabilní populace vysoce afinitních paměťových $CD8^+ CD44^{high}$ T lymfocytů [7] a pro vývoj a přežití NK buněk [8]. IL-15 dále široce působí na nelymfocytární kompartment imunitního systému: chrání neutrofile od apoptózy, zvyšuje fagocytózu a stimuluje sekreci IL-6, IL-8 a $TNF\alpha$ u makrofágů a indukuje maturaci dendritických buněk (DC; zvyšuje expresi CD83, CD86, CD40 a MHCII) [9].

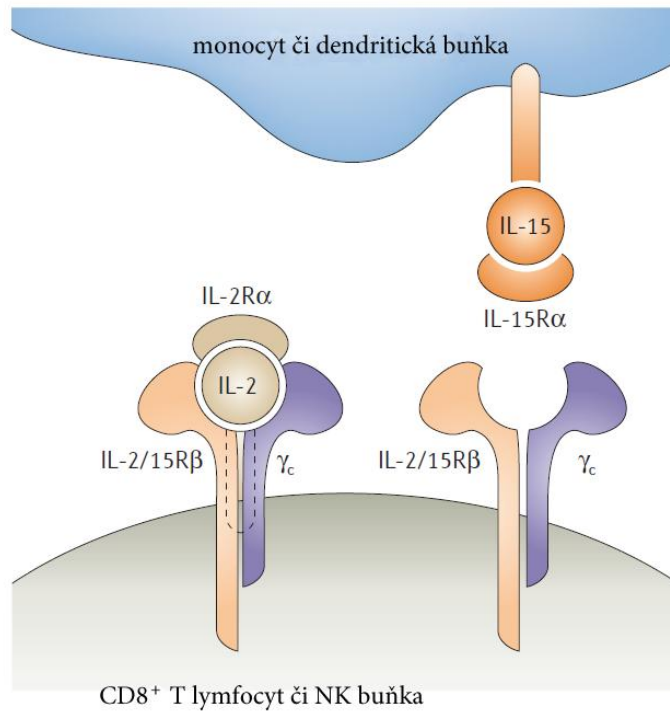
V neposlední řadě se IL-2 a IL-15 rozdílně uplatňují při indukci subpopulací paměťových $CD8^+$ T buněk. Ty jsou dle nynějších poznatků děleny na centrální (T_{CM}) a efektorové (T_{EM}) paměťové buňky, které se liší fenotypovými znaky, funkčními vlastnostmi a migratorní schopností [10]. Přítomnost IL-2 preferenčně vede k indukci tkáňových efektorových T_{EM} buněk rychle se akumulujících v místě zánětu a schopných rychlé produkce $IFN-\gamma$ a IL-4. Jejich fyziologickou funkcí je tedy pravděpodobně zajištění rychlé kontroly nad patogeny. Oproti tomu IL-15 vede k indukci T_{CM} buněk produkujících IL-2 a exprimujících CCR7 chemokinový receptor a L-selektin. Tyto T_{CM} buňky nejspíše v sekundárních lymfoidních orgánech stimulují DC buňky, poskytují pomoc B-buňkám a/nebo vytváří druhou vlnu T-buněčných efektorů. Přestože doposud panují o roli těchto dvou populací v sekundární imunitní odpovědi jisté nejasnosti, byla v několika odlišných modelových systémech prokázána vyšší účinnost T_{CM} ve srovnání s T_{EM} buňkami při ochraně před viry, bakteriemi a nádory [11-12].

Odlíšné jsou také fenotypy IL-2 a IL-15 knockoutů. IL-2 či IL-2R α deficientní myši trpí polyklonální lymfoproliferací spolu s T-dependentní autoimunitou, reflektující poruchu vývoje T regulačních buněk a AICD [13]. Zatímco IL-15 či IL-15R α deficientní myši jeví lymfopénii, vyznačující se redukcí thymových a periferních NK buněk, NKT buněk a intestinálních epiteliálních lymfocytů, a projevující se zvýšenou (až fatální) citlivostí k mikrobiálním infekcím [14]. Všechny popsané vlastnosti IL-2 a IL-15 indikují nutnost vyrovnaného působení těchto dvou cytokinů pro dosažení adekvátní buněčné imunity během imunitních reakcí.

II.1.3 Složení receptorů pro IL-2 a IL-15

Signalizace indukovaná vazbou IL-2 a IL-15 neprobíhá pouze přes společný dimerní IL-2/15 receptor, který oba interleukiny váže s intermediální afinitou ($K_a \approx 10^9/M$). Při signalizaci se uplatňuje ještě třetí, unikátní receptorová podjednotka, která rozpoznává pouze příslušný cytokin, a tak zajišťuje ligandovou specifitu. V případě IL-2 se jedná o

IL-2R α (CD25) a v případě IL-15 o IL-15R α podjednotku [15], které přestože determinují vazbu toho či onoho cytokinu k receptoru, sdílejí mnoho strukturních rysů [16].

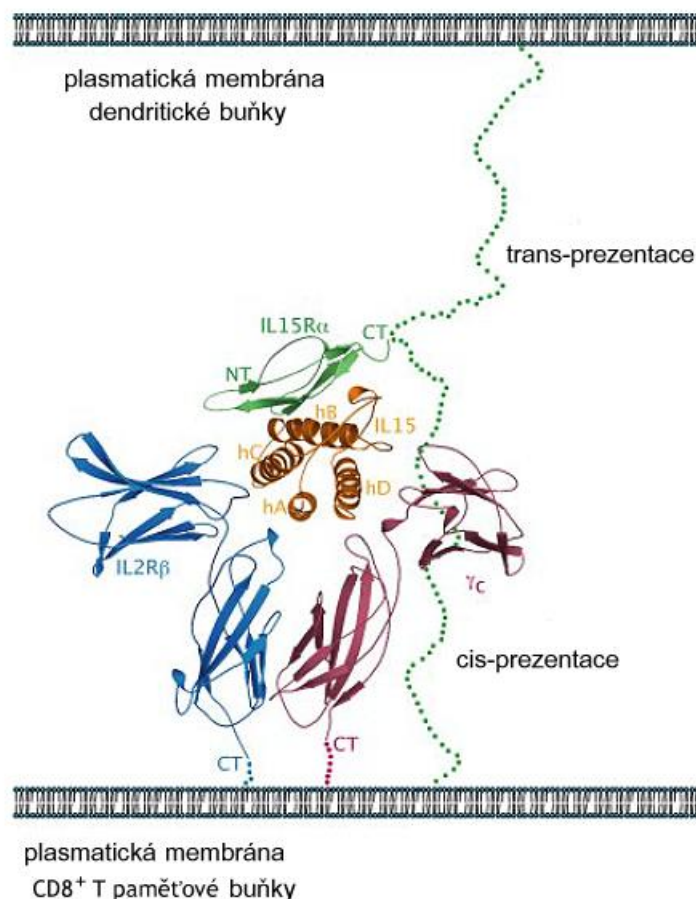


Obr. II.1: Způsob interakce IL-2 a IL-15 s receptorovými podjednotkami svého receptoru. IL-2 je sekretovaná molekula, která se váže k preformovanému vysokoafinitnímu receptoru složenému z IL-2R α , IL-2/15R β a IL-2R γ_c . Oproti tomu IL-15 je membránově vázán v komplexu s IL-15R α a trans-prezentován buňkám nesoucím receptor složený pouze z IL-2/15R β a IL-2R γ_c . Převzato z Waldmann TA. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. Nature Rev. 2006, upraveno.

Působení IL-2 je tedy zprostředkováno vazbou na IL-2 receptor, který se vyskytuje ve dvou formách. Dimerní IL-2 receptor složený z IL-2R β (CD122) a IL-2R γ_c (CD132) řetězců, nebo trimerní vysoko afinitní receptor složený z IL-2R $\beta\gamma_c$ a IL-2R α (viz Obr. II.1). A zatímco na klidových buňkách je β a γ_c řetězec exprimován konstitutivně, teprve aktivace T buněk indukuje syntézu IL-2R α řetězce a uskupení vysoko afinitního receptoru IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$. Obě formy receptoru mohou po vazbě IL-2 přenášet signál, avšak trimerní $\alpha\beta\gamma_c$ IL-2R váže IL-2 se 100 vyšší afinitou než dimerní $\beta\gamma_c$ IL-2R [17]. Nízkou afinitu k IL-2 má i samotný CD25 řetězec ($K_a = 10^8/M$), který se však neúčastní signální transdukce [18-19].

Trimerní IL-2R se nachází na aktivovaných T lymfocytech a CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T regulačních buňkách [20]. Právě Treg buňky jsou charakteristické silnou konstitutivní expresí CD25 umožňující formaci vysoko afinitního trimerního receptoru a tudíž schopností využít nízké hladiny IL-2. Oproti tomu antigenně specifické CD8⁺ T buňky s

paměťovým fenotypem (CD44^{high}), paměťové CD8⁺ T buňky (CD44^{high} CD122^{high}) a NK buňky (CD3⁻ NK1.1⁺ DX5⁺) vystavují na svém povrchu vysokou hladinu dimerního $\beta\gamma_c$ IL-2/15R [21].



Obr. II.2: Model IL-15 kvaternárního komplexu s naznačenou *trans* i *cis* prezentací. IL-15 je v barvě oranžové, IL-15R α zelené, IL-15R β modré a γ_c růžové. Převzato z Olsen et al. Crystal Structure of the Interleukin-15·Interleukin-15 Receptor α Complex., J. Biol. Chem. 2007, upraveno.

Oproti solubilnímu IL-2, který se váže s vysokou afinitou na preformované heterotrimerní receptory na povrchu aktivovaných buněk [22], je IL-15 sekretován pouze ve velmi malém množství a nachází se především ve formě membránově vázané (viz Obr. II.1). Při ní funguje receptorový řetězec IL-15R α jako trans-prezentační molekula, která s IL-15 vytváří stabilní, membránově vázaný IL-15/IL-15R α komplex, v němž je IL-15 vázán se 100 vyšší afinitou než má CD25 pro IL-2 [16]. IL-15R α řetězec tedy stabilizuje IL-15 a zvyšuje jeho biologický poločas [23]. Komplex IL-15/IL-15R α je prezentován okolním buňkám, nesoucím na svém povrchu IL-2/15 $\beta\gamma_c$ receptor: CD8⁺ T lymfocytům, paměťovým CD8⁺ T, $\gamma\delta$ T, NK a NKT buňkám (viz Obr. II.2) [24]. Hlavním způsobem indukce IL-15

signalizace je pak trans-prezentace vyžadující kontakt IL-15/IL-15R α ⁺ buňky s buňkou nesoucí na povrchu IL-15 $\beta\gamma_c$ (viz Obr II.2). Takto trans-prezentovaný IL-15 poskytuje dlouhodobější a silnější signalizaci responzivním buňkám, než solubilní IL-15 [25]. V současné době je stále více diskutována role cis-prezentace IL-15, při níž dochází díky plastickému hinge regionu IL-15R α k prezentaci komplexu IL-15/IL-15R α vlastnímu $\beta\gamma_c$ receptoru na povrchu buňky (viz Obr. II.2) [26].

II.1.4 Zdroje IL-2 a IL-15

IL-2 je produkován a sekretován hlavně aktivovanými naivními CD4⁺ T_H lymfocyty během primární imunitní odpovědi, méně pak CD8⁺ T lymfocyty a minimálně B lymfocyty a granulocyty. Aktivované dendritické buňky, NK buňky a NKT buňky mohou být rovněž producenty IL-2, avšak biologická důležitost takto produkováného IL-2 je nejasná [27-28].

Po setkání se specifickým antigenem a v přítomnosti kostimulačního signálu, indukují T_H lymfocyty expresi nejen IL-2, ale současně také CD25, který dále umožňuje vysoko afinitní vazbu IL-2. Následná parakrinní (a nikoli autokrinní) signalizace přes IL-2R je nutná pro proliferaci těchto T_H buněk a jejich diferenciaci v efektorové buňky [29]. Exprese IL-2 je regulována zejména na úrovni mRNA transkripce a stabilizace [30]. Také Treg buňky regulují koncentraci dostupného IL-2. Vyvazují ho svým vysoko afinitním IL-2 receptorem, následnou internalizací kvarterního IL-2/IL-2R komplexu ho degradují, a tímto způsobem určují tempo, velikost a rozsah T buněčných imunitních odpovědí [31].

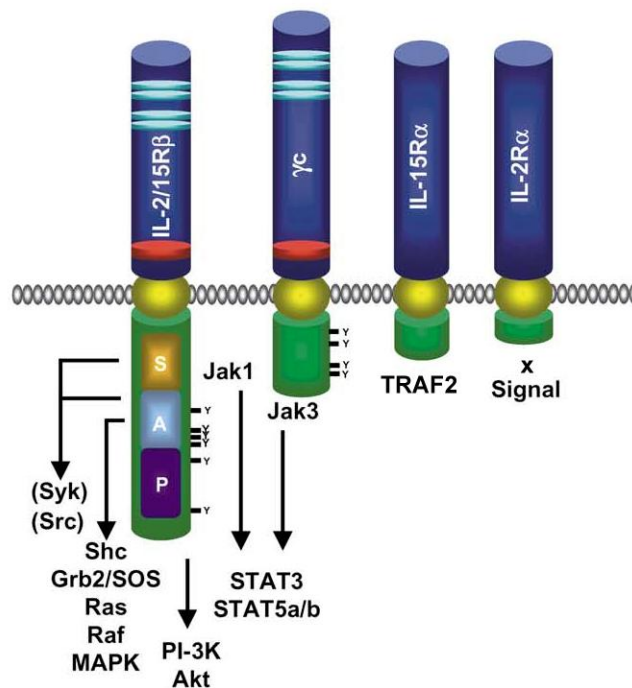
Oproti tomu IL-15 mRNA je konstitutivně exprimována velkým množstvím buněčných typů a tkání (například keratinocyty, fibroblasty, monocyty, makrofágy, placentou, thymickým epitelem). Avšak detekovat jimi uvolněný IL-15 do supernatantu je velmi obtížné i přes tuto širokou distribuci IL-15 mRNA [32]. Hlavními producenty IL-15 jsou stimulované monocyty a dendritické buňky. Interferony typu I nebo II v nich indukují společně s aktivací NF- κ B dráhy (vazbou CD40-CD40L nebo TLR4 s LPS) koordinovanou expresi IL-15 a IL-15R α na buněčném povrchu [33]. Méně produkují IL-15 také epiteliální buňky a fibroblasty [34-35]. Produkce interleukinu 15 je kontrolována mnoha faktory na úrovni transkripce, translace a vnitrobuněčného pohybu, přičemž se ukazuje, že dominantní postavení má regulace posttranskripční [36].

Podmínkou pro efektivní působení IL-15 je současná exprese IL-15 a IL-15R α nelymfoidními buňkami [37]. Různé izoformy IL-15R α jsou exprimovány velkým množstvím hematopoetických i nehematopoetických buněk a tkání, přičemž exprese jednotlivých izoform vykazuje tkáňovou specifitu. IL-15R α mRNA je exprimována

například aktivovanými T a B lymfocyty, aktivovanými NK buňkami, NKT buňkami, makrofágy, dendritickými buňkami, stromálními buňkami thymu a kostní dřeně a také v mnoha orgánech zahrnujících játra, srdce, slezinu, plíce a kosterní svastvo [38].

II.1.5 Signalizace indukovaná IL-2 a IL-15

Signální transdukce zprostředkovaná IL-2 a IL-15 obsahuje společné signální molekuly (viz Obr. II.3). Ty jsou asociované s β a γ_c řetězcem sdíleného IL-2/15R, avšak ne s řetězcem IL-2R α , který specifitu vysoko afinitního receptoru determinuje [1, 3, 39].



Obr. II.3: Schematické znázornění signalizačních kaskád spouštěných přes IL-2 a IL-15 receptorový komplex. Komponenty IL-2/15R β a γ_c jsou sdílené mezi IL-2 a IL-15 receptory. Převzato z Fehniger TA et al. Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. Cytokine & Growth Factor Reviews 2002, upraveno.

Společnými mediátory, spouštějícími sdílené signalizační kaskády, jsou Jak kinázy (Jak1 asociovaná s β řetězcem a Jak3 s γ_c řetězcem), které zprostředkovávají fosforylaci STAT3 a STAT5 a následnou signalizaci [1, 40]. Pro buněčnou proliferaci je obzvláště důležitá aktivace PI3K-AKT dráhy, regulující transkripční aktivitu E2F a umožňující průchod stěžejním G₁ kontrolním bodem buněčného cyklu. [41]. Aktivace PI3K zprostředkovává přes mTOR a p70S6 kinázu fosforylaci regulačního proteinu S6 v rámci 40S ribozomální podjednotky, což vede k translační kontrole mRNA transkriptů

esenciálních pro buněčnou proliferaci, tedy ribosomálních proteinů a elongačních faktorů [42]. Dále vede signalizace k fosforylaci protein tyrosinové kináz ze SRC-rodiny (Lck, Syk) a indukcii exprese anti-apoptické molekuly Bcl-2 [43]. Kromě toho je fosforylace IL-2R β indukovaná Jak kinázou nezbytná pro vytvoření vazebných míst pro další signální molekuly. Vazba Shc proteinu na fosforylovaný tyrosin-338 IL-2R β tak spojuje IL-2/15 receptor s Ras-Raf-MAPK kaskádou, vedoucí k aktivaci komplexu Fos a Jun transkripčních faktorů [44]. V buňkách prezentujících IL-15 byla navíc prokázána rekruce TRAF2 (tumor-necrosis factor-receptor-associated factor 2) a Syk kinázy k cytoplazmatickému konci IL-15R α , které se účastní reverzní signalizace [45].

Jak je tedy zajištěno, že mají IL-2 a IL-15 i přes sdílené signalizační komponenty kromě svých překryvných imunoregulačních účinků také účinky rozdílné? Pomocí cDNA mikročipů bylo prokázáno, že na buněčné úrovni dochází působením obou cytokinů k velmi podobnému profilu genové aktivace [46]. Odlišné funkce IL-2 a IL-15 *in vivo* tedy nepramení jen z jejich působení na odlišné typy buněk. Dále bylo prokázáno, že T-buněčná proliferace indukovaná IL-2 či IL-15 jeví odlišnou citlivost k imunosupresivnímu léčivu rapamycinu. Ve studii provedené Dubois et al. byla proliferace indukovaná IL-15 avšak ne IL-2 velmi náchylná k působení rapamycinu, přestože bylo působením léčiva pozorováno snížení aktivace p70S6 kinázy v odpovědi na oba cytokiny [47]. To vedlo k odhalení další signalizační komponenty při indukcii proliferace T buněk. Aktivace p70S6 kinázy a výsledná proliferace je IL-15 zprostředkována především přes FK506-vazebný protein 1A (FKBP12), který je na působení rapamycinu citlivý. Oproti tomu IL-2 signalizace nezahrnuje pouze tuto dráhu, ale minimálně ještě jednu další, v níž se uplatňuje aktivace p70S6 kinázy přes FKBP12.6 protein (FKBP1B) [47].

Kromě toho se signalizační dráhy indukované IL-2 a IL-15 liší také v intenzitě předávaného signálu a zdá se, že odlišná intenzita signalizace je pro správný vývoj jednotlivých buněčných subtypů důležitá. Oba cytokiny totiž indukují AKT-PDK1 signalizační dráhu s odlišnou kinetikou - ta ústí v rozdílnou schopnost IL-2 a IL-15 řídit proteinovou syntézu a růst T buněk, a tak ve výsledku odlišně ovlivňovat T-buněčné funkce. Přejídná signalizace přes IL-15 tedy na molekulární úrovni primárně aktivuje proliferaci buněk (IL-15 působí jako mitogen). Zatímco IL-2 indukuje komplexnější buněčnou odpověď, zahrnující proliferaci, příjem aminokyselin a (*de novo*) proteinovou syntézu (je tedy skutečný růstový faktor) [48].

Jaký je tedy mechanismus, který řídí výstup signalizace? Zdá se, že je to hlavně dostupnost obou interleukinů a jejich receptorových forem. IL-2 a IL-15 se oba teoreticky mohou vázat na intermediální $\beta\gamma_c$ IL-2/15R, avšak je-li přítomen vysoko afinitní IL-2R,

vyvazuje preferenčně IL-2. Tak poskytuje vysoká hladina IL-2R α způsob, jak kontinuálně zachycovat IL-2 nutný pro udržení signalizace. Přičemž zapojení společných podjednotek CD122 a γ_c je podpořeno omezenou IL-15 signalizací, která je limitována hladinou IL-15R α . Dále oba cytokiny vyvolávají rychlou receptorem zprostředkovanou endocytózu cytokinu v komplexu s jeho receptorovým řetězcem, čímž limitují komponenty receptoru. Protože pro signalizaci závislou na IL-15R je limitující komponentou IL-15R α , poskytuje jeho rychlá endocytóza po prezentaci IL-15 $\beta\gamma_c$ komplexu vysvětlení pro přechodnější povahu signalizace spouštěnou IL-15. Signální transdukce je tedy v případě IL-15 účinně limitována deplecí vysoko afinitní receptorové podjednotky IL-15R α [26]. Oproti tomu vazba IL-2 ke svému receptoru vyvolá nejen internalizaci receptoru a degradaci IL-2, ale současně také zvýšení exprese CD25. Tím zabrání snížení exprese receptoru a naopak umožní aktivovaným T lymfocytům dlouhodobější signalizaci, která indukuje proliferaci a buněčný růst [48-49]. IL-2 a IL-15 se tedy také liší způsobem, jakým regulují expresi svých receptorů: IL-2 vyvolává pozitivní zpětnou vazbu, která zvýší expresi IL-2R α , klíčové podjednotky vysoko afinitního IL-2R. Naopak hladiny IL-15R α řetězce u CD8⁺ T kultivovaných s IL-15 klesají. Regulace hladiny IL-2R α a IL-15R α tak poskytuje jednoduchý avšak účinný mechanismus, jak kvantifikovat a přizpůsobit signalizaci přes společné intermediátory, vedoucí k odlišným biologickým odpovědím.

Závěrem lze shrnout, že několik hlavních faktorů přispívá k odlišnému působení IL-2 a IL-15: rozdílná distribuce obou interleukinů a jejich receptorových α -podjednotek a hlavně odlišný mechanismus působení těchto dvou cytokinů přes své receptory.

II.2 Imunoterapie

II.2.1 Imunoterapie pomocí cytokinů

Imunoterapie zahrnuje léčebné postupy podporující, využívající anebo naopak tlumící obranné či regulační mechanismy imunity. Může být založena na přenosu *in vitro* stimulovaných efektorových buněk imunitního systému (lymfocytů, makrofágů, dendritických buněk, cytotoxických T lymfocytů); nebo na podávání aktivních látek – imunomodulátorů. Ty zahrnují široké pole rekombinantních, syntetických i přírodních látek a často jsou jimi právě cytokiny.

Některé z cytokinů jsou již schváleny pro léčbu pacientů. Patří mezi ně například granulocytární kolonie-stimulující factor (G-CSF) pro léčbu neutropenie [50] a IL-2 pro léčbu metastatického melanomu a maligního renálního karcinomu. Již od roku 1991 jsou FDA schváleny také interferony: IFN- β jako léčivo pro roztroušenou sklerózu; IFN- α pro

léčbu kožního melanomu, trichocelulární leukémie, maligního melanomu, folikulární lymfomu, Kaposiho sarkomu souvisejícího s AIDS a hepatitidy B a C. Další imunomodulátory – IL-12, různé chemokiny a IL-15 jsou v současné době podrobovány klinickým a preklinickým studiím [51-55].

II.2.1.1 Současná IL-2 terapie

Mezi imunomodulačními léčivými, ovlivňujícími rozsah a povahu imunitních odpovědí, je IL-2 průkopníkem. Je to již 22 let (1990), kdy byla schválena kontinuální intravenózní administrace nízké dávky IL-2 pro léčbu metastatického renálního karcinomu v Evropě. Osm let poté byla FDA schválena vysoká jednorázová dávka IL-2 pro obecné terapeutické použití také ve Spojených státech amerických. V současné době je IL-2, samostatně nebo v kombinaci s chemoterapií či imunoterapií, schválen jako standardní způsob léčby metastazujícího melanomu a metastatického renálního karcinomu. Pro pacienty s metastazujícím karcinomem ledviny dokonce imunoterapie pomocí IL-2 představuje primární farmakologickou léčbu.

Interleukin-2 je také využíván pro expanzi T lymfocytů a NK buněk před adoptivní terapií [56]. A dále pro imunoterapii s využitím LAK buněk - při této terapii jsou pacientovi purifikované PBMC či izolované T lymfocyty a NK buňky *in vitro* stimulovány rekombinantním IL-2 a následně vráceny zpět do oběhu pacienta. Takto stimulované LAK buňky vykazují na MHC-nezávislou cytolytickou aktivitu, jsou schopny zabít NK-rezistentní nádorové buňky a potlačovat vznik metastáz [57-59]. Tento přístup je poměrně úspěšný při léčbě mnoha typů nádorů, například gastrointestinálních, metastatického melanomu, ovariálního a renálního karcinomu [57-59].

Od roku 2005 byl IL-2 testován pro léčbu HIV a AIDS. Avšak nedávné výsledky dvou multicentrických klinických studií - SILCAAT a ESPRIT – shledaly, že zahrnutí IL-2 k standardní HIV terapii nemělo žádný efekt na riziko úmrtí či výskyt oportunistických infekcí. Ačkoli IL-2 skutečně stimuloval počty CD4⁺ T lymfocytů, u několika pacientů dokonce významně, což bylo spjato s celkovým zlepšením zdravotního stavu. Nicméně, FDA rozhodla, že náklady společně s riziky spjatými s vedlejšími účinky IL-2 léčby převážily tyto benefity a shledala IL-2 neefektivním [60]. Kromě toho ověřují probíhající klinické studie použití IL-2 pro léčbu chronických virových infekcí a jako adjuvans při vakcinaci [61].

Slibné výsledky přinesly dvě nedávné klinické studie, ve kterých bylo podávání nízkých dávek IL-2 využito k preferenční expanzi Treg buněk. Aniž by se změnila počty

efektorových T lymfocytů, vedla tato terapie u pacientů s chronickou reakcí štěpu proti hostiteli (GVHD) k nárůstu počtu Treg buněk a klinickému zlepšení u poloviny pacientů [62]. V druhé studii byl sledován efekt terapie nízkými dávkami IL-2 na autoimunitní vaskulitidu vyvolanou infekcí virem hepatitidy C. Výsledky této studie potvrdily zvýšenou hladinu funkčních Treg buněk u všech pacientů a dokonce u 90 % z nich bylo pozorováno klinické zlepšení [63]. Důležité je, že ani v jedné studii nebyly zaznamenány žádné nežádoucí účinky takto podávaného IL-2.

II.2.1.2 Současný stav klinických studií IL-15

Interleukin-15 byl díky své schopnosti inhibovat IL-2-indukovanou AICD, mediovat přetrvávání paměťových CD8⁺ T lymfocytů a expandovat NK buňky navržen jako vhodný cytokin pro imunoterapii. Široké spektrum imunologické aktivity spojené s absencí toxicity (vycházející z preklinických studií) jej činí obzvláště vhodným kandidátem pro protinádorovou terapii. Pro sdílené vlastnosti s IL-2, avšak oproti němu zvýšenou bezpečnost a účinnost, byl IL-15 určen pro léčbu tam, kde se již prokázala účinnost IL-2. Proto koncem roku 2009 započala fáze I klinické studie, evaluující bezpečnost, toxicitu, dávkování a protinádorovou účinnost IL-15 u pacientů s metastazujícím melanomem a renálním karcinomem [54].

IL-15 je v klinických studiích také testován pro léčbu imunodeficiencí (HIV) a pro *in vitro* expanzi a aktivaci T a NK buněk. Dále se testuje jeho použití jako adjuvans pro vakcinační strategie, a to zejména v souvislosti se zvýšením imunogenicity HIV vakcín a jako součást vakcín nádorových [9]. Další směr využití IL-15 byl naznačen v nedávné preklinické studii, v níž bylo prokázáno, že IL-15 poskytuje signál přežití T lymfocytům přeneseným autologní PBMC transplantací, které jsou velmi náchylné k spontánní apoptóze [64].

II.2.2 Úskalí cytokinové imunoterapie – nízký poločas, vysoká toxicita

Imunoterapie s využitím cytokinů ale naráží na několik biologických problémů. Jedním z nich je extrémně krátký poločas cytokinů v oběhu, pohybující se v řádu několika minut [65] a s ním spojená nízká terapeutická aktivita. Protože po intravenózním podání cytokinů dochází k jejich rychlé renální filtraci a eliminaci z oběhu, je výsledkem *in vivo* poločas typicky 3-20 minut (například IL-2, IL-4, IL-10, IL-15) [65-66]. To je důvodem, proč je pro dosažení terapeutického efektu, který je podmíněný dostatečným zvýšením

systemového cytokinu v oběhu, nutno podávat vysoké léčebné dávky. A z toho také vyplývá hlavní limitace cytokinové imunoterapie – závažné toxické vedlejší účinky, způsobenými stejnou fyziologickou funkcí cytokinu, jaká je zodpovědná i za terapeutický efekt. Pro úspěšné využití cytokinu je proto nutné najít takové léčebné protokoly či modifikace, aby bylo dosaženo vysoké terapeutické aktivity při ještě přijatelné vedlejší toxicitě.

II.2.2.1 Omezení IL-2 léčby – toxicita, stimulace Treg buněk

Ve snaze o co nejefektivnější imunoterapii je třeba aplikovat vysoké dávky IL-2. Avšak hlavní limitací takto eskalované léčby je značná toxicita [67]. Tato toxicita vychází ze syndromu průsaku z cév (vascular leak syndrome, VLS), který vede k akumulaci intravaskulární tekutiny v orgánech [68]. Postupně dochází k plicnímu edému, poškození jater a případně až fatálnímu multiorgánovému selhání. Nedávno bylo prokázáno, že plicní edém je způsoben přímou vazbou IL-2 k vysokoafinitivnímu $\alpha\beta\gamma_c$ receptoru na plicních endoteliálních buňkách. Ty po léčbě IL-2 zvyšují expresi CD25, a to pravděpodobně proto, aby snížily lokální hladinu IL-2 a tímto způsobem zabránily nadměrné stimulaci imunitního systému v tak důležitém orgánu, jako jsou plíce [69].

Podávání IL-2 ve vysokých dávkách je srovnatelné s řízeným navozením stavu septického šoku. Nízký krevní tlak, nízká systémová vaskulární rezistence, vysoký srdeční výdej, hematologická toxicita stupně 3 až 4, jaterní toxicita, renální toxicita a plicní edém – k tomu všemu může dojít. Ačkoli je toxicita téměř vždy reverzibilní, obvykle je její odstranění podmíněno ukončením léčby. I při nižším stupni toxicity dochází z důvodů možnosti kontroly a eliminaci vedlejších účinků v průběhu léčby k hospitalizaci pacientů a výjimečně v těžkých případech k umístění na jednotku intenzivní péče. Léčba vedlejších účinků zahrnuje podávání dopaminu profylakticky a terapeuticky, neosynephrinu proti hypotenzi, paracetamolu proti horečce a zimnici, cimetidinu proti překyselování žaludku a oxacilinu proti dysfunkci neutrofilů, která může vést až k sepsi. Současná léčba antibiotiky je rovněž nezbytná, neboť míra sepse bez nich dosahuje až 27%.

Nicméně, léčebný efekt IL-2 terapie není zanedbatelný. V případě pacientů s metastatickým melanomem dokázal IL-2 podávaný ve vysokých dávkách zajistit 5-15 let života bez progresu nádoru, což je nesrovnatelné s konvenční léčbou chemoterapií [70]. Při léčbě karcinomu ledvin bylo nejvyšší možnou dávkou IL-2 dosaženo léčebného efektu až u 24% pacientů. Avšak klinická odpověď, která u nich byla pozorována, byla asociována se závažnými vedlejšími účinky a až 4% mortalitou [71]. V protinádorové imunoterapii je

dalším omezením administrace vyšších dávek IL-2 to, že kromě stimulace efektorových buněk protinádorové imunity stimuluje IL-2 současně také T regulační buňky. To je Achillovou patou této terapie, protože přestože u pacientů během léčby dochází k proliferaci efektorových buněk, expandované Treg buňky dlouhodobě vystavené IL-2 kompenzují jejich množství a tím mohou znemožnit účinnou protinádorovou imunitní odpověď [72-73]. To je zřejmě také důvod, proč protinádorová imunoterapie vysokými dávkami IL-2 stabilně dosahuje 15-25% léčebného efektu [74].

Léčba IL-2 se tedy potýká s mnoha omezeními a riziky, které je třeba eliminovat nalezením vhodných alternativních léčebných režimů či modifikací stávajících. V současné době ještě stále není přijat konsensus jak nejlépe IL-2 podávat (v intencích dávky, režimu a načasování podání), aby bylo dosaženo co možná největších léčebných účinků a přitom byly vedlejší účinky minimální. Hlavní dva léčebné režimy oscilují mezi efektivností spojenou s vážnou toxicitou (intravenózní podání vysokého bolu IL-2) a nedostatečným léčebným efektem zato bez vedlejších účinků (kontinuální nízká dávka IL-2 intravenózně). Ve snaze vyvarovat se toxicity a přitom zachovat účinnost terapie se v nynější době zavádí odlišné protokoly aplikace. V mnoha zemích Evropy se například osvědčila subkutánní aplikace IL-2, vykazující nižší toxicitu. Také kontinuální nízké dávky IL-2 vykazaly objektivní odpověď na léčbu až u 20% pacientů s renálním karcinomem, a to bez toxických vedlejších účinků [75-76].

Ačkoli detailní charakterizace vedlejších účinků asociovaných s IL-15 léčbou ještě čeká na dokončení všech klinických studií, studie na myších a primátech již byly provedeny. Jednoznačně pozitivním výsledkem je to, že IL-15 neindukuje VLS, toxický syndrom asociovaný s IL-2 léčbou. Žádné zvíře nevyvinulo autoprotilátky proti lidskému rekombinantnímu IL-15. V žádné studii nebyla pozorována hemodynamická nestabilita ani selhání ledvin. Jedinou změnou byla neutropenie, která se zdá být závislá na dávce a schématu léčby, a je vždy plně reverzibilní [9].

II.2.3 Experimentální přístupy k překonání vysoké toxicity a nízké účinnosti cytokinové imunoterapie

Ve snaze zvýšit biologickou aktivitu cytokinů *in vivo* již bylo s větším či menším úspěchem využito mnoho experimentálních přístupů. Jedním z nich je konjugace cytokinů k větším proteinům (jako je například albumin) a tím oddálení jejich rychlé renální filtrace. Pod názvem albuleukin byl vytvořen fúzní protein rekombinantního lidského albuminu a IL-2, u něhož bylo prokázáno prodloužení poločasu v oběhu na 6-8 hodin. Albuleukin navíc

v myším modelu B16F10 metastatického melanomu a RenCa renálního karcinomu prokázal protinádorovou aktivitu srovnatelnou či lepší než samotný IL-2 a postoupil do klinických studií. Studie však již byly pro nevalné výsledky ukončeny [77-78]. Také chemická modifikace rekombinantního IL-2 kovalentním připojením polyethylen glykolu zvýšila biologický poločas IL-2 [79]. Navíc, tento PEG-rIL-2 vykázal vyšší protinádorovou aktivitu v myším modelu karcinomu děložního čípku [80], hepatomu [81] a Meth A sarkomu [79] než nemodifikovaný IL-2. Podobně jako Albuleukin postoupil PEG-rIL-2 do klinických studií, avšak ty byly ve fázi I/II rovněž ukončeny pro nevalné výsledky.

Dalším přístupem pro zvýšení biologického poločasu je konjugace cytokinu s IgG protilátkou - vytvoření imunoglobulinových fúzních proteinů [65]. Již bylo vytvořeno mnoho fúzních proteinů s těžkým řetězcem IgG, ve kterých byla cílová molekula geneticky fúzována k hinge regionu a CH2 a CH3 regionům Fc γ . Příkladem agonistických fúzních proteinů mohou být cytokiny (IL-2/Ig [82], IL-10/Ig [83], IL-15/Ig [84]) a také cytokinové receptory (solubilní IL-15-R α -Fc [85]). Nejvýznamnějším antagonistickým fúzním proteinem je inhibitor kostimulace CTLA-4-Fc, který byl extenzivně využit zejména pro objasnění role B7-mediované kostimulace v mnoha imunitních odpovědích [86-89]. Všechny tyto fúzní proteiny jsou díky Fc regionu IgG obdařeny několika klíčovými atributy. Jejich nejdůležitější charakteristikou je výjimečně dlouhý biologický poločas v organismu ve srovnání s poločasem původní nefúzované molekuly. Například u IL-10 se fúzí s Fc částí IgG zvýšil poločas původní molekuly z 20 minut na 35 hodin [90]. A u IL-2 bylo dokonce prokázáno až 200násobné prodloužení poločasu v oběhu [82]. Fc sekvence dále fúzním proteinům umožňuje divalentní prezentaci cytokinu (či jiné molekuly) a jednoduchou purifikaci díky vazebnému místu pro stafylokokový protein A.

V případě vysoko afinitního α řetězec IL-15 receptoru se osvědčila kombinace myšího solubilního sIL-15R α a Fc části lidského IgG1 (sIL-15R α -Fc). Tento fúzní komplex nejenže jeví vyšší poločas v séru, ale také značnou schopnost potencovat aktivitu IL-15 *in vivo* [85]. Stejně efekty jako IgG1 mělo i použití Fc částí lidského IgG2 a IgG3. Naopak zkušební konstrukt s lidským fragmentem IgG4 byl nefunkční již ve smyslu stimulace proliferace NK buněk *in vitro* [91]. Pro dosažení agonistického efektu výsledného fúzního proteinu je tedy důležité vhodně zvolit izotyp konjugované IgG protilátky.

V poslední době je nejvíce studovaným přístupem jak zvýšit biologickou aktivitu a současně snížit vedlejší účinky tvorba cytokinových komplexů. Tedy využití specifických monoklonálních protilátek za vzniku komplexů cytokin/anti-cytokin mAb anebo specifického solubilního receptoru za vzniku komplexu cytokin/receptor. Přičemž oba z těchto přístupů jsou podpořeny pozorováním přirozeně se vyskytujících agonistických

komplexů cytokin/protilátka a cytokin/receptor v organismu [92]. Cytokinové komplexy jsou pro svou důležitost v této práci popsány v samostatné kapitole.

II.3 Cytokinové komplexy (superagonistická forma volného cytokin)

Uměle připravené komplexy cytokin/anti-cytokin monoklonální protilátka (cytokin/mAb) nebo cytokin/solubilní receptor (cytokin/sR) byly doposud studovány pouze pro několik cytokinů, a to konkrétně: IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7 a IL-15. Všechny komplexy zahrnující tyto cytokiny sdílejí důležité vlastnosti: zvyšují poločas cytokinu v systému a vedou ke zvýšení jeho aktivity *in vivo*, tj. indukují významné změny v imunitním systému narozdíl od volných cytokinů. Přičemž existují dva hlavní mechanismy, jakými ke zvýšení biologické aktivity cytokinu dochází. V případě IL-4/mAb a IL-6/mAb komplexů (a pravděpodobně taky IL-7/mAb [21]) je esenciální zvýšení biologického poločasu cytokinu v komplexu, avšak cytokiny musí být z komplexu uvolněny, aby mohly účinkovat. Když je toto uvolnění blokováno velkým nadbytkem volné monoklonální protilátky, ztrácí cytokin/mAb komplex svou aktivitu a stává se neutralizujícím antagonistou daného cytokinu [92]. Oproti tomu k vysoké biologické aktivitě komplexů IL-2/mAb či IL-15/sIL-15R nepřispívá pouze zvýšení biologického poločasu cytokinu. V případě IL-2 imunokomplexů se v závislosti na typu IL-2 monoklonální protilátky uplatňuje ještě selektivní utilizace cytokinového imunokomplexu buňkami exprimujícími dimerní či trimerní formu IL-2 receptoru (detailněji vysvětleno níže). A v případě IL-15/sIL-15R komplexů se uplatňuje schopnost komplexů plně nahradit transprezentaci IL-15. Uvolnění cytokinu z IL-2/mAb či IL-15/sIL-15R komplexu tak snižuje biologickou aktivitu komplexu [21, 85].

Několik dalších vysvětlení vysoké biologické aktivity *in vivo* bylo navrženo, včetně protekce chemické alternace aktivního místa, inhibice degradace proteázami a prezentace buňkami nesoucími Fc receptor na svém povrchu [67, 93]. V neposlední řadě mohou protilátky v rámci cytokinového komplexu ovlivnit vazbu cytokinu na extracelulární matrix, jev který byl popsán pro řadu z nich (například IL-2, IL-3, IL-7) [94]. Zdá se, že všechny tyto faktory do jisté míry kooperují, a to v závislosti na typu komplexu cytokin/mAb. Nicméně, agonistické efekty cytokinových komplexů jsou pozorovatelné hlavně u komplexů, v nichž protilátka chrání cytokin před degradací či exkrecí a současně nedochází k blokaci vazebného místa cytokinu pro receptor [95].

II.3.1 Komplexy cytokinu a specifické monoklonální protilátky

V nynější době jsou mezi komplexy tvořenými cytokinem a specifickou monoklonální protilátkou studovány například IL-3/mAb komplexy, které jsou schopny indukovat až 16násobné zvýšení počtu žírných buněk oproti volnému IL-3 [96]. Dále jsou předmětem výzkumu IL-4/mAb a IL-7/mAb komplexy v souvislosti s indukcí B a T buněčné expanze a maturace. Zatímco volný IL-4 nemá téměř žádný efekt, komplexy složené z IL-4 a MAB404 nebo 11B11 účinně stimulují proliferaci CD8⁺ T lymfocytů s paměťovým fenotypem a zvyšují množství CD23⁺ buněk ve slezině [93]. Obdobně IL-7/mAb komplexy vykazují vysokou biologickou aktivitu oproti volnému IL-7 - působí enormní (200-400násobnou) expanzi nezralých (B220⁺ IgM⁺) B buněk a jsou schopny indukovat homeostatickou proliferaci naivních a paměťových CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů [97].

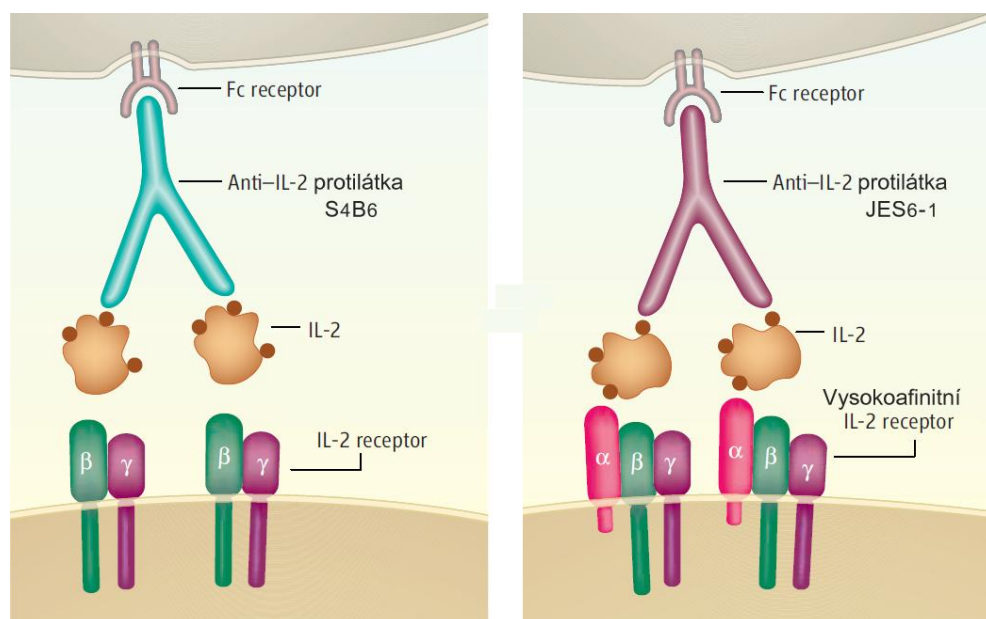
Nicméně, nejvyšší pozornost je věnována IL-2/mAb komplexům, aktivujícím maturaci a proliferaci CD8⁺ T lymfocytů a NK buněk v mnohem vyšší míře než konvenční terapie pomocí volného IL-2 [92-93]. Komplexy IL-2/mAb vykazují nejen dlouhý biologický poločas díky Fc regionu protilátky, ale i selektivitu pro jednotlivé subpopulace imunokompetentních buněk. Tato selektivita je dána specifitou monoklonální protilátky, která svou vazbou na IL-2 limituje vazebné místo cytokinu pro receptor. Komplexy IL-2/mAb sloužily v této diplomové práci pro demonstraci potenciace biologické aktivity IL-2; jejich doposud popsané vlastnosti jsou rozvedeny dále.

II.3.1.1 Komplexy IL-2/mAb

V myším systému může být dosaženo selektivity IL-2/mAb komplexu použitím S4B6 anebo JES6-1 klonu anti-IL-2 monoklonální protilátky (viz Obr. II.4) [21]. Analogické vlastnosti byly prokázány pro komplexy složené z lidského hIL-2 a MAB602 nebo 5344 anti-rhIL-2 monoklonální protilátky [69]. Klon S4B6 (alt. MAB602) se váže na IL-2 tak, že zabraňuje vazbě na CD25 podjednotku vysoko afinitního receptoru (zakrývá CD25-vazebný epitop IL-2), avšak neblokuje vazebné místo pro receptor s intermediální afinitou. Komplexy mIL-2/S4B6 a hIL-2/MAB602, tak stimulují CD122^{high} populace buněk: paměťové CD8⁺, CD8⁺ lymfocyty s paměťovým fenotypem (MP), NK buňky a s menší intenzitou také T_{reg} buňky.

Oproti tomu klon JES6-1 (alt. 5344 mAb) váže IL-2 odlišným způsobem, zabraňujícím interakci s receptorem s intermediální afinitou, a to pravděpodobně zakrytím

CD122-vazebného epitopu IL-2. Obdobně komplexy mIL-2/JES6-1 a hIL-2/5344 působí specificky na CD25^{high} buňky: právě aktivované T lymfocyty a Treg buňky [21, 69, 98].



Obr. II.4: Monoklonální protilátky vazbou odlišných míst IL-2 stimují proliferaci různých subpopulací lymfocytů v závislosti na typu IL-2R, který exprimují. Obrázek A: IL-2/S4B6 komplex - stimulace proliferace buněk, nesoucích na povrchu dimerní $\beta\gamma_c$ receptor (paměťové CD8⁺ T lymfocyty a NK buňky). Obrázek B: IL-2/JES6-1 komplex – stimulace proliferace buněk s vysoko afinitním $\alpha\beta\gamma_c$ receptorem (T regulační lymfocyty). Převzato z Prlic L, Bevan MJ. An Antibody Paradox, Resolved. Science 2006, upraveno.

Zajímavé je srovnání rekombinantního lidského fúzního proteinu hIL-2-IgG (imunoglobulinový fúzní protein hIL-2/Fc, viz výše) s komplexy IL-2/S4B6. Biologický poločas mají téměř totožný, avšak schopnost v ekvivalentní dávce indukovat expanzi MP CD8⁺ T lymfocytů jasně favorizuje IL-2/S4B6 komplexy (zhruba trojnásobně) [92]. To je důkazem, že ke zvýšené aktivitě IL-2/S4B6 komplexů oproti volnému IL-2 přispívá více faktorů než jen samotné prodloužení biologického poločasu. Deplečními experimenty pomocí anti-CD25 mAb a za použití CD25^{-/-} knockoutu bylo prokázáno, že aktivita IL-2/S4B6 komplexů stimuluje CD122^{high} populace buněk *in vivo* vyplývá hlavně z prodlouženého biologického poločasu, avšak druhým nejdůležitějším mechanismem je zabránění interakce s CD25. Pomocí ¹³¹I-značeného IL-2 byl stanoven poločas IL-2/S4B6 imunokomplexů v oběhu zhruba na 3 hodiny, tedy asi 50násobně prodloužené setrvání v oběhu oproti volnému IL-2 [99]. Na druhou stranu pro *in vivo* aktivitu IL-2/anti-IL-2 mAb imunokomplexů stimuluje CD25^{high} populace je rozhodující zejména přítomnost neonatálního FcRn [98].

II.3.1.1.1 Komplexy IL-2/S4B6

Jak již bylo řečeno výše, komplexy IL-2/S4B6 stimulují hlavně CD122^{high} populace buněk: hlavně tedy MP CD8⁺ T lymfocyty a NK buňky. Treg buňky jsou těmito komplexy stimulovány taktéž (ale slaběji než IL-2/JES6-1 komplexy popsány níže), zatímco B220⁺ B lymfocyty vůbec. Léčba IL-2/S4B6 komplexy také zvyšuje počet dendritických buněk ve slezině, počet granulocytů, makrofágů a nezralých myeloidních buněk [100]. Expanze některých populací dosažené IL-2/S4B6 komplexy jsou velmi silné: například 7denní administrace 1,5 µg ekvivalentu IL-2 ve formě IL-2/S4B6 komplexů vedla až k 100násobné expanzi paměťových CD8⁺ T lymfocytů a 20-30násobné expanzi NK buněk [21]. Dochází tak k několikanásobnému zvýšení celkové celularity sleziny, což vede k jejímu silnému zvětšení (splenomegalii) [21, 95]. Zajímavé je, že přes silné efekty na buněčnou expanzi nebyly pozorovány žádné změny v sérových hladinách IFN- γ , TNF, IL-6, IL-4, IL-10 ani MCP-1 [101]. Nicméně expanze buněk je pouze přechodná, dvanáct dní po poslední aplikaci IL-2/S4B6 komplexů jsou téměř všechny buněčné populace na hladině srovnatelné s kontrolou, pouze počty paměťových CD8⁺ T jsou stále na o něco vyšší [101].

IL-2/S4B6 komplexy stimulují maturaci NK buněk, zvyšují u nich hladinu exprese perforinu, granzymu B, CD25, CD69 a IFN- γ [102]. Po léčbě IL-2/S4B6 komplexy jeví téměř všechny CD8⁺ T lymfocyty paměťový fenotyp, ačkoli je komplexy ve skutečnosti neaktivují. *In vivo* indukují IL-2/S4B6 imunokomplexy narozdíl od volného IL-2 vysokou proliferaci aktivovaných naivních CD8⁺ T lymfocytů. Tyto expandované CD8⁺ T lymfocyty exprimují vysokou hladinu CD25 [99]. Oproti tomu pro naivní T lymfocyty, definované nízkou expresí CD122 a CD44, mají imunokomplexy IL-2/S4B6 *in vivo* jen minimální stimulační aktivitu [21]. Nicméně, ty i bez současné antigenně-specifické stimulace přijímají fenotyp centrálních paměťových buněk (central-memory; CD62L^{hi} CD44^{hi} CD122⁺). Tyto CD8⁺ T lymfocyty paměťového fenotypu jeví efektorovou funkčnost, i když sníženou oproti paměťovým CD8⁺ T lymfocytům vznikajícím po řádném setkání s antigenem [103].

Komplexy IL-2/S4B6 dále zvyšují množství antigenně-specifických CD8⁺ T lymfocytů během probíhající imunitní odpovědi. Například u infekce *Vaccinií* je celkové množství CD8⁺ T lymfocytů specifických pro daný antigen léčbou komplexy zvýšeno až 7x. Expandované T lymfocyty jeví vyšší antigenně-specifickou cytotoxicitu *in vivo* a větší část z nich je po *in vitro* restimulaci IFN- γ pozitivní [101].

Díky tomu, že IL-2/S4B6 komplexy mají pro Treg buňky poměrně nízkou stimulační aktivitu, je poměr expanze Treg buněk k expanzi antigenně-specifických

CD8⁺ T lymfocytů a NK buněk značně zvýšen právě ve prospěch těch druhých. Expanze těchto efektorových buněk protinádorové imunity má důležité implikace pro nádorovou imunoterapii. Volný IL-2 naopak tento poměr snižuje a favorizuje supresivní prostředí mediované Treg buňkami [21, 101]. Například pro nádorovou tkáň platí, že poměr favorizující CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Treg buňky nad CD8⁺ T lymfocyty je asociován s horší prognózou u pacientů s karcinomem prsu [104], žaludku [105] a ovarií [105-106].

Zdá se, že nárůst počtu T lymfocytů, ke kterému dochází *in vivo* po stimulaci IL-2/S4B6 komplexy, je zčásti závislý na expresi 4-1BBL ligandu z rodiny TNF. Bylo prokázáno, že aplikace IL-2/S4B6 komplexů vede k indukci exprese 4-1BB jak na adoptivně přenesených antigenně-specifických paměťových CD8⁺ T lymfocytech, tak na endogenních paměťových buňkách [107]. Kostimulační receptor 4-1BB je za fyziologických podmínek indukován TCR signálem a poskytuje suvival signál aktivovaným T lymfocytům. Přes něj indukovaná antiapoptická signalizace brání aktivaci indukované buněčné smrti T lymfocytů [108] a klonální delecii po vystavení superantigenu u CD8⁺ T lymfocytů. Tento signál je však odlišný od CD28 kostimulace, která se vyznačuje klonální expanzí a případným prodloužením krátkodobého přežití [109]. IL-2/S4B6 komplexy tak *in vivo* indukují signalizaci přes 4-1BB, která je závislá na přítomnosti 4-1BBL v organismu a vede ke zvýšení exprese antiapoptických molekul Bcl-x_L and Bfl-1, čímž přispívá k nárůstu počtu T-lymfocytů [110-111].

II.3.1.1.2 Komplexy IL-2/JES6-1

Komplexy IL-2/mAb tvořené protilátkou JES6-1 vytváří oproti IL-2/S4B6 naprosto odlišný fenotyp *in vivo*: protože působí specificky na CD25^{high} buňky, stimulují téměř výhradně Treg lymfocyty, aniž by současně ovlivňovaly populaci paměťových CD8⁺ T lymfocytů. Zvýšený poměr imunopresivních Treg buněk (ve srovnání s populací paměťových CD8⁺ T lymfocytů) pak může být využit například při terapii autoimunitních chorob. Tato skutečnost může být ilustrována tím, že podávání IL-2/JES6-1 komplexů po dobu 10 týdnů zabránilo vzniku diabetu u NOD myši (nonobese diabetic, myši spontánně vyvíjející diabetes) [112]. Selektivní expanze Treg buněk předcházející orgánové transplantaci by také mohla vylepšit uchycení allogenních orgánových štěpů. Tento imunoterapeutický model byl potvrzen na myším modelu, v němž bylo léčbou IL-2/JES6-1 komplexy před samotnou transplantací dosaženo trvalého uchycení 82% allogenních štěpů pankreatických ostrůvků. Indukovaná tolerance byla tak silná, že k rejekci nedošlo ani po

silné stimulaci příjemcových T lymfocytů donorovými splenocyty depletovanými na T-lymfocyty (použití jako zdroj APC buněk) [113].

Nicméně, IL-2/JES6-1 komplexy stimulují také proliferaci aktivovaných naivních CD8⁺ T lymfocytů *in vitro* a hlavně *in vivo* [99]. Takto expandované T lymfocyty vytváří stabilní populaci dlouhožijících buněk s paměťovým fenotypem, které jsou po reaktivaci schopny exprese IFN- γ a granzymu B [21]. Proto se zejména při léčbě autoimunitních onemocnění v indukční fázi, kdy dochází k aktivaci T lymfocytů exprimujících vysoko afinitní IL-2R, uplatňuje další experimentální přístup pro selektivní stimulaci Treg buněk. Tím je kombinace IL-2/JES6-1 komplexů s rapamycinem, který inhibuje proliferaci efektorových T buněk, avšak současně umožňuje či zvyšuje proliferaci Treg lymfocytů. Tímto léčebným režimem se podařilo významně snížit závažnost již započaté EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis, myši model roztroušené sklerózy) oproti kontrolním myším, čímž byl prokázán silný terapeutický efekt této kombinace [113].

II.3.1.1.3 Nastínění využití IL-2 komplexů

Použití IL-2/mAb komplexů místo volného IL-2 by mohlo být klinicky velmi výhodné. Nejenže IL-2/mAb komplexy jeví mnohonásobně vyšší účinnost oproti volnému IL-2, ale současně i možnost selektivně ovlivňovat imunitní reakce. V závislosti na povaze požadované polarizace imunitní odpovědi by tak bylo možno dosáhnout efektivity při rapidním snížení dávky a počtu léčebných cyklů, čímž by se snad podařilo minimalizovat či zcela obejít vedlejší účinky (VLS).

Z tohoto hlediska se obzvláště hIL-2/MAB602 komplexy jeví jako bezchybná náhrada terapie vysokými dávkami IL-2. Působení těchto komplexů je mediováno přes dimerní $\beta\gamma_c$ receptor - nemohou tedy ovlivňovat plicní endoteliální buňky exprimující $\alpha\beta\gamma_c$ receptor, tudíž ani indukovat VLS. Tato selektivita při působení na jednotlivé buněčné populace předurčuje hIL-2/MAB602 komplexy pro použití v terapiích, kde je potřeba cíleně expandovat CD8⁺ T lymfocyty a NK buňky – například v protinádorové léčbě. Léčbou hIL-2/MAB602 komplexy by bylo možno obejít Treg-mediovanou regulaci kinetiky, velikosti a charakteru T buněčných imunitních odpovědí a tím by bylo dosaženo přímé a efektivní stimulace buněčných populací, exprimujících $\beta\gamma_c$.

Protože myši IL-2/S4B6 komplexy dokážou navodit zvýšenou protektivní imunitu u neočkovaných zvířat, dalším a poněkud neotřelým přístupem by mohlo být využít hIL-2/MAB602 komplexy jako adjuvans vakcín. Zejména pro navození silné buněčné

zprostředkované imunitní odpovědi u vážných infekcí jako je například HIV, kde současné vakcinační přístupy selhávají [114].

Při indukci tolerance by se oproti tomu uplatnily IL-2/JES6-1 komplexy, které v nízkých dávkách rovněž neindukují VLS, zato jsou nesrovnatelně účinnější než stejné množství volného IL-2 [69]. Jejich schopnost expandovat T regulační buňky by mohla být nesmírně cenná například pro použití v léčbě autoimunitních onemocnění a před transplantací pro lepší uchycení štěpu.

II.3.2 Komplexy cytokinu a solubilního receptoru

II.3.2.1 Solubilní IL-15/IL-15R α komplexy

Cytokinové komplexy mohou být tvořeny také cytokinem a jeho specifickým solubilním receptorem. Myšlenka fungování sIL-15/IL-15R α -Fc komplexů byla podpořena skutečností, že v organismu přirozeně dochází ke štěpení membránové formy receptoru vázané s trans-prezentovaným IL-15 proteinázou TACE/ADAM17. Vznikají tak přirozené solubilní komplexy IL-15/IL-15R α , vytvářející další zdroj IL-15, avšak tentokrát ne membránově vázaný a tím limitovaný v dostupnosti, ale solubilní a sloužící k aktivaci středně afinního IL-2/15R [92]. Tyto solubilní IL-15/IL-15R α komplexy pak mohou působit nejen lokálně, ale i parakrinně či endokrinně (systémově) a současně ovlivňovat podstatu a/nebo délku trvání signálních procesů a dostupnost IL-15 [38]. Velmi pravděpodobně se jedná o majoritní způsob IL-15 sekrece [115].

Podáním samotného IL-15 není možné dosáhnout takové míry proliferace buněk jako solubilními IL-15/IL-15R α komplexy. Efektivita působení podaného IL-15 je limitována dostupností volného IL-15R α , proto je výhodné podat současně i tento vysoko afinní IL-15R α [116]. Tak se pro potenciaci IL-15 účinků *in vitro* a hlavně také *in vivo* ukázaly jako velmi potentní solubilní IL-15/IL-15R α -Fc komplexy, využívající vlastnosti imunoglobulinových fúzních proteinů pro zvýšení biologického poločasu a zároveň zvyšující biologickou dostupnost IL-15 simulováním přirozené transprezentace [85].

II.3.2.2 IL-15/IL-15R α -Fc komplexy jako superagonistická forma IL-15

Komplexy IL-15/IL-15R α -Fc mají mnohem vyšší stimulační efekt než IL-15 samotný, a to jak *in vitro* (5-10x), tak především *in vivo* (zhruba 50x). Vysvětlením je prodloužení biologického poločasu IL-15 v komplexu, ale hlavně simulace přirozené transprezentace IL-15. Důkazem je obnovení populace NK1.1⁺ DX5⁺ NK buněk a

MP CD8⁺ T lymfocytů po podání IL-15/IL-15R α -Fc komplexů IL-15R α ^{-/-} myším (deficientní na CD122^{high} populace, tj. paměťové CD8⁺ T a NK buňky). Preasociace IL-15 komplexů je důležitá, vyplývá totiž z úlohy sIL-15R α -Fc/IL-15 komplexu: prezentovat IL-15 jednotlivým subtypům buněk, exprimujících IL-15R $\beta\gamma_c$. Důkazem je vyšší proliferace buněk oproti současnému podání IL-15 a IL-15R α -Fc [85]. Aplikace samotného IL-15R α -Fc neprokázala vliv na prezentaci endogenního IL-15 MP CD8⁺ buňkám, tedy ani žádný blokační efekt na jejich proliferaci. Je to dáno tím, že IL-15 má pouze jedno vazebné místo pro interakci s IL-15R α , tudíž když už je jednou obsazené, interakce s IL-15R α -Fc nemůže proběhnout [85]. Dojde-li tedy v organismu k spontánní disociaci IL-15R α -Fc z komplexu, není tím zabráněno terapeutickému efektu.

In vitro testy neukázaly závislost komplexů na FcR signalizaci pro indukci proliferace [116], nicméně vazba na Fc-receptory bude mít pravděpodobně podpůrnou roli, neboť efekty signalizace přes sIL-15R α -Fc/IL-15 komplex jsou redukovány v Fc receptor- γ -negativní myši [91].

Rubinstein et al. (2006) ve svých výsledcích dokazují superagonistické působení komplexů, vznikajících vazbou solubilního lidského IL-15 k solubilnímu myším IL-15R α -Fc konstrukt. *In vitro* tento komplex účinně expanduje paměťové CD8⁺ T lymfocyty, CD122^{high} NK buňky a dokonce v menší míře i naivní CD8⁺ CD44^{lo} CD122^{lo} T lymfocyty [85, 116]. Protože citlivost buněk k množství podaného komplexu vždy koreluje s mírou CD122 exprese, pak NK buňky, exprimující nejvyšší hladiny CD122, odpovídají na nejnižší dávky podaného komplexu [91]. To bylo potvrzeno na modelu CD122^{-/-} CD8⁺ T lymfocytů či podáním blokační CD122 protilátky [116]. V souladu s touto skutečností B lymfocyty nereagují na přítomnost komplexů vůbec [117] a CD4⁺ T lymfocyty jen mírně [116]. Kvůli podstatně nižší hladině exprese CD122 jsou paměťové CD4⁺ T lymfocyty schopny efektivně využít IL-15 pouze v absenci paměťových CD8⁺ T lymfocytů a NK buněk [118]. sIL-15/IL-15R α komplex je také schopen expandovat IL-15 responzivní buňky (NK a CD8⁺ CD44^{hi} T lymfocyty) získané z periferních tkání v *in vitro* tkáňové kultuře. [85].

Komplexy IL-15/IL-15R α -Fc jsou až 50x účinnější než volný IL-15 *in vivo*. Aplikace komplexu IL-15/IL-15R α -Fc vede k troj- a vícenásobné proliferaci >95% adoptivně přenesených MP CD8⁺ buněk, ve srovnání s méně než 5% u stejného množství samotného IL-15 *in vivo*. Shodný efekt byl pozorován i pro antigenně specifické paměťové CD8⁺ T lymfocyty a NK buňky [85].

Kinetické studie, sledující proliferaci CD8⁺ T lymfocytů prokazují, že nejvyšší proliferace je dosaženo 4. den po podání jedné dávky IL-15/IL-15R α -Fc. Stupeň proliferace pozorovaný při aplikaci komplexů, nemůže být dosažen ani velkými dávkami samotného

IL-15. Proliferace CD8⁺ T lymfocytů *in vivo* totiž jeví při podání 12 µg samotného IL-15 plató fázi, tj. nedochází k vyšší proliferaci při dále se zvyšujících dávkách IL-15 [116].

In vivo indukují preasociované IL-15/IL-15R α -Fc komplexy také proliferaci naivních T-lymfocytů, i když až při vyšších koncentracích IL-15 [85]. I v nepřítomnosti antigenního stimulu v nich imunokomplexy indukují masivní proliferaci (klonální expanzi) a vyvinutí efektorových funkcí (antigenně specifickou lytickou aktivitu), následovanou zmenšením populace (retrakcí) a nakonec ústící ve vytvoření stabilní populace paměťových CD8⁺ T lymfocytů. Vzniklé paměťové CD8⁺ T lymfocyty jsou po *in vitro* restimulaci schopné produkce IFN- γ [116].

II.4.2.1 IL-15 komplexy – budoucí využití

IL-15/IL-15R α -Fc komplexy mají oproti volnému IL-15 mnoho předností [85, 91, 116]. Jejich hlavní výhodou je schopnost plně nahradit přirozenou transprezentaci IL-15 [85], a tak v cílových buňkách účinně navozovat efektorové funkce. Další výhodou je pak delší životnost v séru (až 20násobná ve srovnání s IL-15) a tím i o mnoho vyšší účinnost, které použitím samotného IL-15 není možné při působení na NK buňky, CD8⁺ a dokonce i CD4⁺ T lymfocyty (zejména paměťového fenotypu) dosáhnout. Tyto vlastnosti předurčují IL-15/IL-15R α -Fc komplexy k využití v případech, kde se již ukazuje pozitivní vliv aplikace IL-15. Zejména tedy v onkologii a vakcinaci, kde by účinná potenciace efektů IL-15 mohla mít významný terapeutický efekt.

Potenciál IL-15 komplexů v nádorové imunoterapii již byl prokázán na myších. Terapie pomocí IL-15/IL-15R α -Fc komplexů vedla společně s chemoterapií či adoptivním transferem nádorově-reaktivních CD8⁺ T lymfocytů k delšímu přežití jedinců či úplné regresi nádoru v mnoho myších nádorových modelech [119]. Například v experimentálním modelu B16-F₁ melanomu se po podání IL-15/IL-15R α -Fc komplexů u devíti z deseti myší nevytvořily metastázy v plicích a játrech [116]. Dále se v myším nádorovém modelu TC-1 jako velmi nadějná ukázala nádorová vakcína, využívající ozářené nádorové buňky exprimující chimérické IL-15/IL-15R α konstrukty, pro schopnost vyvolat nádorově-specifickou imunitní odpověď vyjádřenou systémovými protinádorovými efekty proti rodičovskému nádoru [120].

Rovněž preklinické studie prováděné na lidech naznačují slibné výsledky. Nicméně možnost, že zvýšená účinnost IL-15 komplexů povede současně k zvýšení toxicity nebo autoimunitě u lidí, je potřeba v dalších preklinických a klinických studiích vyloučit.

III. MATERIÁL A METODY

III.1 Roztoky

Fyziologický roztok (Fo)

NaCl 9,0 g

Doplnit do 1 l destilovanou vodou a upravit pH pomocí 4 M NaOH na 7,35.

Fosfát –fyziologický roztok (PBS)

NaCl 9,0 g

Na₂HPO₄.12H₂O 1,2 g

NaH₂PO₄.1H₂O 0,2 g

Doplnit do 1 l destilovanou vodou a upravit pH pomocí 4 M NaOH na 7,35.

Lyzační roztok

NH₄Cl 8,3 g

KHCO₃ 1,0 g

Na₂EDTA . 2 H₂O 0,037 g

Doplnit do 900 ml destilovanou vodou, upravit pH pomocí 4 M NaOH na 7,2-7,4 a doplnit do 1000 ml. Uchovávat při 4 °C.

Ředící pufr (RBT)

PBS 100 ml

1% želatina 100 ml

PEG 6000 6 g

Tween 20 0,2 ml (vznikne 0,1 % roztok)

Promývací pufr (PBT)

PBS 1000 ml

Tween 20 1 ml (vznikne 0,1 % roztok)

Blokovací roztok (1% želatina)

Želatina 1 g

PBS 100 ml

Roztok na průtokovou cytometrii (FACS roztok)

PBS obsahující navíc: 2 mM Na₂EDTA roztok (Invitrogen)

2 % FCS (fetal calf serum, Invitrogen)

Roztok pro magnetickou separaci buněk (MACS roztok)

PBS obsahující navíc: 2 mM Na₂EDTA roztok

0,5 % BSA (bovine serum albumin, ICN Biomedicals)

Roztok pro značení buněk karboxyfluorescein sukcinimidyl esterem (CFSE roztok)

PBS obsahující navíc: 0,1 % BSA

RPMI 1640 s 10 % FCS: médium pro buněčné kultury

450 ml RPMI 1640:

základní aminokyseliny: Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Tyr;

solí: Na₂HPO₄, NaCl, KCl;

pufrovací roztoky: NaHCO₃ -7,5 % roztok

tkáňová H₂O

5 ml glutamin (200 mM, Sigma-Aldrich)

5 ml antibiotika (10 000 U penicilin + 10 mg streptomycin/ml, Sigma-Aldrich)

5 ml Na-pyruvát (100 mM, Sigma-Aldrich)

5 ml HEPES (1,5 M, pH 7,2; Sigma-Aldrich)

0,5 ml 2-merkeptoethanol (50 mM, Sigma-Aldrich)

50 ml fetální telecí sérum (FCS) s inaktivovaným komplementem

III.2 Buňky

III.2.1 Používané buněčné linie

YAC-1 buněčná linie (ATCC) je odvozená z lymfomu indukovaného Mo-MuLV virem (Moloney murine leukemia virus), z myšího inbredního kmene A/Sn (Kiessling et al., 1975). YAC-1 buňky jsou vysoce citlivé k NK cytolytické aktivitě. Buňky jsou v *in vitro* systému suspenzní.

B16F10 kožní melanomová buněčná linie C57BL/6J myši. Buňky jsou v *in vitro* systému adherentní.

EL4 lymfoblastická buněčná linie odvozená z lymfomu indukovaného 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracenem v C57BL/6N myši. Buňky jsou rezistentní ke kortisolu a dexamethason a sensitivní k PHA. Buňky jsou v *in vitro* systému suspenzní.

III.2.2 Propagace buněk in vitro, zamrazení a rozmrazení buněk

Buňky byly propagovány v kultivačním médiu, a to buď na Petriho miskách, anebo v lahvích pro buněčné kultury. Kultivace probíhala v kultivačním boxu (Sanyo MCO-18AIC, Japonsko) při 37 °C, 100 % vlhkosti a v atmosféře 5 % CO₂. Buňky byly ředěny při dosažení vysoké, ale pokud možno ne maximální, populační denzity.

Zamrazování buněk bylo prováděno v kultivačním médiu s 20 % FCS a 10 % DMSO (dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich). Buňky (10⁶-10⁷ buněk/ml) byly v zamrazovacích ampulích uloženy do kryokontejneru s izopropanolem a přes noc ponechány v -70 °C. Poté byly skladovány při -150 °C.

Buňky byly rozmrazovány co nejrychleji ve vodní lázni (37 °C), poté převedeny do 50 ml kyvety a 2x promyty (250 g, 5 min, 4 °C, centrifuga Jouan MR22i, Francie) větším objemem (20-30 ml) kultivačního média. Životnost buněk byla určena pod mikroskopem pomocí trypanové modři, vždy se pohybovala mezi 65-95 %.

S buňkami bylo manipulováno v laminárním boxu (Telstar Bio-II-A/G, Španělsko) za sterilních podmínek. Počítání buněk bylo prováděno pod mikroskopem v trypanové modři pomocí Burkerovy komůrky nebo automaticky na Countess cell counteru (Life Technologies C10227, USA).

III.3 Protilátky a cytokiny

III.3.1 Cytokiny

Použitý rekombinantní myší IL-2 byl komerční produkt firmy PeproTech. Použitý rekombinantní myší IL-15 byl produktem firmy Prospec.

III.3.2 Konjugát IL-2-pHPMA

Hvězdicový konjugát poly(HPMA)-IL-2 (tj. IL-2-pHPMA) je molekula IL-2 kovalentně modifikována průměrně 3 semitelechelickými poly[N-(2-hydroxypropyl)metakrylamid] (pHPMA) řetězci [121]. Tento konjugát obsahuje 59

hmotnostních % IL-2 a má oproti volnému myšímému rIL-2 zhruba 4x vyšší molekulovou hmotnost ($M_w = 62,3$ kDa). Konjugát byl syntetizován na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i. v laboratoři prof. Ing. Karla Ulbricha, DrSc. Celé této laboratoři patří velký dík.

III.3.3 Příprava imunokomplexů

IL-2 imunokomplexy byly připraveny inkubací IL-2 s anti-IL-2 mAb v molárním poměru 2:1. Po 15 min inkubace byly imunokomplexy naředěny PBS na požadovanou koncentraci. Obdobně IL-15 komplexy byly připraveny inkubací IL-15 s IL-15R α -Fc v molárním poměru 2:1. A stejně tak po 15 min inkubace naředěny PBS na požadovanou koncentraci.

Anti-IL-2 mAb S4B6 byla darem od RNDr. Karla Drbala, Ph.D. z ÚMG, AV ČR, v.v.i. Anti-IL-2 mAb JES6-1A12 byla komerčním produktem firmy BioLegend, rekombinantní IL-15R α -Fc produktem firmy R&D Systems.

III.3.4 Stimulační a inhibiční protilátky

Stimulační anti-CD3 mAb použitá pro stimulaci CD8⁺ T buněk *in vitro* byla komerčním produktem firmy eBioscience. Blokační protilátka CTLA-4-IgG použitá při *in vitro* stimulaci OT-1 buněk od firmy BD Pharmingen.

III.3.5 Protilátky použité v ELISA

Od firmy BD Pharmingen byly použity protilátky anti-Rat IgG2a a RG7/1.30 (anti-Rat IgG2b). Pro ELISA detekci byla použita biotinylovaná anti-IL-2 mAb JES6.5H4 (eBioscience), anti-Rat IgG κ light chain-biotin (BD Pharmingen) a Extravidin-HRP (Sigma).

III.3.6 Protilátky využívané při průtokové cytometrii

Pro analýzu pomocí průtokové cytometrie byly použity tyto mAb: CD4-APC, CD8-PerCP-Cy5.5, CD8-A700, CD3-eF450, CD44-APC, CD45.2 (Ly 5.2)-APC, Ly5.2-A700, CD11b-A700, DX5-PE, IFN- γ -PE, IgG2b-PE, NK1.1-PerCP-Cy55, CD25-PE, CD25-APC,

Foxp3-PE, CD122-PE (eBioscience), CD4-PerCP, (BD Pharmingen). Bylo dodržováno doporučené ředění protilátek.

III.4 Experimentální zvířata

Myši kmene BALB/c a C57BL/6 byly získány z chovu na FGÚ AV CR, v.v.i. Transgenní OT-I myši a B6.SJL (Ly 5.1) myši byly získány z GMO chovu na ÚMG AVČR, v.v.i, kde byly taktéž provedeny všechny experimenty, ve kterých bylo nutné tyto myši použít (tj. myši nebyly transportovány do jiného zvěřince). Všechny myši byly staré 9-15 týdnů.

III.4.1 Izolace splenocytů

C57BL/6 myš byla usmrcena cervikální dislokací a byla jí vyjmuta slezina do MACS/FACS roztoku (MACS pro separaci buněk, FACS pro analýzu). Slezina byla homogenizována pomocí tkáňového disociátoru (gentleMACS Dissociator), suspenze buněk přefiltrována přes 70 µm filtr (BD Falcon) a stočena (250 g, 5 min, 4 °C). Pro odstranění erytrocytů byl pelet buněk resuspendován v 5 ml lyzačního roztoku pokojové teploty, po 10 min byl doplněn MACS/FACS roztokem do 50 ml a stočen (250 g, 5 min, 4 °C). Pelet byl resuspendován ve 2 ml MACS/FACS roztoku (pro separaci buněk/analýzu) nebo 2 ml kultivačního média (pro *in vitro* použití) a znovu přefiltrován. Buňky pak byly spočítány.

III.4.2 Izolace splenocytů pomocí Histopaque 1083

C57BL/6 myš byla usmrcena cervikální dislokací a byla jí vyjmuta slezina. Slezina byla homogenizována v Hanks pufru (Sigma-Aldrich), buňky byly přefiltrovány přes 70 µm filtr, stočeny (250 g, 5 min, 4 °C) a resuspendovány v 7,5 ml Hanks pufru. Do kyvety byly napipetovány 3 ml Histopaque 1083 (Sigma-Aldrich) a převrstveny 7 ml buněčné suspenze. Po stočení (350 g, 30 min, 4 °C) došlo k oddělení mononukleárních buněk od erytrocytů. Mononukleární buňky byly sebrány, promyty Hanks puftrem, resuspendovány v kultivačním médiu a spočítány.

III.4.3 Purifikace (OT-I) CD8⁺ T buněk

Pro izolaci CD8⁺ T lymfocytů byla C57BL/6 myš usmrcena cervikální dislokací a byly jí vyjmuty superficiální cervikální, inguinální, axilární, brachiální, lumbární a mezenteriální uzliny. V případě izolace OT-I CD8⁺ T lymfocytů je protokol shodný, jen se jednalo o OT-I myš. Uzliny byly homogenizovány v MACS roztoku, přefiltrovány přes 70 µm filtr a stočeny (250 g, 5 min, 4 °C). CD8⁺ T buňky byly purifikovány imunomagnetickou separací na MidiMACS separátoru (Miltenyi Biotec, Německo) s využitím LS Columns (Miltenyi Biotec) a pomocí CD8a⁺ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec). Purifikované CD8⁺ T buňky byly resuspendovány v PBS nebo v kultivačním médiu a spočítány.

III.4.4 CFSE značení buněk

Purifikované CD8⁺ T buňky byly stočeny (250 g, 5 min, 4 °C) a dvakrát promyty ledovým CFSE roztokem. Poté byl pelet buněk resuspendován (1×10^7 /ml) v CFSE roztoku předehřátém na 37 °C a k buňkám byly přidány 2 µl 5 mM CFDA SE v DMSO na každý 1 ml buněčné suspenze (Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit, Invitrogen). Poté byly buňky inkubovány 10 min při 37 °C. Pak byly buňky promyty ledovým kultivačním médiem a resuspendovány v ledovém PBS. Takto značené buňky byly připraveny k injikování do myši.

III.4.5 Purifikace NK buněk

Pro izolaci NK buněk byla C57BL/6 myš usmrcena cervikální dislokací a byly jí vyjmuty superficiální cervikální, inguinální, axilární, brachiální, lumbální a mezenteriální uzliny. Uzliny byly homogenizovány v MACS roztoku, přefiltrovány přes 70 µm filtr a stočeny (250 g, 5 min, 4 °C). NK buňky byly purifikovány imunomagnetickou separací na MidiMACS separátoru (Miltenyi Biotec, Německo) s využitím LS Columns (Miltenyi Biotec) a pomocí NK Cell Isolation Kit mouse (Miltenyi Biotec). Purifikované NK buňky byly resuspendovány v kultivačním médiu a spočítány.

III.5 Detekce proliferční aktivity

III.5.1 Proliferace OT-I CD8⁺ T buněk *in vitro*

Purifikované OT-I CD8⁺ T buňky byly ve 200 µl kultivačního média přeneseny do 96 jamkové destičky v množství 5x10⁴ na jamku. Stimulovány byly 50 nM SIINFEKL peptidem, nespecifická aktivace byla tlumena přidáním inhibiční CTLA-4-IgG o koncentraci 1 µg/ml. Do jamek bylo poté přidáno 10 µl (různé koncentrace) IL-2, IL-15, IL-2-pHPMA, IL-2/mAb (S4B6/JES6-1) imunokomplexů, nebo IL-15/IL-15Rα-Fc. Vše bylo prováděno za sterilních podmínek v laminárním boxu. Poté byla destička umístěna do kultivačního boxu a buňky byly inkubovány 72 h. Na posledních 8 h inkubace bylo k buňkám přidáno 50 µl roztoku ³H-thymidinu (20 kBq, Lacomed). Poté byly buňky z celé destičky zpracovány na přístroji Harvester 96 Mach 3 (Tomtec, USA). Membrána (Printed Filtermat A, Wallac) byla usušena v digestoři za laboratorní teploty. Poté byla zasunuta s destičkou plastického scintilátoru (MeltiLex A, Wallac) do foliové kapsy a na zatavovacím přístroji (Microsealer, Wallac, Finsko) byl scintilátor protaven skrz membránu. Měření aktivity (cpm) jednotlivých jamek probíhalo na přístroji MicroBeta 1450 Trilux (Wallac, Finsko).

III.5.2 Proliferace CD8⁺ T buněk *in vitro*

Purifikované CD8⁺ T lymfocyty byly přeneseny do 96 jamkové destičky v množství 5x10⁴ na jamku ve 200 µl kultivačního média s anti-CD3 mAb o koncentraci 10 µg/ml. Do jamek bylo poté přidáno 10 µl (různé koncentrace) IL-2, IL-15, IL-2-pHPMA, IL-2/mAb (S4B6/JES6-1) imunokomplexů, nebo IL-15/IL-15Rα-Fc komplexů. Vše bylo prováděno za sterilních podmínek v laminárním boxu. Dále je protokol shodný s tím výše popsaným (III.5.1).

III.5.3 Proliferace NK buněk *in vitro*

Purifikované NK buňky byly přeneseny do 96 jamkové destičky v množství 4,5x10⁴ na jamku ve 200 µl kultivačního média. Do jamek bylo poté přidáno 10 µl (různé koncentrace) IL-2, IL-2/S4B6 nebo IL-2/JES6-1 imunokomplexů, IL-15 nebo IL-15/IL-15Rα-Fc komplexů. Vše bylo prováděno za sterilních podmínek v laminárním boxu. Dále je protokol shodný s tím výše popsaným (III.5.1).

III.6 Průtoková cytometrie (FACS)

Analýza buněk byla prováděna na průtokovém cytometru LSR II (BD Bioscience, USA) a pro následné vyhodnocení dat byl využit FlowJo software (Tree Star, USA).

III.6.1 Expanze OT-I CD8⁺ T lymfocytů a dalších buněčných populací *in vivo*

Purifikované OT-I CD8⁺ T buňky (Ly 5.2) byly naznačeny CFSE a injikovány intravenózně (i.v.) B6.SJL (Ly 5.1) myším (2 myši/skupina) v obvyklém množství $1,2 \times 10^6$ buněk/myš. Po 24 h byly myším i.p. injikovány 4 nmol peptidu SIINFEKL (MBL International) ve 250 μ l PBS. Ten samý den byla myším i.p. podána první dávka IL-2/mAb imunokomplexů, IL-2-pHPMA, IL-15/ IL-15R α -Fc, nebo volného IL-2 či IL-15 ve 250 μ l PBS. Dle schématu pokusu byly eventuelní další dávky myším denně injikovány stejným způsobem. Přesné dávkování je uvedeno u jednotlivých experimentů. Skupině, která sloužila jako negativní kontrola, nebylo po adoptivním transferu buněk již nic aplikováno. Skupině, která sloužila jako pozitivní kontrola, byl aplikován peptid spolu s poly I:C (75 μ g, Sigma-Aldrich). Myši byly usmrceny 24 h po poslední dávce či v jiných časových bodech (dle jednotlivých experimentů). Izolované splenocyty byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie.

III.6.2 Značení buněčných populací na FACS analýzu

Z B6.SJL (Ly 5.1) myši byly homogenizací sleziny izolovány splenocyty. Buňky byly promyty FACS roztokem a stočeny (250 g, 5 min, 4 °C). S buňkami bylo dále pracováno na ledu. Pelet byl resuspendován ve FACS roztoku a buňky byly spočítány. Poté bylo do 96-ti jamkové destičky (dno typu V) napipetováno 3×10^6 buněk na jamku. Buňky byly v destičce stočeny (250 g, 4 min, 4 °C) a poté byly resuspendovány v 50 μ l 10 % myšího séra a ponechány na ledu. Pro značení povrchových antigenů byly stočené buňky (250 g, 4 min, 4 °C) inkubovány s příslušnými monoklonálními protilátkami konjugovanými s fluorochromem (v 10 μ l FACS roztoku) 30 min na ledu ve tmě a poté třikrát promyty FACS roztokem.

Pro intracelulární značení Foxp3 molekuly byly buňky resuspendovány ve 100 μ l fixačního pufru (eBioscience) a nechány 30 min na ledu ve tmě. Poté byly dvakrát promyty permeabilizačním pufrem (eBioscience), resuspendovány ve 100 μ l permeabilizačním pufrem

s 1 μ l anti-Foxp3 mAb a ponechány 30 min na ledu ve tmě. Poté byly buňky třikrát promyty permeabilizačním pufrem.

Na závěr byly buňky resuspendovány ve 100 μ l FACS roztoku a přeneseny do polypropylenových zkumavek se 100 μ l 6 % paraformaldehydu (Lach-Ner).

III.6.3 Restimulace CD8⁺ T lymfocytů *ex vivo* - indukce exprese IFN- γ

Suspenze splenocytů izolované z pokusných B6.SJL (Ly 5.1) myši byly spočítány. Buňky byly stočeny (250 g, 8 min, 4 °C) a přeneseny ve 2 ml kultivačního média do 12 jamkové destičky. K buňkám byl do kultivačního média přidán SIINFEKL peptid do výsledné koncentrace 50 nM a destičky byly po 6 hodin inkubovány v kultivačním boxu. Na poslední 4 hodiny inkubace byl do jamek připipetován Brefeldin A (Sigma-Aldrich) do výsledné koncentrace 2,5 μ g/ml. Buňky byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie.

Buňky byly převedeny do FACS roztoku a blokovány myším sérem viz výše (III.6.2). Pro značení povrchových antigenů byly buňky inkubovány s příslušnými monoklonálními protilátkami konjugovanými s fluorochromem (v 10 μ l FACS roztoku) 30 min na ledu ve tmě. Poté byly buňky třikrát promyty FACS roztokem a bylo provedeno intracelulární značení pomocí IFN- γ -PE mAb (eBioscience). Kontrolní značení bylo provedeno monoklonální izotypovou protilátkou IgG2b-PE (eBioscience). Postup a použité pufrы byly shodné jako při detekci Foxp3. Na závěr byly buňky resuspendovány ve 200 μ l FACS roztoku a přeneseny do polypropylenových zkumavek.

III.7 Stanovení maximální tolerované dávky (MTD)

III.7.1 MTD IL-2-pHPMA konjugátu a IL-2/S4B6 imunokomplexu

C57BL/6 myši (2-5 myši/skupinu) byly převáženy a označeny. Dle předchozích zkušeností bylo navrženo několik různě vysokých dávek ekvivalentu IL-2 v konjugátu/imunokomplexu. Dávka byla myším podána i.p., a to jeden den anebo pět po sobě následujících dnů ve stejnou dobu (přesné schéma uvedeno u jednotlivých experimentů). Přičemž veškeré dávky IL-2-pHPMA konjugátu nebo IL-2/S4B6 imunokomplexů byly vztaženy na hmotnost myši 20 g a případně navýšeny dle aktuální hmotnosti myši tak, aby poměr účinné látky na hmotnost myši byl konstantní. Pro zjištění toxicity byla během několika dní (7-13 dle experimentu) sledována vitalita myši a

zaznamenávána jejich hmotnost v % změně váhy oproti původnímu (neléčenému) stavu. Úmrtí byt' jediné myši ve skupině indikovalo přesazení MTD.

III.8 Stanovení poločasu v oběhu

III.8.1 Získání vzorků

V čase 0 byly C57BL/6 myšim (2 myši/skupina) i.v. aplikovány 2 μg IL-2 ekvivalentu IL-2-pHPMA, IL-2/JES6-1 komplexu anebo IL-2 v 250 μl PBS v čase 0. V časových intervalech: 3 min, 15 min, 1 hod, 2, 4, 6, 8, 24 a 48 hodin po aplikaci vzorků byly vždy dvě kontrolní myši vykrvены (podstřížením krkavice) do eppendorfek na ledu. Krev se nechala v lednici 30 minut srazit a poté byla centrifugována při vysokých otáčkách (14 000 rpm, 10 min, 4 °C) pro získání séra. Sérum bylo přeneseno do nové eppendorfky a znovu centrifugováno. Čisté sérum bez zbytků krve bylo použito pro ELISA detekci.

III.8.2 ELISA stanovení koncentrace IL-2-pHPMA ve vzorcích séra

Pro detekci koncentrace IL-2-pHPMA v séru byla použita sendvičová ELISA. NUNC MaxiSorp 96-ti jamková destička byla přes noc v lednici inkubována s anti-mouse JES6.1A12 (Biolegend) o konc. 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ředěné v PBS). Další den byly jamky 2 h při pokojové teplotě (RT) blokovány blokovacím roztokem (na třepačce). Po promytí jamek promývacím roztokem byly nanášeny zahuštěné vzorky a kalibrační řada séra s definovanou koncentrací IL-2-pHPMA (kontrola). Destičky byly inkubovány na třepačce 2 h při RT. Po promytí jamek promývacím roztokem byla nanášena protilátka anti-mouse JES6.5H4 – *biotin* (eBioscience) o konc. 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (v ředícím roztoku). Destička byla inkubována 1,5 h RT na třepačce. Následovalo promytí jamek promývacím roztokem a nanášení extravidin-HRP (Sigma) o konc. 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (v ředícím roztoku). Destička byla inkubována 1 h RT na třepačce. Po posledním promytí byl přidán substrát 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, Sigma) a destičky byly inkubovány ve tmě (max 10 min). Reakce byla zastavena 2 M H_2SO_4 . Absorbance byla vyhodnocena při 450 nm na přístroji BIOLISA. Z kalibrační křivky IL-2-pHPMA byla vypočtena koncentrace v séru v různých časových bodech od počátečního podání.

Stejným způsobem byla stanovena koncentrace IL-2 v séru (pro kalibraci byla použita kalibrační řada séra s definovanou koncentrací IL-2).

III.8.3 ELISA stanovení koncentrace IL-2/JES6-1 ve vzorcích séra

Opět byla pro detekci použita sendvičová ELISA (viz protokol III.8.2). Jedinou výjimkou v protokolu bylo použití anti-mouse protilátky RG7/1.30 pro adsorpci na destičku a následnou detekci IL-2/JES6-1 v séru.

III.9 Test NK aktivity

C57BL/6 myším (2 myši/skupina) byly i.p. injikovány 2,5 µg volného IL-2, nebo IL-15 a ekvivalentní množství IL-2-pHPMA, IL-15/ IL-15R α -Fc nebo IL-2/mAb imunokomplexů ve 250 µl PBS, a to pět dní před usmrcením a izolací splenocytů. Byl zvolen šetrný způsob izolace splenocytů pomocí Histopaque 1083. Splenocyty byly resuspendovány v kultivačním médiu a spočítány (dále jen efektorové buňky).

Narostlé YAC-1 buňky byly 24 h kultivovány s ³H-thymidinem (185 kBq/ml) v kultivačním médiu. Poté byly stočeny a třikrát promyty čistým kultivačním médiem. Nakonec byly resuspendovány v kultivačním médiu a spočítány (dále jen cílové buňky).

Efaktorové a cílové (1×10^4) buňky byly přeneseny do 96-ti jamkové destičky (dno typu U) v poměru 100:1, 33:1 a 11:1. Buňky byly inkubovány 4 h v celkovém objemu kultivačního média 200 µl na jamku. Poté byly buňky zpracovány na přístroji Harvester 96 a byla změřena aktivita (cpm) odpovídající jednotlivým jamkám. Cílové buňky kultivované v čistém médiu bez efektorových buněk sloužily jako kontrola. Cytolytická aktivita efektorových buněk (zabíjení cílových buněk) byla stanovena jako úbytek radioaktivity oproti kontrole („JAM assay“).

III.10 Teplotní denaturace cytokinů

Testovány byly IL-2, imunokomplexy IL-2/S4B6, IL-2/JES6-1 a konjugát IL-2-pHPMA. Komplexy IL-2 byly připraveny, jak je výše popsáno (III.3.3). Vzorky byly naředěny do eppendorfek na koncentraci 1 µg ekvivalentu cytokinu/ml v PBS. Teplotní škála byla zvolena následující: 40-100 °C (vždy po deseti stupních). TermoStat plus (Eppendorf) byl vyhřát na požadovanou teplotu, eppendorfky se vzorky v něm byly 5 min inkubovány a následně přeneseny do lednice.

Purifikované CD8⁺ T lymfocyty byly přeneseny do 96-ti jamkové destičky v množství 5×10^4 na jamku ve 200 µl kultivačního média s anti-CD3 mAb o koncentraci 10 µg/ml. Do jamek bylo poté přidáno 10 µl teplotně opracovaných vzorků IL-2, IL-15,

IL-15/IL-15R α -Fc, komplexů IL-2/S4B6, IL-2/JES6-1 a konjugátu IL-2-pHPMA (konečná koncentrace 50 ng/ml). Vše bylo prováděno za sterilních podmínek v laminárním boxu. Poté byla destička umístěna do kultivačního boxu a buňky byly inkubovány 72 h. Následně je protokol shodný s tím výše popsáním (III.5.1).

III.11 Léčba nádorů *in vivo*

III.11.1 Inokulace nádorových buněk

III.11.1.1 EL4 T lymfom

Suspenzní EL4 buňky byly propagovány v kultuře do dosažení požadovaného množství. Pak byly sebrány, stočeny (250 g, 8 min, 4 °C) a naředěny v PBS na požadovanou koncentraci. C57BL/6 myším bylo i.p. injikováno 1×10^5 EL4 buněk na myš (ve 250 μ l PBS pokud není u experimentu uvedeno jinak). Den, kdy byly myším injikovány buňky, je označován jako den 0.

III.11.1.2 B16F10 melanom

Adherentní B16F10 buňky byly propagovány v kultuře do dosažení požadovaného množství. Při izolaci bylo nejprve odsáto médium z kultivační nádoby. Pak byly buňky opláchnuty 0,53 mM roztokem EDTA proto, aby byly odstraněny všechny zbytky séra s inhibitory proteáz. Buňky byly uvolněny 5 minutovou kultivací s 3 ml roztoku Trypsin-EDTA (v kultivačním boxu (uvolnění buněk kontrolováno pod mikroskopem). Reakce byla zastavena přikapáním 7 ml kompletního média. Suspenze buněk byla poté sebrána, stočena (250 g, 8 min, 4 °C) a resuspendována v 5 ml PBS. Izolované B16F10 buňky byly naředěny v PBS na požadovanou koncentraci a i.p. injikovány C57BL/6 myším v množství 1×10^6 B16F10 buněk na myš (ve 250 μ l PBS pokud není u experimentu uvedeno jinak).

III.11.2 Podávání léčiv

III.11.2.1 Polymerní konjugát B-737

Polymerní konjugát B-737 je složen ze semitelechelických polymerů nesoucích hydrazonovou vazbou vázaný doxorubicin a navázaných na jádro konjugátu tvořené dendrimerní molekulou 2. generace. Konjugát má $M_w = 285$ kDa a obsahuje

9,5 hmotnostních % doxorubicinu. Konjugát B-737 byl syntetizován a charakterizován na Ústavu makromolekulární chemie AVČR, v.v.i. v laboratoři prof. Ing. Karla Ulbricha, DrSc. Celé této laboratoři patří velký dík.

BALB/c myším byl konjugát B-737 podáván i.v. do ocasní žíly ve 250 μ l PBS. Kontrolní myši byly ponechány bez léčby. Přesný rozvrh léčby, dávkování a počet myší ve skupině je uveden u jednotlivých experimentů.

III.11.2.2 Modulační imunitního systému

IL-2/S4B6 nebo IL-2/JES6-1 imunokomplexy, IL-15/IL-15R α -Fc a IL-2-pHPMA byly BALB/c myším injikovány i.p. ve 250 μ l PBS. Přesný rozvrh léčby, dávkování a počet myší ve skupině je uveden u jednotlivých experimentů. Kontrolním myším byl aplikován stejný objem fyziologického roztoku (250 μ l).

III.11.2.3 Sledování terapeutického efektu

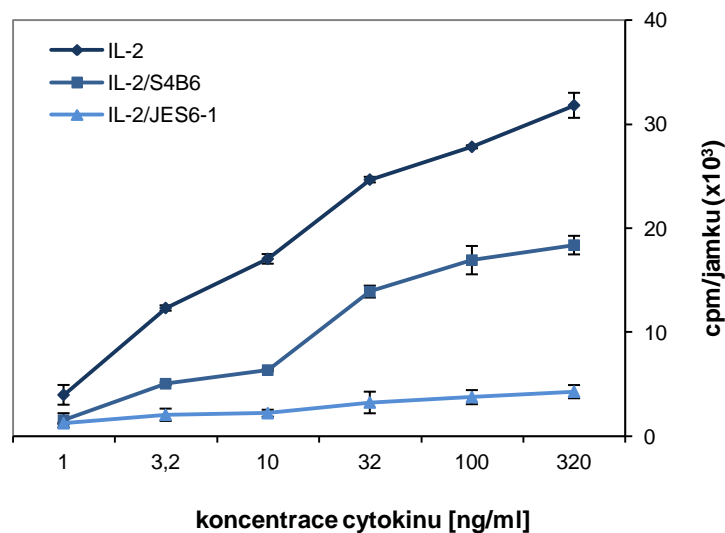
Při léčbě EL4 T lymfomu i B16F10 melanomu byla sledována doba přežití léčených myší ve srovnání s kontrolní neléčenou skupinou. Myši přežívající 120 dní bez známek nádoru byly považovány za vyléčené. Dále byla zaznamenávána velikost nádoru a případný úbytek hmotnosti myší, jako ukazatel možné toxicity léčby.

IV. VÝSLEDKY

IV.1 Potenciace biologické aktivity IL-2: α IL-2 mAb

IV.1.1 Vliv IL-2/mAb imunokomplexů na proliferaci NK buněk *in vitro*

Již bylo publikováno, že imunokomplexy IL-2/S4B6 i IL-2/JES6-1 (IL-2 imunokomplexy) stimulují proliferaci aktivovaných CD8⁺ T lymfocytů *in vitro*, avšak až při několikanásobně vyšší koncentraci než volný IL-2 [99]. Protože IL-2 se v klinické praxi využívá pro *in vitro* expanzi NK buněk před adoptivní terapií, ověřili jsme tedy, zda by neměl v této aplikaci IL-2 ve formě imunokomplexů větší potenciál. Purifikované NK buňky byly *in vitro* stimulovány různými koncentracemi ekvivalentu IL-2 ve formě volného cytokinu nebo imunokomplexu IL-2/S4B6 či IL-2/JES6-1 po 3 dny, stimulační potenciál byl vyjádřen jako proliferace NK buněk detekovaná pomocí inkorporace ³H-thymidinu.



Obr. IV.1: Srovnání schopnosti volného IL-2 a IL-2/mAb imunokomplexů indukovat proliferaci NK buněk *in vitro*. Purifikované NK buňky ($4,5 \times 10^4$ b./jamka) byly inkubovány 72 h v kultivačním médiu za standardních podmínek s různými koncentracemi volného IL-2, IL-2/S4B6 nebo IL-2/JES6-1. Proliferační aktivita byla měřena inkorporací ³H-thymidinu, který byl přidán na posledních 8 h inkubace. Každý experimentální bod představuje průměr 3 měření \pm SD. Experiment byl opakován dvakrát se srovnatelnými výsledky.

Oba IL-2/mAb imunokomplexy vykázaly oproti volnému IL-2 nízkou schopnost stimulace NK buněk zcela v souladu s publikovanými výsledky na aktivovaných CD8⁺ T lymfocytech. Na obrázku IV.1 je vidět, že téměř zanedbatelná proliferace NK buněk byla indukována IL-2/JES6-1 imunokomplexy, což je ve shodě s jejich popsanou selektivní schopností působit pouze na CD25^{high} buňky. Oproti tomu volný IL-2 byl velmi účinný již

při nízkých koncentracích a při maximální koncentraci dosáhl o 70 % vyšší proliferace NK buněk než nejvyšší koncentrace IL-2/S4B6 imunokomplexů (Obr. IV.I). Volný IL-2 prokázal schopnost indukovat při stejné koncentraci mnohonásobně vyšší míru proliferace NK buněk než oba IL-2 imunokomplexy *in vitro*.

IV.1.2 Charakterizace biologické aktivity IL-2/JES6-1 imunokomplexů *in vivo*

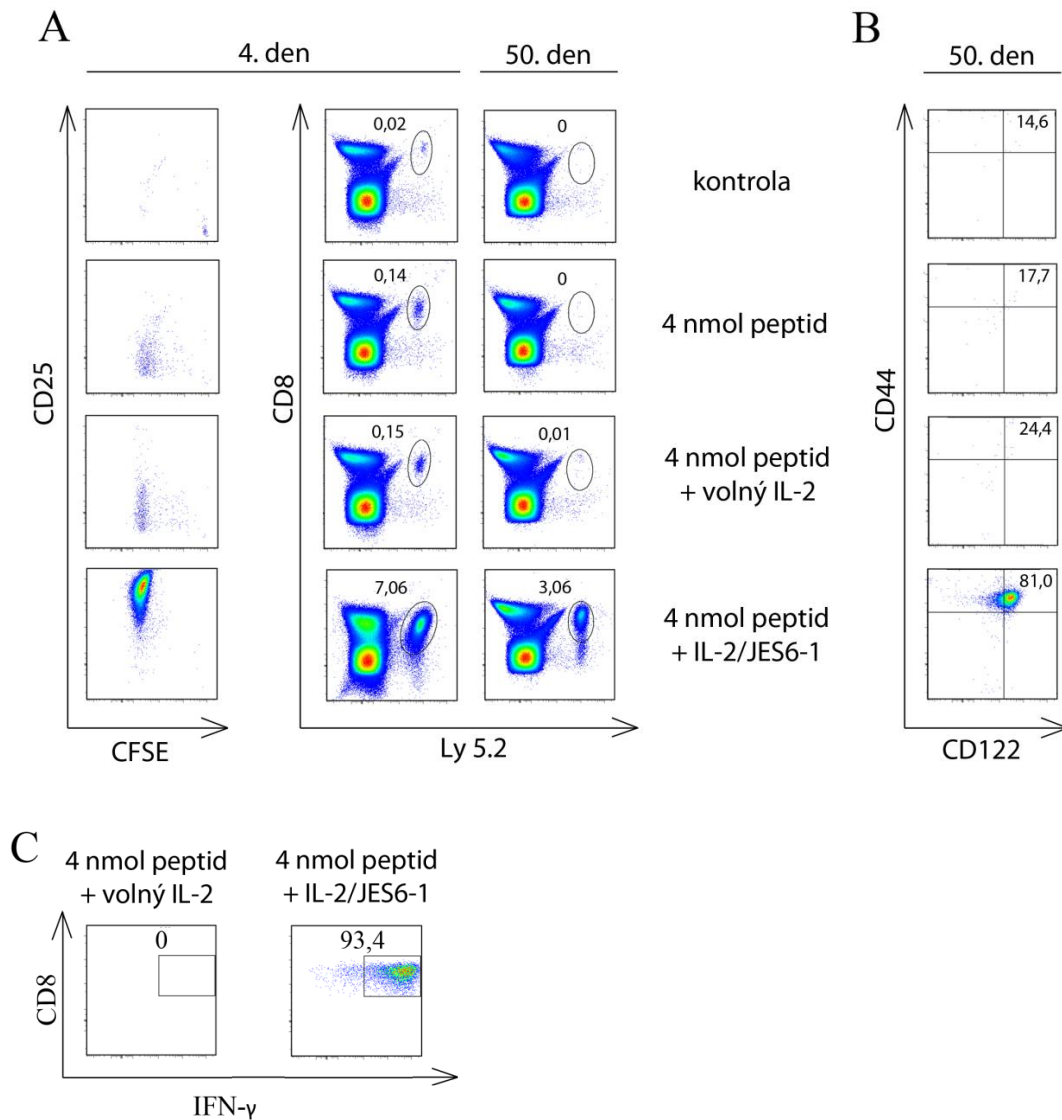
IV.1.2.1 *In vivo* expanze aktivovaných naivních OT-I CD8⁺ T lymfocytů pomocí IL-2/JES6-1 imunokomplexů

Schopnost IL-2/JES6-1 imunokomplexů selektivně stimulovat pouze CD25^{high} buňky již byla extenzivně popsána [21, 99, 113]. Naivní CD8⁺ T lymfocyty indukují po aktivaci přes TCR expresi CD25, stávají se tedy cílovou populací pro působení IL-2/JES6-1 imunokomplexů. Ověřili jsme schopnost imunokomplexů indukovat proliferaci a expanzi aktivovaných naivních CD8⁺ T lymfocytů a dále to, jestli takto aktivované buňky vytvoří stabilní populaci dlouho žijících a efektorově funkčních paměťových buněk.

V experimentu byl využit OT-I transgenní systém. C57BL/6 OT-I myši exprimují transgenní TCR ($V\alpha 2V\beta 5.1$), který rozpoznává peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) v kontextu s H2-K^b. Purifikované OT-I CD8⁺ T buňky (Ly5.2) byly adoptivně přeneseny do B6.SJL (Ly5.1) kongenních myší, aktivovány peptidem a stimulovány 1 vysokou dávkou volného IL-2, nebo IL-2 ve formě IL-2/JES6-1 imunokomplexů. Pro kontrolu byla použita stimulace pouze SIINFEKL peptidem; negativní kontrole nebylo po adoptivním transferu pak již nic aplikováno. Relativní expanze přenesených buněk byla sledována ve slezině 4. den po aktivaci, a také 50. den - tedy dostatečně dlouho na to, aby byly detekovány pouze skutečné paměťové buňky. 50. den byly naznačeny přenesené a hostitelské CD8⁺ T lymfocyty na expresi CD44 a CD122 pro možnost stanovení jejich paměťového fenotypu. Část splenocytárních suspenzí, izolovaných 50. den ze slezin myší stimulovaných IL-2 nebo IL-2/JES6-1 imunokomplexy, byla *in vitro* restimulována SIINFEKL peptidem a analyzována pro intracelulární expresi IFN- γ .

IL-2/JES6-1 imunokomplexy indukovaly značnou proliferaci (Obr. IV.2A, levý sloupec) a primární expanzi (Obr. IV.2A, prostřední sloupec) přenesených aktivovaných OT-I lymfocytů. Tyto expandované CD8⁺ T lymfocyty navíc vykazovaly ještě 4. den po aktivaci signifikantně vyšší hladinu exprese CD25 než buňky expandované samotným peptidem či peptidem kombinovaným s volným IL-2 (Obr. IV.2A, levý sloupec). Oproti tomu proliferace a primární expanze buněk indukované samotným peptidem či peptidem s

volným IL-2 (Obr. IV.2A, levý a prostřední sloupec) byly vzájemně srovnatelné a dramaticky nižší než po aplikaci IL-2/JES6-1 imunokomplexů.

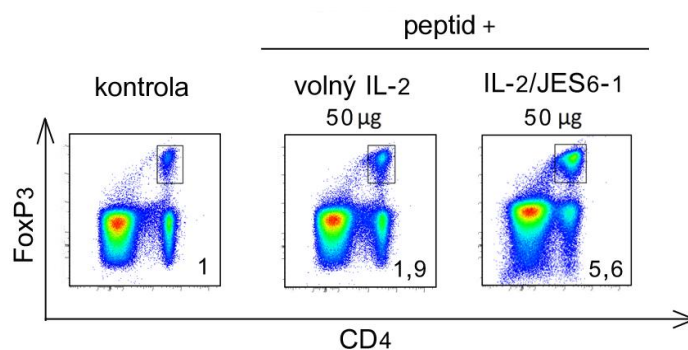


Obr. IV.2: IL-2/JES6-1 imunokomplexy indukují silnou expanzi aktivovaných naivních CD8⁺ T lymfocytů, které poté vytváří mohutnou populaci funkčních paměťových buněk. Purifikované naivní OT-I CD8⁺ T buňky (Ly5.2) byly adoptivně přeneseny do B6.SJL (Ly5.1) kongenních myši (2 myši/skupina). O 24 h později byl myším i.p. podán SIINFEBL peptid (4 nmol) současně s IL-2 (50 μ g/dávku) nebo IL-2/JES6-1 (50 μ g IL-2 ekvivalentu/dávku). Kontrola dostala pouze SIINFEBL peptid a negativní kontrola byla ponechána bez stimulace. Myši byly usmrceny 4. a 50. den po adoptivním transferu OT-I CD8⁺ T buněk, izolované splenocyty byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie. (A) Proliferace a relativní expanze Ly5.2⁺ CD8⁺ buněk ve slezině 4. a 50. den po aktivaci. (B) Přenesené CD8⁺ T lymfocyty byly značeny na expresi CD44 a CD122. (C) Splenocyty izolované 50. den z pokusných myši byly *ex vivo* restimulovány peptidem po 6 hodin a na poslední 4 hodiny byl přidán Brefeldin A. Expresie IFN- γ byla analyzována v Ly 5.2⁺ CD8⁺ buňkách. Experiment byl opakován dvakrát se srovnatelnými výsledky.

Významná část populace přenesených CD8⁺ T buněk byla detekována ještě 50. den ve slezině myši, kterým byl aplikován peptid společně s IL-2/JES6-1 imunokomplexy. Celých 81 % z těchto buněk navíc mělo CD44^{high} CD122^{high} fenotyp (Obr. IV.2B), který je identifikuje jako skutečné paměťové CD8⁺ T lymfocyty. Po setkání s příslušným peptid/MHC-I komplexem bylo 93 % těchto buněk s paměťovým fenotypem schopno exprese IFN- γ (Obr. IV.2C). Buňky expandované samotným peptidem během retrakční fáze zcela vymizely (Obr. IV.2A, pravý sloupec). U myši, kterým byl podán peptid společně s volným IL-2, se vytvořila velmi malá populace paměťových buněk (Obr. IV.2B), tyto buňky navíc po restimulaci nebyly schopny exprese IFN- γ .

IV.1.2.2 Expanze Treg buněk pomocí IL-2/JES6-1 imunokomplexů *in vivo*

Další populací CD25^{high} buněk jsou CD4⁺ FoxP3⁺ T regulační lymfocyty. V následujícím experimentu jsme ověřili schopnost IL-2/JES6-1 imunokomplexů indukovat expanzi těchto buněk, a to na stejných myších, jaké byly použity v experimentu expanze aktivovaných naivních OT-I CD8⁺ T buněk (IV.1.2.1). Myším byla i.p. injikována vysoká dávka volného IL-2 či stejné množství IL-2 ve formě IL-2/JES6-1 imunokomplexů; 5. den po aplikaci byla v jejich slezinách stanovena relativní expanze T reg buněk (CD4⁺ FoxP3⁺) vztahovaná ke kontrole.



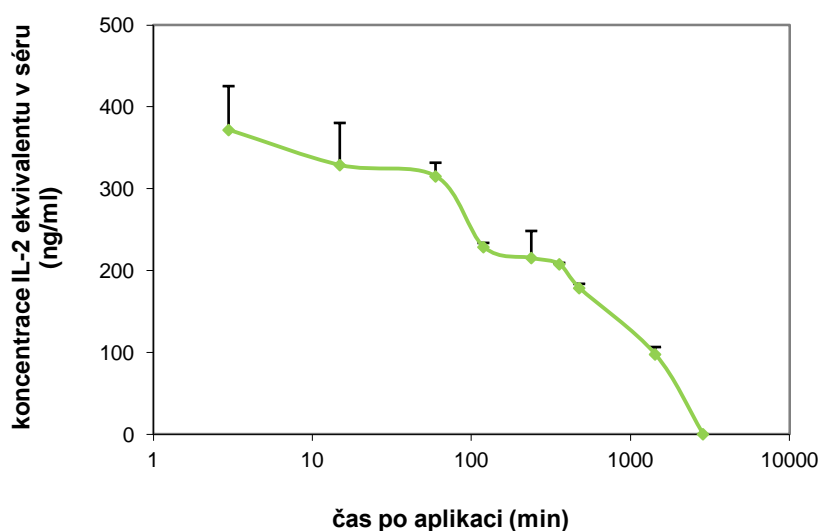
Obr. IV.3: IL-2/JES6-1 imunokomplexy indukují expanzi Treg buněk. B6.SJL myším bylo aplikováno 50 μ g volného IL-2 nebo jeho ekvivalentu ve formě IL-2/JES6-1 imunokomplexů. Kontrolní myši byly ponechány bez stimulace. Myši byly usmrceny 5. den po aplikaci IL-2, izolované splenocyty byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie. Expanze CD4⁺ FoxP3⁺ Treg buněk ve slezině byla analyzována a vynesena jako relativní expanze vztahovaná ke kontrole. Experiment byl opakován třikrát se srovnatelnými výsledky.

Volný IL-2 stimuloval expanzi Treg buněk, zcela v souladu se svojí známou biologickou aktivitou. Avšak na obrázku IV.3 je vidět, že IL-2/JES6-1 imunokomplexy indukovaly expanzi T reg buněk mnohonásobně vyšší než volný IL-2, dosahující téměř 6násobku kontroly.

IV.1.2.3 Určení biologického poločasu IL-2/JES6-1 imunokomplexů

Prokázali jsme, že IL-2/JES6-1 imunokomplexy jeví při stimulaci expanze aktivovaných CD8⁺ T lymfocytů (viz Obr. IV.2) a T regulačních buněk (viz Obr. IV.3) superagonistické schopnosti oproti volnému IL-2. Pro IL-2/S4B6 imunokomplexy, které rovněž vykazují superagonistické schopnosti oproti volnému IL-2, bylo popsáno prodloužení poločasu setrvání v oběhu [99]. Z tohoto důvodu jsme se pokusili určit biologický poločas IL-2/JES6-1 imunokomplexů s ohledem na objasnění jejich zvýšené biologické aktivity.

C57BL/6 myším bylo i.v. aplikováno 2 µg IL-2 ekvivalentu ve formě IL-2/JES6-1 imunokomplexů. Koncentrace IL-2/JES6-1 imunokomplexů v séru byla detekována po 3 a 15 minutách, 1 hodině a dále po 2, 4, 6, 8, 24 a 48 hodinách pomocí sendvičové ELISA metody.



Obr. IV.4: Eliminace IL-2/JES6-1 imunokomplexů z krve. C57BL/6 myším bylo i.v. aplikováno 2 µg IL-2 ekvivalentu IL-2/JES6-1 v čase 0. Po 3 a 15 minutách, 1 hodině a dále po 2, 4, 6, 8, 24 a 48 hodinách byla myším odebrána krev a z ní izolováno sérum. Koncentrace IL-2/JES6-1 imunokomplexů ve vzorcích séra byla detekována ELISA metodou s využitím IL-2/JES6-1 kalibrační řady. Experiment byl opakován dvakrát se srovnatelnými výsledky.

Imunokomplexy IL-2/JES6-1 byly v séru bez problémů detekovány ještě po 24 hodinách od aplikace (viz Obr. IV.4). Z vynesené křivky závislosti koncentrace na čase byl odhadnut jejich biologický poločas na 4-6 hodin. V porovnání s biologickým poločasem udávaným pro volný IL-2 projevíly IL-2/JES6-1 imunokomplexy v séru poločas zhruba 90x delší.

IV.1.3 Charakterizace biologické aktivity IL-2/S4B6 imunokomplexů *in vivo*

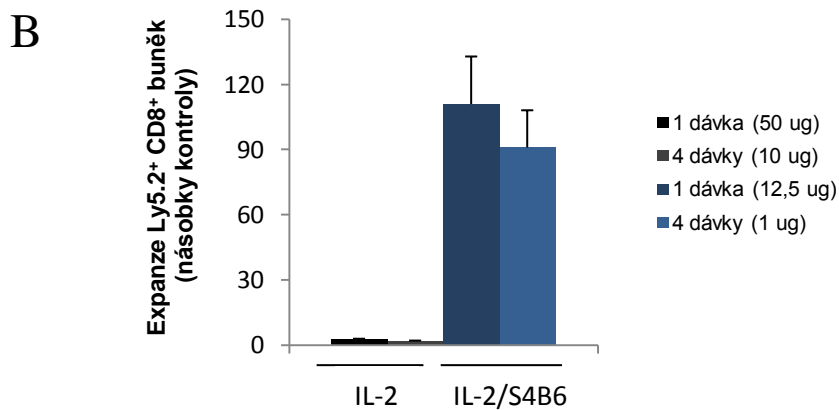
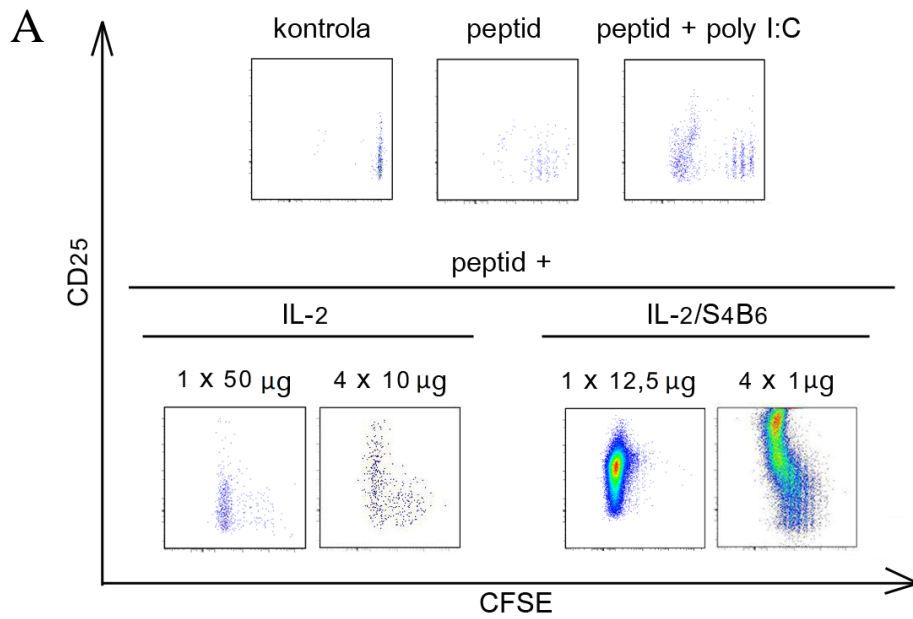
IV.1.3.1 *In vivo* expanze aktivovaných naivních OT-I CD8⁺ T lymfocytů pomocí IL-2/S4B6 imunokomplexů

Bylo publikováno, že IL-2/S4B6 imunokomplexy indukují signifikantně vyšší míru proliferace aktivovaných naivních CD8⁺ T lymfocytů než volný IL-2 *in vivo* [99]. Pozorovali jsme, že biologické efekty dosažené jednou vysokou dávkou IL-2/S4B6 imunokomplexů mohou být srovnatelné s administrací několika po sobě následujících nízkých dávek. Ověřili jsme tedy schopnost IL-2/S4B6 imunokomplexů indukovat expanzi OT-I CD8⁺ T buněk a dále porovnali expanzi indukovanou 1 vysokou nebo 4 nízkými dávkami imunokomplexů.

Purifikované OT-I CD8⁺ T buňky (Ly5.2) byly adoptivně přeneseny do B6.SJL (Ly5.1) kongenních myší a aktivovány SIINFEKL peptidem. IL-2/S4B6 imunokomplexy byly podány jednorázově v dávce 12,5 μg ekvivalentu IL-2 nebo ve čtyřech dávkách po ekvivalentu 1 μg IL-2. Kvůli dříve popsanému zanedbatelnému vlivu na expanzi aktivovaných OT-I CD8⁺ T buněk [99] byla pro srovnání zvolena vyšší jednorázová (50 μg) i čtyřnásobná (10 μg) dávka volného IL-2. Pro pozitivní kontrolu byla použita stimulace kombinací peptidu a poly I:C, další kontrolou byla aplikace samotného peptidu. Myším, které sloužily jako negativní kontrola, nebylo po adoptivním transferu již nic aplikováno. Byla sledována relativní expanze aktivovaných CD8⁺ T lymfocytů oproti kontrole.

IL-2/S4B6 imunokomplexy podané v jedné i čtyřech dávkách vykázaly vysokou schopnost stimulovat proliferaci (viz Obr. IV.5A) a expanzi (Obr. IV.5B) aktivovaných OT-I CD8⁺ T lymfocytů. Volný IL-2, ač podaný v mnohonásobně vyšším množství, prokázal oproti IL-2/S4B6 imunokomplexům pouze zanedbatelný stimulační efekt. OT-I CD8⁺ T buňky expandované IL-2/S4B6 imunokomplexy měly 5. den po aktivaci vysokou expresi CD25, která se dále zvýšila spolu s počtem dávek (Obr. IV.5A, 4 dávky). OT-I CD8⁺ T buňky expandované volným IL-2 či SIINFEKL peptidem a poly I:C jevíly hladinu exprese CD25 značně nižší. Nicméně i v těchto skupinách byla zaznamenána detekovatelná expanze OT-I CD8⁺ T lymfocytů (2-3x).

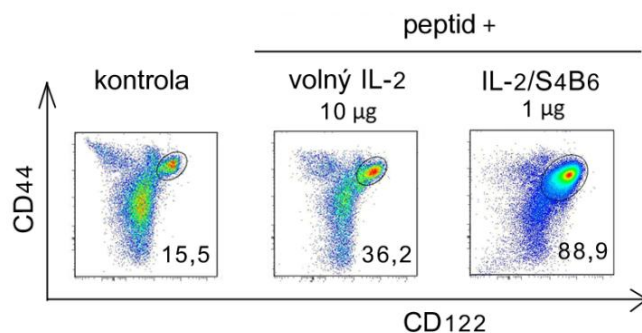
Dále jsme ukázali, že srovnatelné míry expanze aktivovaných OT-I CD8⁺ T buněk může být dosaženo jednou vysokou dávkou IL-2/S4B6 imunokomplexů či čtyřmi nízkými dávkami o signifikantně nižším celkovém množství IL-2 ekvivalentu.



Obr. IV.5: Proliferace a expanze aktivovaných CD8⁺ T buněk indukovaná IL-2/S4B6 imunokomplexy. Purifikované naivní OT-I CD8⁺ T buňky (Ly5.2) byly označeny CFSE a adoptivně přeneseny do B6.SJL (Ly5.1) kongenních myší (2 myši/skupina). SIINFEKL peptid (4 nmol) byl myším podán i.p. o 24 h později. Myším byla podána jedna dávka IL-2 (50 µg) či IL-2/S4B6 imunokomplexů (12,5 µg IL-2 ekvivalentu) nebo 4 dávky IL-2 (10 µg/dávku) či IL-2/S4B6 imunokomplexů (1 µg IL-2 ekvivalentu/dávku). První dávka byla podána stejný den jako peptid, každá další vždy po 24 hodinách. Kontrolní myši byly ponechány bez stimulace. Pozitivní kontrole byl aplikován peptid spolu s 25 µg poly I:C. Myši byly usmrceny 5. den po adoptivním transferu OT-I CD8⁺ T buněk a izolované splenocyty byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie. (A) Exprese CD25 a CFSE profil Ly5.2⁺ CD8⁺ buněk. (B) Kvantifikace relativní expanze Ly5.2⁺ CD8⁺ buněk ve slezině. Experiment byl opakován třikrát se srovnatelnými výsledky.

IV.1.3.2 Expanze paměťových CD8⁺ T buněk mediovaná IL-2/S4B6 imunokomplexy *in vivo*

Určili jsme stimulační aktivitu IL-2/S4B6 imunokomplexů pro paměťové CD8⁺ T lymfocyty. B6.SJL myšim byly ve čtyřech dávkách i.p. injikovány IL-2/S4B6 imunokomplexy nebo volný IL-2. Ve slezině byla sledována populace CD3⁺ CD8⁺ lymfocytů a v rámci ní bylo stanoveno procentuální zastoupení paměťových CD8⁺ T buněk (CD44^{high} CD122^{high}).



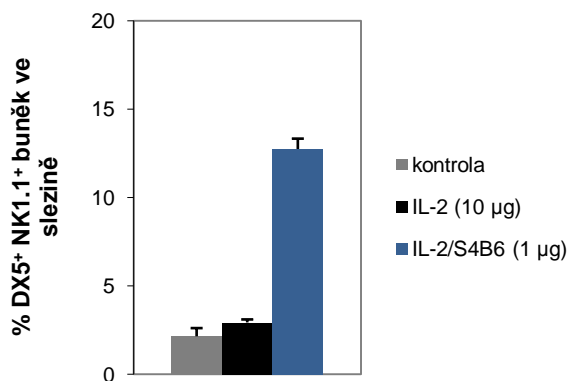
Obr. IV.6: Expanze paměťových CD8⁺ T buněk indukovaná IL-2/S4B6 imunokomplexy. B6.SJL (Ly5.1) myšim byl ve 4 dávkách (s intervaly vždy 24 h mezi dávkami) podán volný IL-2 (10 µg/dávku) či IL-2/S4B6 imunokomplexy v množství 1 µg ekvivalentu IL-2 na dávku. Kontrolní myši byly ponechány bez stimulace. Myši byly usmrceny 5. den (24 h po poslední dávce) a izolované splenocyty byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie. Ve slezině bylo stanoveno procentuální zastoupení CD44^{high} CD122^{high} CD8⁺ T buněk v populaci CD3⁺ CD8⁺ buněk. Experiment byl opakován třikrát se srovnatelnými výsledky.

IL-2/S4B6 imunokomplexy, ač podané v desetkrát nižší dávce než volný IL-2, indukovaly téměř 6násobnou expanzi CD44^{high} CD122^{high} paměťových CD8⁺ T buněk oproti ničím nestimulované kontrole (Obr. IV.6).

IV.1.3.3 Expanze NK buněk pomocí IL-2/S4B6 imunokomplexů *in vivo*

NK buňky jsou významnou součástí vrozeného imunitního systému, neboť hrají významnou roli v rejekci nádorů a buněk infikovaných virem. Schopnost IL-2/S4B6 indukovat expanzi NK buněk *in vivo* byla popsána již dříve [21, 85]. Protože jsme však tyto komplexy zamýšleli použít pro imunomodulaci imunitního systému v protinádorové terapii, ověřili jsme publikovaná data týkající se míry expanze NK buněk indukované několika po sobě jdoucími dávkami IL-2/S4B6 komplexů.

V tomto experimentu bylo sledováno procento NK buněk (NK1.1⁺ DX5⁺) ve slezině B6.SJL myši, kterým byly ve čtyřech dávkách i.p. injikovány volný IL-2 či IL-2/S4B6 imunokomplexy.



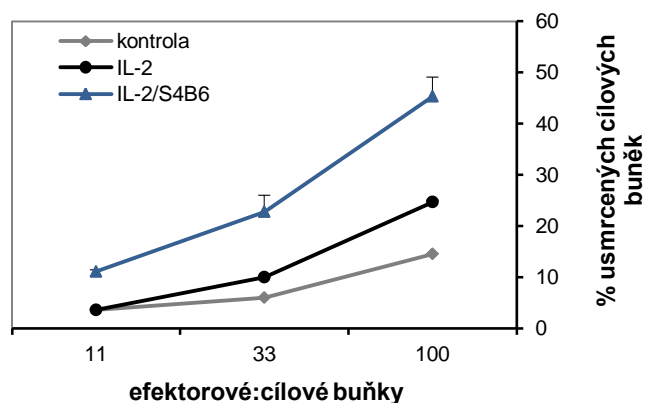
Obr. IV.7: Expanze NK buněk indukovaná IL-2/S4B6 imunokomplexy, sledovaná jako procento NK1.1⁺ DX5⁺ buněk ve slezině. Volný IL-2 v dávce 10 µg nebo IL-2/S4B6 imunokomplexy v dávce 1 µg ekvivalentu IL-2 byly B6.SJL myším (2 myši/skupina) podány ve čtyřech dávkách s intervaly vždy 24 h mezi dávkami. Kontrolní myši byly ponechány bez stimulace. Myši byly usmrceny 24 h po poslední dávce a izolované splenocyty byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie. Experiment byl opakován třikrát se srovnatelnými výsledky.

V souladu s literaturou bylo pozorováno, že NK buňky jsou významně expandovány pomocí IL-2/S4B6 imunokomplexů, zatímco samotný IL-2, přestože podáván v desetinásobné dávce, měl jen zanedbatelný efekt (Obr. IV.7).

IV.1.3.4 Vliv IL-2/S4B6 imunokomplexů na aktivitu NK buněk

Prokázali jsme, že po systémovém podání IL-2/S4B6 imunokomplexů dochází k několikanásobné expanzi NK buněk (viz IV.1.3.3). Dále jsme chtěli zjistit, jak tyto komplexy ovlivňují jejich funkční aktivitu. Vliv IL-2/S4B6 imunokomplexů na NK buňky byl tedy určen funkčním testem jejich cytotoxické aktivity („JAM assay“).

C57BL/6 myším bylo i.p. injikováno 2,5 µg samotného IL-2 nebo IL-2 ve formě IL-2/S4B6 imunokomplexů. Po pěti dnech byly myši usmrceny a následně byly izolovány mononukleární buňky, které sloužily jako buňky efektorové. Jako cílové buňky byly použity buňky YAC-1 buněčné linie, které jsou vysoce senzitivní k cytolytické aktivitě zprostředkované NK buňkami. Cílové buňky byly označeny ³H-thymidinem a byly inkubovány s různým počtem mononukleárních buněk (efektorových buněk). Usmrcování cílových buněk bylo sledováno jako úbytek radioaktivity.



Obr. IV.8: Srovnání vlivu IL-2 a IL-2/S4B6 imunokomplexů na cytolytickou aktivitu NK buněk u C57BL/6 myši. (A) i (B): Myšim (2 myši/skupina) byly i.p. injikovány 2,5 µg IL-2 volného, nebo ekvivalentu ve formě IL-2/S4B6 imunokomplexu (den 0). Kontrolním myšim byl aplikován stejný objem fyziologického roztoku (250 µl). Po 5 dnech byly myši usmrceny a byly izolovány mononukleární buňky. Ty byly inkubovány 4 h za standardních podmínek v kulturačním médiu s ³H-thymidinem-značenými cílovými YAC-1 buňkami v poměru 11:1, 33:1, 100:1. Usmrcování cílových buněk bylo sledováno jako procentuální úbytek radioaktivity vzhledem k hladině radioaktivity v kontrolních vzorcích bez efektorových buněk (vždy vyšší než 5x10⁴ cpm). Každý experimentální bod představuje průměr 8 měření ± SD. Experiment byl opakován čtyřikrát se srovnatelnými výsledky.

Na obrázku IV.8 je znázorněno, že mononukleární buňky izolované z kontrolních myši byly schopné ve 100násobném nadbytku (poměr efektorů a cílových buněk 100:1) usmrtit přibližně 15 % cílových buněk. Stimulace myši volným IL-2, který se pro stimulaci NK cytotoxické aktivity již klinicky využívá, zvýšila cytolytickou aktivitu jejich efektorových buněk o 10% oproti kontrole, avšak pouze při 100:1 poměru efektorů k cílovým buňkám. Oproti tomu NK buňky z myši stimulované imunokomplexy IL-2/S4B6 vykazovaly signifikantně vyšší cytolytickou aktivitu než kontrolní splenocyty. Navíc oproti volnému IL-2 stimulovaly IL-2/S4B6 imunokomplexy cytolytickou aktivitu NK buněk s několikanásobně vyšší účinností, a to při všech testovaných poměrech efektorů k cílovým buňkám. Tato účinnost při 100násobném nadbytku efektorových buněk shodně dosahovala až 45 % usmrcených cílových buněk. Prokázali jsme tedy, že IL-2/S4B6 imunokomplexy nejen významně expandují NK buňky *in vivo*, ale současně v nich stimulují i cytolytickou aktivitu - v obou případech mnohem účinněji než volný IL-2.

IV.1.3.5 Stimulační poměr IL-2/S4B6 imunokomplexů pro efektorové buňky vůči buňkám supresorovým

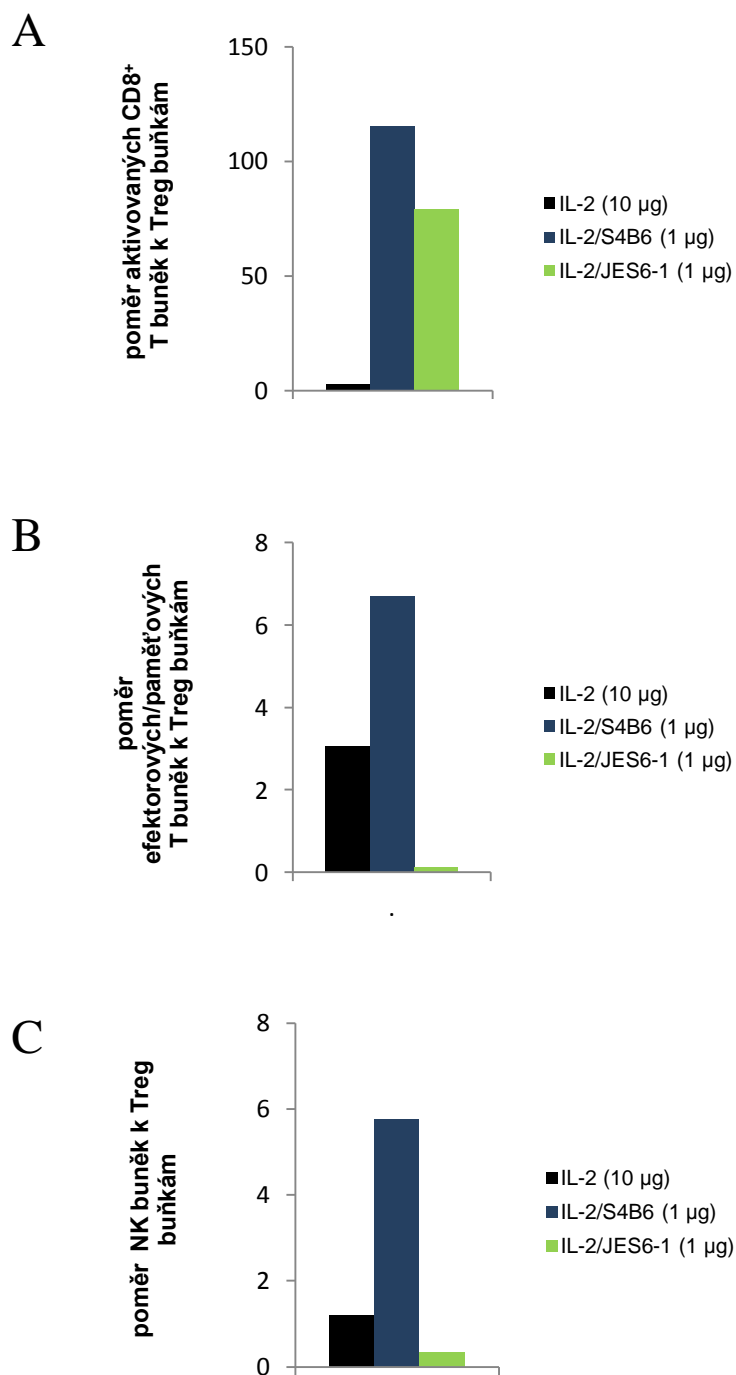
Mezi efektorové buňky protinádorové imunity patří aktivované i efektorové (paměťové) CD8⁺ T lymfocyty a NK buňky. Prokázali jsme, že aktivované naivní CD8⁺ T

lymfocyty jsou značně expandovány IL-2/JES6-1 imunokomplexy a následně vytváří stabilní populaci dlouho žijících a efektorově funkčních paměťových buněk (IV.1.2.1). Schopnost IL-2/S4B6 imunokomplexů indukovat expanzi aktivovaných i paměťových CD8⁺ T lymfocytů a NK buněk jsme také experimentálně potvrdili (viz IV.1.3.1-3). Kromě vysoké stimulační aktivity pro efektorové buňky je však pro eventuelní využití IL-2 imunokomplexů v protinádorové terapii důležitá také nízká stimulační aktivita pro buňky supresorové.

Z tohoto hlediska jsme testovali vliv IL-2/S4B6 a IL-2/JES6-1 imunokomplexů na expanzi Treg buněk a díky tomu mohli vyjádřit stimulační poměr pro efektorové versus supresorové buňky. S ohledem na použití v imunoterapii nádorů tak bylo možno porovnat volný IL-2, nespecificky působící na T lymfocyty, s jeho selektivně působícími formami - IL-2 imunokomplexy.

Purifikované OT-I CD8⁺ T buňky (Ly5.2) byly adoptivně přeneseny do B6.SJL (Ly5.1) kongenních myší a následující den aktivovány SIINFEKL peptidem. Myším bylo ve čtyřech dávkách i.p. injikováno 10 µg volného IL-2 nebo 1 µg ekvivalentu IL-2 ve formě IL-2/S4B6 či IL-2/JES6-1 imunokomplexů na dávku. Indukovaná expanze Treg buněk (CD4⁺ FoxP3⁺), aktivovaných CD8⁺ T lymfocytů (Ly5.2⁺ CD8⁺), paměťových CD8⁺ T lymfocytů (CD44^{high} CD122^{high}) a NK buněk (DX5⁺ NK1.1⁺) ve slezině byla kvantifikována a z ní byly vypočteny stimulační poměry.

Výsledky ukázaly, že IL-2/S4B6 imunokomplexy nestimulují T regulační buňky v takové míře, jako volný IL-2. V souladu s tím jsme u IL-2/S4B6 imunokomplexů prokázali stimulační poměr vhodný pro protinádorovou imunoterapii, tedy mnohonásobně favorizující expanzi efektorových buněk - CD8⁺ T lymfocytů (Obr. IV.9A a B) a NK buněk (Obr. IV.9C) nad buňkami supresorovými. IL-2/JES6-1 imunokomplexy, vykazující schopnost selektivně stimulovat pouze CD25^{high} buňky, indukovaly vysokou míru expanze Treg buněk. V souladu s tím jsme u IL-2/JES6-1 imunokomplexů prokázali vhodný stimulační poměr pro protinádorovou imunoterapii pouze pro aktivované CD8⁺ T lymfocyty (viz Obr. IV.9A).



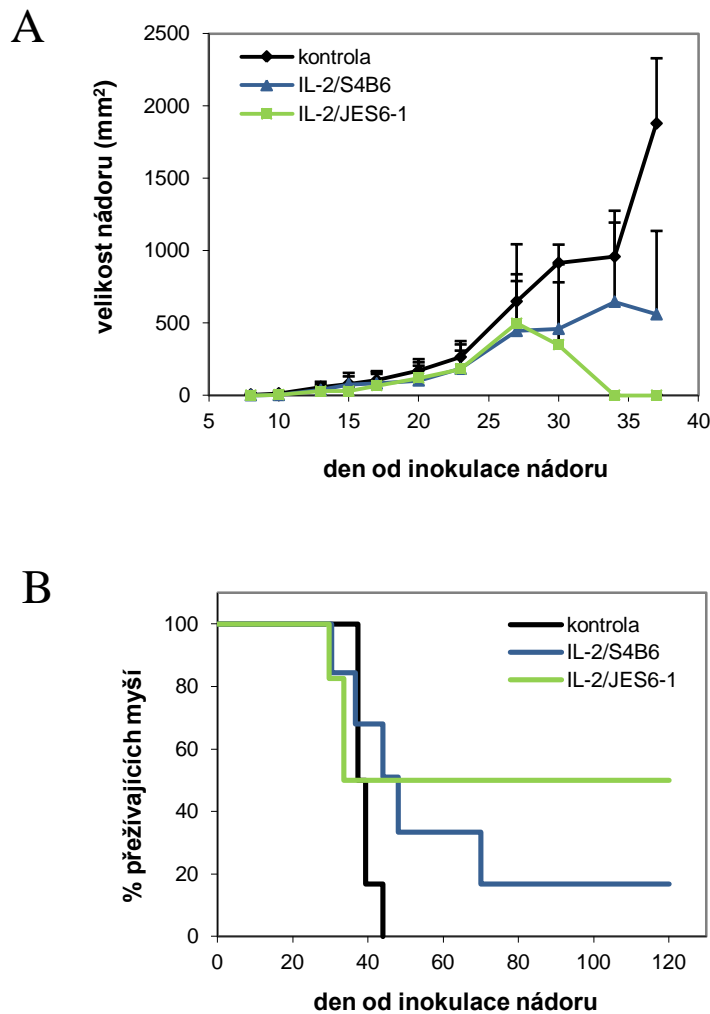
Obr. IV.9: Stimulační poměr IL-2/S4B6 imunokomplexů pro efektorové versus supresorové buňky protinádorové imunity. (A-C) Purifikované naivní OT-I CD8⁺ T buňky (Ly5.2) byly označeny CFSE a adoptivně přeneseny do B6.SJL (Ly5.1) kongenních myši (2 myši/skupina). SIINFEKL peptid (4 nmol) byl myším podán i.p. o 24 h později. Volný IL-2 v dávce 10 µg nebo IL-2/S4B6 či IL-2/JES6-1 imunokomplexy v dávce 1 µg ekvivalentu IL-2 byly B6.SJL myším (2 myši/skupinu) podány ve čtyřech dávkách s intervaly vždy 24 h mezi dávkami. Kontrolní myši byly ponechány bez stimulace. Myši byly usmrceny 24 h po poslední dávce a izolované splenocyty byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie. Relativní expanze Ly5.2⁺ T lymfocytů, paměťových CD44^{high} CD122^{high} CD8⁺ T lymfocytů, DX5⁺ NK1.1⁺ a CD4⁺ FoxP3⁺ T buněk ve slezině byly analyzovány. Průměrné stimulační poměry pro dané populace byly vypočteny z těchto relativních expanzí. Experiment byl opakován třikrát se srovnatelnými výsledky. (A) Poměr expanze aktivovaných Ly5.2⁺ CD8⁺ T buněk k CD4⁺ FoxP3⁺ buňkám. (B) Poměr expanze CD8⁺CD44^{high} CD122^{high} T lymfocytů k CD4⁺ FoxP3⁺ buňkám. (C) Poměr expanze Ly5.2⁺ CD8⁺ buněk k CD4⁺ FoxP3⁺ buňkám.

IV.1.4 Protinádorový potenciál IL-2/mAb imunokomplexů

Aktivované CD8⁺ T lymfocyty a NK buňky hrají důležitou roli v protinádorové imunitě. Prokázali jsme, že IL-2/S4B6 imunokomplexy indukují značnou expanzi aktivovaných CD8⁺ T lymfocytů (IV.1.3.1) a NK buněk (IV.1.3.3), u nichž současně stimulují cytolytickou aktivitu (IV.1.3.4). Také jsme potvrdili schopnost IL-2/JES6-1 imunokomplexů indukovat proliferaci a expanzi aktivovaných naivních CD8⁺ T lymfocytů a dále to, že tyto aktivované buňky vytváří stabilní populaci dlouho žijících a efektorově funkčních paměťových buněk (IV.1.2.1). U IL-2/S4B6 imunokomplexů jsme navíc prokázali stimulační poměr pro jednotlivé buněčné subpopulace vhodný pro imunoterapii nádorů (IV.1.3.5). Na základě všech těchto zjištění jsme se rozhodli otestovat protinádorovou aktivitu IL-2 imunokomplexů na dvou nádorových modelech - EL4 T-lymfomu a B16F10 melanomu.

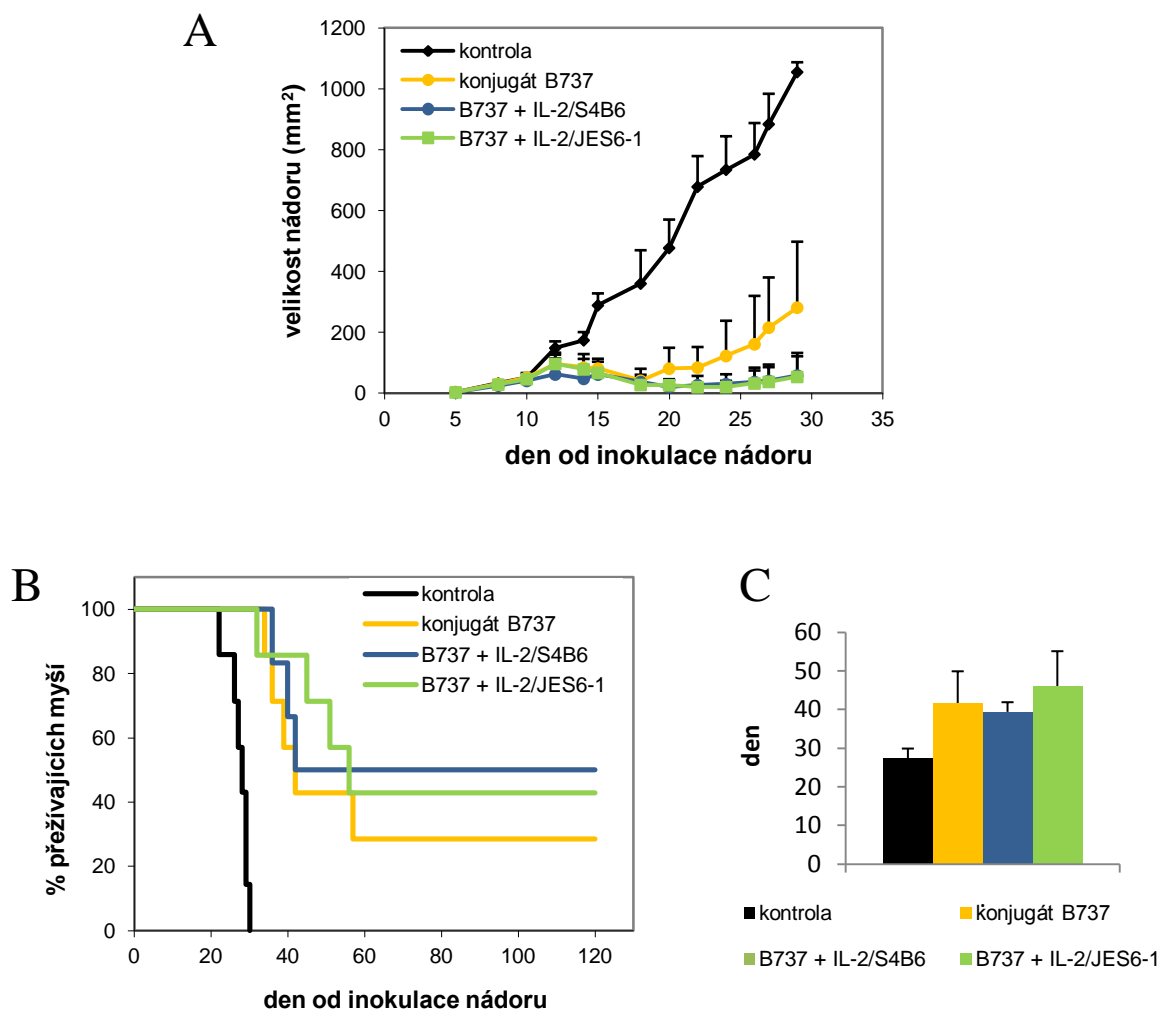
V nádorovém modelu EL4 T-lymfomu bylo C57BL/6 myším subkutánně (s.c.) injikováno 1×10^5 EL4 buněk. Léčba imunokomplexy IL-2/S4B6 či IL-2/JES6-1 byla provedena v terapeutickém režimu - ve dvou dávkách, a to 3. a 6. den po inokulaci EL4 nádoru. Časové rozmezí mezi dávkami bylo vybráno dle studií expanze buněk po léčbě komplexy, druhá dávka tak měla podpořit buněčnou imunitu indukovanou dávkou první. Léčebný režim byl tedy nastaven tak, aby byl imunitní systém stimulován k vyvinutí protinádorové odpovědi v době, kdy je ještě schopen rostoucí nádor eliminovat, tedy ještě před tím, než dosáhl hmatatelné velikosti.

U neléčených kontrolních myší byl zaznamenán exponenciální růst nádoru do 35. dne po inokulaci. U myší léčených IL-2 imunokomplexy byl růst nádoru značně zpomalen a byl doprovázen prodloužením doby života oproti kontrolní neléčené skupině (viz Obr. IV.10). Při tomto léčebném režimu došlo ve skupině myší léčených IL-2/S4B6 imunokomplexy k vyléčení 1 myš z 6. Největším překvapením byla protinádorová aktivita dosažená léčbou IL-2/JES6-1 imunokomplexy, která vykazala striktní ano/ne charakter. Ve skupině šesti myší tak u tří myší nedošlo k reakci na léčbu IL-2/JES6-1 imunokomplexy, tedy ani k prodloužení doby života oproti neléčeným kontrolním myším. Naproti tomu zbylé 3 myši z šesti rychle zareagovaly na léčbu, nádor odhrojily a zcela se vyléčily (Obr. IV.10). V případě reakce na IL-2/JES6-1 imunokomplexy tedy pravděpodobně převážila aktivita a expanze imunokompetentních buněk s pozitivní funkcí v kontrole/eliminaci nádoru (aktivovaných CD8⁺ T lymfocytů) nad expanzí supresivních Treg buněk.



Obr. IV.10: Vliv léčby pomocí IL-2/S4B6 či IL-2/JES6-1 imunokomplexů na růst EL4 lymfomu a přežívání C57BL/6 myši s nádorem. Samicím C57BL/6 myši bylo s.c. injikováno 1×10^5 EL4 buněk v 50 μ l fyziologického roztoku (den 0). Léčeným myším ($n=6$) bylo i.p. aplikováno 2 μ g/myš/dávka IL-2 ve formě IL-2/S4B6 nebo IL-2/JES6-1 imunokomplexů, a to 3. a 6. den po podání EL4 buněk. Kontrolním myším ($n=6$) byl aplikován stejný objem fyziologického roztoku (250 μ l). (A) Průměrný růst EL4 T lymfomu. (B) Přežívání myši s EL4 lymfomem. Myši přežívající 120 dní bez známek lymfomu byly považovány za vyléčené. Experiment byl opakován dvakrát se srovnatelnými výsledky.

Na modelu EL4 T-lymfomu jsme při časném terapeutickém režimu prokázali protinádorovou aktivitu obou typů IL-2 imunokomplexů (viz Obr. IV.10). Dále jsme chtěli zjistit, zda je modulace imunitního systému schopna podpořit nedostatečně efektivní chemoterapii v pozdějším stádiu růstu nádoru. V experimentu byla pro chemoterapeutickou léčbu EL4 T-lymfomu zvolena suboptimální dávka polymerního konjugátu obsahujícího doxorubicin (B-737 [122]). Konjugát B737 byl podán 10. den po inokulaci EL4 buněk, tedy při velikosti nádoru zhruba 50 mm^2 . Léčba imunokomplexy IL-2/S4B6 či IL-2/JES6-1 byla provedena 12., 13. a 14. den.

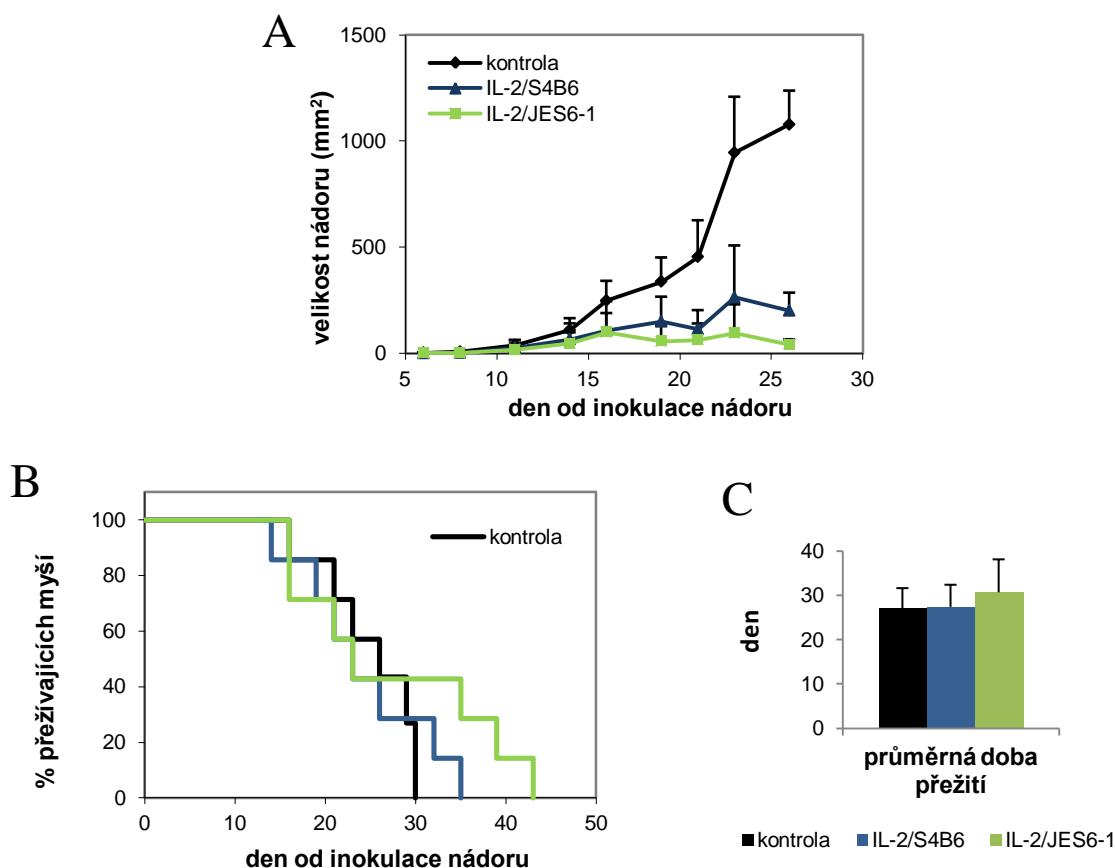


Obr. IV.11: Vliv léčby suboptimální dávkou polymerního konjugátu obsahujícího doxorubicin (B737) v kombinaci s imunomodulací pomocí IL-2/S4B6 či IL-2/JES6-1 imunokomplexů na růst EL4 lymfomu a přežívání C57BL/6 myši s nádorem. Samicím C57BL/6 myši bylo s.c. injikováno 1×10^5 EL4 buněk v 50 μ l fyziologického roztoku (den 0). Léčeným myším ($n=7$; v případě skupiny léčené IL-2/S4B6 $n=6$) bylo i.v. aplikováno 5 mg/kg ekvivalentu doxorubicinu ve formě B737 konjugátu ve fyziologickém roztoku, a to 10. den po inokulaci EL4 buněk. Kontrolním myším ($n=7$) byl aplikován stejný objem fyziologického roztoku (50 μ l). Myším léčeným imunomodulací bylo i.p. aplikováno 2 μ g/myš/dávka IL-2 ve formě IL-2/S4B6 nebo IL-2/JES6-1 imunokomplexů, a to 12., 13. a 14. den. (A) Průměrný růst EL4 lymfomu. (B) Přežívání myši s EL4 lymfomem. (C) Průměrná doba přežití myši, které nakonec umřely. Experiment byl opakován dvakrát se srovnatelnými výsledky.

Ve skupině, která byla léčena pouze chemoterapií pomocí B-737 konjugátu bez následné imunomodulace, došlo k značnému omezení růstu nádoru oproti ničím neléčené skupině myši, avšak počínaje 18. dnem byl rychlý nádorový růst obnoven (viz Obr. IV.11A). Oproti tomu u skupin dále léčených pomocí IL-2/S4B6 či IL-2/JES6-1 imunokomplexů k znovuoobnovení nádorového růstu po 18. dni nedošlo. Léčba myši samotným B-737 konjugátem vyléčila 2 myši ze 6 (Obr. IV.11B). Oproti tomu kombinovaná léčba zahrnující imunomodulaci IL-2/S4B6 imunokomplexy vyléčila

3 myši z 6 a léčba IL-2/JES6-1 imunokomplexy 3 myši ze 7 (Obr. IV.11). Léčba konjugátem B-737 i oběma IL-2 imunokomplexy také prodloužila průměrnou dobu přežití myši nesoucích EL4 lymfom (br. IV.11C). Ukázali jsme tedy, že modulace imunitního systému pomocí IL-2 imunokomplexů může do jisté míry pozitivně ovlivnit léčbu EL4 T-lymfomu suboptimální dávkou chemoterapeutik (zde reprezentovaných doxorubicinovým konjugátem B7-37).

Pro uspokojivé výsledky při léčbě EL4 T-lymfomu jsme se rozhodli otestovat protinádorovou aktivitu IL-2 imunokomplexů také na dalším typu solidního nádoru – B16F10 melanomu. V nádorovém modelu B16F10 melanomu bylo subkutánně injektováno 1×10^6 melanomových buněk do C57BL/6 recipientních myši. Kontrolní myši nesoucí B16F10 nádor byly ponechány bez léčby, ostatní myši byly léčeny intraperitoneální injekcí (i.p.) dvěma dávkami IL-2/S4B6 či IL-2/JES6-1 imunokomplexů 2. a 6. den po podání B16F10 buněk.



Obr. IV.12: Vliv léčby pomocí IL-2/S4B6 či IL-2/JES6-1 imunokomplexů na růst B16F10 melanomu a přežívání C57BL/6 myši s nádorem. Samicím C57BL/6 myši bylo s.c. injektováno 1×10^6 B16F10 buněk v 50 μ l fyziologického roztoku (den 0). Léčeným myším (n=7) bylo i.p. aplikováno 2 μ g/myš/dávka IL-2 ve formě IL-2/S4B6 nebo IL-2/JES6-1 imunokomplexů, a to 2. a 6. den po podání B16F10 buněk. Kontrolním myším (n=7) byl aplikován stejný objem fyziologického roztoku (250 μ l). (A) Průměrný růst B16F10 melanomu. (B) Přežívání myši s B16F10 melanomem. (C) Průměrná doba přežití myši, které nakonec umřely. Experiment byl opakován dvakrát se srovnatelnými výsledky.

U neléčených kontrolních myší docházelo k exponenciálnímu nárůstu nádorů. Tento jev nebyl pozorován ani u jedné ze skupin myší léčených IL-2 imunokomplexy, kde s.c. nádory zůstávaly dlouhou dobu poměrně malé (viz Obr. IV.12A). Tento skutečně výrazný rozdíl mezi kontrolou a myší léčenou IL-2 imunokomplexy v růstu nádoru však nebyl příliš reflektován průměrnou dobou přežití (Obr. IV.12B). IL-2/S4B6 a IL-2/JES6-1 imunokomplexy tedy prodloužily dobu života léčených myší oproti kontrolní neléčené skupině jen zcela minimálně (Obr. IV.12C).

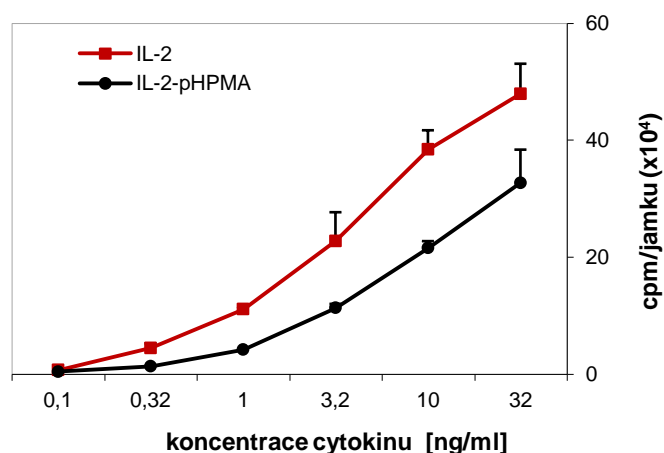
IV.2 Potenciace biologické aktivity IL-2: p(PHPMA)

IV.2.1 Experimenty *in vitro*

V souvislosti s tím, že IL-2 imunokomplexy *in vitro* stimulují proliferaci aktivovaných CD8⁺ T lymfocytů s mnohem nižší intenzitou, a tudíž až při mnohonásobně vyšší koncentraci než volný IL-2 [99], jsme chtěli zjistit, zda tento jev platí i v případě, je-li IL-2 modifikován kovalentně navázanými řetězci p(HPMA). V tomto případě tedy IL-2 není se svým „nosičem“ v komplexu ale jedná se o IL-2-pHPMA konjugát. Pro určení stimulační aktivity jsme použili aktivované CD8⁺ T lymfocyty. Naivní CD8⁺ T lymfocyty totiž neodpovídají na fyziologické hladiny IL-2, dokud nejsou aktivovány přes TCR - tato aktivace následně vede ke zvýšení exprese CD25. TCR signál tak může být použit k přepnutí IL-2-neresponzivních naivních CD8⁺ T lymfocytů na IL-2-responzivní buňky. Jelikož ale normální myši obsahují v populaci CD8⁺ T lymfocytů podmnožinu paměťových buněk (10%), které na IL-2 odpovídají bez jakékoli další stimulace, byly použity naivní OT-I C57BL/6 myši. Tyto myši, exprimující transgenní TCR (V α 2V β 5.1) rozpoznávající peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) v kontextu s H2-K^b, totiž nemají paměťové CD8⁺ T lymfocyty. Tím byl vymezen jasně definovaný experimentální systém obsahující pouze naivní buňky mezi purifikovanými CD8⁺ T lymfocyty a tudíž reagující na přítomnost IL-2 pouze po TCR signalizaci.

Purifikované OT-1 CD8⁺ T lymfocyty byly *in vitro* aktivovány SIINFEKL peptidem a stimulovány různými koncentracemi IL-2 nebo IL-2-pHPMA v přítomnosti inhibiční CTLA4-Ig mAb. Schopnost volného interleukinu a jeho p(HPMA) modifikované formy stimulovat proliferaci byla vyjádřena jako proliferace CD8⁺ T lymfocytů detekovaná pomocí inkorporace ³H-thymidinu. Prokázali jsme, že biologická aktivita IL-2 modifikovaného p(HPMA) je přibližně 2-5x nižší v porovnání s nemodifikovaným IL-2

in vitro. Stejně jako u IL-2 imunokomplexů je i v tomto případě biologická aktivita IL-2 *in vitro* snížena.



Obr. IV.13: Srovnání schopnosti IL-2 a IL-2-pHPMA indukovat proliferaci aktivovaných OT-I CD8⁺ T lymfocytů *in vitro*. Buňky (5×10^4 b./jamka) byly inkubovány 72 h v kulturačním médiu s 10 nM SIINFEKL peptidem, CTLA4-Ig o koncentraci 1 μ g/ml a různými koncentracemi volného IL-2 nebo IL-2-pHPMA. Proliferační aktivita byla měřena inkorporací ³H-thymidinu, který byl přidán na posledních 8 h inkubace. Každý experimentální bod představuje průměr 3 měření \pm SD. Experiment byl opakován třikrát se srovnatelnými výsledky.

Experimentální výsledky tedy potvrdily, že nejen oba IL-2 imunokomplexy, ale i IL-2-pHPMA konjugát, vykazují oproti volnému IL-2 sníženou schopnost indukovat proliferaci aktivovaných CD8⁺ T lymfocytů *in vitro* (viz Obr. IV.13).

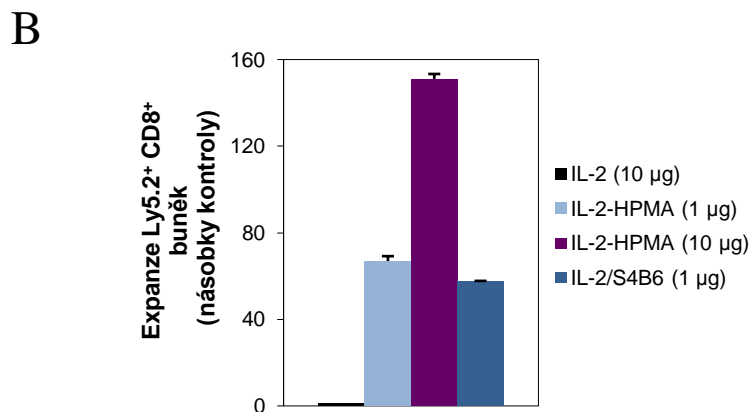
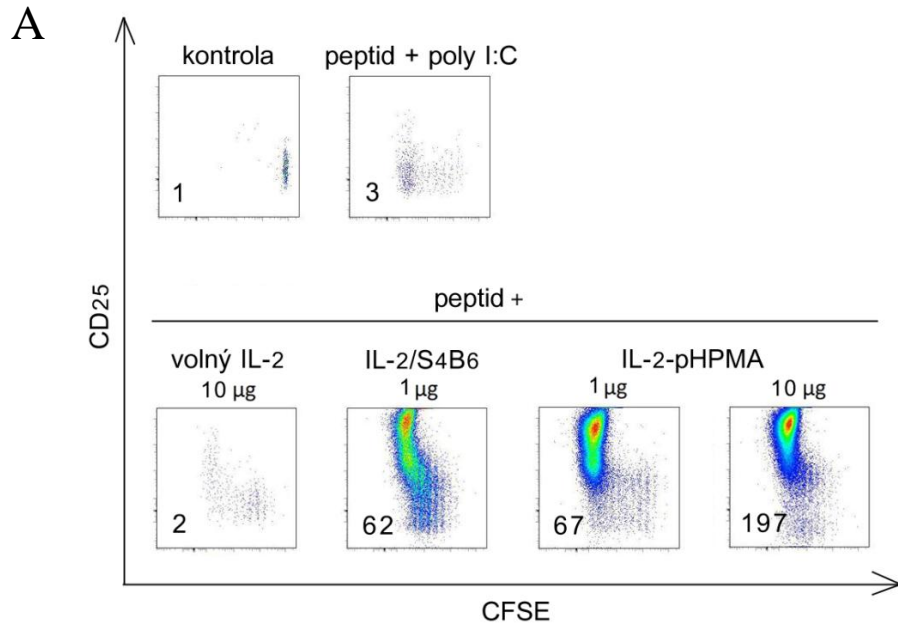
IV.2.1 Experimenty *in vivo*

IV.2.1.1 Expanze aktivovaných OT-I CD8⁺ T buněk

Doposud publikované práce popsaly schopnost IL-2/S4B6 i IL-2/JES6-1 imunokomplexů indukovat signifikantně vyšší míru proliferace aktivovaných naivních CD8⁺ T lymfocytů ve srovnání s ekvivalentní dávkou volného IL-2 *in vivo*. Dalším krokem v charakterizaci IL-2-pHPMA konjugátu tedy bylo ověřit, jestli je rovněž schopen tyto buňky efektivně expandovat a jestliže ano, tak do jaké míry. Protože IL-2-pHPMA konjugát je zcela nová a zatím z hlediska biologické aktivity a vlastností necharakterizovaná forma modifikovaného IL-2, byly pro srovnání aktivity využity také IL-2/S4B6 imunokomplexy.

V experimentu byl využit OT-I transgenní systém (popsaný v kapitole IV.1.2.1 a detailněji v kapitole IV.2.1). Purifikované OT-I CD8⁺ T buňky (Ly5.2) byly adoptivně přeneseny do B6.SJL (Ly5.1) kongenních myší, aktivovány peptidem a stimulovány 4 dávkami volného IL-2, nebo IL-2 ve formě IL-2-pHPMA konjugátu či IL-2/S4B6

imunokomplexů. Pro pozitivní kontrolu byla použita stimulace kombinací peptidu a poly I:C a myším, které sloužily jako negativní kontrola, nebylo po adoptivním transferu již nic aplikováno. Byla sledována indukovaná relativní expanze aktivovaných naivních CD8⁺ T buněk.



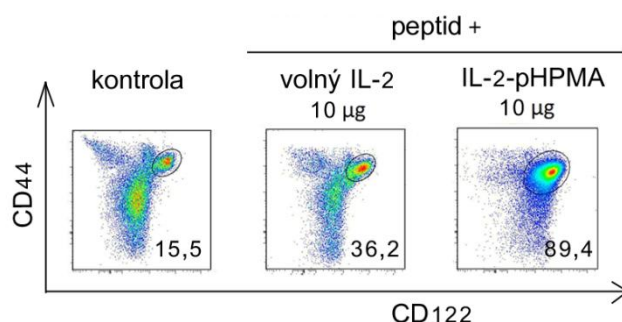
Obr. IV.14: Expanze aktivovaných CD8⁺ T buněk pomocí IL-2-pHPMA konjugátu. Purifikované naivní OT-I CD8⁺ T buňky (Ly5.2) byly označeny CFSE a adoptivně přeneseny do B6.SJL (Ly5.1) kongenních myší (2 myši/skupina). SIINFEKL peptid (2 nmol) byl myším podán i.p. o 24 h později. IL-2 (10 µg/dávku), IL-2/S4B6 imunokomplexy (1 µg IL-2 ekvivalentu/dávku) či IL-2-pHPMA konjugát (1 nebo 10 µg IL-2 ekvivalentu/dávku) byly myším podávány ve 4 dávkách. První dávka byla podána stejný den jako peptid, každá další vždy po 24 h. Pozitivní kontrole bylo společně se SIINFEKL peptidem i.p. aplikováno 75 µg poly I:C. Kontrolní myši byly ponechány bez stimulace. Myši byly usmrceny 5. den po adoptivním transferu OT-I CD8⁺ T buněk (24 h po poslední dávce) a izolované splenocyty byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie. (A) CFSE profil, exprese CD25 a relativní expanze Ly5.2⁺ CD8⁺ buněk u dané myši vztažená ke kontrole vlevo u každého dotplotu. (B) Relativní expanze Ly5.2⁺ CD8⁺ buněk vztažená ke kontrole ve slezině. Experiment byl opakován třikrát se srovnatelnými výsledky.

Bylo potvrzeno, že aktivované $CD8^+$ T buňky jsou významně expandovány pomocí IL-2/S4B6 imunokomplexů, zatímco samotný IL-2 měl i při desetinásobné dávce na jejich expanzi jen zanedbatelný efekt (viz Obr. IV.14). IL-2-pHPMA konjugát vykázal vysokou schopnost indukovat proliferaci (Obr. IV.14A) a také expanzi (Obr. IV.14B) aktivovaných $CD8^+$ T lymfocytů. Nižší dávka IL-2-pHPMA vyvolala srovnatelnou míru expanze jako IL-2/S4B6 imunokomplexy o shodném obsahu IL-2. Zatímco dávka 10 μ g IL-2 ve formě IL-2-pHPMA konjugátu byla schopna indukovat expanzi rovnající se téměř 200násobku kontroly, t.j. násobku počtu $Ly5.2^+ CD8^+$ T buněk v myši neinjikované SIINFEKL peptidem ani žádnou formou IL-2. Také bylo pozorováno, že buňky expandované IL-2/S4B6 imunokomplexy a také IL-2-pHPMA konjugátem exprimovaly 5. den po aktivaci vysoké hladiny CD25 narozdíl od buněk expandovaných pomocí peptidu a poly I:C.

IV.2.1.2 Expanze paměťových $CD8^+$ T buněk

Dále byla určena stimulační aktivita IL-2-pHPMA konjugátu pro paměťové $CD8^+$ T lymfocyty. B6.SJL myším byl ve čtyřech dávkách i.p. injikováno ekvivalentní množství IL-2 volného nebo ve formě IL-2-pHPMA konjugátu. Ve slezině byla sledována populace $CD3^+ CD8^+$ lymfocytů a v rámci ní bylo stanoveno procentuální zastoupení paměťových $CD8^+$ T buněk ($CD44^{high} CD122^{high}$).

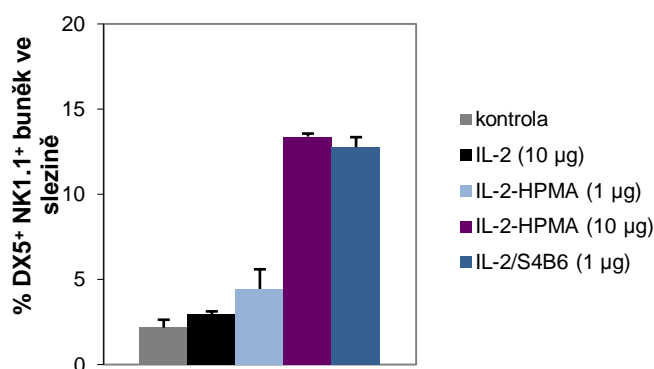
IL-2-pHPMA konjugát indukoval téměř 6násobnou expanzi $CD44^{high} CD122^{high}$ paměťových $CD8^+$ T buněk oproti ničím nestimulované kontrole. Volný IL-2, podaný ve stejné dávce, měl na expanzi těchto buněk vliv zhruba poloviční (viz Obr. IV.15).



Obr. IV.15: Expanze paměťových $CD8^+$ T buněk pomocí IL-2-pHPMA konjugátu. B6.SJL (Ly5.1) myším byl ve 4 dávkách (s intervaly vždy 24 h mezi dávkami) podán volný IL-2 či IL-2-pHPMA v množství 10 μ g ekvivalentu IL-2 na dávku. Kontrolní myši byly ponechány bez stimulace. Myši byly usmrceny 5. den (24 h po poslední dávce) a izolované splenocyty byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie. Ve slezině bylo stanoveno procentuální zastoupení $CD44^{high} CD122^{high} CD8^+$ T buněk v populaci $CD3^+ CD8^+$ buněk. Experiment byl opakován třikrát se srovnatelnými výsledky.

IV.2.1.3 Expanze NK buněk

V souvislosti s vlastností IL-2 ovlivňovat NK buňky a schopností IL-2/S4B6 komplexů indukovat expanzi NK buněk *in vivo* (viz IV.1.3.3 a také [21, 85]), bylo důležité zjistit, jak na tyto buňky působí IL-2-pHPMA konjugát, jako odlišná forma IL-2. V tomto experimentu tedy byla popsána stimulační aktivita IL-2-pHPMA pro NK buňky a určena dávka, při které konjugát dosahoval přibližně ekvivalentní expanze NK buněk jako experimentálně použité množství IL-2/S4B6 imunokomplexů.



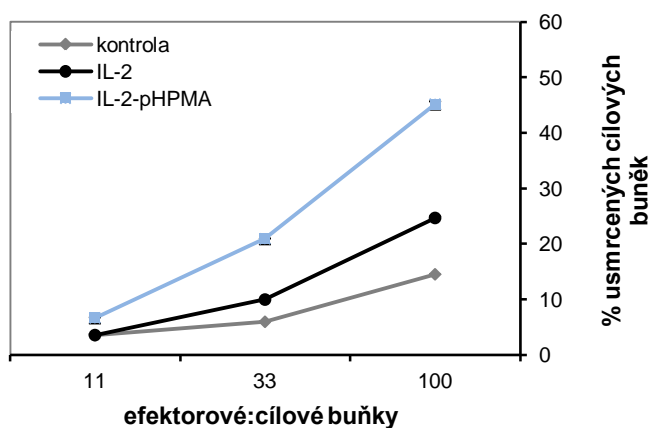
Obr. IV.16: Expanze NK buněk indukovaná IL-2-pHPMA a sledovaná jako procento NK1.1⁺ DX5⁺ buněk ve slezině. Volný IL-2 (10 µg/dávku), IL-2-pHPMA (1 µg nebo 10 µg IL-2 ekvivalentu/dávku) nebo IL-2/S4B6 imunokomplexy (1 µg IL-2 ekvivalentu/dávku) byly B6.SJL myším (2 myši/skupina) podány ve čtyřech dávkách s intervaly vždy 24 h mezi dávkami. Kontrolní myši byly ponechány bez stimulace. Myši byly usmrceny 24 h po poslední dávce a izolované splenocyty byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie. Experiment byl opakován třikrát se srovnatelnými výsledky.

B6.SJL myším byly ve čtyřech dávkách i.p. injikován volný IL-2, IL-2-pHPMA konjugát či IL-2/S4B6 imunokomplexy a bylo sledováno procentuální zastoupení NK buněk (NK1.1⁺ DX5⁺) ve slezině.

V souladu s publikovanou literaturou bylo pozorováno, že NK buňky jsou významně expandovány pomocí IL-2/S4B6 imunokomplexů, zatímco samotný IL-2, přestože podáván v desetinásobné dávce, měl jen zanedbatelný efekt (viz Obr. IV.16). Míry expanze indukované 1 µg IL-2/S4B6 imunokomplexů bylo dosaženo použitím 10 µg IL-2-pHPMA. Desetkrát nižší dávka IL-2-pHPMA vyvolala expanzi NK buněk zhruba 3x nižší. Dále se ukázalo, že aktivované CD8⁺ T buňky jsou více senzitivní ke stimulační aktivitě IL-2-pHPMA, než NK buňky. Oproti NK buňkám byla expanze aktivovaných OT-I CD8⁺ T lymfocytů indukovaná 1 µg IL-2 ve formě IL-2/S4B6 imunokomplexů srovnatelná s použitím nižší testované dávky IL-2 ve formě IL-2-pHPMA (1 µg) (viz Obr. IV.14).

IV.2.1.4 Vliv IL-2-pHPMA na aktivitu NK buněk (NK cytotoxicita)

Prokázali jsme, že IL-2-pHPMA konjugát má značnou schopnost expandovat NK buňky (viz Obr. IV.16). Vzhledem k tomu, že jsme u IL-2/S4B6 imunokomplexů prokázali, že jejich schopnost expandovat NK buňky (viz IV.1.3.3) je současně spojena se zvýšením NK cytolytické aktivity (viz IV.1.3.4), bylo důležité zjistit, jak jsou NK buňky ovlivněny p(HPMA) modifikovanou formou IL-2. C57BL/6 myším bylo i.p. injikováno 2,5 µg samotného IL-2 nebo IL-2 ve formě IL-2-pHPMA konjugátu. Vliv IL-2-pHPMA byl tedy určen funkčním testem jejich cytotoxické aktivity - JAM testem, popsáném v kapitole IV.1.3.4.



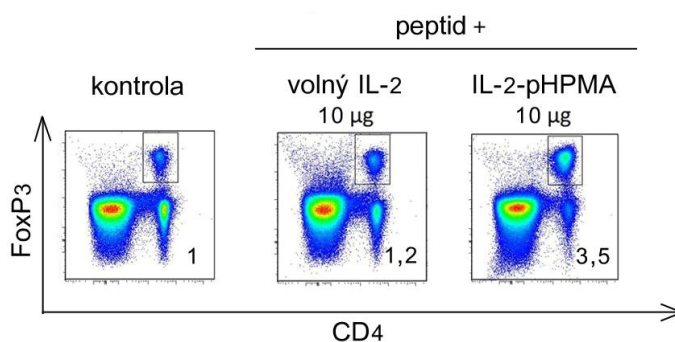
Obr. IV.17: Srovnání vlivu volného IL-2 a IL-2-pHPMA konjugátu na cytolytickou aktivitu NK buněk u C57BL/6 myši. (A) i (B): Myším (2 myši/skupina) byly i.p. injikovány 2,5 µg samotného IL-2, či IL-2 ve formě IL-2-pHPMA (den 0). Kontrolním myším byl aplikován stejný objem fyziologického roztoku (250 µl). Po 5 dnech byly myši usmrceny a byly izolovány mononukleární buňky. Ty byly inkubovány 4 h za standardních podmínek v kultivačním médiu s ³H-thymidinem-značenými cílovými YAC-1 buňkami v poměru 11:1, 33:1, 100:1. Zabíjení cílových buněk bylo sledováno jako procentuální úbytek radioaktivity vzhledem k hladině radioaktivity v kontrolních vzorcích bez efektorových buněk (vždy vyšší než 5x10⁴ cpm). Každý experimentální bod představuje průměr 8 měření ± SD. Experiment byl opakován pětkrát se srovnatelnými výsledky.

Schopnost efektorových buněk izolovaných z kontrolních myši usmrtit buňky cílové se při obou nižších testovaných poměrech efektorů k cílovým buňkám pohybovala okolo 10% a při 100 násobném nadbytku efektorů vystoupala na 15 %. Stimulace myši volným IL-2 znatelně zvýšila cytolytickou aktivitu efektorových buněk až při 100:1 poměru efektorů k cílovým buňkám, a to o 10% oproti kontrole. Oproti tomu IL-2-pHPMA konjugát stimuloval myši NK buňky s minimálně trojnásobnou účinností oproti kontrole. Tato účinnost při 100násobném nadbytku efektorových buněk shodně dosahovala až 45 % usmrcených cílových buněk. Podobně jako IL-2/S4B6 imunokomplexy, vykázal IL-2-pHPMA konjugát vyšší schopnost indukovat expanzi NK buněk (viz Obr. IV.17) a současně v nich podporovat efektorovou aktivitu oproti volnému IL-2.

IV.2.1.5 Expanze T regulačních buněk

U IL-2-pHPMA konjugátu jsme neočekávali selektivitu při působení na různé buněčné populace, která byla popsána pro IL-2 imunokomplexy tvořené S4B6 nebo JES6-1 monoklonální protilátkou. V souladu s biologickými funkcemi IL-2 se naopak dalo předpokládat, že IL-2-pHPMA konjugát, tvořený IL-2 s navázanými vysokomolekulárními polymerními řetězci, bude mít značnou stimulační aktivitu pro Treg buňky. Ověřili jsme proto schopnost IL-2-pHPMA konjugátu stimulovat expanzi Treg buněk, neboť tato informace je velmi důležitá zejména z hlediska potenciálního využití IL-2-pHPMA konjugátu v imunoterapii.

V tomto experimentu byl B6.SJL myším ve čtyřech dávkách i.p. injikován 1 µg volného IL-2 či IL-2 ve formě IL-2-pHPMA konjugátu. Sledovali jsme indukovanou expanzi Treg buněk ($CD4^+ FoxP3^+$) ve slezině.



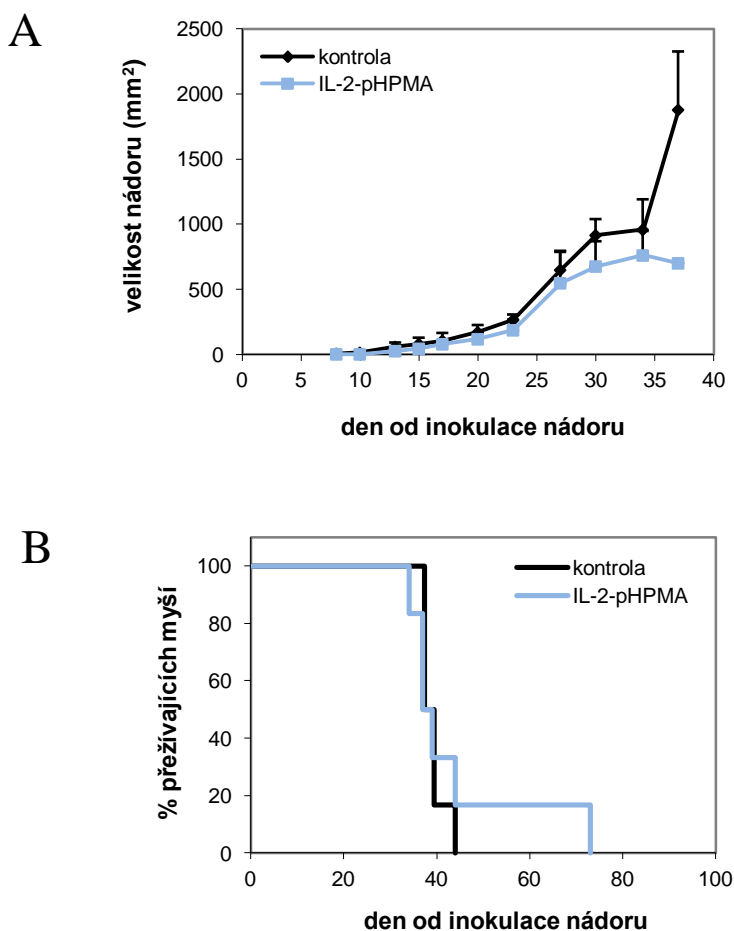
Obr. IV.18: IL-2-pHPMA konjugát stimuluje expanzi Treg buněk. B6.SJL myším bylo aplikováno 10 µg volného IL-2 nebo jeho ekvivalent ve formě IL-2-pHPMA, a to ve čtyřech dávkách s intervaly vždy 24 h mezi dávkami. Kontrolní myši byly ponechány bez stimulace. Myši byly usmrceny 24 h po poslední dávce a izolované splenocyty byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie. Expanze $CD4^+ FoxP3^+$ Treg buněk ve slezině byla analyzována a vynesena jako relativní expanze vztahovaná ke kontrole. Experiment byl opakován třikrát se srovnatelnými výsledky.

Volný IL-2, zcela v souladu se svojí známou biologickou aktivitou, stimuloval relativní expanzi Treg buněk oproti kontrole. Oproti tomu IL-2-pHPMA konjugát projevil značnou stimulační aktivitu pro T regulační buňky - jím indukovaná expanze dosahovala až 3,5násobku kontroly (viz Obr. IV.18).

IV.2.1.6 Protinádorová aktivita IL-2-pHPMA

Prokázali jsme, že IL-2-pHPMA konjugát indukuje expanzi aktivovaných $CD8^+$ T buněk (IV.2.1.1) a NK buněk (IV.2.1.3) a současně podporuje i NK cytolytickou aktivitu

(IV.2.1.4). Zároveň jsme ale prokázali, že indukuje nezanedbatelnou expanzi Treg buněk (IV.2.1.5), nicméně tato vlastnost je mu společná s IL-2, který se přesto v imunoterapii nádorů již využívá. Proto byla na dvou nádorových modelech, EL4 T-lymfomu a B16F10 melanomu, otestována protinádorová aktivita IL-2-pHPMA konjugátu.



Obr. IV.19: Vliv léčby pomocí IL-2-pHPMA konjugátu na růst EL4 lymfomu a přežívání C57BL/6 myši s nádorem. Samicím C57BL/6 myši bylo s.c. injikováno 1×10^5 EL4 buněk v 50 μ l fyziologického roztoku (den 0). Léčeným myším (n=6) bylo i.p. aplikováno 10 μ g/myš/dávka IL-2 ve formě IL-2-pHPMA konjugátu, a to 3. a 6. den po podání EL4 buněk. Kontrolním myším (n=6) byl aplikován stejný objem fyziologického roztoku (50 μ l). (A) Průměrný růst EL4 T lymfomu. (B) Přežívání myši s EL4 lymfomem. Experiment byl opakován dvakrát se srovnatelnými výsledky.

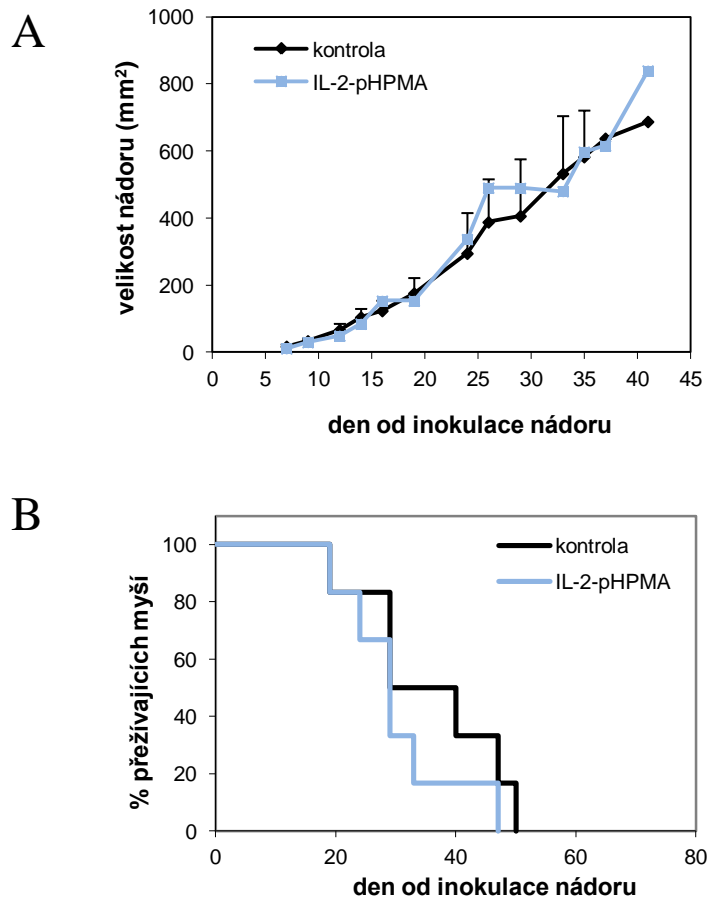
V modelu EL4 T-lymfomu bylo C57BL/6 myším s.c. injikováno 1×10^5 EL4 buněk. Pro léčbu pomocí IL-2-pHPMA konjugátu byl zvolen terapeutický režim, ve kterém byl konjugát podán ve dvou dávkách, a to 3. a 6. den po inokulaci EL4 nádoru. Léčebný režim byl tedy nastaven tak, aby byl imunitní systém stimulován k vyvinutí protinádorové odpovědi v době, kdy je ještě schopen rostoucí nádor eliminovat, tedy ještě před tím, než dosáhl hmatatelné velikosti. Dávka IL-2-pHPMA konjugátu (10 μ g ekvivalentu IL-2) byla

vzhledem k prokázaným vlastnostem konjugátu zvolena vyšší, než bylo množství IL-2 zvolené pro léčbu stejného typu nádoru při stejném terapeutickém režimu pomocí IL-2 imunokomplexů (viz IV.1.4).

IL-2-pHPMA konjugát vykázal velmi slabou inhibici růstu nádoru a stejně tak i velmi slabě prodlouženou průměrnou dobu přežití (viz Obr. IV.19). Podání IL-2-pHPMA konjugátu nevyhládilo ani jednu experimentální myš ze 6.

I přes tyto výsledky jsme prověřili protinádorovou aktivitu IL-2-pHPMA konjugátu ještě na dalším modelu. V modelu B16F10 melanomu bylo subkutánně (s.c.) injektováno 1×10^6 melanomových buněk do C57BL/6 recipientních myší. Kontrolní myši nesoucí B16 nádor byly ponechány bez léčby, ostatní myši byly léčeny intraperitoneální injekcí (i.p.) dvěma dávkami IL-2-pHPMA konjugátu 2. a 6. den po podání B16 buněk. Pro možnost srovnání protinádorové aktivity ekvivalentního množství IL-2 v různých formách (tedy IL-2 imunokomplexů s IL-2-pHPMA konjugátem) jsme pro léčbu B16F10 melanomu zvolili stejný terapeutický režim jako pro léčbu IL-2/S4B6 imunokomplexy a tudíž nižší dávku IL-2-pHPMA konjugátu.

V modelu B16F10 melanomu IL-2-pHPMA konjugát nezpomalil růst nádoru, ani neprodloužil přežívání myší oproti ničím neléčené kontrole (Obr. IV.20). Naopak, z kratšího přežívání léčených myší jsme usoudili, že v modelu B16F10 melanomu převládá vliv IL-2-pHPMA na Treg buňky nad aktivitou IL-2-pHPMA konjugátu vůči aktivovaným a paměťovým $CD8^+$ T lymfocytům a NK buňkám. Oproti tomu IL-2 imunokomplexy jevíly při stejné dávce a stejném léčebném režimu prokazatelnou protinádorovou aktivitu (viz Obr. IV.10), tzn. že v tomto případě se stala dominantním jevem aktivace a expanze imunokompetentních buněk s pozitivní funkcí v kontrole/eliminaci nádoru. Shledali jsme, že IL-2-pHPMA konjugát ani v jednom z nádorových modelů neprokázal signifikantní protinádorovou aktivitu. Po srovnání s výsledky dosaženými po léčbě IL-2 imunokomplexy došli k závěru, že IL-2-pHPMA konjugát není vhodný pro nádorovou imunoterapii.



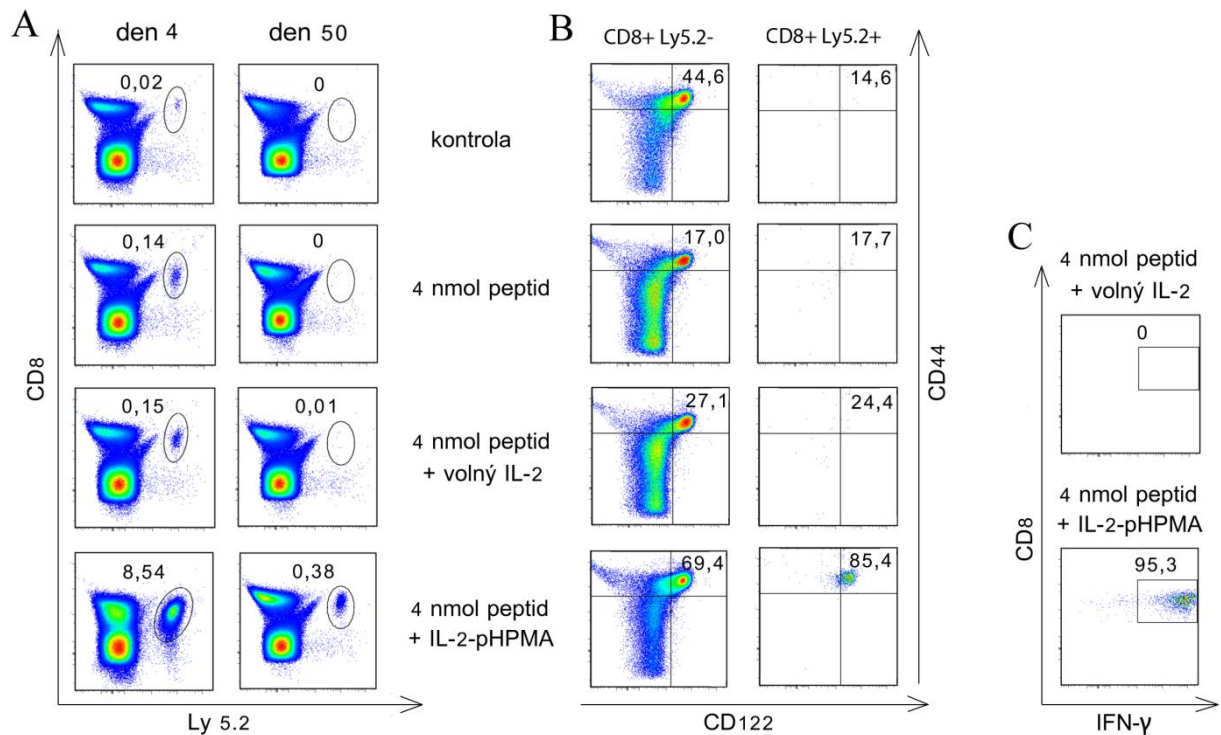
Obr. IV.20: Vliv léčby pomocí IL-2-pHPMA konjugátu na růst B16F10 melanomu a přežívání C57BL/6 myši s nádorem. Samicím C57BL/6 myši bylo s.c. injikováno 1×10^6 B16F10 buněk ve 50 μ l fyziologického roztoku (den 0). Léčeným myším (n=7) bylo i.p. aplikováno 2 μ g/myš/dávka IL-2 ve formě IL-2-pHPMA konjugátu, a to 2. a 6. den po podání B16F10 buněk. Kontrolním myším (n=7) byl aplikován stejný objem fyziologického roztoku (50 μ l). (A) Průměrný růst B16F10 melanomu. (B) Přežívání myši s B16F10 melanomem. Experiment byl opakován dvakrát se srovnatelnými výsledky.

IV.2.1.7 Vytvoření stabilní a funkční populace paměťových CD8⁺ T buněk

IL-2-pHPMA konjugát prokázal schopnost indukovat proliferaci a expanzi aktivovaných CD8⁺ T lymfocytů (viz Obr IV.14). Důležitou otázkou bylo, jestli takto expandované CD8⁺ T lymfocyty vytvoří dlouhožijící populaci paměťových buněk. Mohli by jsme si tedy pak udělat představu o vhodnosti potenciálního využití IL-2-pHPMA konjugátu například jako adjuvans při vakcinaci.

V experimentu byl využit OT-I transgenní systém (například IV.1.2.1). Purifikované OT-I CD8⁺ T buňky (Ly5.2) byly adoptivně přeneseny do B6.SJL (Ly5.1) kongenních myši, aktivovány peptidem a stimulovány jednou vysokou dávkou volného IL-2, nebo IL-2 ve formě IL-2-pHPMA konjugátu. Pro kontrolu byla použita stimulace SIINFEKL

peptidem. Negativní kontrole nebylo po adoptivním transferu již nic aplikováno. Relativní expanze přenesených buněk byla sledována ve slezině 4. den po aktivaci, a také 50. den - tedy dostatečně dlouho na to, aby byly detekovány pouze skutečné paměťové buňky. Pro 50. den byly přenesené a hostitelské CD8⁺ T lymfocyty naznačeny na expresi CD44 a CD122 pro možnost stanovení jejich paměťového fenotypu.



Obr. IV.21: Aktivované naivní CD8⁺ T lymfocyty, expandované pomocí IL-2-pHPMA konjugátu, vytváří mohutnou populaci funkčních paměťových buněk. Purifikované naivní OT-I CD8⁺ T buňky (Ly5.2) byly adoptivně přeneseny do B6.SJL (Ly5.1) kongenních myší (2 myši/skupina). O 24 h později byl myším i.p. podán SIINFEKL peptid (4 nmol) současně s IL-2 (50 μ g/dávku) nebo IL-2-pHPMA (50 μ g IL-2 ekvivalentu/dávku). Kontrola dostala pouze SIINFEKL peptid a negativní kontrola byla ponechána bez stimulace. Myši byly usmrceny 4. a 50. den po adoptivním transferu OT-I CD8⁺ T buněk, izolované splenocyty byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie. (A) Relativní expanze Ly5.2⁺ CD8⁺ buněk ve slezině 4. a 50. den po aktivaci. (B) Hostitelské (levý sloupec) a přenesené CD8⁺ T lymfocyty (pravý sloupec) byly značeny na expresi CD44 a CD122. (C) Splenocyty izolované 50. den z pokusných myší byly *ex vivo* restimulovány peptidem po 6 hodin a na poslední 4 hodiny byl přidán Brefeldin A. Expresie IFN- γ byla detekována v Ly 5.2⁺ CD8⁺ buňkách. Experiment byl opakován dvakrát se srovnatelnými výsledky.

Primární expanze přenesených OT-I lymfocytů indukovaná samotným peptidem byla srovnatelná s expanzí indukovanou peptidem a volným IL-2 (viz Obr. IV.20A, levý sloupec), avšak během retrakční fáze buňky expandované samotným peptidem zcela vymizely (Obr. IV.20A, pravý sloupec). U myší, kterým byl podán peptid společně s volným IL-2, došlo k vytvoření populace paměťových buněk, i když velmi malé. Oproti

tomu významná populace přenesených buněk byla detekována 50. den ve slezině myší, kterým byl aplikován peptid společně s IL-2-pHPMA a celých 85 % z těchto buněk mělo CD44^{high} CD122^{high} fenotyp (Obr. IV.20B, pravý sloupec).

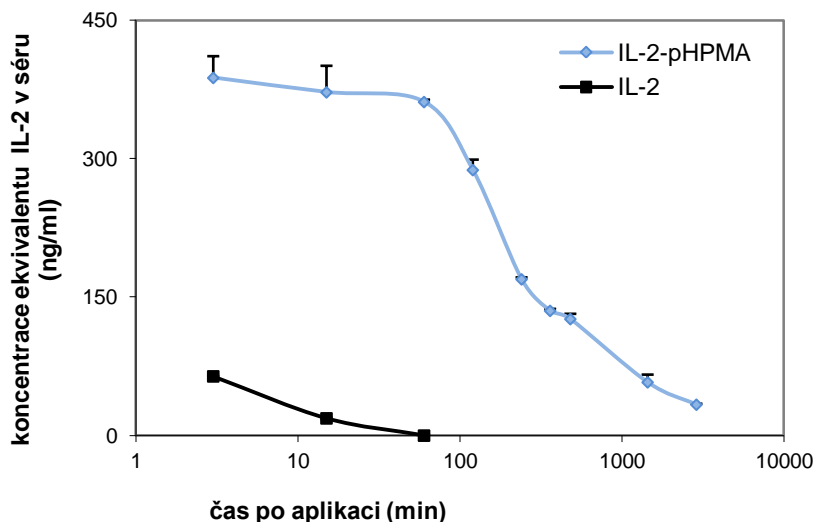
Dále jsme určili, zda je populace CD8⁺ T lymfocytů s paměťovým fenotypem, která se ustanovila z aktivovaných naivních CD8⁺ T lymfocytů expandovaných IL-2-pHPMA konjugátem, schopná efektorové aktivity po setkání s příslušným peptid/MHC-I komplexem. Část ze suspenzí splenocytů, izolovaných 50. den ze slezin myší léčených IL-2 nebo IL-2-pHPMA v předešlém pokuse, byla *in vitro* restimulována SIINFEKL peptidem a analyzována na intracelulární expresi IFN- γ . Na obrázku IV.20C je znázorněno, že OT-I buňky z myší stimulovaných volným IL-2 po reaktivaci neexprimovaly IFN- γ , zatímco 95 % OT-1 buněk z myší stimulovaných IL-2-pHPMA konjugátem ano.

Potvrdili jsme, že IL-2-pHPMA konjugát by v budoucnu mohl být využíván jako velmi účinné adjuvans například při očkování. Prokázali jsme, že IL-2-pHPMA konjugát je schopen nejen výrazně expandovat aktivované naivní CD8⁺ T lymfocyty, ale také dát vzniknout populaci dlouhožijících buněk s paměťovým fenotypem, které jsou po reaktivaci schopny efektorových funkcí.

IV.2.1.8 Určení biologického poločasu IL-2-pHPMA

Prokázali jsme, že IL-2-pHPMA konjugát stimuluje expanzi aktivovaných (IV.2.1.1) i paměťových CD8⁺ T lymfocytů (IV.2.1.2), T regulačních buněk (IV.2.1.5) a NK buněk (IV.2.1.3), u nichž současně indukuje cytolytickou aktivitu (IV.2.1.4). Stimuluje tedy všechny buněčné populace jako IL-2, avšak s mnohem vyšší účinností *in vivo*. Protože se jedná o vysokomolekulární IL-2 konjugát, chtěli jsme ověřit, zda dochází k prodloužení poločasu setrvání IL-2-pHPMA v oběhu. Tento jev byl v literatuře popsán pro IL-2/S4B6 imunokomplexy [99] a pro imunokomplexy IL-2/JES6-1 jsme ho potvrdili experimentálně (viz IV.1.2.3). U IL-2-pHPMA konjugátu by do značné míry objasnil jeho superagonistické chování oproti volnému IL-2.

C57BL/6 myším bylo i.v. aplikováno 2 μ g volného IL-2 nebo jeho ekvivalentu ve formě IL-2-pHPMA v čase 0. V různých časových intervalech izolováno myší sérum. Křivka eliminace IL-2-pHPMA byla stanovena detekcí koncentrace IL-2-pHPMA ve vzorcích séra pomocí sendvičové ELISA metody.



Obr. IV.22: Poločas eliminace IL-2-pHPMA konjugátu z krve. C57BL/6 myším (3 myši/skupina) bylo i.v. aplikováno 2 μ g volného IL-2 nebo IL-2 ekvivalentu ve formě IL-2-pHPMA v čase 0. Po 3 a 15 minutách, 1 hodině a dále po 2, 4, 6, 8, 24 a 48 hodinách byla myším odebrána krev a z ní izolováno sérum. Koncentrace IL-2 nebo IL-2-pHPMA ve vzorcích séra byla detekována ELISA metodou s využitím interních kalibračních řad pro IL-2 i IL-2-pHPMA individuálně. Každý experimentální bod představuje průměr 3 měření \pm SD. Experiment byl opakován čtyřikrát se srovnatelnými výsledky.

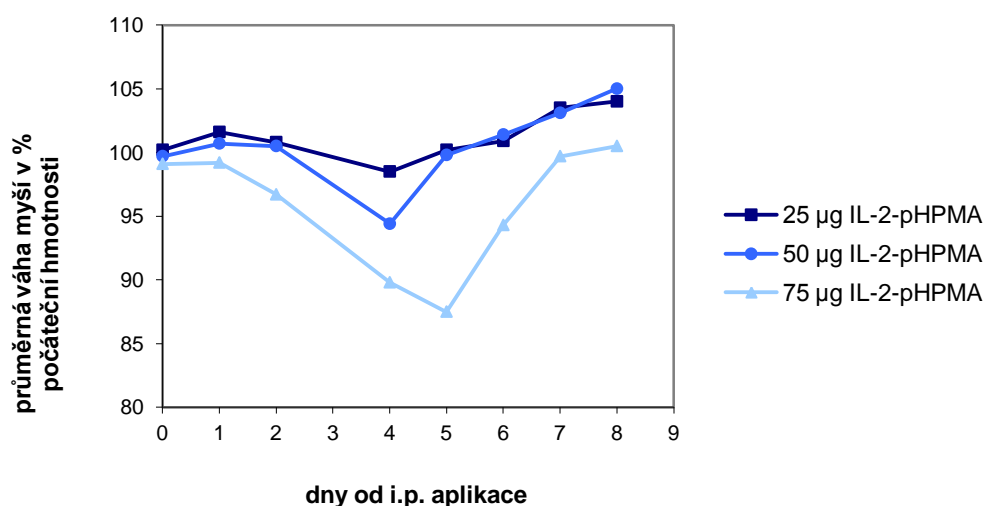
Na obrázku IV.22 je znázorněno, že volný IL-2 byl z krve velmi rychle eliminován. Při podání 2 μ g IL-2 byla po 3 minutách detekována již jen relativně nízká koncentrace IL-2 v séru, a to pouze 60 ng/ml. Hodinu po aplikaci byl IL-2 již nedetekovatelný. Oproti tomu IL-2-pHPMA konjugát byl v séru detekován ještě 48 hodin po aplikaci, a to v koncentraci dokonce vyšší než jaká byla stanovena pro volný IL-2 po 15 minutách. Z vynesené křivky závislosti koncentrace na čase byl odhadnut biologický poločas IL-2-pHPMA konjugátu na ~ 4 hodiny. IL-2-pHPMA konjugát tedy projevil asi 70x delší poločas v séru než volný IL-2.

IV.2.1.9 Určení maximální tolerované dávky

Pokusili jsme se určit maximální tolerovanou dávku (MTD) IL-2-pHPMA konjugátu. Tedy maximální dávku konjugátu, která není doprovázena mortalitou a také způsobí nepřijatelné vedlejší účinky (úbytek tělní hmotnosti > 15 %). C57BL/6 myším o zhruba stejné váze, byla jednorázově i.p. aplikována dávka IL-2-pHPMA, a to 25, 50 nebo 75 μ g IL-2 ekvivalentu. Myši byly zváženy před aplikací dávky a dále vždy po 24 hodinách. Toxicita podaného IL-2-pHPMA konjugátu byla sledována jako váhový úbytek myší, který byl následně vyjádřen v procentech původní váhy myši. Dále byl

monitorován stav myší – známky kachexie, rychlejší frekvence dýchání, povrchové dýchání, nižší vitalita myší.

V průběhu experimentu nezemřela žádná myš na toxické účinky IL-2-pHPMA konjugátu. Na obrázku IV.23, znázorňujícím stav myší po aplikaci jedné dávky léčiva je navíc vidět, že obě nižší testované dávky IL-2-pHPMA konjugátu byly pro myši relativně netoxické. Pouze nejvyšší dávka IL-2-pHPMA konjugátu vedla k signifikantnímu váhovému úbytku myší, a to až o 13 % oproti váze původní. Ani 5. den po aplikaci nejvyšší dávky nebyla nicméně u myší pozorována snížená vitalita a váhový úbytek byl rychle kompenzován. Usoudili jsme, že pro myši je MTD jednorázově i.p. podaného IL-2-pHPMA konjugátu zhruba 80 µg/myš.

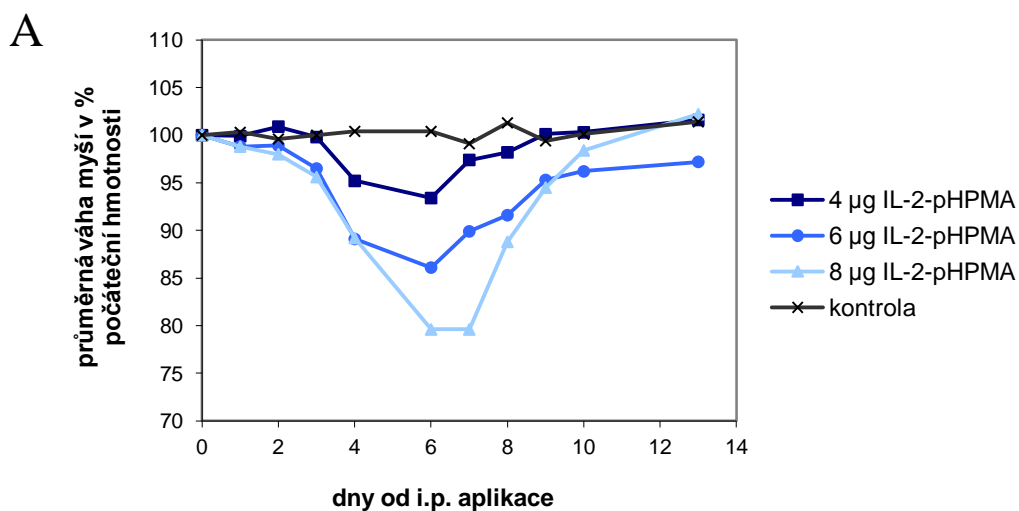


Obr. IV.23: Určení MTD IL-2-pHPMA konjugátu podaného i.p. v jedné dávce u myší. C57BL/6 myším (3 myši/skupina) o podobné váze bylo i.p. aplikováno 25, 50, či 75 µg IL-2 ekvivalentu IL-2-pHPMA v čase 0. Myši byly zváženy před aplikací léčiva a každých 24 hodin v průběhu 8 dnů. Zaznamenána byla váha myší a do grafu vynesena změna váhy myší v % váhy dané myši před léčbou. Každý experimentální bod představuje průměr 3 myší ve skupině.

Pozorovali jsme, že biologické efekty se při opakovaném podání nižších dávek konjugátu výrazně zesilují s množstvím podaných dávek. Proto jsme se pokusili určit MTD IL-2-pHPMA konjugátu podaného v pěti dávkách. C57BL/6 myším o zhruba stejné váze, bylo v pěti po 24 hodinách jdoucích dávkách i.p. aplikováno 4, 6, nebo 8 µg IL-2 ekvivalentu IL-2-pHPMA konjugátu/myš. Toxicita takto podaného IL-2-pHPMA konjugátu byla sledována v následujících 13 dnech od podání a zaznamenávána jako v předešlém pokuse.

Pozorovali jsme výraznou toxicitu spojenou s pěti dávkami 6 µg i 8 µg IL-2-pHPMA konjugátu (viz Obr. IV.24). Myši léčené těmito dávkami konjugátu jevíly

známky kachexie, byla apatické, byla patrná vyšší frekvence povrchového dýchání a úbytek hmotnosti až o 20 % oproti své původní váze. Ve skupině myši, které při tomto režimu dostávaly dávku 6 μg IL-2-pHPMA vedla toxicita 6. den k úhynu 2 myši a ve skupině dostávající 8 μg dokonce 4 myši z 5 (Obr. IV.24B). Pouze 5 dávek 4 μg IL-2-pHPMA konjugátu nezpůsobilo žádnou mortalitu. A úbytek na váze byl necelých 7 %. Z těchto dat jsme usoudili, že MTD IL-2-pHPMA konjugátu podaného v pěti po sobě jdoucích dávkách je přibližně 4 $\mu\text{g}/\text{myš}$.



B

skupina	zemřelé myši/všechny
4 μg	0/5
6 μg	2/5
8 μg	4/5

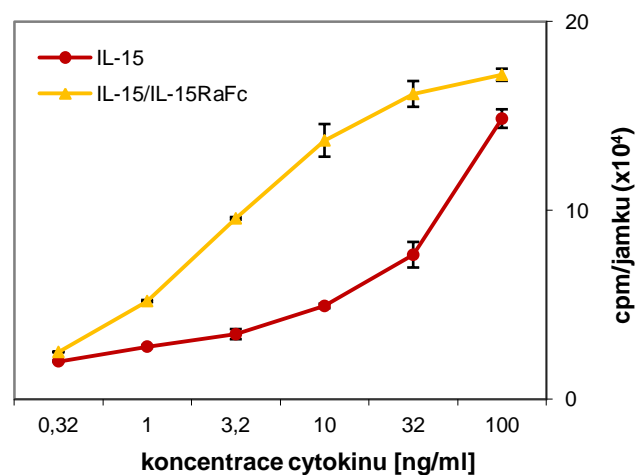
Obr. IV.24: Určení MTD IL-2-pHPMA konjugátu podaného i.p. v pěti dávkách u myši. C57BL/6 myším (5 myši/skupina) o podobné váze bylo v pěti dávkách i.p. aplikováno 4, 6, či 8 μg ekvivalentu IL-2 ve formě IL-2-pHPMA; první dávka v čase 0 a další vždy po 24 hodinách. Myši byly zváženy před aplikací léčiva a každých 24 hodin v průběhu 13 dnů. (A) Zaznamenána byla váha myši a do grafu vynesena změna váhy myši v % váhy dané myši před léčbou. (B) Tabulka ukazuje mortalitu při podání IL-2-pHPMA. Každý experimentální bod představuje průměr 5 myši ve skupině.

IV.3 Potenciace biologické aktivity IL-15: IL-15/IL-15R α -Fc

IV.3.1 Experimenty *in vitro*

Nejdříve byla *in vitro* porovnána schopnost volného IL-15 a IL-15 vázaného ve formě IL-15/IL-15R α -Fc komplexu indukovat proliferaci aktivovaných OT-1 CD8⁺ T lymfocytů (popsán například v kap. IV.1.2.1). Purifikované OT-1 CD8⁺ T lymfocyty byly *in vitro* aktivovány SIINFEKL peptidem a stimulovány různými koncentracemi ekvivalentu IL-15 ve formě volné nebo vázané (IL-15/IL-15R α -Fc komplex) v přítomnosti inhibiční CTLA4-Ig mAb. Schopnost volného IL-15 nebo IL-15 komplexu stimulovat proliferaci byla vyjádřena pomocí inkorporace ³H-thymidinu.

Přestože IL-15/IL-15R α -Fc komplex působí zejména na CD122^{high} populace, stimuloval proliferaci aktivovaných OT-1 CD8⁺ T lymfocytů, a to zhruba 5-10x účinněji než volný IL-15 (Obr. IV.25).

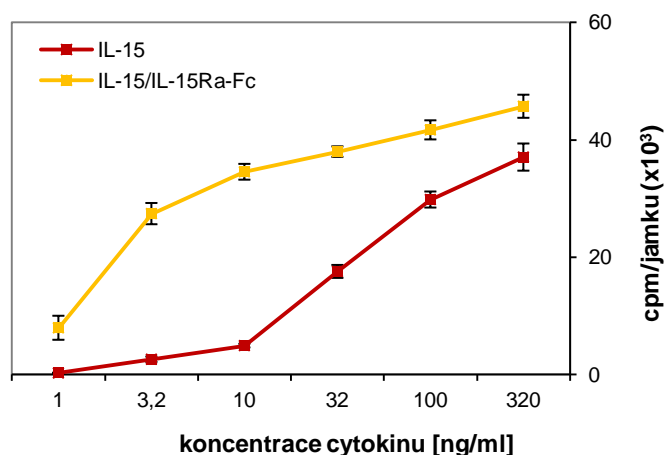


Obr. IV.25: Srovnání schopnosti volného IL-15 a IL-15/IL-15R α -Fc komplexů indukovat proliferaci aktivovaných OT-1 CD8⁺ T lymfocytů *in vitro*. Naivní CD8⁺ T buňky byly izolovány z OT-1 transgenních myší. Buňky (5×10^4 b/jamka) byly 72 h kultivovány v kultivačním médiu s 10 nM SIINFEKL peptidem, CTLA4-Ig o koncentraci 1 μ g/ml a různými koncentracemi volného IL-15 nebo ekvivalentní koncentrací IL-15 ve formě IL-15/IL-15R α -Fc. Proliferační aktivita byla měřena inkorporací ³H-thymidinu, který byl přidán na posledních 8 h inkubace. Každý experimentální bod představuje průměr 3 měření \pm SD. Experiment byl opakován třikrát se srovnatelnými výsledky.

Protože IL-15 je důležitý růstový faktor NK buněk, porovnali jsme také schopnost volného IL-15 a IL-15 komplexů stimulovat proliferaci NK buněk *in vitro*.

Obrázek IV.26 znázorňuje, že volný IL-15 byl schopen stimulovat proliferaci NK buněk, avšak až ve vyšších koncentracích. Oproti tomu IL-15 vázaný ve formě IL-15 komplexů projevil již při nízkých koncentracích vysokou stimulační aktivitu pro NK buňky.

Schopnost indukovat proliferaci NK buněk se u IL-15 komplexu zvýšila až 10x oproti volnému IL-15. Z těchto výsledků vyplývá, že *in vitro* vykazují IL-15/IL-15R α -Fc komplexy oproti shodné koncentraci volného IL-15 schopnost silnější stimulace aktivovaných CD8⁺ T lymfocytů a NK buněk.



Obr. IV.26: Srovnání schopnosti IL-15 a IL-15/IL-15R α -Fc komplexu indukovat proliferaci NK buněk *in vitro*. Purifikované NK buňky ($4,5 \times 10^4$ b/jamka) byly inkubovány 72 h v kultivačním médiu za standardních podmínek s různými koncentracemi volného IL-15 nebo ekvivalentní koncentrací IL-15 ve formě IL-15/IL-15R α -Fc. Proliferační aktivita byla měřena pomocí inkorporace ³H-thymidinu, který byl přidán na posledních 8 h inkubace. Každý experimentální bod představuje průměr 3 měření \pm SD. Experiment byl opakován dvakrát se srovnatelnými výsledky.

IV.3.2 Experimenty *in vivo*

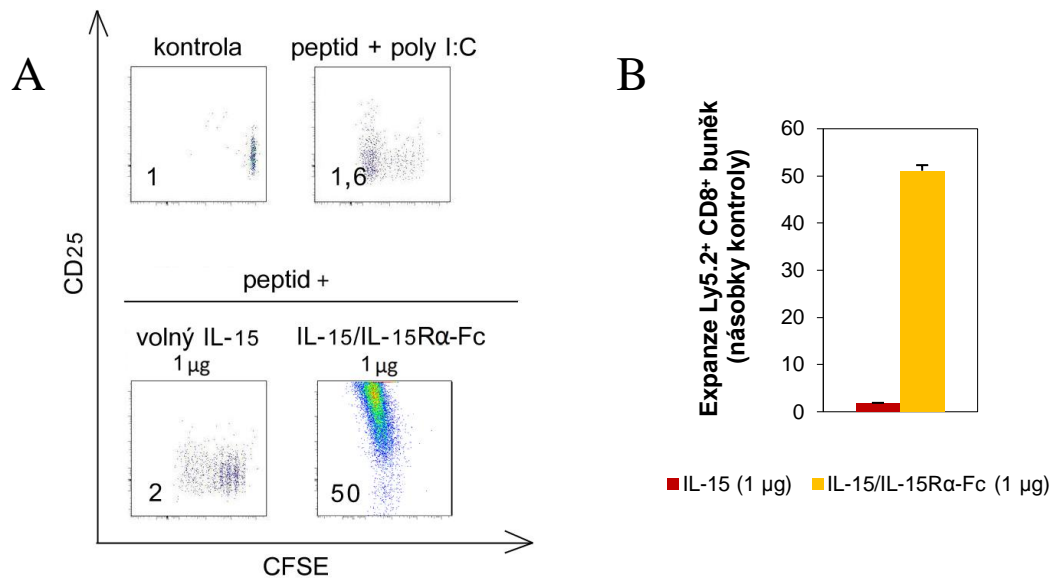
IV.3.2.1 Expanze aktivovaných OT-I CD8⁺ T buněk

Bylo publikováno, že IL-15/IL-15R α -Fc komplexy stimulují proliferaci aktivovaných paměťových CD8⁺ T lymfocytů (CD44^{high} CD122^{high}) a NK buněk [85]. Doposud se však publikované práce blíže nezabývaly vlivem volného IL-15 a IL-15 komplexů na aktivované CD8⁺ T buňky. Tyto buňky hrají důležitou roli například v protinádorové imunitě, a tak bylo jedním z cílů této práce ukázat, v jaké míře ovlivňují IL-15/IL-15R α -Fc komplexy jejich expanzi.

V experimentu byl využit OT-I transgenní systém. Purifikované OT-I CD8⁺ T buňky (Ly5.2) byly adoptivně přeneseny do B6.SJL (Ly5.1) kongenních myší, aktivovány peptidem a stimulovány 4 dávkami volného IL-15 anebo IL-15/IL-15R α -Fc komplexů. Pro pozitivní kontrolu byla použita stimulace kombinací peptidu a poly I:C a naopak myším,

kteře sloužily jako negativní kontrola, nebylo po adoptivním transferu již nic aplikováno. Byla sledována relativní expanze aktivovaných naivních CD8⁺ T buněk.

Volný IL-15 stimuloval proliferaci aktivovaných OT-I CD8⁺ T buněk (viz Obr. IV.27A) a zajistil jejich zhruba dvojnásobnou expanzi (Obr. IV.27B) oproti ničím nestimulované kontrole. Nicméně stejné množství IL-15 ve formě IL-15/IL-15R α -Fc komplexu zvýšilo aktivitu IL-15 zhruba 25x, tj. indukovalo 50násobnou expanzi OT-I CD8⁺ T buněk oproti kontrolním myším (Obr. IV.27B). Také bylo pozorováno, že buňky expandované IL-15/IL-15R α -Fc komplexy exprimují 5. den po aktivaci vysoké hladiny CD25, narozdíl od buněk expandovaných pomocí peptidu + poly I:C či pomocí volného IL-15 (Obr. IV.27A).

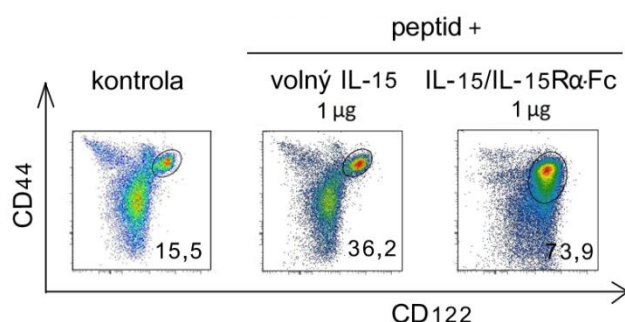


Obr. IV.27: Proliferace a expanze aktivovaných CD8⁺ T buněk pomocí IL-15/IL-15R α -Fc komplexů *in vivo*. Purifikované naivní OT-I CD8⁺ T buňky (Ly5.2) byly označeny CFSE a adoptivně přeneseny do B6.SJL (Ly5.1) kongenních myší (2 myši/skupina). SIINFEKL peptid (2 nmol) byl myším podán i.p. o 24 h později. IL-15 nebo IL-15/IL-15R α -Fc komplexy byly myším podávány i.p. ve 4 dávkách v množství 1 µg ekvivalentu IL-15 na dávku. První dávka byla podána stejný den jako peptid, každá další vždy po 24 h. Kontrolní myši byly ponechány bez stimulace. Pozitivní kontrole bylo společně se SIINFEKL peptidem i.p. aplikováno 75 µg poly I:C. Myši byly usmrceny 5. den po adoptivním transferu OT-I CD8⁺ T buněk (24 h po poslední dávce) a izolované splenocyty byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie. (A) CFSE profil, exprese CD25 a relativní expanze Ly5.2⁺ CD8⁺ buněk vztažená ke kontrole. (B) Průměrná relativní expanze Ly5.2⁺ CD8⁺ buněk ve slezině. Experiment byl opakován třikrát se srovnatelnými výsledky.

IV.3.2.2 Expanze paměťových CD8⁺ T buněk

Dále jsme ověřili stimulační aktivitu IL-15/IL-15R α -Fc komplexů pro paměťové CD8⁺ T lymfocyty. B6.SJL myším byl ve čtyřech dávkách i.p. injikován volný IL-15 nebo IL-15/IL-15R α -Fc komplexy. Ve slezině byla sledována populace CD3⁺ CD8⁺ lymfocytů a v rámci ní bylo stanoveno procentuální zastoupení paměťových CD8⁺ T buněk (CD44^{high} CD122^{high}).

IL-15/IL-15R α -Fc komplexy indukovaly oproti kontrole výraznou expanzi CD44^{high} CD122^{high} paměťových CD8⁺ T buněk. Zatímco ekvivalentní dávka volného IL-15 indukovala expanzi podstatně nižší (Obr. IV.28).

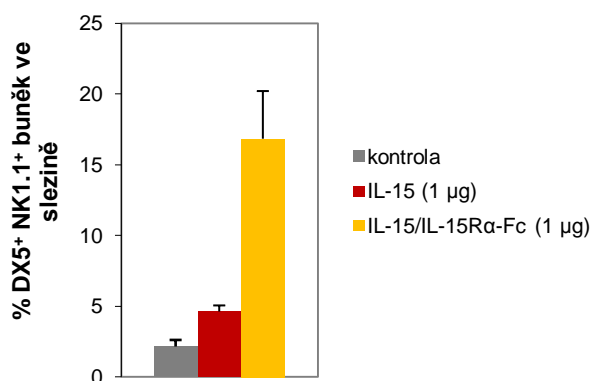


Obr. IV.28: Expanze paměťových CD8⁺ T buněk indukovaná IL-15/IL-15R α -Fc komplexy. B6.SJL (Ly5.1) myším byl ve 4 dávkách (s intervaly vždy 24 h mezi dávkami) podán volný IL-15 či IL-15/IL-15R α -Fc komplexy v množství 1 µg ekvivalentu IL-15 na dávku. Kontrolní myši byly ponechány bez stimulace. Myši byly usmrceny 5. den (24 h po poslední dávce) a izolované splenocyty byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie. Ve slezině bylo stanoveno procentuální zastoupení CD44^{high} CD122^{high} CD8⁺ T buněk v populaci CD3⁺ CD8⁺ buněk. Experiment byl opakován třikrát se srovnatelnými výsledky.

IV.3.2.3 Expanze NK buněk

Schopnost IL-15/IL-15R α -Fc komplexů indukovat expanzi NK buněk již byla popsána dříve [21, 85], nicméně jakákoli kvantitativní data ohledně míry expanze indukované několika po sobě jdoucími dávkami IL-15 komplexů dosud nebyla publikována. Protože NK buňky hrají významnou roli v rejekci nádorů a buněk infikovaných viry, byla tato informace z hlediska budoucího využití IL-15 komplexů důležitá. V experimentu bylo sledováno procento NK buněk (NK1.1⁺ DX5⁺) ve slezině B6.SJL myší, kterým byly ve čtyřech dávkách i.p. injikován volný IL-15 nebo IL-15/IL-15R α -Fc komplexy.

Zhruba dvojnásobná relativní expanze NK buněk oproti kontrole byla indukována volným IL-15. Stejně množství IL-15 ve formě IL-15/IL-15R α -Fc komplexů vyvolalo relativní expanzi 3-4x vyšší než volný IL-15, tj. indukovalo zhruba 8násobné zvýšení procentuálního zastoupení NK buněk ve slezině oproti kontrole (viz Obr. IV.29).



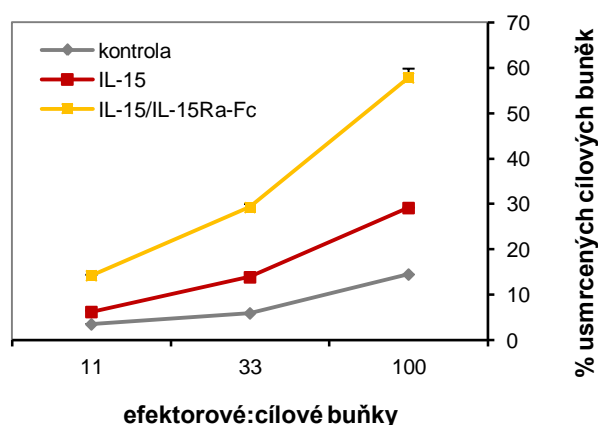
Obr. IV.29: Expanze NK buněk indukovaná IL-15/IL-15R α -Fc komplexy, sledovaná jako procentuální zastoupení NK1.1⁺ DX5⁺ buněk ve slezině. Ekvivalentní množství 1 μ g IL-15 ve formě volné či IL-15/IL-15R α -Fc komplexů bylo B6.SJL myším (2 myši/skupina) podáno ve čtyřech dávkách s intervaly vždy 24 h mezi dávkami. Kontrolní myši byly ponechány bez stimulace. Myši byly usmrceny 24 h po poslední dávce a izolované splenocyty byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie. Experiment byl opakován třikrát se srovnatelnými výsledky.

IV.3.2.4 Vliv IL-15/IL-15R α -Fc komplexů na aktivitu NK buněk (NK cytotoxicita)

Prokázali jsme, že systémově podané IL-15/IL-15R α -Fc komplexy mají výraznou schopnost expandovat NK buňky (IV.3.2.3). Vzhledem k tomuto zjištění jsme chtěli dále ověřit, jestli IL-15 komplexy zároveň ovlivňují aktivitu těchto expandovaných NK buněk. C57BL/6 myším bylo i.p. injikováno 2,5 μ g IL-15, či IL-15 ve formě IL-15/IL-15R α -Fc. Vliv IL-15/IL-15R α -Fc komplexů na aktivitu NK buněk byl tedy určen funkčním testem jejich cytotoxické aktivity - JAM testem, popsáném v kapitole IV.1.3.4.

Mononukleární buňky izolované z kontrolních myši byly schopné při 100násobném nadbytku (poměr efektorů a cílových buněk 100:1) usmrtit přibližně 15 % cílových buněk. Volný IL-15 zvýšil cytolytickou aktivitu NK buněk oproti kontrole zhruba dvakrát, a to při všech testovaných poměrech efektorů a cílových buněk.

Na obrázku IV.30 je znázorněno, že nejvyšší cytolytickou aktivitu, dosahující až 60 % usmrcených cílových buněk, vykazovaly NK buňky myši stimulovaných IL-15/IL-15R α -Fc komplexy (při poměru 100:1 efektorů k cílovým buňkám). Tato aktivita byla při všech poměrech efektorových buněk k cílovým zhruba několikanásobně vyšší než cytolytická aktivita dosažená pomocí IL-15 stimulace. Volný IL-15 má tedy sice schopnost stimulovat efektorovou aktivitu NK buněk *in vivo*, ta je však s mnohonásobně vyšší účinností indukována IL-15/IL-15R α -Fc komplexy.

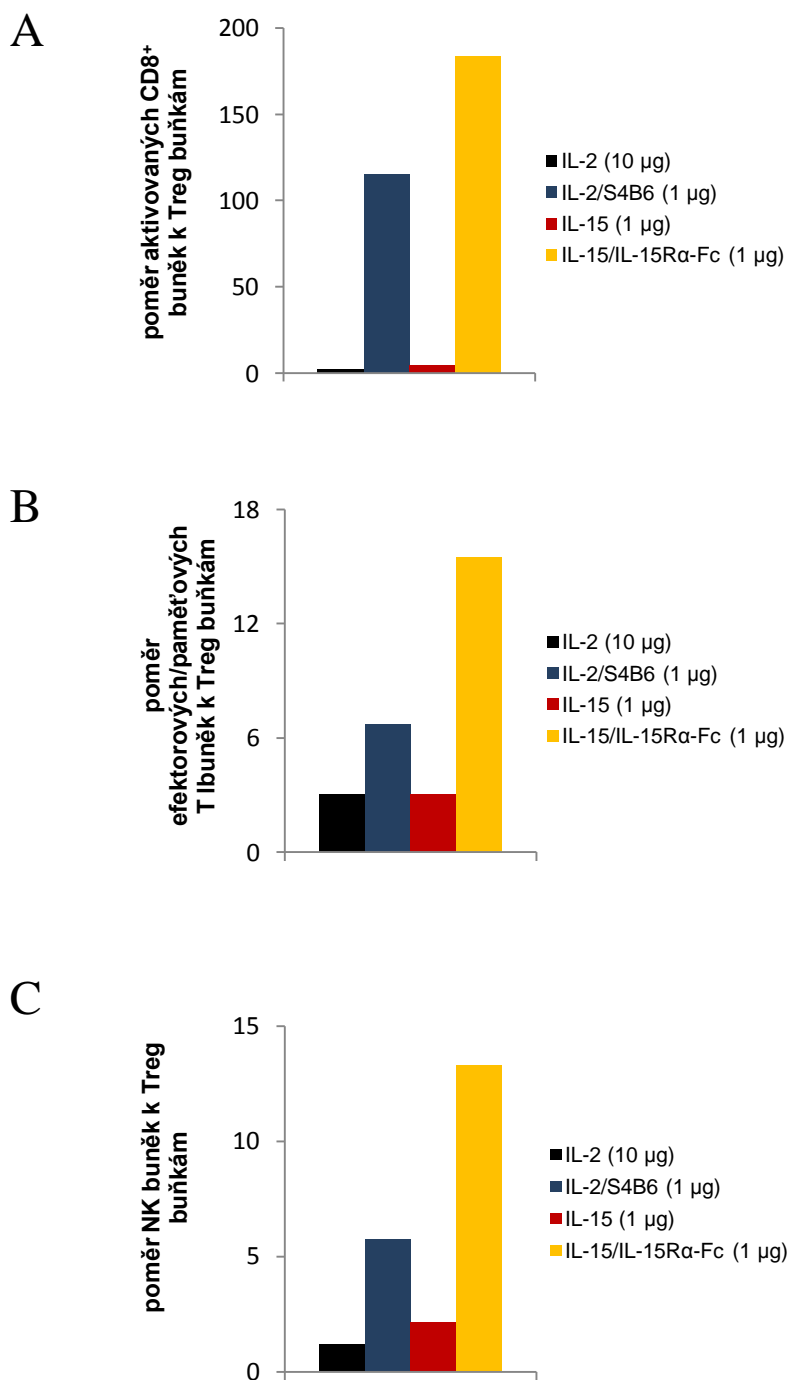


Obr. IV.30: Srovnání vlivu volného IL-15 s IL-15/IL-15R α -Fc komplexu na cytolytickou aktivitu NK buněk u C57BL/6 myši. A i B: Myším (2 myši/skupina) byly i.p. injikovány 2,5 μ g volného IL-15, či IL-15 ve formě IL-15/IL-15R α -Fc (den 0). Kontrolním myším byl aplikován stejný objem fyziologického roztoku (250 μ l). Po 5 dnech byly myši usmrceny a byly izolovány mononukleární buňky. Ty byly inkubovány 4 h za standardních podmínek v kultivačním médiu s 3 H-thymidinem-značenými cílovými YAC-1 buňkami v poměru 11:1, 33:1, 100:1. Zabíjení cílových buněk bylo sledováno jako procentuální úbytek radioaktivity vzhledem k hladině radioaktivity v kontrolních vzorcích bez efektorových buněk (vždy vyšší než 5×10^4 cpm). Každý experimentální bod představuje průměr 8 měření \pm SD. Experiment byl opakován pětkrát se srovnatelnými výsledky.

IV.3.2.5 Expanze T regulačních buněk

Prokázali jsme, že IL-15/IL-15R α -Fc komplexy indukují expanzi efektorových buněk protinádorové imunity – aktivovaných a paměťových CD8 $^+$ T lymfocytů (IV.3.2.1 a IV.3.2.2) a NK buněk (IV.3.2.3), u kterých zároveň zvyšují cytolytickou aktivitu (IV.3.2.4). Z hlediska využití těchto komplexů v protinádorové terapii je však důležitý hlavně poměr jejich stimulační aktivity pro efektorové versus supresorové buňky. Proto bylo důležité zjistit vliv IL-15/IL-15R α -Fc komplexů na expanzi Treg buněk. Vzhledem k tomu, že jsme u IL-2/S4B6 imunokomplexů prokázali, že tento stimulační poměr je výrazně posunut ve prospěch efektorových buněk (viz IV.1.3.5), byly IL-2/S4B6 imunokomplexy zahrnuty do srovnání s IL-15/IL-15R α -Fc komplexy.

Purifikované OT-I CD8 $^+$ T buňky (Ly5.2) byly adoptivně přeneseny do B6.SJL (Ly5.1) kongenních myši a následující den aktivovány SIINFEKL peptidem. Myším byl ve čtyřech dávkách i.p. injikován 1 μ g volného IL-15 či ekvivalentu IL-15 ve formě IL-15/IL-15R α -Fc komplexů anebo 1 μ g IL-2 ve formě IL-2/S4B6 imunokomplexů. Indukovaná relativní expanze Treg buněk (CD4 $^+$ FoxP3 $^+$), aktivovaných CD8 $^+$ T lymfocytů (Ly5.2 $^+$), paměťových CD8 $^+$ T lymfocytů (CD44 $^{\text{high}}$ CD122 $^{\text{high}}$) a NK buněk (DX5 $^+$ NK1.1 $^+$) ve slezině byly kvantifikovány. Z nich jsme potom vypočetli stimulační poměry.



Obr. IV.31: Stimulační poměr IL-15/SIL-15R α -Fc komplexů pro efektorové versus supresorové buňky protinádorové imunity. Purifikované naivní OT-I CD8⁺ T buňky (Ly5.2) byly označeny CFSE a adoptivně přeneseny do B6.SJL (Ly5.1) kongenních myší (2 myši/skupina). SIINFEKL peptid (4 nmol) byl myším podán i.p. o 24 h později. B6.SJL myším (2 myši/skupina) byl podán 1 µg IL-2 ve formě IL-2/S4B6 imunokomplexů, nebo 1 µg ekvivalentu IL-15 volného či v komplexu IL-15/SIL-15R α -Fc, a to ve čtyřech dávkách s intervaly vždy 24 h mezi dávkami. Kontrolní myši byly ponechány bez stimulace. Myši byly usmrceny 24 h po poslední dávce a izolované splenocyty byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie. Relativní expanze Ly5.2⁺ T lymfocytů, paměťových CD44^{high} CD122^{high} CD8⁺ T lymfocytů, DX5⁺ NK1.1⁺ a CD4⁺ FoxP3⁺ T buněk ve slezině byly analyzovány. Stimulační poměry pro dané populace byly vypočteny z těchto relativních expanzí. Experiment byl opakován třikrát se srovnatelnými výsledky. (A) Poměr expanze aktivovaných Ly5.2⁺ CD8⁺ T buněk k CD4⁺ FoxP3⁺ buňkám. (B) Poměr expanze CD8⁺CD44^{high} CD122^{high} T lymfocytů k CD4⁺ FoxP3⁺ buňkám. (C) Poměr expanze Ly5.2⁺ CD8⁺ buněk k CD4⁺ FoxP3⁺ buňkám.

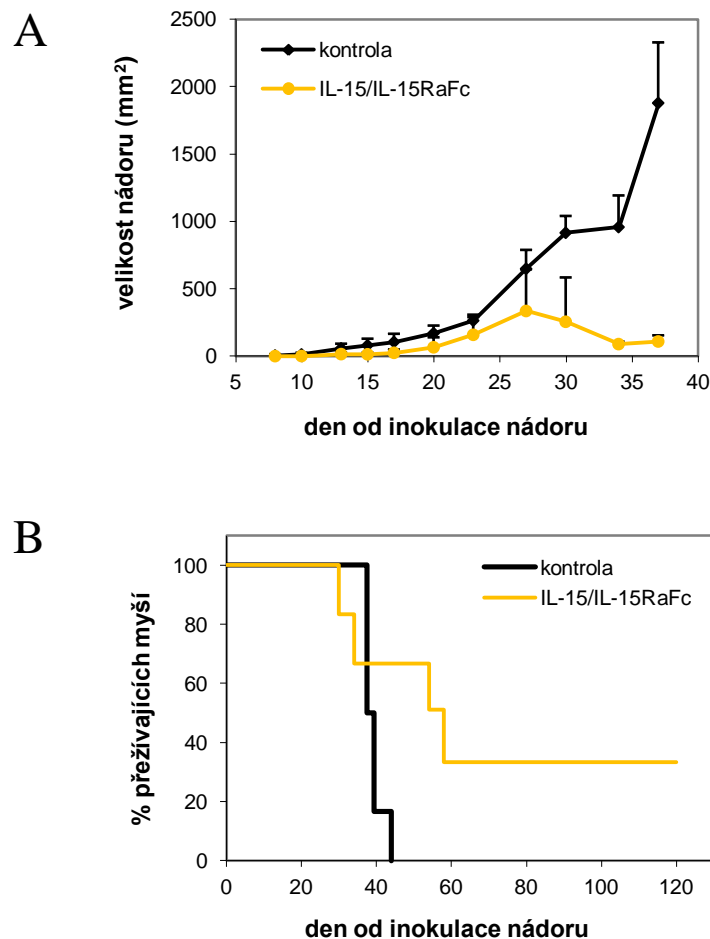
Výsledky tohoto experimentu prokázaly, že IL-15/IL-15R α -Fc komplexy mají nízkou stimulační aktivitu pro T regulační buňky. Ze stanovených stimulačních poměrů a v souladu s našimi výsledky jsme dále potvrdili, že IL-15/IL-15R α -Fc komplexy vykazují poměr stimulace ve prospěch efektorových buněk (Obr. IV.31A-C), výhodný pro jejich budoucí použití v protinádorové imunoterapii. Tento poměr byl navíc zhruba dvojnásobně lepší, než ten dosažený léčbou IL-2/S4B6 komplexy.

IV.3.2.6 Protinádorová aktivita

Pro IL-15/IL-15R α -Fc komplexy jsme prokázali stimulační aktivitu pro efektorové buňky protinádorové imunity (IV.3.2.1-3), a dále vyjádřili poměr stimulace efektorů versus regulačních buněk, vhodný pro možné využití těchto komplexů v nádorové imunoterapii. Na základě těchto zjištění jsme otestovali protinádorovou aktivitu IL-15/IL-15R α -Fc komplexů na dvou nádorových modelech, EL4 T-lymfomu a B16F10 melanomu.

V nádorovém modelu EL4 T-lymfomu bylo C57BL/6 myším s.c. injikováno 1×10^5 EL4 buněk. Léčba IL-15/IL-15R α -Fc komplexy byla provedena v terapeutickém režimu - ve dvou dávkách, a to 3. a 6. den po inokulaci EL4 nádoru. Časové rozmezí mezi dávkami bylo vybráno tak, aby druhá dávka podpořila buněčnou imunitu indukovanou dávkou první. Léčebný režim byl tedy nastaven tak, aby byl imunitní systém stimulován k vyvinutí protinádorové odpovědi v době, kdy je ještě schopen rostoucí nádor eliminovat, tedy ještě před tím, než dosáhl hmatatelné velikosti. Za vyléčené byly považovány ty myši, které alespoň 120 dní po léčbě nejevili příznaky EL4 T lymfomu.

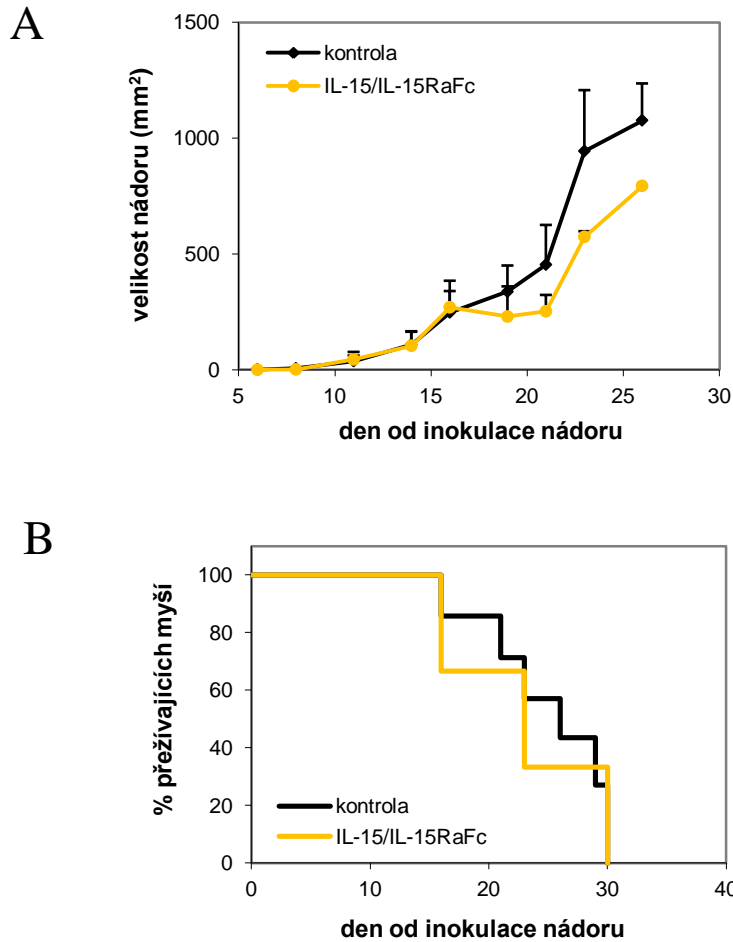
U neléčených kontrolních myší EL4 nádory exponenciálně rostly a zabily všechny myši. U léčených myší byl růst nádoru značně omezen a došlo k prodloužení doby života oproti kontrolní neléčené skupině myší. Při tomto léčebném režimu dokázala léčba IL-15/IL-15R α -Fc komplexy vyléčit 2 myši z šesti (viz Obr. IV.32).



Obr. IV.32: Vliv IL-15/IL-15R α -Fc komplexů na růst EL4 lymfomu a přežívání C57BL/6 myši s nádorem. Samicím C57BL/6 myši bylo s.c. injikováno 1×10^5 EL4 buněk v 50 μ l fyziologického roztoku (den 0). Léčeným myším (n=6) bylo i.p. aplikováno 2 μ g/myš/dávka IL-15 ve formě IL-15/IL-15R α -Fc komplexů, a to 3. a 6. den po podání EL4 buněk. Kontrolním myším (n=6) byl aplikován stejný objem fyziologického roztoku (50 μ l). (A) Průměrný růst EL4 T lymfomu. (B) Přežívání myši s EL4 lymfomem. Myši přežívající 120 dní bez známek lymfomu byly považovány za vyléčené. Experiment byl opakován dvakrát se srovnatelnými výsledky.

V dalším nádorovém modelu - B16F10 melanomu, bylo subkutánně (s.c.) injikováno 1×10^6 melanomových buněk do C57BL/6 recipientních myši. Kontrolní myši nesoucí B16F10 nádor byly ponechány bez léčby, ostatní myši byly léčeny intraperitoneální injekcí (i.p.) dvěma dávkami IL-15/IL-15R α -Fc komplexů 2. a 6. den po podání B16F10 buněk.

V tomto nádorovém modelu prokázaly IL-15/IL-15R α -Fc komplexy pouze schopnost slabě zpomalit růst nádoru, což se ale neprojevovalo na prodloužení doby života léčených myši (Viz obr. IV.33).



Obr. IV.33: Vliv IL-15/IL-15 α -Fc komplexů na růst B16F10 melanomu a přežívání C57BL/6 myši s nádorem. Samicím C57BL/6 myši bylo s.c. injikováno 1×10^6 B16F10 buněk v 50 μ l fyziologického roztoku (den 0). Léčeným myším (n=3) bylo i.p. aplikováno 2 μ g/myš/dávka IL-15 ve formě IL-15/IL-15 α -Fc komplexů, a to 2. a 6. den po podání B16F10 buněk. Kontrolním myším (n=7) byl aplikován stejný objem fyziologického roztoku (50 μ l). (A) Průměrný růst B16F10 melanomu. (B) Přežívání myši s B16F10 melanomem. Myši přežívající 120 dní bez známek melanomu byly považovány za vyléčené. Experiment byl opakován dvakrát se srovnatelnými výsledky.

V. DISKUZE

Cytokiny jsou nepostradatelnou součástí imunitního systému jako intermediátory regulace funkcí imunokompetentních buněk. Jejich terapeutické využití v imunoterapii představuje slibné odvětví medicíny a je již nyní nedílnou součástí léčby řady maligních onemocnění. Potýká se však s řadou problémů - nízkou terapeutickou aktivitou vyplývající z krátkého poločasu systémově podaných cytokinů na straně jedné a s toxicitou vysokých dávek cytokinu na straně druhé. V budoucnu je proto třeba najít takové léčebné protokoly či modifikace, které by efektivní využití cytokinů v imunoterapii umožnily.

V posledních letech se do centra pozornosti dostala nová forma cytokinové imunoterapie – cytokinové imunokomplexy. Při tomto přístupu je nejprve cytokin komplexován se specifickou anti-cytokinovou monoklonální protilátkou nebo solubilní formou svého cytokinového receptoru za vzniku (imuno)komplexu, který má po aplikaci do organismu nesrovnatelně vyšší biologickou aktivitu než ekvivalent volného cytokinu. Fenomén cytokinových komplexů již byl popsán pro imunokomplexy složené z IL-2, IL-3, IL-4, IL-6 či IL-7 a specifické monoklonální protilátky a také komplexy složené z IL-15 a jeho solubilního vysoko afinitního receptoru α fúzovaného s Fc částí IgG molekuly. Přestože je tato terapeutická strategie pro efektivní použití cytokinů v imunoterapii zatím relativně nová a testovaná pouze na myších modelech, prokázala již svou použitelnost například pro zesílení imunitních reakcí proti nádoru a infekcím.

IL-2 je již po dlouhou dobu atraktivní molekulou pro imunoterapii, avšak v klinické praxi se jeho terapeutické použití potýká s mnoha závažnými problémy a nedostatky. Nyní je velká pozornost věnována zejména IL-2/anti-IL-2 mAb imunokomplexům, jako možné formě IL-2 použitelné pro terapii. V závislosti na klonu specifické anti-IL-2 monoklonální protilátky byly popsány dva odlišně biologicky působící typy výsledných IL-2 imunokomplexů. Jsou jimi IL-2/JES6-1 mAb a IL-2/S4B6 mAb imunokomplexy, u kterých byla popsána unikátní schopnost selektivně stimulovat odlišné populace imunokompetentních buněk podle toho, jakou formu IL-2 receptoru exprimují. Nezávisle na specifitě IL-2 imunokomplexů pro jednotlivé subpopulace imunokompetentních buněk je jejich biologická aktivita *in vivo* vždy mnohonásobně vyšší než aktivita volného IL-2. V této diplomové práci jsme se nejprve zabývali potenciací biologické aktivity IL-2 komplexováním s JES6-1 či S4B6 anti-IL-2 monoklonální protilátkou.

Pro IL-2/JES6-1 imunokomplexy byla popsána specifická stimulační aktivita pro CD25^{high} buňky, mezi které patří T regulační buňky a aktivované CD8⁺ T lymfocyty. V této

diplomové práci jsme prokázali, že IL-2/JES6-1 imunokomplexy indukují významnou proliferaci a expanzi aktivovaných CD8⁺ T lymfocytů (zhruba 50-100x vyšší oproti ekvivalentní dávce volného IL-2, který indukoval expanzi v podstatě zanedbatelnou) a že takto expandované aktivované CD8⁺ T buňky vytváří dlouho žijící populaci efektorově funkčních paměťových CD8⁺ T lymfocytů schopných exprese IFN- γ po opětovném setkání s antigenem. U myši léčených volným IL-2 se ustavila dramaticky menší populace paměťových CD8⁺ T lymfocytů (asi 10x nižší); a tyto buňky navíc nebyly po restimulaci schopny exprese IFN- γ). Po léčbě IL-2/JES6-1 imunokomplexy jsme pozorovali také výraznou expanzi Treg buněk. Při podání ekvivalentní dávky volného IL-2 pak byla expanze Treg buněk nevýznamná. Zdokumentovali jsme tedy vysokou biologickou aktivitu IL-2 v komplexu s monoklonální protilátkou JES6-1 při působení na aktivované CD8⁺ T lymfocyty a Treg buňky. Protože bylo publikováno, že vysoká biologická aktivita IL-2/S4B6 imunokomplexů je dána zejména jejich prodlouženým setrváním v cirkulaci, určili jsme s ohledem na objasnění vysoké biologické aktivity IL-2/JES6-1 imunokomplexů také jejich poločas v cirkulaci. Poločas IL-2/JES6-1 imunokomplexů v cirkulaci byl stanoven přibližně na 5 hodin (oproti poločasu volného IL-2 zhruba 90x delší), což vysokou biologickou aktivitu IL-2/JES6-1 imunokomplexů alespoň zčásti objasnilo.

Rovněž u IL-2/S4B6 imunokomplexů jsme prokázali významnou potenciaci biologické aktivity IL-2. I zde jsme pozorovali silnou proliferaci a expanzi aktivovaných CD8⁺ T lymfocytů *in vivo*, avšak o něco nižší než v případě IL-2/JES6-1 imunokomplexů. Volný IL-2, a to i v případě že byl podaný v mnohonásobně vyšším množství (cca 15násobném), prokázal oproti IL-2/S4B6 imunokomplexům jen slabý stimulační efekt. Mimo to jsme zaznamenali fakt, že biologický efekt dosažený jednou vysokou dávkou imunokomplexů může být plně nahrazen několika dávkami o znatelně nižším celkovém množství IL-2 ekvivalentu. Toto pozorování vypovídá o kumulativním účinku působení imunokomplexů na expandované buněčné populace. Míra expanze paměťových CD8⁺ T lymfocytů i NK buněk indukovaná IL-2/S4B6 imunokomplexy byla nesrovnatelně vyšší než při stimulaci buněk volným IL-2, kde se blížila neléčené kontrole. Po léčbě IL-2/S4B6 imunokomplexy mělo až 90% CD3⁺CD8⁺ T lymfocytů ve slezině paměťový fenotyp (CD44^{high} CD122^{high}). Pozorovali jsme také významný pozitivní vliv IL-2/S4B6 mAb imunokomplexů na NK cytolytickou aktivitu splenocytů; volný IL-2 byl v ekvivalentním dávkování opět téměř neúčinný.

Bylo zdokumentováno, že v průběhu terapie nádorů pomocí IL-2 dochází k nárůstu počtu imunosupresivních T regulačních buněk, které mohou navíc růst nádoru podpořit [72, 123-124]. Během léčby pomocí IL-2 tak u pacientů dochází k expanzi Treg buněk spíše než

k proliferaci NK buněk a CD8⁺ T lymfocytů, tj. efektorových buněk protinádorové imunitní odpovědi [123, 125-128]. Velkým nedostatkem klinické imunoterapie nádorů pomocí IL-2 je tedy to, že IL-2-expandované Treg buňky následně znemožňují vyvinutí účinné protinádorové odpovědi [124, 129]. Terapeutickou efektivitu podávaného IL-2 by proto mohla vylepšit selektivní polarizace biologické aktivity IL-2 směrem k efektorovým buňkám imunitní odpovědi proti nádoru. Podařilo se nám prokázat, že tento problém je z velké části vyřešen, pokud je IL-2 komplexován s monoklonální protilátkou S4B6. Pro IL-2/S4B6 imunokomplexy jsme totiž prokázali stimulační poměr vhodný pro protinádorovou imunoterapii, tedy mnohonásobně favorizující expanzi efektorových buněk – aktivovaných i paměťových CD8⁺ T lymfocytů a NK buněk nad buňkami supresorovými.

Dalším přístupem jak zvýšit biologickou aktivitu IL-2 je zamezit jeho rychlé eliminaci z oběhu. V minulosti se jako vhodné řešení ukázala konjugace IL-2 k větším molekulám, jako je například polyethylenglykol nebo albumin. Na stejném principu byla založena syntéza IL-2-pHPMA konjugátu v laboratoři prof. Ing. Karla Ulbricha, DrSc. Konjugát IL-2-pHPMA tak má oproti volnému myšimú rIL-2 zhruba 4x vyšší molekulovou hmotnost. Prvním krokem v charakterizaci IL-2-pHPMA konjugátu bylo určení jeho biologické aktivity. Prokázali jsme, že při použití ekvivalentních množství IL-2 je IL-2-pHPMA konjugát schopen indukovat proliferaci a expanzi aktivovaných CD8⁺ T lymfocytů ve stejné míře jako IL-2/S4B6 imunokomplexy. Také jsme pozorovali, že zatímco volný IL-2 měl na aktivované CD8⁺ T lymfocyty téměř zanedbatelný vliv, shodné množství IL-2 ve formě IL-2-pHPMA konjugátu vyvolalo jejich téměř 200násobnou expanzi. Důležité je, že během retrakční fáze došlo u CD8⁺ T lymfocytů expandovaných IL-2-pHPMA konjugátem k vytvoření významné populace dlouho žijících a z naprosté většiny efektorově funkčních paměťových buněk.

IL-2-pHPMA konjugát prokázal také značnou stimulační aktivitu pro paměťové CD8⁺ T lymfocyty i NK buňky oproti shodné dávce volného IL-2. Dále jsme pozorovali, že u expandovaných NK buněk zároveň dochází k zvýšení jejich cytolytické aktivity. Při srovnání se stimulační aktivitou IL-2/S4B6 imunokomplexů se ukázalo, že k působení IL-2-pHPMA konjugátu jsou více senzitivní aktivované CD8⁺ T lymfocyty než NK buňky.

Protože v případě IL-2-pHPMA konjugátu se jedná o odlišný způsob potenciace IL-2 aktivity oproti IL-2 imunokomplexům (v nichž je IL-2 nekovalentně vázán ke svému „nosiči“ - monoklonální protilátce), neočekávali jsme selektivitu IL-2-pHPMA při působení na různé buněčné populace. V souladu s tímto předpokladem projevil IL-2-pHPMA konjugát znatelně vyšší stimulační aktivitu pro T regulační buňky než volný IL-2.

Pro potvrzení prvotního záměru vytvořit vysokomolekulární formu IL-2 s omezenou eliminací jsme určili poločas IL-2-pHPMA v cirkulaci. Poločas IL-2-pHPMA konjugátu jsme stanovili na zhruba 4 hodiny, tj. jednalo se zhruba o 70násobné prodloužení setrvání v oběhu ve srovnání s volným IL-2. Dále jsme se pokusili určit maximální tolerovanou dávku, tedy maximální dávku konjugátu, která není doprovázena mortalitou a také nezpůsobí nepříjemné vedlejší účinky. Tu jsme vymezili pro jednorázové i.p. podání (~ 80 µg/myš) a pro pět po sobě následujících dávek (4 µg/myš).

Prokázali jsme, že IL-2-pHPMA konjugát postrádá při působení na jednotlivé subpopulace imunokompetentních buněk selektivitu popsanou u IL-2 imunokomplexů. Protože jsme ve všech studovaných aspektech pro IL-2-pHPMA konjugát prokázali nesrovnatelně vyšší biologickou aktivitu ve srovnání s volným IL-2 *in vivo*, považujeme ho za IL-2 „superagonistu“.

Vysoká biologická aktivita byla popsána také pro komplexy složené z IL-15 a vysoko afinitního IL-15R α receptoru fúzovaného s Fc částí lidského IgG1 (IL-15R α -Fc). Bylo popsáno, že IL-15/IL-15R α -Fc komplexy, působící jako IL-15 „superagonista“, efektivně prezentují IL-15 cílovým buněčným populacím, a tak indukují biologické efekty, které podáním samotného IL-15 nemohou být dosaženy [91, 116]. V souladu s touto skutečností byla po podání volného IL-15 pozorována pouze zanedbatelná proliferace a expanze aktivovaných CD8⁺ T lymfocytů. IL-15 ve formě IL-15/IL-15R α -Fc komplexů zvýšil svou aktivitu zhruba 25x, tj. indukoval asi 50násobnou expanzi aktivovaných CD8⁺ T lymfocytů *in vivo* oproti kontrole. Mnohem vyšší stimulační aktivita v porovnání s volným IL-15 byla u IL-15/IL-15R α -Fc komplexů pozorována také při indukci proliferace CD8⁺ T lymfocytů a NK buněk. U NK buněk navíc IL-15/IL-15R α -Fc komplexy značně stimulovaly cytolytickou aktivitu.

IL-15/IL-15R α -Fc komplexy překvapivě vykazaly velmi nízkou schopnost stimulovat Treg buňky. Z hlediska jejich využití v nádorové imunoterapii jsme proto podobně jako u IL-2 imunokomplexů určili výsledný poměr jejich stimulační aktivity pro efektorové versus supresorové buňky. Potvrdili jsme poměr stimulace ve prospěch efektorových buněk protinádorové imunity, výhodný pro budoucí použití IL-15/IL-15R α -Fc komplexů v nádorové imunoterapii.

Námi popsané vlastnosti obou IL-2 imunokomplexů, IL-2-pHPMA konjugátu i IL-15/IL-15R α -Fc komplexů podpořily myšlenku otestovat jejich protinádorovou aktivitu. Předpokládali jsme, že účinné by mohly být zejména IL-2/S4B6 i IL-15/IL-15R α -Fc komplexy, u kterých jsme pozorovali nízkou stimulační aktivitu pro Treg buňky a zároveň

také značné zvýšení poměru aktivovaných Ag-specifických $CD8^+$ T buněk, paměťových/efektorových $CD8^+$ T lymfocytů a NK buněk k Treg buňkám. Další příznivou indikací pro námi zamýšlenou imunoterapii nádorů byl pozitivní vliv IL-2/S4B6 imunokomplexů, IL-2-pHPMA konjugátu i IL-15/IL-15R α -Fc komplexů na efektorovou aktivitu NK buněk. Pokud bychom srovnávali cytolytickou aktivitu NK buněk stimulovaných těmito „superagonistickými“ formami cytokinů, nejvyšší by byla indukována IL-15/IL-15R α -Fc komplexy. Zdá se tedy, že ačkoli při stejné dávce ekvivalentu cytokinu indukují IL-2/S4B6 imunokomplexy i IL-2-pHPMA konjugát vyšší míru proliferace NK buněk než komplexy IL-15/IL-15R α -Fc, nestimulují v nich zároveň stejnou míru efektorové aktivity, což by se mohlo odrazit na jejich terapeutické efektivitě.

Systémově podané IL-2/S4B6, IL-2/JES6-1 i IL-15/IL-15R α -Fc komplexy skutečně prokázaly protinádorovou aktivitu. V modelu EL4 lymfomu jsme pouhou imunomodulací imunitního systému dosáhli nejlepších výsledků použitím IL-2/JES6-1 imunokomplexů, které byly schopny vyléčit až 50% myši. Jen o málo nižší účinnost prokázaly IL-2/S4B6 imunokomplexy či IL-15/IL-15R α -Fc komplexy. Kromě toho jsme pozorovali, že neefektivní léčba EL4 T lymfomu suboptimální dávkou chemoterapeutik může být pozitivně ovlivněna imunomodulací imunitního systému pomocí IL-2/S4B6 i IL-2/JES6-1 imunokomplexů. Při léčbě B16F10 melanomu jsme použitím IL-2 imunokomplexů a také IL-15/IL-15R α -Fc komplexů dosáhli alespoň prodloužení přežívání myši.

Přestože jsme pro IL-15/IL-15R α -Fc komplexy prokázali vyšší stimulaci cytolytické aktivity NK buněk a lepší poměr stimulace efektorových versus supresorových buněk protinádorové imunity než pro IL-2/S4B6 imunokomplexy, nemůžeme konstatovat, že by se to projevilo znatelně vyšší účinností léčby. Velkým překvapením byla vysoká protinádorová aktivita IL-2/JES6-1 imunokomplexů, která bude potřeba ještě v budoucnu objasnit. Předpokládáme však, že u myši reagujících na léčbu IL-2/JES6-1 imunokomplexy převážila role expanze nádorově-specifických aktivovaných $CD8^+$ T lymfocytů nad expanzí Treg buněk.

Ve srovnání s IL-2 či IL-15 komplexy jsme nezaznamenali protinádorový efekt léčby IL-2-pHPMA konjugátem ani u jednoho typu nádoru. Zdá se tedy, že IL-2-pHPMA konjugát se pro nádorovou imunoterapii nehodí. Navrhujeme tedy jeho použití jako adjuvans při vakcinaci, neboť jsme prokázali, že je schopen nejen expandovat aktivované $CD8^+$ T lymfocyty, ale také dát vzniknout dlouho žijící populaci buněk s paměťovým fenotypem, které jsou po opětovném setkání s antigenem schopné efektorových funkcí.

Při porovnávání volných interleukinů s jejich modifikovanými formami *in vitro* se projevil hlavní rozdíl mezi působením IL-2 imunokomplexů či konjugátu a IL-15 vázaným ke svému vysokoafinitnímu receptoru kovalentně připojenému k Fc části lidského IgG1 (IL-15R α -Fc). *In vitro* jsme pro oba IL-2 imunokomplexy a také IL-2-pHPMA konjugát prokázali nižší aktivitu ve smyslu stimulace proliferaci aktivovaných CD8⁺ T lymfocytů či NK buněk než vykazoval volný IL-2. Naproti tomu IL-15/IL-15R α -Fc komplexy projevily *in vitro* superagonistické schopnosti. IL-15 ve formě IL-15/IL-15R α -Fc komplexů tak projevil až 10x vyšší schopnost stimulovat proliferaci aktivovaných CD8⁺ T lymfocytů a NK buněk než ekvivalentní koncentrace volného IL-15 *in vitro*.

Popsané odlišnosti vyplývají z rozdílných mechanismů, jakými dochází k potenciaci biologické aktivity v (imuno)komplexu/konjugátu. Ke zvýšení biologické aktivity IL-2 v imunokomplexu či konjugátu totiž *in vivo* dochází zejména prodloužením poločasu cytokinu v oběhu (ačkoli v případě IL-2 imunokomplexů se uplatňuje ještě selektivní utilizace IL-2/S4B6 či IL-2/JES6-1 imunokomplexů jednotlivými subpopulacemi buněk v závislosti na typu IL-2 receptoru, který exprimují). Totéž platí i pro IL-15 vázaný ve formě IL-15/IL-15R α -Fc komplexů. Avšak tyto jevy se v *in vitro* systému neuplatňují, a tak nemůže dojít k plnému projevení esenciálních vlastností modifikovaného cytokinu vedoucích k jeho vysoké biologické aktivitě *in vivo*. U IL-15/IL-15R α -Fc komplexů k vysoké biologické aktivitě *in vivo* přispívá také schopnost komplexů nahradit přirozenou transprezentaci IL-15, tedy hlavní mechanismus efektivního působení IL-15, který se projeví již *in vitro*. Předpokládá se totiž, že vazbou na IL-15R α se indukuje konformační změna v IL-15, která má za následek vyšší afinitu k $\beta\gamma_c$ dimernímu receptoru.

Závěrem lze konstatovat, že všechny v této diplomové práci popsané formy IL-2 a IL-15 by v budoucnu mohly být úspěšně využity v imunoterapii místo příslušného volného interleukinu. Prokázali jsme, že IL-2/S4B6 imunokomplexy stimulují maturaci a proliferaci nejen CD8⁺ T lymfocytů ale i NK buněk v mnohem vyšší míře než konvenční IL-2 terapie. Oproti tomu výhodou IL-2/JES6-1 imunokomplexů se ukázala být velmi vysoká stimulační aktivita pro aktivované CD8⁺ T lymfocyty. Navrhujeme tedy, že nedostatky současné IL-2 terapie zahrnující omezenou terapeutickou aktivitu, závažnou toxicitu a stimulaci Treg buněk by mohly být tak jednoduchým přístupem jakým je komplexování s vybraným klonem anti-IL-2 mAb minimalizovány či zcela obejity. Výjimečné důležitosti nabývají popsané vlastnosti IL-2 komplexů ve světle toho, že pro oba typy byly popsány ekvivalentně působící lidské IL-2 komplexy [69]. Z těchto důvodů se domníváme, že by

obzvláště slibnou náhradou za konvenční IL-2 imunoterapii mohly být hIL-2/MAB602 imunokomplexy (s vlastnostmi ekvivalentními IL-2/S4B6 imunokomplexům).

Pro sdílené vlastnosti jsou pro obdobná terapeutická využití předurčeny IL-2/S4B6 (lidské hIL-2/MAB602) imunokomplexy a IL-15/IL-15R α -Fc komplexy. Vykazují téměř identickou schopnost stimulovat stejné populace buněk - CD8⁺ T lymfocyty a NK buňky. Obzvláště jejich vysoká stimulační aktivita pro aktivované a paměťové CD8⁺ T lymfocyty a zároveň nízká schopnost stimulace Treg buněk by v důsledku mohla vést k snížení účinnosti Treg buněk při potlačování T-buněčné imunitní odpovědi, a tak dále posílit probíhající imunitní reakce. Navíc ani u jednoho z těchto komplexů nebyla prokázána systémová toxicita, jež je spojená s IL-2 [69, 130].

IL-2/JES6-1 imunokomplexy (lidské hIL-2/5344) by naopak pro svou vysokou stimulační aktivitu pro Treg buňky mohly být využity pro indukci tolerance před transplantací či pro léčbu patologických autoimunitních stavů. V souladu s výsledky diplomové práce tedy navrhuje využití popsaných „superagonistických“ forem cytokinů zejména pro imunoterapii nádorů (kde jsme zdůvodnili použití obou typů IL-2 imunokomplexů i IL-15/IL-15R α -Fc komplexů) či jako adjuvans při vakcinaci, a to v závislosti na jejich popsaných vlastnostech.

VI. SOUHRN

Hlavní výsledky diplomové práce lze v souladu s jejími cíli shrnout takto:

- Nejen oba IL-2 imunokomplexy, ale také IL-2-pHPMA konjugát vykazaly oproti volnému IL-2 sníženou schopnost indukovat proliferaci buněk *in vitro*. Oproti tomu IL-15/IL-15R α -Fc komplexy vykazovaly vyšší stimulační aktivitu oproti volnému IL-15 měřenou jako proliferativní odpověď aktivovaných CD8⁺ T lymfocytů i NK buněk *in vitro*.
- Schopnost IL-2/JES6-1 imunokomplexů selektivně stimulovat CD25^{high} populace buněk byla potvrzena na aktivovaných CD8⁺ T lymfocytech a T regulačních buňkách. Míra expanze těchto buněk indukovaná IL-2/JES6-1 imunokomplexy *in vivo* byla významně vyšší oproti použití volného IL-2. Aktivované CD8⁺ T lymfocyty expandované IL-2/JES6-1 imunokomplexy navíc vytvořily robustní populaci dlouho žijících efektorově funkčních paměťových CD8⁺ T lymfocytů. Biologický poločas IL-2/JES6-1 imunokomplexů byl odhadnut zhruba na 5 hodin, oproti volnému IL-2 tedy asi 90x delší.
- Potvrdili jsme selektivní působení IL-2/S4B6 imunokomplexů na CD122^{high} populace buněk *in vivo*. IL-2/S4B6 imunokomplexy indukovaly oproti volnému IL-2 vysokou míru proliferace a expanze aktivovaných CD8⁺ T lymfocytů. Indukovaly také několikanásobnou expanzi paměťových CD8⁺ T lymfocytů a NK buněk, u kterých současně účinně stimulovaly efektorové funkce.
- IL-2-pHPMA konjugát prokázal schopnost stimulovat totožné buněčné populace, tj. aktivované a paměťové CD8⁺ T lymfocyty, NK a T regulační buňky jako volný IL-2, avšak s mnohem vyšší účinností *in vivo*. U tohoto vysokomolekulárního IL-2 konjugátu došlo k výraznému prodloužení poločasu setrvání IL-2 v oběhu. Biologický poločas IL-2-pHPMA v séru byl odhadnut přibližně na 4 hodiny, oproti volnému IL-2 tedy asi 70x delší. Určili jsme také maximální tolerovanou dávku IL-2-pHPMA, která byla odhadnuta při jednorázovém podání na zhruba 80 μ g/myš a při pěti po sobě následujících dávkách na 4 μ g/myš.

- IL-15/IL-15R α -Fc komplexy projevily oproti volnému IL-15 výraznou schopnost stimulovat expanzi aktivovaných i paměťových CD8⁺ T lymfocytů a také NK buněk, u kterých současně účinně stimulovaly efektorové funkce.
- U obou IL-2 imunokomplexů i IL-15/IL-15R α -Fc komplexů byla determinována stimulační aktivita pro efektorové versus supresorové buňky protinádorové imunity. Prokázali jsme, že IL-2/S4B6 imunokomplexy a v o něco vyšší míře i IL-15/IL-15R α -Fc komplexy představují potenciálně účinnou imunoterapeutickou metodu jednoznačně favorizující efektorové buňky účastnící se eradikace nádorových buněk. Oba IL-2 imunokomplexy a také IL-15/IL-15R α -Fc komplexy dále prokázaly protinádorovou aktivitu v myším modelu EL4 T lymfomu a B16F10 melanomu. Modulace imunitního systému pomocí IL-2 imunokomplexů také pozitivně ovlivnila léčbu EL4 T-lymfomu suboptimální dávkou chemoterapeutik.

VII. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

1. Sugamura K, A.H., Kondo M, Tanaka N, Ishii N, Ohbo K, Nakamura M, Takeshita T, *The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID*. Annu Rev Immunol., 1996. **14**: p. 179-205.
2. Bamford RN, G.A., Burton JD, Peters C, Kurys G, Goldman CK, Brennan J, Roessler E, Waldmann TA, *The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1994. **91**(11): p. 4940-4.
3. Waldmann TA, D.S., Tagaya Y, *Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy*. Immunity, 2001. **14**(2): p. 105-10.
4. Carson WE, F.T., Haldar S, Eckhert K, Lindemann MJ, Lai CF, Croce CM, Baumann H, Caligiuri MA, *A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival*. J Clin Invest., 1997. **99**(5): p. 937-43.
5. Fontenot JD, R.J., Gavin MA, Rudensky AY, *A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells*. Nat Immunol. Nat Immunol., 2005 **6**(11): p. 1142-51.
6. Marks-Konczalik J, D.S., Losi JM, Sabzevari H, Yamada N, Feigenbaum L, Waldmann TA, Tagaya Y, *IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice*. . Proc Natl Acad Sci U S A., 2000. **97**(21): p. 11445-50.
7. Schluns KS, L.L., *Cytokine control of memory T-cell development and survival*. Nat Rev Immunol., 2003. **3**(269-279.).
8. Grabstein KH, E.J., Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, Beers C, Richardson J., Schoenborn MA, Ahdieh M, Johnson L, Alderson MR, Watson JD, Anderson DM, Giri JG, *Cloning of a T cell growth factor that interacts with the β chain of the interleukin-2 receptor*. . Science, 1994(264): p. 965-968.
9. Steel JC, W.T., Morris JC, *Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer*. Trends Pharmacol Sci., 2012. **33**(1): p. 35-41.
10. Sallusto F, G.J., Lanzavecchia A., *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. Annu Rev Immunol., 2004. **22**: p. 745-63.
11. Wherry EJ, T.V., Becker TC et al, *Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets*. Nature Immunol., 2003. **4**(3): p. 225–234.
12. Klebanoff CA, G.L., Torabi-Parizi P, Kerstann K, Cardones AR, Finkelstein SE, Palmer DC, Antony PA, Hwang ST, Rosenberg SA, Waldmann TA, Restifo NP., *Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells*. Proc Natl Acad Sci USA., 2005. **102**(27): p. 9571-6.
13. Schorle H, H.T., Hünig T, Schimpl A, Horak I, *Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting*. Nature, 1991. **352**(6336): p. 621-4.
14. Lodolce JP, B.D., Chai S, Swain RE, Dassopoulos T, Trettin S, Ma A, *IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation*. Immunity., 1998. **9**(5): p. 669-76.

15. Giri JG, A.M., Eisenman J, Shanebeck K, Grabstein K, Kumaki S, Namen A, Park LS, Cosman D, Anderson D, *Utilization of the β and γ chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15*. EMBO J, 1994. **13**: p. 2822-2830.
16. Giri JG, K.S., Ahdieh M, Friend DJ, Loomis A, Shanebeck K, DuBose R, Cosman D, Park LS, Anderson DM., *Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the α chain of the IL-2 receptor*. EMBO J., 1995. **14**: p. 3654-3663.
17. Minami Y, K.T., Miyazaki T, Taniguchi T, *The IL-2 receptor complex: Its structure, function, and target genes*. Annu Rev Immunol. , 1993. **11**: p. 245–268.
18. Nelson BH, L.J., Greenberg PD, *A membrane-proximal region of the interleukin-2 receptor gamma c chain sufficient for Jak kinase activation and induction of proliferation in T cells*. Mol Cell Biol., 1996. **16**: p. 309-317.
19. Waldmann TA, *The interleukin-2 receptor*. J Biol Chem., 1991. **266**: p. 2681-2684.
20. Sakaguchi S, S.N., Asano M, Itoh M, Toda M, *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.* . J Immunol., 1995. **155**: p. 1151–1164.
21. Boyman O, K.M., Rubinstein MP, Surh CD, Sprent J. , *Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes.* . Science, 2006. **311**: p. 1924–1927.
22. Waldmann TA, *The interleukin-2 receptor*. J Biol Chem., 1991. **266**(5): p. 2681-4.
23. Bergamaschi C, R.M., Jalah R, et al., *Intracellular interaction of interleukin-15 with its receptor α during production leads to mutual stabilization and increased bioactivity*. J Biol Chem., 2008. **283**: p. 4189–99.
24. Schluns KS, S.T., Lefrancois L, *The roles of interleukin-15 receptor α : Trans-presentation, receptor component, or both?* Int J Biochem Cell Biol., 2005. **37**: p. 1567–1571.
25. Sato N, P.H., Waldmann TA, Tagaya Y., *The IL-15/IL-15R α on cell surfaces enables sustained IL-15 activity and contributes to the long survival of CD8 memory T cells*. PNAS, 2007. **107**: p. 588–593.
26. Castro I, Y.A., Dee MJ, Malek TR, *The basis of distinctive IL-2- and IL-15-dependent signaling: weak CD122-dependent signaling favors CD8 + T central-memory cell survival but not T effector-memory cell development*. J Immunol. , 2011. **187**: p. 5170-5182.
27. Jiang S, G.D., Davies D, Lombardi G, Lechler RI, *Activated CD1d-restricted natural killer T cells secrete IL-2: innate help for CD4+CD25+ regulatory T cells?* Eur.J. Immunol., 2005. **35**(1193–200.).
28. Granucci F, V.C., Pavelka N, Feau S, Persico M, *Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis*. Nat. Immunol., 2001. **2**: p. 882–88.
29. Long M, A.A., *Cutting Edge: Paracrine, but Not Autocrine, IL-2 Signaling Is Sustained during Early Antiviral CD4 T Cell Response*. The Journal of Immunology, 2006. **177**: p. 4257-4261.
30. Ragheb, J.A., M. Deen, Schwartz RH, *CD28-mediated regulation of mRNA stability requires sequences within the coding region of the IL-2 mRNA*. J. Immunol., 1999. **163**: p. 120–129.

31. Antony PA, P.C., Ahmadzadeh M, Akpinarli A, Palmer DC, Sato N, Kaiser A, Hinrichs CS, Klebanoff CA, Tagaya Y, Restifo NP., *Interleukin-2-dependent mechanisms of tolerance and immunity in vivo*. J Immunol., 2006. **176**(9): p. 5255-66.
32. Gaggero A, A.B., Andrei C, Mishal Z, Meazza R, Zappia E, *Differential intracellular trafficking, secretion and endosomal localization of two IL-15 isoforms*. Eur J Immunol., 1999. **29**: p. 1265–1274.
33. Waldman TA, T.Y., *The Multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens*. Annu Rev Immunol., 1999. **17**: p. 19-49.
34. Rappl G, K.A., Heuser C, Rossler M, Ugurel S, Tilgen W, *Dermal fibroblasts sustain proliferation of activated T cells via membrane-bound interleukin-15 upon long-term stimulation with tumor necrosis factor- α* . J Invest Dermatol., 2001. **116**(102–109).
35. Rückert R, A.K., Seifert M, Budagian V, Arnold R, Trombotto C, *Inhibition of keratinocyte apoptosis by IL-15: a new parameter in the pathogenesis of psoriasis?* J Immunol., 2000. **165**: p. 2240–2250.
36. Bamford RN, D.A., Azimi N, Kurys G, Waldmann TA, *The 5' Untranslated Region, Signal Peptide, and the Coding Sequence of the Carboxyl Terminus of IL-15 Participate in Its Multifaceted Translational Control*. J Immunol., 1998. **160**: p. 4418–4426.
37. Burkett PR, K.R., Chien M, Chai S, Boone DL, Ma A., *Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15 α and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8+ T cell homeostasis*. J Exp Med., 2004. **200**(825–34).
38. Bulfone-Paus S, B.E., Budagian V, Paus R, *The interleukin-15/interleukin-15 receptor system as a model for juxtacrine and reverse signaling*. BioEssays, 2006. **28**: p. 362–377.
39. Fehniger TA, C.M., *Interleukin 15: biology and relevance to human disease*. Blood, 2001. **97**(1): p. 14-32.
40. Gaffen SL, *Signaling domains of the interleukin 2 receptor*. 14, 2001. **2**(63-77).
41. Brennan P, B.J., Burgering BM, Groner B, Reif K, Cantrell DA., *Phosphatidylinositol 3-kinase couples the interleukin-2 receptor to the cell cycle regulator E2F*. Immunity, 1997. **7**(5): p. 679-89.
42. Brennan P, B.J., Thomas G, Cantrell D., *P70(s6k) integrates phosphatidylinositol 3-kinase and rapamycin-regulated signals for E2F regulation in T lymphocytes*. Mol Cell Biol., 1999. **19**(7): p. 4729-38.
43. Miyazaki T, L.Z., Kawahara A, Minami Y, Yamada K, Tsujimoto Y, Barsoumian EL, Permuter RM, Taniguchi T, *Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-2, c-myc, and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation*. Cell, 1995. **81**(2): p. 223-31.
44. Evans GA, G.M., Johnston JA, Xu W, Weiler SR, Erwin R, Howard OM, Abraham RT, O'Shea JJ, Greene WC, et al., *Analysis of interleukin-2-dependent signal transduction through the Shc/Grb2 adapter pathway. Interleukin-2-dependent mitogenesis does not require Shc phosphorylation or receptor association*. J Biol Chem., 1995. **270**(48): p. 28858-63.
45. Bulfone-Paus S, B.E., Pohl T, Budagian V, Durkop H, Rückert R, Kunzendorf U, Paus R, Krause H, *Death deflected: IL-15 inhibits TNF- α -mediated apoptosis in fibroblasts by TRAF2 recruitment to the IL-15 α chain*. FASEB J., 1999. **13**(12): p. 1575-85.

46. Kovanen PE, R.A., Fu J, Hurt EM, Lam LT, Giltane JM, Wright G, Staudt LM, Leonard WJ., *Analysis of gamma c-family cytokine target genes. Identification of dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a regulator of mitogen-activated protein kinase activity in interleukin-2 signaling.* J Biol Chem., 2003. **278**(7): p. 5205-13.
47. Dubois S, S.W., Haneline LS, Fleischer S, Waldmann TA, Müller JR, *Distinct pathways involving the FK506-binding proteins 12 and 12.6 underlie IL-2-versus IL-15-mediated proliferation of T cells.* Proc Natl Acad Sci U S A., 2003. **100**(24): p. 14169-74.
48. Cornish GH, S.L., Cantrell DA., *Differential regulation of T-cell growth by IL-2 and IL-15.* Blood, 2006. **108**(2): p. 600-608.
49. Smith KA, C.D., *Interleukin 2 regulates its own receptors.* Proc Natl Acad Sci USA., 1985. **82**: p. 864-868.
50. Fleischman RA, *Southwestern Internal Medicine Conference: clinical use of hematopoietic growth factors.* Am J Med Sci., 1993. **305**(4): p. 248-73.
51. Zent CS, S.B., Ballas ZK, Wooldridge JE, Link BK, Call TG, Shanafelt TD, Bowen DA, Kay NE, Witzig TE, Weiner GJ., *Phase I clinical trial of CpG oligonucleotide 7909 (PF-03512676) in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia.* Leuk Lymphoma, 2012. **53**(2): p. 211-7.
52. Younes A, P.B., Robertson MJ, Flinn IW, Romaguera JE, Hagemeister F, Dang NH, Fiumara P, Loyer EM, Cabanillas FF, McLaughlin PW, Rodriguez MA, Samaniego F, *Phase II clinical trial of interleukin-12 in patients with relapsed and refractory non-Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease.* Clin Cancer Res., 2004. **10**(16): p. 5432-8.
53. NCI, *NHS-IL12 for Solid Tumors.* 2011.
54. NCI, *A Phase I Study of Intravenous Recombinant Human IL-15 in Adults With Refractory Metastatic Malignant Melanoma and Metastatic Renal Cell Cancer.*
55. NCI, *IL15 Dendritic Cell Vaccine for Patients With Resected Stage IIIc and Stage IV Melanoma.* 2010.
56. Rosenberg SA, *Progress in human tumour immunology and immunotherapy.* Nature, 2001. **411**: p. 380-4.
57. Monson JR, R.C., Giles GR, Brennan TG, Guillou PJ, *Lymphokine activated killer (LAK) cells in patients with gastrointestinal cancer.* Gut., 1987. **28**(11): p. 1420-5.
58. Grimm EA, M.A., Zhang HZ, Rosenberg SA, *Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes.* J Exp Med., 1982. **155**(6): p. 1823-41.
59. Sinkovics JG, H.J., *Human natural killer cells: a comprehensive review.* Int J Oncol., 2005. **27**(1): p. 5-47.
60. *Interleukin-2 Therapy in Patients with HIV Infection: The INSIGHT-ESPRIT Study Group and SILCAAT Scientific Committee.* . N Engl J Med., 2009. **361**: p. 1548-1559.
61. Tomova R, A.K., Ivanova A, Jacobs JJ, Koten JW, Den Otter W, Krastev Z, *Low-dose IL-2 Therapy Reduces HCV RNA and HBV DNA: Case Report.* . Anticancer Res., 2009. **29**(12): p. 5241-4.
62. Koreth J, M.K., Kim HT, McDonough SM, Bindra B, Alyea EP 3rd, Armand P, Cutler C, Ho VT, Treister NS, Bienfang DC, Prasad S, Tzachanis D, Joyce RM, Avigan DE, Antin JH, Ritz J, Soiffer RJ., *Interleukin-2 and Regulatory T Cells in Graft-versus-Host Disease.* N Engl J Med., 2011. **365**(22): p. 2055-2066.

63. Saadoun D, R.M., Joly F, Six A, Carrat F, Thibault V, Sene D, Cacoub P, Klatzmann D., *Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis*. N Engl J Med., 2011. **365**(22): p. 2067-77.
64. Rutella S, P.L., Bonanno G, Mariotti A, Sica S, Sorà F, Chiusolo P, Scambia G, Rumi C, Leone G, *Immune reconstitution after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: Effect of interleukin-15 on T-cell survival and effector functions*. Exp Hematol., 2001. **29**(12): p. 1503-16.
65. Kim YS, M.W., Zheng XX, Schachter AD, Strom TB, *Immunoglobulin-cytokine fusion molecules: the new generation of immunomodulating agents*. Transplant Proc., 1998. **30**(8): p. 4031-6.
66. Donohue JH, R.S., *The fate of interleukin-2 after in vivo administration*. J Immunol., 1983. **130**(5): p. 2203-8.
67. Boyman O, S.C., Sprent J, *Potential use of IL-2/anti-IL-2 antibody immune complexes for the treatment of cancer and autoimmune disease*. Expert Opin Biol Ther., 2006. **6**(12): p. 1323-31.
68. Baluna RG, *Cytokine-Induced Vascular Leak Syndrome*. Methods in Pharmacology and Toxicology., 2007. **4**: p. 205-231.
69. Krieg C, L.S., Pantaleo G, Boyman O, *Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci USA., 2010. **107**(26): p. 11906-11.
70. Rosenberg SA, Y.Y., Topalian SL, *Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin-2*. JAMA., 1994. **271**: p. 907-913.
71. Fyfe G, F.R., Rosenberg SA, Sznol M, Parkinson DR, Louie AC, *Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy*. J Clin Oncol., 1995. **13**: p. 688-696.
72. Zhang H, C.K., Guimond M, Kapoor V, Brown MV, Fleisher TA, Long LM, Bernstein D, Hill BJ, Douek DC, Berzofsky JA, Carter CS, Read EJ, Helman LJ, Mackall CL., *Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Med., 2005. **11**(11): p. 1238-43.
73. Ahmadzadeh M, R.S., *IL-2 administration increases CD4+ CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients*. Blood, 2006. **107**(6): p. 2409-14.
74. SA., R., *Progress in human tumour immunology and immunotherapy*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 380-4.
75. Fisher RI, R.S., Fyfe G, *Long-term survival update for high-dose recombinant interleukin-2 in patients with renal cell carcinoma*. Cancer J Sci Am., 2000: p. 55-57.
76. Lissoni P, B.S., Tancini G, *Clinical response and survival in metastatic renal carcinoma during subcutaneous administration of interleukin-2 alone*. Arch Ital Urol Androl., 1997. **69**: p. 41-47.
77. Yao Z, D.W., Perry J, Brechbiel MW, Sung C, *Effect of albumin fusion on the biodistribution of interleukin-2*. Cancer Immunol Immunother., 2004. **53**(5): p. 404-10.
78. Melder RJ, O.B., Riccobene T, Kanakaraj P, Wei P, Chen G, Stolow D, Halpern WG, Migone TS, Wang Q, Grzegorzewski KJ, Gallant G, *Pharmacokinetics and in vitro and in vivo anti-tumor response of an interleukin-2-human serum albumin fusion protein in mice*. Cancer Immunol Immunother., 2005. **54**(6): p. 535-47.

79. Katre NV, K.M., Laird WJ, *Chemical modification of recombinant interleukin 2 by polyethylene glycol increases its potency in the murine Meth A sarcoma model*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1987. **84**(6): p. 1487-91.
80. Wang L, W.Y., Zhang Y, *In vivo antitumor effects of polyethylene glycol--modified recombinant human interleukin-2 on mouse uterine cervical carcinoma*. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 1996. **18**(4): p. 253-5.
81. Feng XS, *In vivo antitumor activities of polyethylene glycol modified recombinant interleukin 2 (PEG-rIL-2) against murine hepatoma*. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 1993. **15**(4): p. 256-8.
82. Zheng XX, S.A., Hancock WW, Kawamoto K, Li XC, Nickerson PW, Li Y, Tian Y, Strom TB, *IL-2 receptor-targeted cytolytic IL-2/Fc fusion protein treatment blocks diabetogenic autoimmunity in nonobese diabetic mice*. J Immunol., 1999. **163**(7): p. 4041-8.
83. Ferrari-Lacraz S, Z.X., Kim YS, Li Y, Maslinski W, Li XC, Strom TB, *An antagonist IL-15/Fc protein prevents costimulation blockade-resistant rejection*. J Immunol., 2001. **167**(6): p. 3478-85.
84. Zheng XX, S.A., Nickerson PW, Steurer W, Steiger J, Strom TB, *Administration of noncytolytic IL-10/Fc in murine models of lipopolysaccharide-induced septic shock and allogeneic islet transplantation*. J Immunol., 1995. **154**(10): p. 5590-600.
85. Rubinstein MP, K.M., Purton JF, Cho J-H, Boyman O, Surh ChD, Sprent J., *Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R α* . PNAS, 2006. **103**(9166-9171).
86. Steurer W, N.P., Steele AW, Steiger J, Zheng XX, Strom TB, *Ex vivo coating of islet cell allografts with murine CTLA4/Fc promotes graft tolerance*. J Immunol., 1995. **153**(3): p. 1165-74.
87. Boasso A, H.J., Hardy AW, Winkler C, Shearer GM., *Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4+ T cells*. Blood., 2005. **105**(4): p. 1574-81.
88. Cross AH, S.M., Keeling RM, Karr RW., *CTLA-4-Fc treatment of ongoing EAE improves recovery, but has no effect upon relapse rate. Implications for the mechanisms involved in disease perpetuation*. J Neuroimmunol., 1999. **96**(2): p. 144-7.
89. Cross AH, G.T., Giacometto KS, Evans RJ, Keeling RM, Lin RF, Trotter JL, Karr RW., *Long-term inhibition of murine experimental autoimmune encephalomyelitis using CTLA-4-Fc supports a key role for CD28 costimulation*. J Clin Invest., 1995. **95**(6): p. 2783-9.
90. Zheng XX, S.A., Hancock WW, Stevens AC, Nickerson PW, Roy-Chaudhury P, Tian Y, Strom TB., *A noncytolytic IL-10/Fc fusion protein prevents diabetes, blocks autoimmunity, and promotes suppressor phenomena in NOD mice*. 158, 1997. **9**(4507-13).
91. Dubois S, P.H., Zhang M, Waldmann TA, Müller JR, *Preassociation of IL-15 with IL-15R α -IgG1-Fc Enhances Its Activity on Proliferation of NK and CD8+/CD44high T Cells and Its Antitumor Action*. J Immunol., 2008. **180**: p. 2099–2106.
92. Mostböck, S., *Cytokine/Antibody complexes: an emerging class of immunostimulants*. Curr Pharm Des., 2009. **15**(7): p. 809-25.
93. Finkelman FD, M.K., Morris SC, Holmes JM, Boiani N, Katona IM a Maliszewski CR, *Anti-cytokine antibodies as carrier proteins. Prolongation of*

- in vivo effects of exogenous cytokines by injection of cytokine-anti-cytokine antibody complexes.* Journal of Immunol., 1993. **151**(3): p. 1235-1244.
94. Ramsden L, R.C., *Selective and differential binding of interleukin (IL)-1 alpha, IL-1 beta, IL-2 and IL-6 to glycosaminoglycans.* Eur J Immunol., 1992. **22**(11): p. 3027-31.
 95. Phelan JD, O.T., Finkelman FD, *Cutting edge: mechanism of enhancement of in vivo cytokine effects by anti-cytokine monoclonal antibodies.* J Immunol., 2008. **181**(4): p. 44-8.
 96. Jones AT, Z.H., *Enhancement of the biologic effects of interleukin-3 in vivo by anti-interleukin-3 antibodies.* Blood, 1993. **82**(4): p. 1133-41.
 97. Boyman O, R.C., Kim DM, Sprent J, Surh CD, *IL-7/anti-IL-7 mAb complexes restore T cell development and induce homeostatic T Cell expansion without lymphopenia.* J Immunol., 2008. **180**(11): p. 7265-75.
 98. Létourneau S, v.L.E., Krieg C, Martin C, Pantaleo G, Sprent J, Surh CD, Boyman O, *IL-2/anti-IL-2 antibody complexes show strong biological activity by avoiding interaction with IL-2 receptor alpha subunit CD25.* . Proc Natl Acad Sci USA., 2010. **107**(5): p. 2171-6.
 99. Tomala J, C.H., Mrkvan T, Rihova B, Kovar M., *In vivo expansion of activated naive CD8+ T cells and NK cells driven by complexes of IL-2 and anti-IL-2 monoclonal antibody as novel approach of cancer immunotherapy.* J Immunol., 2009. **183**(8): p. 4904-12.
 100. Jin GH, H.T., Murakami M., *Combination treatment with IL-2 and anti-IL-2 mAbs reduces tumor metastasis via NK cell activation.* Int Immunol., 2008. **20**(6): p. 783-9.
 101. Mostböck S, L.M., Milenic DE, Baidoo K, Schlom J, Sabzevari H, *IL-2/anti-IL-2 antibody complex enhances vaccine-mediated antigen-specific CD8+ T cell responses and increases the ratio of effector/memory CD8+ T cells to regulatory T cells.* J Immunol., 2008. **180**(7): p. 5118-29.
 102. Kamimura D, S.Y., Sato M, Agung E, Hirano T, Murakami M, *IL-2 in vivo activities and antitumor efficacy enhanced by an anti-IL-2 mAb.* J Immunol., 2006. **177**(1): p. 306-14.
 103. Kamimura D, B.M., *Naive CD8+ T cells differentiate into protective memory-like cells after IL-2 anti IL-2 complex treatment in vivo.* J Exp Med., 2007. **204**(8): p. 1803-12.
 104. Bates GJ, F.S., Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, Banham AH., *Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse.* Clin Oncol., 2006. **24**(5373–80.).
 105. Sasada T, K.M., Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A., *CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression.* . Cancer, 2003. **98**: p. 1089–99.
 106. Curiel TJ, C.G., Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, et al., *Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival.* Nat Med., 2004. **10**: p. 942–9.
 107. Lin GH, S.J., Surh CD, Watts TH, *In vivo accumulation of T cells in response to IL-2/anti-IL-2 mAb complexes is dependent in part on the TNF family ligand 4-1BBL.* Immunol Cell Biol., 2011. **Sept 27**.

108. Hurtado JC, K.Y., Kwon BS, *Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death.* J. Immunol., 1997: p. 158:2600.
109. Takahashi C, M.R., Vella AT, *Cutting edge: 4-1BB is a bona fide CD8 T cell survival signal.* J. Immunol., 1999. **162**: p. 5037.
110. Lee H-W, P.S.-J., Choi BK, Kim HH, Nam K-O, Kwon BS, *4-1BB Promotes the Survival of CD8+ T Lymphocytes by Increasing Expression of Bcl-xL and Bfl-1.* J. Immunol., 2002. **169**: p. 4882-4888.
111. Nam K-O, K.H., Shin S-M, Cho K-H, Kwon B, Kwon BS, Kim SJ, Lee H-W, *Cross-Linking of 4-1BB Activates TCR-Signaling Pathways in CD8+ T Lymphocytes.* J. Immunol., 2005. **174**: p. 1898-1905.
112. Tang Q, A.J., Penaranda C, Melli K, Piaggio E, Sgouroudis E, Piccirillo CA, Salomon BL, Bluestone JA, *Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction.* Immunity, 2008. **28**(5): p. 687-97.
113. Webster KE, W.S., Kohler RE, Mrkvan T, Boyman O, Surh CD, Grey ST, Sprent J, *In vivo expansion of T reg cells with IL-2-mAb complexes: induction of resistance to EAE and long-term acceptance of islet allografts without immunosuppression.* J Exp Med., 2009. **206**(4): p. 751-60.
114. Hamilton SE, S.J., Akue AD, Jameson SC, *IL-2 complex treatment can protect naive mice from bacterial and viral infection.* J Immunol., 2010. **185**(11): p. 6584-90.
115. Duitman EH, O.Z., Bulanova E, Paus R, Bulfone-Paus S, *How a Cytokine Is Chaperoned through the Secretory Pathway by Complexing with Its Own Receptor: Lessons from Interleukin-15 (IL-15)/IL-15 Receptor α .* Mol Cell Biol., 2008. **28**: p. 4851–4861.
116. Stoklasek TA, S.K., Lefrancois L, *Combined IL-15/IL-15R α Immunotherapy Maximizes IL-15 Activity In Vivo.* J Immunol., 2006. **177**: p. 6072–6080.
117. Phillips JH, T.T., Sugamura K, Lanier LL, *Activation of natural killer cells via the p75 interleukin 2 receptor.* J Exp Med., 1989. **170**: p. 291-296.
118. Purton JF, T.J., Rubinstein MP, Kim DM, Sprent J, Surh CD, *Antiviral CD4+ memory T cells are IL-15 dependent.* JEM, 2007. **204**(4): p. 951–961.
119. Diab A, C.A., Alpdogan O, Perales MA, *IL-15: targeting CD8+ T cells for immunotherapy.* Cytotherapy, 2005. **7**(23-35.).
120. Rowley J, M.A., Hung CF, Wu TC, *Inhibition of tumor growth by NK1.1+ cells and CD8+ T cells activated by IL-15 through receptor beta/common gamma signaling in trans.* J Immunol., 2008. **181**: p. 8237-47.
121. Kopecek, J., *Soluble biomedical polymers.* Polym Med., 1977. **7**(3): p. 191-221.
122. Etrych T, S.J., Chytil P, Černoch P, Starovoytova L, Pechar M, Ulbrich K., *Biodegradable star HPMA polymer conjugates of doxorubicin for passive tumor targeting.* Eur J Pharm Sci., 2001. **42**(5): p. 527-39.
123. Kovar M, T.J., Chmelova H, Kovar L, Mrkvan T, Joskova R, Zakostelska Z, Etrych T, Strohalm J, Ulbrich K, Sirova M, Rihova B., *Overcoming immunoescape mechanisms of BCL1 leukemia and induction of CD8+ T-cell-mediated BCL1-specific resistance in mice cured by targeted polymer-bound doxorubicin.* Cancer Res., 2008. **68**(23): p. 9875-83.
124. Ahmadzadeh M, R.S., *IL-2 administration increases CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ regulatory T cells in cancer patients.* Blood, 2006. **107**: p. 2409–14.
125. Weiss L, R.S., Slavin S., *Allogeneic cell therapy in murine B-cell leukemia (BCL1). 2. The role of non-activated and rIL-2-activated CD4+ and CD8+ T*

- cells in immunotherapy for leukemia.* Cytokines Cell Mol Ther., 1999. **5**: p. 153–8.
126. Zwirner NW, F.M., Girart MV, Domaica CI, Rossi LE., *Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity: role of the MICA-NKG2D system.* Cytokine Growth Factor Rev., 2007. **18**(1-2): p. 159-70.
127. Borg C, T.J., Terme M, Maruyama K, Flament C, Angevin E, Zitvogel L., *NK cell-based immunotherapy: new prospects and involvement of dendritic cells.* Bull Cancer., 2003. **90**(8-9): p. 699-705.
128. Wright SE, R.-F.K., Quinlin IS, Phillips CA, Townsend M, Philip R, Dobrzanski MJ, Lockwood-Cooke PR, Robinson W., *Cytotoxic T-lymphocyte immunotherapy for ovarian cancer: a pilot study.* J Immunother., 2012. **35**(2): p. 196-204.
129. Cesana GC, D.G., Cohen S, Moroziewicz D, Mitcham J, Stoutenburg J, Cheung K, Hesdorffer C, Kim-Schulze S, Kaufman HL., *Characterization of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma.* J Clin Oncol., 2006. **24**: p. 1169–77.
130. Epardaud M, E.K., Rubinstein MP, Yonekura AR, Bellemare-Pelletier A, Bronson R, Hamerman JA, Goldrath AW, Turley SJ., *Interleukin-15/interleukin-15R alpha complexes promote destruction of established tumors by reviving tumor-resident CD8⁺ T cells.* Cancer Res., 2008. **68**(8): p. 2972-83.