

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Eliška Frantová

**Produkce IL-2 fúzních protilátek a stanovení jejich biologické  
aktivity**

**Production of IL-2 fusion antibodies and determination of their biological activity**

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D.

Konzultanti: Mgr. Ondřej Skořepa, Ph.D., RNDr. Jakub Tomala, Ph.D.

Praha, 2022

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani žádná její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11. 5. 2022

Podpis

## **Poděkování**

Děkuji svému školiteli RNDr. Ondřeji Vaňkovi, PhD. za vedení mé práce a důvěru, se kterou mě vybral pro tento projekt. Dále velké díky patří mému konzultantovi Mgr. Ondřeji Skořepovi, PhD., který se mě ujal a po celou dobu práce v laboratoři 204 mi poskytoval cenné rady, předával své zkušenosti a v nesnázích mi byl vždy ku pomoci. V neposlední řadě bych ráda poděkovala RNDr. Jakubovi Tomalovi, PhD., se kterým jsem měla možnost realizovat experimenty na myších modelech ve výzkumném centru BIOCEV a který se mi věnoval s neskutečnou trpělivostí, předal mi nespočet drahocenných rad během mnoha konzultací a byl ochotný mi odpovědět na veškeré mé dotazy ohledně vyhodnocování experimentu a práce s daty.

## **Abstrakt**

Interleukin 2 je malý cytokin s mnoha důležitými imunitními funkcemi. Uplatňuje se zejména jako růstový faktor T buněk, ale působí také na další imunitní buňky a to především na NK a NK-T buňky. IL-2 ve vyšších dávkách indukuje diferenciaci a proliferaci buněčné populace efektorových a paměťových T buněk, které se vyznačují cytotoxicitou a jsou schopny účinné obrany organismu před patogeny anebo nádorovými buňkami. Naproti tomu IL-2 v nízkých dávkách stimuluje populaci Treg, které tlumí imunitní reakce a pomáhají předcházet autoimunitním onemocněním. V nádorové terapii je však stimulace této buněčné populace nežádoucí. Protože je volný IL-2 ve vysokých dávkách pro organismus toxický, byly již dříve navrženy strategie, pomocí kterých by se biologický efekt IL-2 potencoval. Jako jedna z nejslibnějších se jeví jednořetězcový rekombinantní fúzní konstrukt, kde je IL-2 kovalentně vázán pomocí oligopeptidové spojky na anti-IL-2 monoklonální protilátku (mAb). Na základě poznatků ze studia IL-2/anti-IL-2 mAb imunokomplexů by v porovnání s volným IL-2 tento imunocytokin (IC) mohl poskytnout značné terapeutické benefity *in vivo*, a to především velmi robustní posílení biologické aktivity, selektivní stimulaci konkrétních buněčných populací dle zvolené protilátky a snížení systémové toxicity. Důležitou roli u tohoto IC hraje délka peptidové spojky vázající IL-2 a anti-IL-2 mAb. Prodloužením spojky mezi anti-IL-2 mAb a IL-2 v IC by se mohlo dosáhnout vyšší biologické aktivity proteinu, kdy se IL-2 bude moci lépe vázat do variabilního místa mAb. Nebude tak hrozit difuze IL-2 daleko od mAb a tak i ztráta biologické aktivity a dalších výhod plynoucích z asociace IL-2 a anti-IL-2 mAb.

## **Klíčová slova**

IL-2, interleukin 2, imunokomplex, imunocytokin, S4B6, T buňky, Treg, imunoterapie

## **Abstract**

Interleukin 2 is a small cytokine with many important immune functions. It is used mainly as a T cell growth factor, but it also acts on other immune cells, especially NK and NK-T cells. IL-2 at higher doses induces the differentiation and proliferation of the cell population of effector and memory T cells, which are characterized by cytotoxicity and are able to effectively defend the organism against pathogens and / or tumor cells. In contrast, low-dose IL-2 stimulates the Treg population, which suppresses immune responses and helps prevent autoimmune diseases. However, in cancer therapy, stimulation of this cell population is undesirable. Because free IL-2 is toxic to the body at high doses, strategies have previously been proposed to potentiate the biological effect of IL-2. One of the most promising appears to be the single-stranded recombinant fusion construct, where IL-2 is covalently linked via an oligopeptide linker to an anti-IL-2 monoclonal antibody (mAb). Based on the findings of the studies of IL-2 / anti-IL-2 mAb immunocomplexes, this immunocytokine (IC) could provide significant therapeutic benefits *in vivo*, as compared to free IL-2, especially very robust strengthening of biological activity, selective stimulation of specific cell populations according to the selected antibody and reduction of systemic toxicity. The length of the peptide linker binding IL-2 and anti-IL-2 mAb plays an important role in this IC. By extending the linker between the anti-IL-2 mAb and IL-2 in the IC, higher biological activity of the protein could be achieved, allowing IL-2 to bind better to the mAb variable site. Thereby, there will be no risk of IL-2 diffusion far from the mAb and thus loss of biological activity and other benefits resulting from the association of IL-2 and anti-IL-2 mAb.

## **Keywords**

IL-2, interleukin 2, immunocomplex, immunocytokine, S4B6, T cells, Treg, immunotherapy

# Obsah

Použité zkratky .....	9
1 Teoretický úvod.....	12
1.1 Imunitní mechanismy a imunitní buňky.....	12
1.1.1 Vrozená imunita .....	12
1.1.2 Získaná (adaptivní) imunita.....	13
1.2 T lymfocyty .....	14
1.2.1 T regulační lymfocyty .....	15
1.2.2 CD8 <sup>+</sup> T lymfocyty .....	16
1.2.3 $\gamma\delta$ -T buňky.....	18
1.2.4 NK buňky .....	18
1.2.5 NK-T buňky.....	19
1.3 Cytokiny .....	21
1.3.1 Interleukiny.....	22
1.4 Interleukin 2.....	23
1.4.1 Biologie, receptory a funkce IL-2.....	23
1.4.2 Imunoterapie a toxicita IL-2.....	25
1.4.3 Imunokomplexy IL-2.....	26
1.4.4 Imunocytokiny IL-2.....	29
2 Cíle práce.....	31
3 Materiály.....	32
3.1 Chemikálie.....	32
3.2 Roztoky a pufry .....	32
3.3 Enzymy .....	33
3.4 Buněčné linie a bakteriální kmeny .....	34
3.5 Vektory .....	34
3.6 Protilátky .....	34
3.7 Oligonukleotidy .....	34
3.8 Přístroje.....	35
3.9 Biologické modely.....	36
4 Metody.....	37
4.1 Produkce imunocytokinů S4B6 IC LN35.....	37
4.1.1 Zpracování DNA pro dvoukrokovou PCR.....	37
4.1.2 Spojovací („Overlap extension“) PCR.....	37
4.1.3 Štěpení plazmidu restrikčními endonukleázami.....	38
4.1.4 Agarosová elektroforéza.....	38
4.1.5 Vnesení genu do linearizovaného plazmidu.....	39

4.1.6	Transformace bakterií E. coli TOP10.....	39
4.1.7	PCR z kolonií .....	39
4.1.8	Nízkoobjemová izolace plazmidové DNA .....	40
4.1.9	Příprava vzorku pro DNA sekvenování.....	40
4.1.10	Transformace bakterií DH5 $\alpha$ .....	41
4.1.11	Velkoobjemová příprava plazmidové DNA .....	41
4.1.12	Příprava buněčné linie HEK293T pro stabilní transfekci.....	42
4.1.13	Transfekce a produkce proteinů v stabilní linii HEK293T.....	42
4.1.14	Zmražení buněčné linie .....	43
4.1.15	Sklízení buněčné kultury .....	44
4.1.16	Afinitní chromatografie .....	44
4.1.17	Koncentrování proteinů .....	45
4.1.18	Gelová permeační chromatografie.....	45
4.1.19	Analytická gelová permeační chromatografie .....	45
4.1.20	SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.....	45
4.2	Stanovení biologické aktivity (c) imunokomplexu IL-2/S4B6 a imunocytočinu S4B6 IC LN20.....	46
4.2.1	Přehled experimentu – EXP1 .....	46
4.2.2	Příprava terapeutik k aplikaci biologickým modelům.....	47
4.2.3	Aplikace substancí myším modelům.....	48
4.2.4	Odběr sleziny a příprava buněk pro průtokovou cytometrii.....	49
4.2.5	Počítání buněk .....	51
4.2.6	Průtoková cytometrie.....	51
4.3	Stanovení biologické aktivity imunocytočinu S4B6 IC LN35.....	52
4.3.1	Přehled experimentu – EXP2 .....	52
4.3.2	Příprava terapeutik k aplikaci biologickým modelům.....	52
4.3.3	Odběr sleziny a příprava buněk .....	53
4.3.4	Počítání buněk a průtoková cytometrie .....	54
5	Výsledky.....	55
5.1	Produkce imunocytočinu S4B6 IC LN35.....	55
5.1.1	Konstrukty lehkého a těžkého řetězce S4B6IC a plazmid pUT7 .....	55
5.1.2	Příprava inzertu DNA.....	57
5.1.3	Štěpení plazmidu pUT7 .....	58
5.1.4	Vnesení genu do linearizovaného plazmidu a produkce proteinu S4B6IC .....	59
5.1.5	Purifikace proteinu S4B6IC .....	60
5.2	Stanovení biologické aktivity imunokomplexu IL-2/S4B6 (c) a imunocytočinů S4B6IC LN20 a S4B6IC LN35.....	62
5.2.1	Strategie FACS analýzy buněčných populací .....	63
5.2.2	CD8 <sup>+</sup> T efektorové buňky.....	64
5.2.3	CD4 <sup>+</sup> T regulační buňky.....	66
5.2.4	NK / NK-T buňky.....	68
5.2.5	$\gamma\delta$ -T buňky .....	70
5.2.6	Poměrné zastoupení jednotlivých buněčných populací.....	72
5.2.7	Hmotnost myší.....	74
5.2.8	Celularita sleziny .....	75

6	Diskuze.....	76
7	Závěr.....	81
8	Přehled použité literatury.....	82



## Použité zkratky

AICD	Aktivací indukovaná buněčná smrt (Activation-Induced Cell Death)
Ab	Protilátka (Antibody)
APC	Antigen prezentující buňka (Antigen Presenting Cell)
BCL6	Protein B buněčný lymfom 6 (B-cell Lymphoma 6 protein)
BLIMP-1	B lymfocyty indukovaný maturační protein 1 (B Lymphocyte-Induced Maturation Protein-1)
bp	Pár bází
CD	Diferenciační skupina (Cluster Of Differentiation)
CLIR	Inhibiční receptory typu C-lektin (C-Type-Lectin Inhibitory Receptors)
CSF	Faktor stimuluje kolonie (Colony Stimulating Factor)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FACS	Fluorescencí aktivované třídění buněk (Fluorescence-Activated Cell Sorting)
Fas	Receptor z rodiny receptorů smrti
FasL	Ligand receptoru Fas
FBS	Fetální telecí sérum (Fetal Bovine Serum)
Foxp3	Fork head Box P3 protein
GPC	Gelová permeační chromatografie
HEK293T	Označení linie lidských embryonálních ledvinných buněk 293 (Human Embryonic Kidney Cell Line 293)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
i.p.	Intraperitoneálně (v břišní dutině)
IC	Imunocytokin
IFN $\gamma$	Interferon Gama
Ig	Imunoglobulin
IL	Interleukin
IL-2R	Receptor pro interleukin 2

JAK	Janus kináza
KIR	Inhibiční receptor imunoglobulinové skupiny (Killer-Cell Ig-Like Receptor)
LAK	Lymfokinem aktivovaná zabíječská buňka (Lymphokine-Activated Killer Cell)
LC	Lehký řetězec (Light Chain)
LFC	Klonování bez ligace (Ligation-Free Cloning)
LGL	Velký granulární lymfocyt (Large Granular Lymphocyte)
LN	Spojka (Linker)
IPEI	Lineární polyethylenimin
mAb	Myší protilátka (Mouse Antibody)
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex (Major Histocompatibility Complex)
MTD	Maximální tolerovaná dávka
mRNA	Messenger RNA
NK buňky	Přirození zabíječi (Natural Killer)
PBS	Fosfátem pufovaný fyziologický roztok (Phosphate-Buffered Saline)
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PHA	Fytohemaglutinin
pMHC	Peptidový hlavní histokompatibilní komplex (Peptide Major Histocompatibility Complex)
rIL-2	Rekombinantní IL-2
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsírany sodného
SPF	Bez specifických patogenů (Specific Patogen Free)
STAT	Transkripční faktory z rodiny STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription)
TAE	Pufr obsahující Tris, kyselinu octovou a EDTA
Tc	Cytotoxický T lymfocyt
TCGF	T-buněčný růstový faktor (T Cell Growth Factor)
TCR	T-buněčný receptor (T Cell Receptor)
Teff	Efektorový T lymfocyt
Th	Pomocný T lymfocyt (T Helper Cell)

TNF $\alpha$	Faktor nádorové nekrózy alfa
TNFR	Receptor pro faktor nádorové nekrózy
Treg	Regulační T lymfocyt
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
VLS	Syndrom vaskulárního prosakování (Vascular Leak Syndrome)
WT	Přirozený typ (Wild-Type)

# 1 Teoretický úvod

## 1.1 Imunitní mechanismy a imunitní buňky

Imunitní systém je souborem proteinů a buněk, které zprostředkovávají ochranu organismu před cizorodými patogeny jako jsou bakterie, viry, parazité a před nejrůznějšími toxiny. Další důležitou funkcí imunitního systému je tolerance vůči vlastním buňkám a tkáním (autotolerance) a imunitní dohled nad buňkami starými, poškozenými či mutovanými (rakovinnými), které jsou mechanismy imunitního systému průběžně likvidovány. Imunitní systém lze u obratlovců rozdělit na dvě pomyslné spolupracující obranné linie, a to na imunitu vrozenou a imunitu adaptivní.

### 1.1.1 Vrozená imunita

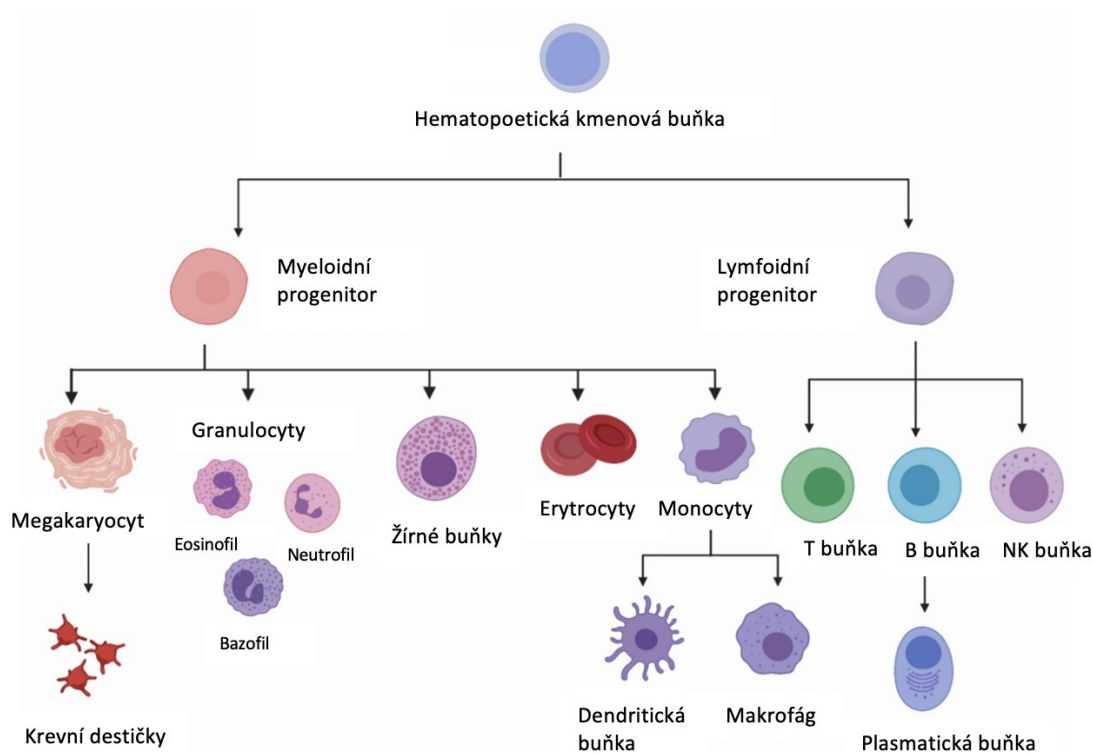
Vrozená imunita je tzv. první linií obrany, je antigenně nespecifická a evolučně starší. Je popsána již u hub, cévnatých rostlin a bakterií. Vrozená imunita funguje na principu molekul a buněk, které jsou v organismu připraveny předem a jsou schopny reagovat na konzervované strukturální či funkční rysy patogenu. Mechanismy vrozené imunity jsou tedy tvořeny humorální a buněčnou složkou. Buněčná složka je reprezentována fagocytujícími buňkami (makrofágy a neutrofilny), NK buňkami, dendritickými buňkami, žírnými buňkami a eosinofilními i basofilními granulocyty. Fagocyty mají schopnost pohlcování (fagocytózy) patogenních agens. Neutrofilny navíc obsahují ve své cytoplazmě granula, která po uvolnění mají antimikrobiální funkci. Na rozdíl od neutrofilů jsou makrofágy schopny dlouhého přežívání a mohou také zastupovat roli antigen prezentujících buněk (APC), které vystavují na svém povrchu fragmenty fagocytovaného materiálu jako antigen pro další imunitní buňky. Dendritické buňky působí jako hlavní APC buňky a také mají schopnost fagocytózy. Žírné buňky a bazofily jsou si v mnoha aspektech podobné, sdílejí schopnost iniciovat zánětlivé procesy, zejména pak ve vztahu k alergickým reakcím a astmatu. Eosinofilní granulocyty mají schopnost fagocytózy a mimo jiné se uplatňují v imunitní odpovědi vůči parazitům (např. helmintům). NK buňky mají cytotoxickou funkci a uplatňují se zejména při virových infekcích či protinádorové imunitě.

Humorální složku nespecifické imunity představují cytokiny a komplementový systém. Cytokiny zprostředkovávají komunikaci mezi buňkami a navádějí je do míst

infekce, podněcují také tvorbu protilátek a dalších proteinů a glykoproteinů, které aktivují druhou část humorální složky imunity, a to komplementový systém. Komplementový systém je soustavou přibližně 30 sérových a membránových proteinů, které kooperují jak mezi sebou, tak s dalšími složkami imunitního systému. Komplement může být aktivován alternativní cestou nebo pomocí protilátek či lektinů. Hlavní funkcí komplementu je primárně tzv. opsonizace (na patogen jsou navázány struktury usnadňující fagocytózu), chemotaxe a osmotická lýze. Reakce těchto mechanismů se uskutečňuje obvykle během několika málo minut či hodin od setkání s antigenem. Dříve se mělo za to, že na rozdíl od složek adaptivní imunity zde není schopnost tzv. imunologické paměti, tj. neadaptivní složky nemají schopnost si zapamatovat předchozí setkání s antigenem [1,2]. Nynější studie však poukazují na existenci NK buněk, které jsou schopné antigen-specifické paměťové reakce na širokou škálu virových, bakteriálních a možná i eukaryotických patogenů [3].

### **1.1.2 Získaná (adaptivní) imunita**

Mechanismy adaptivní imunity jsou, na rozdíl od imunity vrozené, antigenně specifické, reagují na cizorodé patogeny prostřednictvím vysoce specifických molekul (protilátky a antigenně specifické receptory T lymfocytů) a aktivují se až po setkání s daným antigenem. Při těchto reakcích navíc může dojít ke vzniku tzv. imunologické paměti, která umožňuje rychlejší imunitní odpověď v případě opakované infekce. Zároveň dokáže tato složka imunity regulovat odpověď na antigeny organismu vlastní a díky tomu obvykle nedochází k autoimunitním onemocněním. Rozvoj adaptivních mechanismů je značně pomalejší než v případě vrozené imunity, odehrává se v řádu několika dní až týdnů. Adaptivní imunitu lze rozdělit, podobně jako vrozenou, na humorální (protilátky produkované B lymfocyty) a buněčnou, kterou zastupují hlavně T lymfocyty (aktivovány APC buňkami). B lymfocyty vznikají jako ostatní krevní buňky v kostní dřeni z hematopoetické kmenové buňky, po vyžrání na svém povrchu exprimují specifický BCR receptor vázající antigen. Na rozdíl od T lymfocytů mohou B buňky rozpoznat volný antigen přímo bez potřeby prezentace APC buňkami. Po aktivaci antigenem B buňky proliferují a diferencují se v plazmatické buňky tvořící protilátky nebo v paměťové B lymfocyty (Obr. 1.1, str. 14) [1,2,4].



**Obrázek 1.1: Zjednodušené schéma hematopoetické diferenciace.** Kmenová buňka se nachází v kostní dřeni a dává za vznik myeloidnímu anebo lymfoidnímu progenitoru, ze kterého se dále diferencují určité buněčné typy. Přeloženo a upraveno podle [4].

## 1.2 T lymfocyty

T lymfocyty pocházejí z lymfoidních progenitorů migrujících z kostní dřene do thymu, kde vyžívají, procházejí selekcí, diferencují se a následně migrují do periferních tkání, kde cirkulují mezi krevním a lymfatickým oběhem. Subpopulace periferních T buněk tvoří tzv. naivní T lymfocyty, které mají schopnost reagovat na nové antigeny a přeměnit se na aktivované T lymfocyty, paměťové T buňky zodpovědné za dlouhodobou imunitu a regulační T buňky, které udržují imunitní reakce pod kontrolou. Imunitní reakce začíná setkáním naivních T lymfocytů s antigenem nebo hlavním histokompatibilním komplexem (MHC)/kostimulačními molekulami prezentovanými APC buňkami. Tím je indukována transkripce genu pro IL-2, proliferace a diferenciace lymfocytů na efektorové buňky, které poté napomáhají eradikaci patogenu, anebo diferenciace na paměťové T buňky [5].

T lymfocyty zajišťují celou řadu rolí imunitního systému, počínaje imunitní odpovědí vůči patogenům nebo nádorovým buňkám a konečně zajištěním homeostázy a

imunitní paměti organismu. Exprimují T-buněčný receptor (TCR) složený z  $\alpha$  a  $\beta$  řetězce, pomocí něhož rozeznávají nejrůznější cizorodé antigeny, ale také identifikují antigeny organismu vlastní a zajišťují jejich toleranci [6,7]. T-buněčný receptor je dále asociován s CD3 molekulou a tvoří komplex TCR-CD3, v němž se přidaná molekula CD3 zapojuje do přenosu signálu po interakci T buňky s antigenem a je pro T buňky charakteristickým znakem. Přestože rozpoznávání antigenů se uskutečňuje výhradně komplexem TCR-CD3, jsou na povrchu T buněk přítomny i další koreceptory. Ty hrají důležitou roli v aktivaci a inhibici T buňky či doplňují charakteristiku antigenu a můžou také posilovat interakce mezi T a APC buňkami (například kostimulační molekuly CD28-B7 atd.) [8].

T lymfocyty se dělí do dvou populací podle exprese membránových molekul CD4 nebo CD8. CD4<sup>+</sup> T buňky rozeznávají antigen, který je vystaven molekulami MHC třídy II a fungují převážně jako pomocné buňky, jsou proto označovány také jako Th lymfocyty. CD8<sup>+</sup> T buňky rozpoznávají antigen, který je prezentovaný molekulami MHC třídy I a jejich funkce je převážně cytotoxická a označují se jako Tc lymfocyty. Extracelulární domény CD4 a CD8 jsou klasifikovány jako koreceptory vyznačující se schopností rozeznávat komplex peptid-MHC a mají také roli v transdukci signálu [8].

### 1.2.1 T regulační lymfocyty

T regulační buňky patří do podskupiny CD4<sup>+</sup> Th lymfocytů. Spolu s nimi patří do této skupiny ještě Th1, Th2, Th17 a Tfh buňky. Th1 buňky indukují imunitní reakce k ochraně vůči intracelulárním patogenům, jako jsou bakterie, viry atd. aktivací makrofágů. Th2 lymfocyty se účastní aktivace obraných složek imunity pro boj proti parazitům, a to aktivací eozinofilů, bazofilů a žírných buněk. Buňky Th17 zprostředkovávají imunitní odpovědi na infekce způsobené extracelulárními bakteriemi a plísněmi aktivací neutrofilů a indukci produkce antimikrobiálních peptidů. Tfh buňky se nacházejí v sekundárních lymfatických tkáních v těsné interakci s B lymfocyty, kterým pomáhají produkovat protilátky proti cizím patogenům [9–11].

Koncem minulého století Sakaguchi a spol. [12] popsali regulační T buňky (Treg) jako podskupinu myších CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> cirkulujících buněk, konstitutivně exprimujících vysoké hladiny IL-2R $\alpha$  (CD25), tedy  $\alpha$ -řetězce receptoru pro IL-2. CD25 umožňuje Treg účinně zachytit IL-2 a proto jejich počty přímo korelují s dostupností tohoto cytokinu, který je pro jejich přežívání nezbytný [13]. Od té doby se jejich studie začaly rychle

rozvíjet. Obecně jsou tyto buňky považovány za hlavní populaci regulující imunitní děje. T regulační buňky jsou důležité pro kontrolu chronických zánětlivých stavů, prevence proti poškození tkání a zejména autoimunitních reakcí. Jedná se také o významné přispěvatele k úniku nádorových buněk imunitnímu systému [14].

Treg neprodukují IL-2, ten je ale klíčový pro jejich přežití, proliferaci a manifestaci regulačních funkcí. V myších modelech, ve kterých byl trvale deletován gen pro expresi CD25, bylo prokázáno, že exprese transkripčního faktoru Foxp3 silně koreluje s možností využít IL-2 [15]. Foxp3 je při tom považován za hlavní znak a také regulátor supresivní funkce Treg [16]. IL-2 je produkován primárně CD4<sup>+</sup> T buňkami po aktivaci TCR signalizačních drah. T efektorové buňky produkující IL-2 mají pouze dimerní IL-2R (chybí jim molekula CD25).

Oproti tomu Treg, které IL-2 neprodukují, disponují trimerním vysokoafinitním receptorem, který jim umožňuje dosáhnout i na bazální koncentraci IL-2 a přežít. Je-li v systému nadbytek IL-2 (zejména lokálně), spouští se efektorové mechanismy, které jsou posléze usměrněny expanzí Treg. Po vyčerpání IL-2 a úpadku efektorových mechanismů se Treg vrací do normálu a přežívají na bazální koncentraci IL-2, oproti tomu se efektorové buňky přeměňují na paměťové s regulací IL-15 [17]. Vyšší počet regulačních T buněk a vyšší poměr Treg vůči buňkám efektorovým T buňkám je patrně spojen s horší prognózou u různých typů rakoviny [18].

### 1.2.2 CD8<sup>+</sup> T lymfocyty

CD8<sup>+</sup> cytotoxické T buňky (CD8<sup>+</sup> T<sub>c</sub>) se stejně jako CD4<sup>+</sup> pomocné T buňky vyvíjejí v thymu a exprimují buněčný TCR, navíc spolu s molekulou koreceptoru CD8. Tyto lymfocyty jsou velmi důležité pro imunitní obranu jak proti intracelulárním patogenům včetně virů a bakterií, tak i proti nádorům. Efektorové mechanismy této skupiny buněk zahrnují sekreci cytokinů TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$ , dále pak produkci cytolytických enzymů perforinu a granzymu (obdobně jako u NK buněk) a v neposlední řadě i interakci Fas-FasL, která vede k apoptóze cílové buňky [19].

Rozpoznávání antigenu a následná aktivace T buněk je řízena interakcí mezi TCR a molekulami pMHC. Molekuly koreceptoru se nezávisle vážou na invariantní oblasti pMHC a zesilují tak signál pro aktivaci T buňky. Koreceptor CD8 je transmembránový disulfidicky vázaný glykoprotein, který se vyskytuje na buněčném povrchu ve



formě homodimerní  $\alpha\alpha$  nebo heterodimerní  $\alpha\beta$ . Ve formě  $\alpha\alpha$  se koreceptor CD8 vyskytuje na povrchu mnoha různých typů lymfoidních buněk včetně NK buněk,  $\gamma\delta$ -T buněk, střevních intraepiteliálních T lymfocytů a některých subpopulací dendritických buněk. V alternativní  $\alpha\beta$  heterodimerní formě se CD8 nachází na přibližně 90 % cytotoxických T lymfocytů. Zatímco funkční úloha CD8 $\alpha\alpha$  není zcela objasněna, CD8 $\alpha\beta$  hraje klíčovou roli v aktivaci CD8<sup>+</sup> T buněk, a to zvýšením citlivosti buňky na antigen a stabilizací vazby TCR s MHC I [20,21]. Při této interakci dochází k asociaci  $\alpha$ -řetězce CD8 s p56<sup>Lck</sup>, která vyústí v koaktivační signál a zesílení aktivačních signálů T buňky [21]. Kromě kostimulace CD8 molekulou je k aktivaci cytotoxického T lymfocytu potřeba také tzv. „druhého signálu“, který je zajištěn dalšími kostimulačními molekulami exprimovanými na T buňkách. Jsou to kostimulační molekuly CD28, které se vážou na CD80 či CD86 na APC nebo molekuly z rodiny TNFR (CD27/CD70) [22].

Role CD8<sup>+</sup> T buněk v nádorové imunoterapii je klíčová vzhledem k jejich schopnosti klonálně expandovat a vykonávat cytotoxickou funkci jako efektorové (Teff) buňky. Jejich schopnost dále diferencovat na paměťové buňky je zásadní a umožňuje jim dosáhnout větší proliferací kapacity a schopnost zprostředkovat systémovou imunitní odpověď okamžitě při opětovném setkání s antigenem. Přetrvávají dlouhodobě v periferních tkáních ve větším počtu než naivní CD8<sup>+</sup> buňky [23]. Studie na myších modelech však ukázaly, že pouze expanze krátkodobě působících Teff k rejekci nádoru nestačí a ke kompletní eradikaci nádorových buněk je zapotřebí robustní populace CD8<sup>+</sup> T paměťových buněk [24,25]. Bylo také zjištěno, že myši, u kterých došlo k úplnému vymizení nádoru a zachovaly si určitou populaci CD8<sup>+</sup> T paměťových buněk, byly do jisté míry chráněny před sekundárním vznikem stejného typu nádoru [26,27]. Po primární aktivaci naivních CD8<sup>+</sup> T lymfocytů dochází ke klonální expanzi a vzniku Teff buněk, které mohou plnit svoji cytotoxickou funkci. Ty poté podléhají apoptóze, ale jejich část se ještě před tím diferencuje v heterogenní populaci paměťových CD8<sup>+</sup> T lymfocytů s několika různými subpopulacemi [25].

Zatímco IL-7 udržuje hladinu naivních T buněk, IL-2 se zde uplatňuje při podpoře proliferace primárně aktivovaných CD8<sup>+</sup> buněk a také podporuje diferenciaci v CD8<sup>+</sup> paměťové T lymfocyty. IL-15 dále potencuje přežívání efektorových a paměťových CD8<sup>+</sup> T lymfocytů. Funkce jednotlivých cytokinů se však do jisté míry překrývají [28,29]. Při vysokých dávkách IL-2 a silné stimulační aktivitě IL-2R se CD8<sup>+</sup> buňka

diferencuje především do krátkodobého CD8<sup>+</sup> Tc a dochází zároveň k blokaci exprese transkripčních faktorů (BLIMP-1) a centrálních paměťových markerů (BCL6, CD127 a CD62L). Naopak nižší expozice CD8<sup>+</sup> T buněk k IL-2 vede k obnovené expresi těchto paměťových markerů a CD8<sup>+</sup> T buňka se formuje do CD8<sup>+</sup> paměťového T lymfocytu [30]. Jako terapeutická možnost využití takového mechanismu se jeví posílení diferenciace naivních CD8<sup>+</sup> T v paměťové T buňky zeslabením signalizace IL-2 například podáváním anti-CD25 blokujících protilátek, což ovšem může narušit homeostázu Treg a tím zvýšit riziko autoimunitního onemocnění [31].

### 1.2.3 $\gamma\delta$ -T buňky

$\gamma\delta$ -T lymfocyty (CD4 a CD8 negativní) jsou prototypem tzv. nekonvenčních T lymfocytů, které obsahují TCR receptor složený z  $\gamma$  a  $\delta$  řetězce (namísto konvenčního  $\alpha$  a  $\beta$ ) a mohou dozrávat i mimo thymus. Tyto T lymfocyty mají vlastnosti jak vrozených, tak adaptivních složek imunity [32,33]. V mnoha vlastnostech se podobají NK buňkám, které vykazují silnou cytotoxickou aktivitu proti buňkám infikovaným viry nebo nádorovým buňkám například skrze expresi perforinu a granzymu [34]. Mimo to mohou  $\gamma\delta$ -T buňky uvolňovat cytokiny, jako jsou IL-17, TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$ , zastoupit roli APC buněk a také interagovat s B lymfocyty ve snaze podpořit přeskupování tříd imunoglobulinů [33]. Kromě výskytu v krvi a lymfatických tkáních se objevují také v kůži, střevním epitelu a v plicním epitelu [8].

$\gamma\delta$ -T buňky jsou schopny efektivně rozpoznat nádorové buňky a infiltrovat se do maligních tkání, kde slouží jako dobrý marker výskytu rakoviny [35]. Na rozdíl od konvenčních  $\alpha\beta$  T lymfocytů rozeznávají cílové antigeny bez ohledu na haplotyp MHC komplexu a zprostředkovávají tak rychlou a efektivní protinádorovou odpověď [36]. Data ze studie Dieli a kol. (2007) k léčbě metastatického karcinomu prostaty ukazují, že IL-2 hraje kritickou roli pro expanzi  $\gamma\delta$ -T buněk *in vivo* [37].

### 1.2.4 NK buňky

NK buňky pocházejí ze stejného progenitoru jako T lymfocyty a stejně jako CD8<sup>+</sup> Tc mají schopnost ničit nádorové a virové buňky bez předchozí proliferace, diferenciace a stimulace, neexprimují však TCR receptor a nepotřebují k aktivaci APC. NK buňky také nevyžadují pro svou aktivaci a manifestaci efektorových funkcí přítomnost MHC

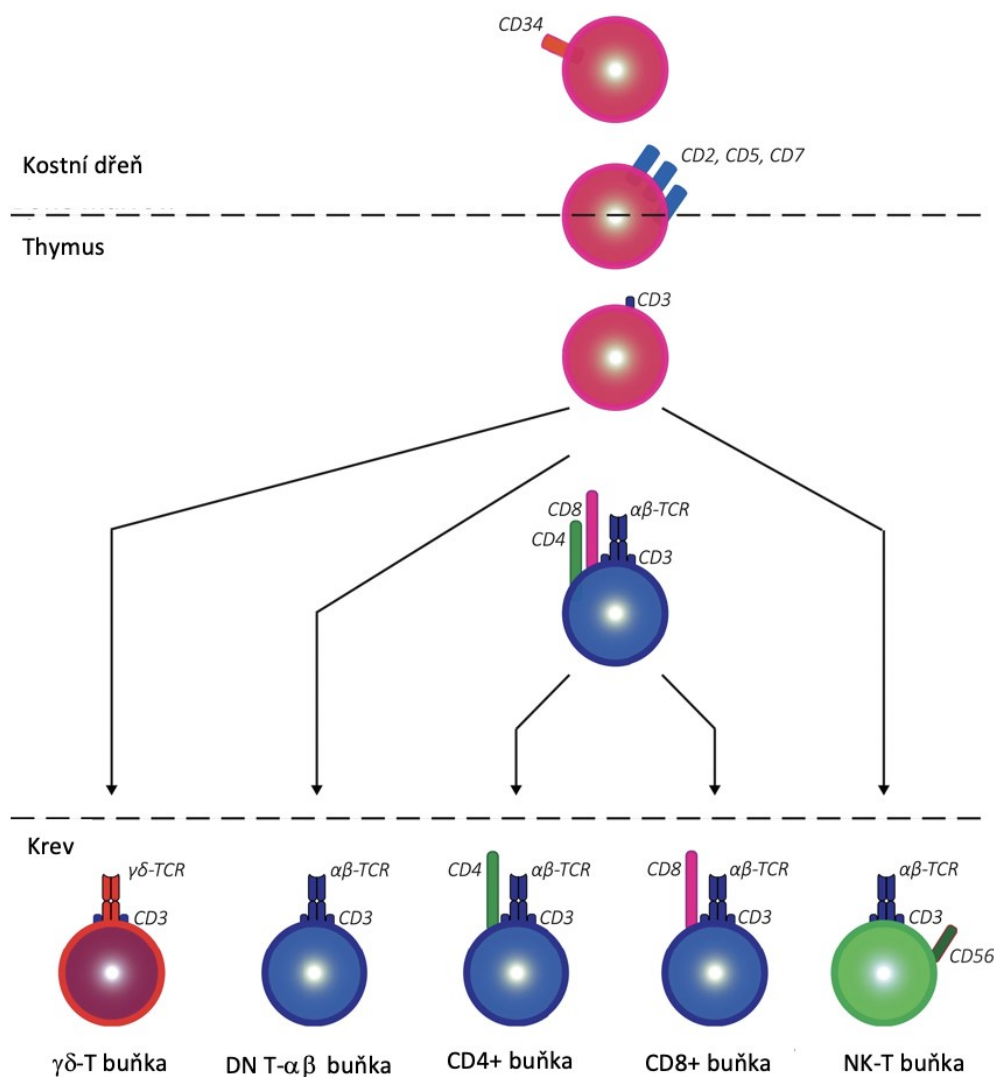
molekul na povrchu jako T buňky, místo toho fungují na principu čtení přítomnosti MHC molekul na povrchu cílových buněk. Jelikož některé nádorové nebo virem infikované buňky neexprimují MHC I molekuly nebo jen velmi málo, hlavně z důvodu snahy o únik před T lymfocyty, NK buňky tak dostanou stimulační signál, že je buňka abnormální a zahájí její zničení. To se uskutečňuje skrze aktivační cytotoxické receptory na povrchu NK buňky (např. NKp30, NKp44, NKp46, či NKG2D) a vede k uvolnění cytotoxických granulí stejně jako u Tc buněk nebo produkci cytokinů IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$ . Aktivační receptory jsou povrchové molekuly patřící nejčastěji mezi imunoglobulinům podobné receptory. Mezi aktivační receptory patří i Fc receptor CD16, který zprostředkovává vazbu NK buňky na Fc domény opsonizujících IgG protilátek. NK buňky exprimují na svém povrchu také inhibiční receptory, které lze rozdělit do dvou hlavních skupin, a to na skupinu inhibičních receptorů podobných lektinům typu C (CLIR), kam se řadí NKR-P1 (CD161) či CD94/NKG2 u lidí a Ly49 u myši. Druhou skupinu jsou imunoglobulinům podobné inhibiční receptory, známé také jako inhibiční receptory zabíječských buněk (KIR) [8,38,39].

NK buňky lze primárně identifikovat podle přítomnosti kombinace povrchových molekul CD16 a CD56 (lidé) a například CD49b a CD161 (NK1.1, myši). Tyto molekuly nejsou unikátní pro NK buňky a hrají aktivační roli. NK-T buňky podporují aktivitu NK buněk sekrecí IFN- $\gamma$ , který je spolu s IL-2, IL-12, IL-15 či IL-18 důležitým stimulantem NK buněk. Naopak IL-10 a TGF- $\beta$  mají na NK buňky vliv inhibiční [8]. Dále bylo zjištěno, že stimulace NK buněk IL-2 přispěla k expresi CD161, zároveň ale nedošlo k hyperaktivitě těchto buněk vzhledem k nestimulovaným kontrolám [40]. CD161 molekula je jedna z prvních, které jsou exprimované na buněčném povrchu během zrání NK buněk a přímo koreluje s mírou cytotoxicity NK buněk, dojde-li k interakci CD161 s LLT1 ligandem, je sekrece cytokinů inhibována [41].

### **1.2.5 NK-T buňky**

NK-T buňky jsou malou populací T lymfocytů, které se vyznačují přítomností  $\alpha\beta$  TCR receptoru stejně jako u konvenčních T lymfocytů. Mají ale navíc také další stimulační či inhibiční receptory, které jsou jinak charakteristické pro NK buňky např. CD161 u myši [42]. Rozeznávají komplexy molekul prezentované CD1d (podobně jako u MHC), kde jde většinou o glykolipidové antigeny. Tato vlastnost je velmi příhodná,

protože složky adaptivní imunity T buňky rozeznávají antigeny pouze pomocí MHC molekul, které jsou však omezeny výhradně na prezentaci peptidových fragmentů proteinových antigenů [43]. Jsou také velkou zásobárnou cytokinů, pro které mají již předem připravenou mRNA, což umožňuje velmi rychlou cytokinovou odpověď při zánětlivých a infekčních stavech [44]. Přehled diferenciací T buněk a jejich populací je uveden na Obr. 1.2 [45].



**Obrázek 1.2: Diferenciace T lymfocytů.** Na počátku stojí  $CD34^+$  hematopoetická kmenová buňka, která během lymfopoézy získává povrchové molekuly CD2, CD5 a CD7. Po migraci z kostní dřeně do brzlíku je exprimována CD3 molekula. Dále je vidět rozložení povrchových znaků základních subpopulací T lymfocytů. Dvojitě-negativní (DN) T- $\alpha\beta$  buňka neexprimuje ani CD4 ani CD8 molekulu. Převzato a upraveno dle [45]

NK-T buňky mají cytotoxické mechanismy podobně jako T a NK buňky, jsou tedy schopny exprimovat lytické enzymy granzymy a perforin, ty pak mohou být využity k lýze nádorových buněk, také schopnost indukovat přímou buněčnou smrt prostřednictvím interakce Fas-FasL je v tomto procesu velmi užitečná [46]. Hlavním mechanismem v boji proti rakovině je jejich schopnost produkovat IFN- $\gamma$  a indukovat expresi dalších efektorových buněk, jako jsou CD8<sup>+</sup> T buňky a NK buňky, rychlost indukce těchto buněk závisí mimo jiné i na IL-2 (a dalších cytokinech jako IL-15), který jsou schopny NK-T buňky také tvořit [47–49].

### 1.3 Cytokiny

Raný rozvoj studia cytokinů spadá do poloviny 40. let minulého století, kdy byly tyto rozpustné „faktory“ nejprve označeny jako výhradní produkty bílých krvinek, později se však ukázalo, že s výjimkou krvinek červených je schopna cytokiny produkovat a reagovat na ně každá buňka [50]. Cytokiny jsou hlavními regulátory vrozené a adaptivní imunity, které buňkám imunitního systému umožňují komunikovat na krátké vzdálenosti a to již ve velmi malé koncentraci v řádu pM, čímž se odlišují od hormonů. Například IL-1 indukuje genovou expresi a syntézu cyklooxygenázy-2 již v koncentraci 10 pM [50,51].

Jsou to rozpustné proteiny s velmi různorodou, obvykle nízkou, molekulovou hmotností ( $\approx$  6-70 kDa) s krátkodobou působností produkované zejména lymfocyty, makrofágy, NK buňkami, žírnými buňkami a vaskulárními buňkami. Odpovídají za dynamickou regulaci zrání a růstu imunitních buněk, účastní se imunitních reakcí. Jeden cytokin může být sekretován různými typy buněk a mít více biologických funkcí [52]. Cytokiny často stimulují buňky k tvorbě dalších cytokinů, jejich produkce se tedy uskutečňuje v kaskádě, mohou potom s dalšími cytokiny působit antagonisticky nebo synergicky [53].

Cytokiny lze klasifikovat s ohledem na to, které buňky je produkují. Jako Typ 1 jsou označeny cytokiny produkované Th1 lymfocyty a zahrnují například IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  a TNF- $\beta$ . Tyto cytokiny se účastní řízení zánětlivých buněčných reakcí včetně aktivace makrofágů. Cytokiny typu 2 produkované Th2 lymfocyty (zahrnují například IL-4, -5, -6, -10 a -13) hrají roli při různých zánětlivých procesech, zejména u hypersenzitivních reakcí, jako alergie, astma a autoimunitní reakce [53].

Obecně mohou být cytokiny klasifikovány do těchto skupin [53]:

- 1) Faktory nádorové nekrózy (TNFs)
- 2) Interleukiny (IL)
- 3) Lymfokiny
- 4) Monokiny
- 5) Interferony (IFNs)
- 6) Faktory stimulující kolonie (CSFs)
- 7) Transformující růstové faktory (TGFs)
- 8) Chemokiny

V závislosti na jejich biologickém působení mohou být cytokiny také tříděny na prozánětlivé a protizánětlivé. Prozánětlivé cytokiny (například TNF, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18) jsou produkovány převážně aktivovanými makrofágy a mohou například stimulovat reaktanty akutní fáze, stimulovat prozánětlivou reakci či působit jako endogenní pyrogeny. Protizánětlivé cytokiny (například IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ) mají tlumivou funkci vzhledem k zánětlivým reakcím. Klasifikace však není jednoznačná, protože zánětlivá odpověď je mimo jiné určena také prostředím, do kterého jsou cytokiny uvolňovány, hustotou receptorů, schopností tkáně na cytokin reagovat atd. Rovnováha těchto cytokinů je klíčová při udržování imunitní homeostázy [53].

### 1.3.1 Interleukiny

Původně se předpokládalo, že je tento typ cytokinů syntetizován leukocyty, na které také výhradně působí. Dnes je již známo, že kromě leukocytů mohou být interleukiny produkovány celou řadou buněk a stejně tak i jejich působení se neomezuje pouze na leukocyty, i když mnohé z nich jsou syntetizovány právě CD4<sup>+</sup> lymfocyty, makrofágy, monocyty a endoepiteliálními buňkami [54]. Jedná se o skupinu více než 30 proteinů, které regulují růst, diferenciaci, proliferaci, či aktivaci imunitních buněk a stimulují nebo naopak inhibují imunitní odpověď. Na rozdíl od chemokinů nemají přímou schopnost směřovat imunitní buňky do místa zánětu nebo zprostředkovat imunitní odpověď na virovou infekci, což zajišťují interferony [55]. Své funkce vyvolávají buď autokrinně nebo parakrinně skrze vazbu na vysokoafinitní receptory povrchu buňky [56]. Odpověď

konkrétní buňky dále závisí na ligandech exprimovaných na buněčném povrchu ovlivňující konkrétní signální kaskádu, která bude takto vyvolána [55]. Interleukiny jsou velmi důležitými mediátory imunitní odpovědi, ale také významně přispívají k patofyziologii široké škály imunitních poruch, představují proto skupinu proteinů s velkým potenciálním významem pro terapeutické cíle [55].

## 1.4 Interleukin 2

Objev interleukinu 2 (IL-2) se datuje do druhé poloviny 20. století, kdy P. Nowell v roce 1960 náhodně objevil, že fytohemagglutinin (PHA), molekula extrahovaná z fazolí, stimuluje dělení a růst lymfocytů [57]. Po inkubaci lymfocytů s PHA se malé lymfocyty transformovaly ve velké blastické buňky. Z počátku byl tento mechanismus transformace nejasný, později se tento jev přičetl IL-2 nejprve pojmenovanému blastogenní faktor a později přejmenovanému na T-buněčný růstový faktor (TCGF) pro jeho primární schopnost stimulovat růst T lymfocytů [58,59].

### 1.4.1 Biologie, receptory a funkce IL-2

IL-2 je v závislosti na glykosylaci cca 15-17 kDa velký cytokin produkovaný převážně stimulovanými  $CD4^+$  T lymfocyty (efektorové a paměťové a pomocné Th1 lymfocyty) [60], v menší míře aktivovanými  $CD8^+$  T, B, NK a NK-T buňkami, monocyty, žírnými a také aktivovanými dendritickými buňkami [30,61,62]. Na imunitní buňky působí autokrinně i také parakrinně a je jedním ze zásadních faktorů proliferace T buněk, cytotoxické aktivity  $CD8^+$  efektorových buněk a utváření paměťových T lymfocytů [58]. V širším pohledu reguluje imunitní reakce ve smyslu působení na vývoj a udržování hladiny Treg v thymu a na periferiích [58,63]. IL-2 má také svůj podíl na aktivaci indukované buněčné smrti (AICD), kdy podporuje expresi FasL na  $CD4^+$  buňkách a zároveň potlačuje inhibitory apoptózy. To zároveň vede ke zpětnému snížení produkce IL-2 [64]. V neposlední řadě má vliv na proliferaci a cytotoxickou aktivitu NK buněk, což ovlivňuje také expresi  $IFN\gamma$  a  $TNF\alpha$  [65].

Pro aktivaci T lymfocytů jsou zapotřebí dva signály. Zásadní roli hraje TCR, který se nachází na všech typech T buněk. Pro  $CD4^+$  T buňky je první signál zajištěn TCR rozeznávajícím antigen prezentovaný MHC molekulou na antigen prezentující buňce (APC, např. makrofág).  $CD8^+$  T buňky rozeznávají MHC I. třídy na všech buňkách.

Druhý signál je zprostředkován kostimulačními molekulami CD80/86, které jsou exprimovány APC buňkou a receptory CD28 na T buňkách. Takto aktivované T buňky začínají produkovat IL-2, který autokrinně používají pro vlastní proliferaci a diferenciaci nebo parakrinně pro ostatní T buňky [8,57,66]. Transkripce IL-2 nastává do 30 minut po stimulaci, ale je pouze přechodná a během 24-48 hodin není detekovatelná, navíc posttranskripční regulační mechanismy omezují dostupnost IL-2 mRNA, kdy hladina mRNA začne obvykle klesat 4-8 hodin po stimulaci [30,67].

Biologická aktivita IL-2 je realizována skrze vazbu na IL-2 receptor (IL-2R), který se vyskytuje v dimerní nebo trimerní variantě. IL-2R může být tvořen kombinací tří receptorových podjednotek a dle toho váže IL-2 s různou afinitou. Dimerní receptor se skládá z  $\beta$  (CD122) a běžné  $\gamma_c$  (CD132) podjednotky a váže IL-2 se střední afinitou ( $K_D \sim 1$  nM) a je běžně přítomen na populacích CD8<sup>+</sup> T lymfocytů a NK buněk [57]. Kompletní trimerní vysokoafinitní receptor váže IL-2 s afinitou  $\sim 10$  pM a je doplněn  $\alpha$  podjednotkou (CD25, IL-2R $\alpha$ ). Je exprimován na aktivovaných T buňkách a Treg [57,58]. Monomerní CD25 je běžně asociován s buněčnou membránou, může se ale vyskytovat taktéž v rozpustné formě a vázat IL-2 s nízkou afinitou ( $K_D \sim 10$  nM). Vazba IL-2 na samotný CD25 nevede k transdukci signálu ve srovnání s vazbou na podjednotky CD122/CD132, kde CD25 slouží ke zvýšení afinity k receptoru [58,68]. Exprese CD25 je vyvolána aktivací T buněk, CD25 se nenachází na naivních ani paměťových T buňkách [57]. Biologická aktivita IL-2 je zprostředkována převážně vazbou na trimerní receptor, zejména z důvodu, že homeostatická hladina IL-2 v organismu je příliš nízká na to, aby ji dimerní receptor mohl využít. Vazba IL-2 na receptor aktivuje navazující signální dráhy, typicky JAK-STAT kaskádu zakončenou fosforylací transkripčního faktoru STAT5 [56].

S ohledem na výše uvedené afinity dimerního IL-2 receptoru je fyziologická hladina IL-2 v organismu příliš nízká na to, aby docházelo k utilizaci IL-2 paměťovými CD8<sup>+</sup> T a NK buňkami a k jejich aktivaci. Je ale dostatečná pro přežití Treg, které exprimují vysokou hladinu CD25, a s ostatními podjednotkami tvoří vysokoafinitní IL-2R. Mohou tak využívat právě nízké hladiny IL-2 běžně dostupné *in vivo* v klidovém stavu [57,69,70]. Studie na myších modelech ukázaly, že jedinci, kteří jsou IL-2 deficitní vykazují masivní autoimunitní reakce či například zánětlivá onemocnění (revmatitida)



[71], které jsou zapříčiněné nedostatečným vývojem Treg a jejich udržení v periferních tkáních [72].

IL-2 je pleiotropní cytokin, který má jak imunostimulační (stimulace Teff a paměťových CD8<sup>+</sup> T, NK a dalších cytolytických buněk), tak imunoinhibiční (Treg) aktivitu v závislosti na cílové buňce. Jeho účinky na ostatní imunitní buňky nejsou ještě zcela dešifrovány, pro jeho stimulační účinky na efektorové a paměťové T a NK buňky byl však IL-2 primárně využit zejména v protinádorové imunoterapii [30].

#### **1.4.2 Imunoterapie a toxicita IL-2**

IL-2 hraje důležitou roli jak v aktivaci imunitních mechanismů, tak ve schopnosti tyto mechanismy tlumit. Po objevu jeho působení na proliferaci a aktivaci T buněk, se stal klíčovým faktorem, který by znamenal úspěch v terapii rakoviny [61]. Zejména pak CD8<sup>+</sup> T lymfocyty, NK a NK-T buňky mají kritickou úlohu při likvidaci maligních buněk, jejich posílená aktivace a proliferace je tak hlavním cílem imunoterapeutických strategií [73,74]. Na rozdíl od konvenční chemoterapie, která má za úkol zničit přímo rakovinné buňky, imunoterapie se soustředí na posílení imunitních mechanismů tak, aby právě ony nádorové buňky odstranily. Zatímco imunoterapie je značně specifická, u chemoterapie často dochází zároveň ke zničení i ostatních buněk v organismu, protože jediná určující selektivita je dána metabolickou aktivitou cílových buněk [75]. Skupina buněk, která zprostředkovává protinádorovou cytotoxicitu se označuje jako LAK buňky (lymfokinem aktivované zabíječské buňky) [76].

Prvotní experimenty ukázaly, že podávání rekombinantního IL-2 (produkovaného v *E. coli*) myším modelům infikovaných nádorem by mohlo působit regresi malých plicních metastáz. K dosažení takového terapeutického efektu bylo třeba vystavit myši vysokým dávkám rIL-2, taktéž spojených se značnou toxicitou tohoto cytokinu [77,78]. U lidských pacientů se v minulosti imunoterapie vysokými dávkami IL-2 setkala s poměrně malou pozitivní odpovědí. Regrese nádorů byla jen mírná (5-17 %), přesto však nezanedbatelná a proto koncem 90. let minulého století byla aplikace vysokých dávek IL-2 schválena k léčbě určitých druhů melanomů a metastazujícího renálního karcinomu, později například i pro karcinom ledvin [78].

Protože Treg exprimují kompletní vysokoafinitní IL-2R, jsou tyto buňky stimulovány už malými dávkami IL-2, což má za následek imunosupresivní účinky

terapie. Imunoterapie nízkými dávkami IL-2 se však uplatnila například při léčbě Alzheimerovy choroby, ale pouze při dlouhodobém pravidelném podávání [79]. Jiné uplatnění bylo objeveno například u transplantací, kdy je imunosupresivní účinek žádoucí [80]. Treg jsou obecně považovány za buňky přispívající k nádorovému bujení [81]. Při terapii vysokými dávkami IL-2 dochází k destabilizaci imunitního systému zejména nárůstem efektorových T buněk, které pak převažují nad Treg, což může v extrémním případě vyústit v autoimunitní reakce [82,83]. Imunoterapie proti nádorům, která je prováděna za pomoci CD8<sup>+</sup> T a NK buněk a je manifestována až při vysokých dávkách IL-2, může mít pak i silné toxické účinky [13,84].

Toxické účinky IL-2 terapie jsou velmi různorodé, od mírných po život ohrožující. Jedná se zejména o horečku, zimnici, malátnosti a edém plic (Vascular Leak Syndrome, VLS), který je pro pacienty potenciálně život ohrožující. Je charakterizovaný zvýšenou permeabilitou endoteliálních buněk a pohybem tekutiny do extravaskulárních prostor. V jeho důsledku vzniká hypotenze, plicní edém a poškození jater, zatímco je saturace krve kyslíkem výrazně snížena [78,85]. Tyto nežádoucí účinky se podařilo zvládat, zvláště pak probíhá-li terapie ve specializovaných centrech [86]. Účinnost terapie samotným IL-2 je omezena zejména krátkým biologickým poločasem *in vivo*, toxicitou, nízkou účinností a indukci imunosupresivních odpovědí prostřednictvím expanze Treg. To je hlavním důvodem pro vývoj imunoterapií cytokiny a jejich deriváty nové generace, například příprava fúzních proteinů na bázi IL-2 a protilátek [84].

### 1.4.3 Imunokomplexy IL-2

Imunokomplexy cytokinu IL-2 a monoklonálních protilátek (mAb) proti IL-2 (IL-2/anti-IL-2 mAb) tvoří jakousi směs nekovalentně vázaného IL-2 s protilátkou tak, že spojení je zajištěno pouze na základě vzájemné afinity IL-2 a variabilní oblasti mAb. Imunokomplexy byly navrženy tak, aby prodlužovaly krátký biologický poločas IL-2 cirkulujícího v oběhu, což je zásadním problémem při imunoterapii založené na malých proteinech jako je právě IL-2 [87]. Studie Boymana a kol. v roce 2006 potvrdila, že komplexace IL-2 s anti-IL-2 mAb nejenže potencuje biologický účinek IL-2, ale zároveň podle konkrétní zvolené mAb také selektivně stimuluje buňky, které IL-2 pro svou proliferaci a aktivaci využívají [88].

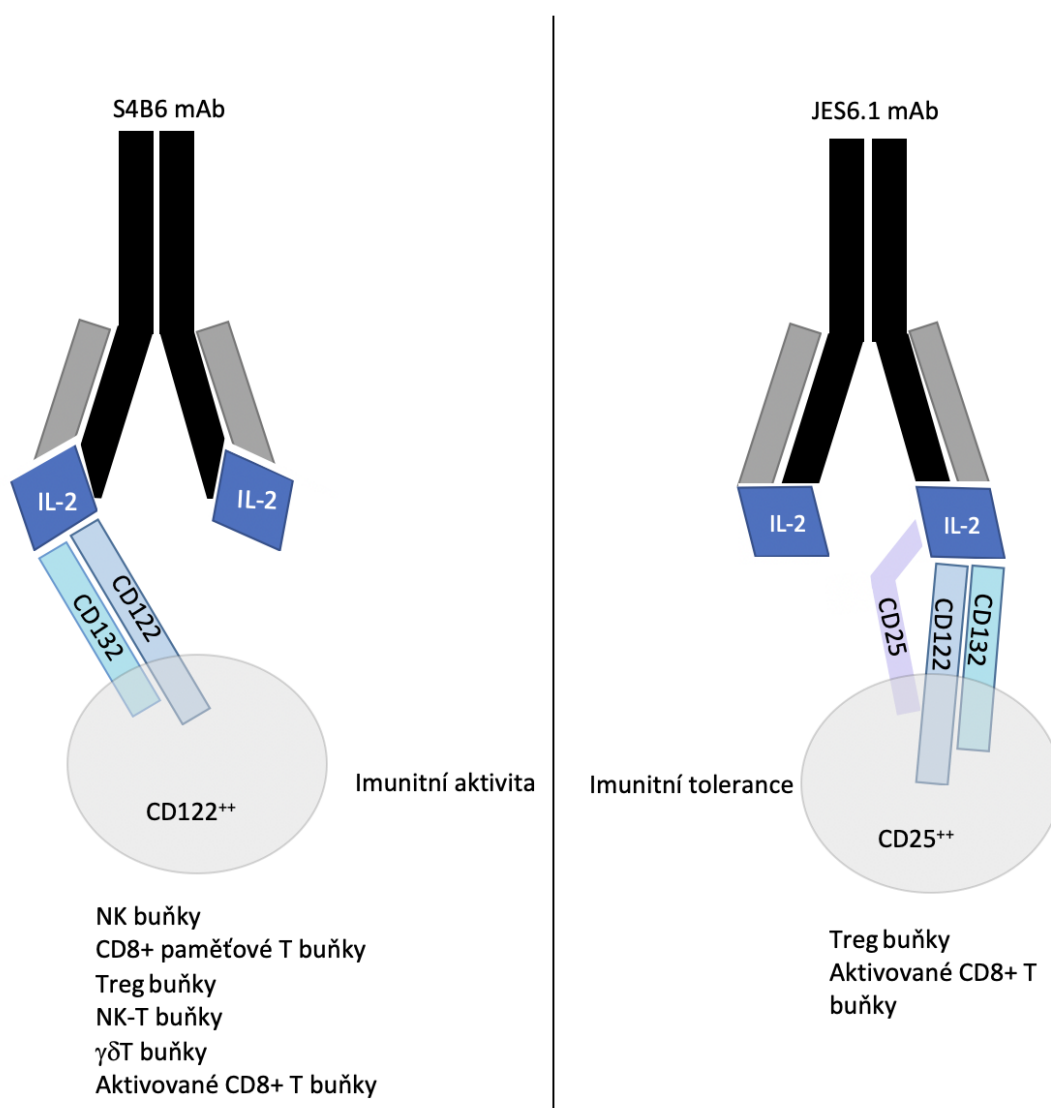
U myši byly popsány dva základní typy imunokomplexů IL-2/anti-IL-2 mAb, ve kterých jsou přítomny dvě různé anti-IL-2 mAb, a to buď mAb S4B6 nebo mAb JES6.1. Oba tyto imunokomplexy mají rozdílnou strukturu a mechanismus účinku, který je dán právě konkrétní použitou protilátkou. Je to s největší pravděpodobností dáno velikostí IL-2 a pouhými dvěma odlišnými a nepřekrývajícími se vazebnými epitopy, které umožňují protilátkám S4B6 a JES6.1 vázat molekulu IL-2 dvěma různými způsoby [57,89]. Vazba na oba epitopy zároveň vede k neutralizaci imunokomplexu a IL-2 ztrácí své biologické funkce [57,90]. Původně byly IL-2 a anti-IL-2 mAb podávány ve dvou oddělených injekcích [88], bylo ale prokázáno, že se imunokomplexy mohou připravovat předem smícháním obou komponent v příslušném poměru (nejčastěji molárně 2:1) [57]. Takový imunokomplex lze poté skladovat v mrazícím boxu a opět použít bez velké ztráty biologické aktivity.

Původně se předpokládalo, že podávání anti-IL-2 mAb povede k blokadě anebo neutralizaci volného IL-2 a tím by se snížila aktivita pronádorových Treg, což by vedlo ke zvýšené proliferaci CD8<sup>+</sup> paměťových T lymfocytů. Boyman a kol. však prokázali, že namísto blokování IL-2 podporovala anti-IL-2 mAb S4B6 biologickou aktivitu endogenního IL-2, čímž přímo stimulovala CD8<sup>+</sup> paměťové T lymfocyty [91]. Kromě toho také předem připravený imunokomplex IL-2 a anti-IL-2 mAb vykazoval *in vivo* silné biologické působení na aktivitu CD8<sup>+</sup> T paměťových lymfocytů a NK buněk [86].

Imunokomplexy založené na anti-IL-2 mAb S4B6 potřebují pro svoji funkci pouze dimerní IL-2R. Jsou proto vysoce stimulační např. pro paměťové CD8<sup>+</sup> T a NK buňky, mimo to také způsobují mírnou expanzi Treg, NK-T buněk a  $\gamma\delta$ -T buněk. Minimální vliv pak mají na CD4<sup>+</sup> paměťové T buňky anebo B lymfocyty [57,92]. Naproti tomu imunokomplexy anti-IL-2 protilátky JES6.1 striktně vyžadují přítomnost CD25 molekuly na povrchu cílové buňky, vyžadují tedy kompletní trimerní IL-2R. Buňky, které CD25 molekulu nemají, nejsou schopny tento imunokomplex IL-2/JES6.1 využít. Z toho důvodu je tento komplex silně stimulační médium pro Treg. Oba imunokomplexy jsou schopny také podnítit expanzi aktivovaných CD8<sup>+</sup> T buněk, u kterých po stimulaci prostřednictvím jejich TCR receptoru dochází k indukci exprese CD25 molekuly (Obr. 1.3, str. 28) [57].

Imunokomplexy IL-2/anti-IL-2 mAb mohou být začátkem slibné alternativy terapie pro pacienty s rakovinou. Z kombinace IL-2 s protilátkou plyne řada benefitů, které byly

zatím testovány s pozitivními výsledky na myších modelech [90,93–95]. Častější je využití imunokomplexu IL-2/S4B6, protože, jak už bylo řečeno, komplex IL-2/JES6.1 silně expanduje Treg, což je v protinádorové terapii nežádoucí. Ve studii z roku 2011 Tomala a kol. ukázali, že imunokomplex IL-2/S4B6 podaný ve stejné dávce a aplikačním schématu jako volný IL-2 měl výrazně silnější účinek na expanzi CD8<sup>+</sup> aktivovaných T, NK-T a NK buněk [92]. Dále pak Tomala a Kovář ve své práci zmiňují, že protinádorová aktivita imunokomplexu IL-2/JES6.1 je dokonce srovnatelná s IL-2/S4B6 v některých modelech nádorů, pokud je terapie podána za odpovídajících podmínek [57]. Rozdíl v účincích imunokomplexů v závislosti na použité mAb poukazuje Obr. 1.3.



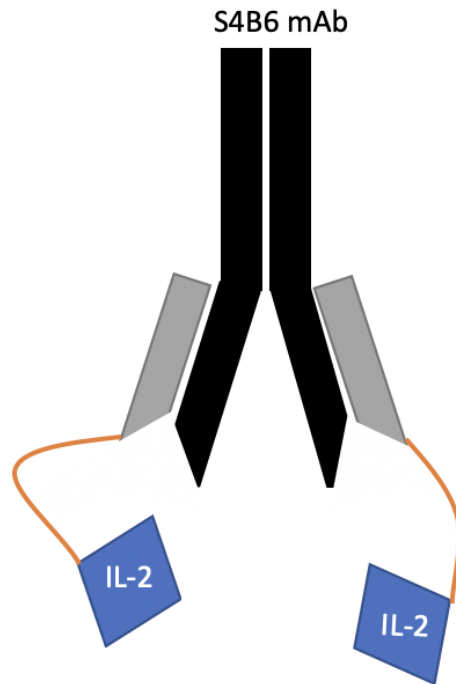
**Obrázek 1.3: Schéma rozdílů v účincích imunokomplexů IL-2/S4B6 a IL-2/JES6.1.** Imunokomplex IL-2/JES6.1 vyžaduje pro svou funkci vysokoafinitní trimerní IL-2R, jehož součástí je IL-2Rα (CD25), tento imunokomplex poté ovlivňuje expanzi zejména

na Treg, což vede k inhibici imunitní reakce. Naproti tomu imunokomplex IL-2/S4B6 nevyžaduje speciální molekulu CD25, stericky ji blokuje a využívá pouze dimerní IL-2R sestávající z IL-2R $\beta$  (CD122) a IL-2R $\gamma$  (CD132), působení stimuluje efektorové a paměťové služby buněčné imunity (CD8 T a NK), což vede k posílení protinádorové aktivity. Převzato a upraveno dle [57].

Protože nekovalentně navázaný cytokin se může *in vivo*, kdy je koncentrace jednotlivých komponent imunokomplexu velmi nízká, z protilátky vyvázat a difundovat pryč, může být biologická potenciace a selektivita daná přítomností imunokomplexu omezena. Samotná anti-IL2 protilátka totiž nebude proti nádorovým buňkám nijak terapeuticky působit a volné IL-2 má jen omezený biologický účinek, zvláště v nízké koncentraci. Tato problematika byla adresována a mohla by být vyřešena přípravou fúzních proteinů sestávajících z cytokinu kovalentně vázaného na příslušnou protilátku.

#### 1.4.4 Imunocytokiny IL-2

Imunocytokiny jsou fúzní jednořetězcové rekombinantní proteiny složené z cytokinu a monoklonální protilátky. Imunocytokin má cytokin na protilátku navázán skrze peptidovou spojku (tzv. linker, LN) zvolené délky. Cytokin je tedy na protilátku vázán kovalentně, na rozdíl od imunokomplexu, kde jde pouze o nekovalentní směs protilátky a cytokinu. Z toho vyplývá, že cytokin nemůže zcela difundovat od protilátky (jen na délku spojky), čili zesílený biologický účinek a selektivita vůči vybraným populacím buněk takového konstruktu zůstanou zachovány i ve velmi nízkých koncentracích (Obr. 1.4) [30,96]. Bylo zjištěno, že volný IL-2, který je podáván ve vysokých terapeutických dávkách nebo je silně stimulováno jeho uvolňování z aktivovaných T buněk, z větší části nedosáhne do konkrétní cílové tkáně (periferní části nádoru a/nebo primární a sekundární lymfoidní tkáně), kde je zamýšlené jeho terapeutické působení; navíc způsobuje silné toxické reakce. Dojde-li k fúzi cytokinu s konkrétní anti-cytokinovou protilátkou, lze terapii nasměrovat do konkrétní populace buněk imunitního systému, a tak i snížit vysoké dávky IL-2, stejně jako systémovou zátěž [97].



**Obrázek 1.4: Schéma imunocytokinů na bázi IL-2 a S4B6 mAb.** Tento chimerní protein spojuje C-terminální konec IL-2 a N-terminální konec lehkého řetězce S4B6 mAb skrze flexibilní aminokyselinovou spojku (linker, oranžově), zabraňující kompletní disociaci komplexu a ztrátě IL-2. Převzato a upraveno dle [96].

Již dříve byly popsány chimerní konstrukty IL-2 a anti-IL-2 mAb, ve kterých byl IL-2 napojen na C-terminální konec těžkého řetězce protilátky mAb [98–100]. Tyto konstrukty rozeznávaly konkrétní nádorové antigeny a mohly tak dodávat IL-2 přímo do nádorového mikroprostředí a vyvolávat tak protinádorovou imunitu. IL-2 je v těchto konstruktech spojen s molekulou protilátky mAb tak, že v podstatě nedochází k žádné vazebné interakci mezi IL-2 a anti-IL-2 mAb. V dalším konstruktu byl IL-2 spojen s Fc doménou protilátky Ig s cílem prodloužit biologický poločas cytokinu v krevním oběhu [101]. Nicméně tyto konstrukty se zásadně liší od jednořetězcových rekombinantních IL-2/anti-IL-2 mAb imunocytokinů, kde je IL-2 spojeno oligopeptidovou spojkou s anti-IL-2 mAb, konkrétně s lehkým řetězcem. Tyto chimerní proteiny byly poprvé konstruovány a popsány Dr. Tomalou a kol. roku 2013 [102].

## 2 Cíle práce

Cíle této práce jsou:

- Příprava plazmidů pro stabilní expresi myší monoklonální protilátky S4B6 ve fúzi s myším interleukinem 2, spojené 35 aminokyselinovou glycin-serinovou spojkou na lehkém řetězci protilátky (S4B6 IC LN35)
- Transfekce buněčné linie HEK293T a následná produkce a purifikace fúzní protilátky S4B6 IC LN35
- Stanovení biologické aktivity tohoto imunocytokinů
- Srovnání biologické aktivity imunocytokinů S4B6 IC LN20 (se spojkou 20 aminokyselin), imunocytokinů S4B6 IC LN35 (s prodlouženou glycin-serinovou spojkou na 35 aminokyselin) a imunokomplexu IL-2/S4B6

## 3 Materiály

### 3.1 Chemikálie

1 kb DNA standard	New England Biolabs, USA
100 bp DNA standard	New England Biolabs, USA
2-merkaptoethanol	Sigma, USA
Agar	Oxoid, Anglie
Agarosa	Sigma, USA
Ampicilin	Biotika, SR
APS	Serva, USA
Blasticidin	Biotika, SR
Combi PPP Master Mix	Top-Bio, ČR
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka Chemika, Švýcarsko
DMSO	Sigma, USA
dNTPs, 10 mM	Top-Bio, ČR
Doxycyklin	Serva, USA
GoodView II	Ecoli, Slovensko
IPEI 25 kDa	Polysciences, USA
NucleoBond Xtra Maxi Kit	Macherey-Nagel, Německo
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Německo
NucleoSpin Plasmid Miniprep Kit	Macherey-Nagel, Německo
PCR H <sub>2</sub> O	Top-Bio, ČR
Puromycin	Serva, USA
SDS	Jersey Lab Supply, USA
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Scientific. USA
TEMED	Serva, USA
Trypanová modř	Sigma, USA
Ostatní běžné chemikálie	

### 3.2 Roztoky a pufry

ACK Lysing buffer, Thermo



Barvicí roztok pro SDS-PAGE (45 % methanol, 10 % kys. octová, 0,25 % CBB R-250)  
 Elektroodový pufr (0,025 M Tris, 0,19 M glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3)  
 ExCELL 293 (komerční médium, před použitím doplněno o L-glutamin do výsledné koncentrace 4 mM; Sigma-Aldrich, USA)  
 FACS roztok (PBS-TK, 2 mM EDTA, 2,5 % FBS)  
 Fix/Perm roztok (1:3 FIX/PERM koncentrát : FIX/PERM diluent, eBioscience “Foxp3 Transcription Factor staining buffer set”, Thermo)  
 HBS (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4 bez NaN<sub>3</sub>)  
 LB – médium (1 % trypton, 0,5 % kvasničný extrakt, 1 % NaCl, pH 7,4)  
 Octanový pufr (50 mM octan sodný, pH 4,0, 10 nM NaN<sub>3</sub>)  
 Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE (35 % ethanol, 10 % kys. octová)  
 PERM roztok (10× PERM roztok, eBioscience “Foxp3 Transcription Factor staining buffer set”, Thermo)  
 PBS pufr (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,5)  
 PBS-TK (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0)  
 Roztok AA pro SDS-PAGE (29 % akrylamid, 1 % N,N-methylenbisakrylamid)  
 Roztok IPEI (10 mg/ml IPEI v PBS-TK)  
 Roztok trypanové modři (0,4 % trypanová modř v PBS-TK)  
 SDS PAGE pufr (0,25 nM TRIS, 1,92 nM glycin, 0,01 % SDS, pH 8,3)  
 TAE pufr pro agarosovou elektroforézu (40 mM Tris, 20 mM kys. octová, 1 mM EDTA)  
 TRIS (pro pH 8,8 i 6,8 1,5M)  
 TruPAGE SDS elektroodový pufr (Sigma, USA)  
 Vzorkový pufr pro agarosovou elektroforézu (30 % glycerol, bromfenolová modř v TAE)  
 Vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× koncentrovaný neredukující (31,5 mM Tris, 10 % (v/v) glycerol, 1 % (w/v) SDS, 0,005 % (w/v) bromfenolová modř, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH 6,8)  
 Vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× koncentrovaný redukující (vzorkový pufr pro SDS-PAGE 5× koncentrovaný naředěný desetinným podílem 2-merkptoethanolu)

### 3.3 Enzymy

CutSmart pufr	New England Biolabs, USA
Polymeráza Q5 a pufr	New England Biolabs, USA
„Ligation-free cloning kit“ (InFusion)	ABM, USA

Restrikční endonukleáza NheI

New England Biolabs, USA

Restrikční endonukleáza PmeI

New England Biolabs, USA

### 3.4 Buněčné linie a bakteriální kmeny

*Escherichia coli* TOP10

New England Biolabs, USA

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$

New England Biolabs, USA

HEK293T

prof. Radu Aricescu, UK

### 3.5 Vektory

Plazmid PBase

Sanger Institute, UK

Plazmid PB-RB

prof. James M. Rini, PhD.,

University of Toronto

Plazmid pUT7

prof. James M. Rini, PhD.,

University of Toronto

Plazmidy puT7\_S4B6/mIL-2\_LN20\_LI a H2

Bc. D. Rožová, bakalářská práce,  
PřF UK, 2020

### 3.6 Protilátky

	Znak	Fluorochrom (FL)	Zkratka FL	Klon mAb	Výrobce
Extracelulární znaky	CD3	eFluor 450	EF450	17A2	Thermo
	CD3	PE-Cyanine7	PE-Cy7	145-2C11	Thermo
	CD3	V500 Horizon	V500	500A2	BD
	CD4	Peridinin-Chlorophyll-protein	PerCP	RM4-5	BD
	CD8	V500 Horizon	V500	53-6.7	BD
	CD25	Allophycocyanin	APC	PC61.5	Thermo
	CD44	Allophycocyanin	APC	IM7	Thermo
	CD49b	Fluorescein isothiocyanate	FITC	DX5	Thermo
	CD62L	eFluor 450	EF450	MEL-14	Thermo
	CD122	Phycoerythrin	PE	5H4	Thermo
	CD161	Allophycocyanin	APC	PK136	Thermo
	gd TCR	eFluor 450	EF450	GL-3	Thermo
	Intracelulární znaky	Ki67	AlexaFluor 700	A700	SolA15
Foxp3		Phycoerythrin	PE	FJK-16s	Thermo
Životnost	Fixable Viability dye (FVD)	eFluor 780	EF780	-	Thermo

### 3.7 Oligonukleotidy

pCT5K-FW

5'-AGTTTGTACAGCTAGGCCACCATGGGAGAACTG-3'

pCT5-REV

5'-CTGATCAGCGGGTTTTTCACCCGTGGTGGTGATG-3'

pCT5seq\_FW

5'-TCAGA TCGCCTGGAGACG-3'

pCT5seq_REV	5'-GTGGGAGTGGCACCTTCC-3'
IL2_merge_FW	5'-ATCATCTAAACAAGCCCTCAA-3'
IL2_merge_REV	5'-TTGAGGGCTTGTTGAGATGAT-3'

### 3.8 Přístroje

Amicon Ultra centrifugační filtr (15000 MWCO)	Amicon®, Německo
Analytické váhy	AND, USA
Automatické pipety Pipetman	Gilson, USA
Automatický počítač buněk EVE	NanoEntek, Korea
Centrifuga Allegra X-22R	Beckman Coulter, USA
Centrifuga EBA 12R	Hettich, Německo
Elektroforetická souprava pro SDS-PAGE	Bio-Rad, USA
GentleMACS Octo disociátor	Miltenyi Biotec, USA
HPLC systém ÄKTA basic	GE Healthcare, USA
Inkubátor IR 5000	LABsystem Praha, ČR
Inkubátor MC0-18 AIC	Sanyo, Japonsko
Kahan Fuego SCS	Verkon, ČR
Kolona Superdex 200 Increase 10/300 GL	GE Healthcare, USA
Kolona Ni-NTA Excell	GE Healthcare, USA
Koncentrátor Amicon Ultra	Millipore, USA
Láhve čtverhranné s prodyšnými víčky	VWR, USA
Mikrocentrifuga Ministar Silverline	P-LAB, ČR
Mikrofiltr o velikosti pórů 0,22 µm	TPP, Švýcarsko
Mikrostríkačka Hamilton	P-LAB, ČR
Mikrovlnná trouba	Optimo Moulinex, Francie
Mikrozkumavka 1,5 ml	Eppendorf, USA
Mikrozkumavka 200 µl	Eppendorf, USA
Nunc 96V jamková destička	Thermo, USA
pH metr Φ 200	Beckman Coulter, USA
Průtokový cytometr BD Fortessa	BD Biosciences, USA
Předvážky KB1200-2	Kern, Německo
Sítový buněčný filtr CellTrics, 30 µm	Sysmex, USA

Sítový buněčný filtr Falcon, 70 µm	Corning, USA
Spektrofotometr DS-11	DeNovix, USA
Souprava pro agarosovou elektroforézu	Biokeystone, USA
Termoblok LS1	VLM, Německo
Termocyklér T100	Bio-Rad, USA
TPP 96U jamková destička	TPP, Švýcarsko
Třepačka Celltron	Infors HT, Švýcarsko
Třepačka G24	New Brunswick Scientific, USA
Třepačka Multitron Pro	Infors HT, Švýcarsko
UV prosvěcovací lampa 312 nm	UVItec, UK
Vortexový mixér	Velp Scietifica, Itálie
Zdroj stejnosměrného napětí EC250-90	E-C Apparatus Corporation, UK

### **3.9 Biologické modely**

Myši inbredního kmene C57BL/6 (CCP, ÚMG AV ČR), samci staří 8–14 týdnů

## 4 Metody

### 4.1 Produkce imunocytokinů S4B6 IC LN35

#### 4.1.1 Zpracování DNA pro dvoukrokovou PCR

Jedna část templátu pro dvoukrokovou PCR reakci S4B6\_LN35\_light byla syntetizována komerčně (Thermo Scientific) a naředěna na pracovní koncentraci 100 ng/μl přidáním příslušného množství PCR H<sub>2</sub>O. Dále bylo nutné extrahovat z gelu PCR produkt DNA, který do reakce vnese gen pro mIL-2, k extrakci z gelu byla využita komerční souprava NucleoSpin. Nejprve bylo k vyříznutému gelovému proužku v mikrozkuhavce přidáno 500 μl solubilizačního roztoku NT1 a vše následně umístěno do termobloku předehřátého na 50 °C. Během 5-10 min se gel rozpustil. V druhém kroku byl roztok převeden do záchytné kolonky a centrifugován na 11000 × g, 1 min. Supernatant byl odlit a kolonka promyta 600 μl promývacího roztoku NT3 a následně opět centrifugována a ještě jednou promyta. Následovalo vysušení centrifugací při 11000 × g po dobu 3 min. Posledním krokem byla eluce 20 μl PCR H<sub>2</sub>O s konečnou centrifugací. Koncentrace byla změřena na spektrofotometru při vlnové délce 260 nm.

#### 4.1.2 Spojovací („Overlap extension“) PCR

Do mikrozkuhavky pro PCR reakce byla připravena reakční směs o celkovém objemu 20 μl následovně:

- 50 ng templátu S4B6\_LN35\_light
- 50 ng PCR produktu DNA pro mIL-2 extrahovaného z gelu
- 2 μl přímý primer pCT5K\_FW
- 2 μl zpětný primer pCT5\_REV
- 4 μl Q5 reakčního pufru
- 4 μl GC enhancer
- 0,5 μl roztoku dNTPs
- 0,5 μl Q5 polymerázy
- zbylý objem byl doplněn na 20 μl PCR H<sub>2</sub>O

PCR reakce probíhala v termocykléru ve dvou krocích, při kterých došlo díky přesahům v DNA řetězcích ke spojení obou templátů do jednoho produktu S4B6/mIL-2\_LN35 a k jeho amplifikaci. Program termocykléru byl nastaven následovně:

- 95 °C, 5 min

10 × cykly:

- 95 °C, 30 s

- 65 °C, 30 s

- 72 °C, 60 s

Následovaly 20 × cykly:

- 95 °C, 30 s

- 55 °C, 30 s

- 72 °C, 60 s

Závěrečná elongace 72 °C, 5 min a dále zchlazení na 4 °C.

PCR produkt byl analyzován na agarosovém gelu a příslušné produkty extrahovány.

#### **4.1.3 Štěpení plazmidu restrikčními endonukleázami**

Do celkového objemu 50  $\mu$ l bylo použito 5  $\mu$ g plazmidu pUT7 (zde 4,5  $\mu$ l), 5  $\mu$ l reakčního pufru CutSmart a restrikční endonukleázy v koncentracích NheI\_HF 20  $\lambda$ / $\mu$ l a PmeI 10  $\lambda$ / $\mu$ l. Enzymu NheI\_HF bylo v tomto případě pipetováno 0,5  $\mu$ l, PmeI 1  $\mu$ l. Objem byl doplněn 39  $\mu$ l PCR H<sub>2</sub>O. To vše bylo inkubováno 1 hod při 37 °C.

#### **4.1.4 Agarosová elektroforéza**

K přípravě 1 % agarosového gelu bylo v Erlenmeyerově baňce rozpuštěno 0,65 g agarosy v 65 ml TAE pufru zahřátím v mikrovlnné troubě po cca 1 min. Po vychladnutí na přibližně 40 °C byly přidány 3  $\mu$ l barviva GoodView II, které slouží ke zvýraznění DNA v UV světle. Gel byl nalit do aparatury a do ještě teplého gelu byl umístěn hřeben k vytvoření jamek. Jako reakční pufr byl nalit k elektrodám po rysku TAE pufr a celý gel byl nakonec převrstven dH<sub>2</sub>O. Ke vzorkům bylo nutné přidat příslušné množství vzorkového pufru (6× koncentrovaný) z důvodu snadnějšího pipetování a udržení vzorku v jamce. První dvě jamky byly použity pro 100 bp a 1 kb standardy, které byly pipetovány

v objemech po 5  $\mu$ l. Pro ověření, zda byl plazmid pUT7 správně naštěpen v předchozím kroku, bylo do další jamky pipetováno 20  $\mu$ l neštěpeného (kontrolního) plazmidu pUT7. Do dalších jamek, vždy s prázdnou jamkou mezi jednotlivými vzorky, bylo pipetováno 20  $\mu$ l štěpeného plazmidu pUT7 a PCR produktu. Elektroforéza probíhala 17 min při 180 V a 500 mA. DNA byla vizualizována pod UV světlem a extrahována z gelu s pomocí komerční soupravy NucleoSpin Gel and PCR Clean-up dle návodu výrobce.

#### **4.1.5 Vnesení genu do linearizovaného plazmidu**

Tzv. InFusion reakce (Ligation-Free Cloning kit) probíhala na ledové lázni v mikrozkuřavkách. Do reakce celkového objemu 20  $\mu$ l bylo pipetováno 12,6  $\mu$ l PCR H<sub>2</sub>O, 136 ng vektoru (zde 1,85  $\mu$ l plazmidu pUT7 štěpeného restričními endonukleázami), 80,1 ng inzertu (zde 1,56  $\mu$ l PCR produktu kódujícího cílový gen). Nakonec byla směs doplněna o 4  $\mu$ l InFusion reakční směsi a inkubována 40 min na ledu.

#### **4.1.6 Transformace bakterií *E. coli* TOP10**

K transformaci bylo využito 60  $\mu$ l buněčné suspenze bakterií *Escherichia coli* TOP10. Tento objem buněčné suspenze byl přenesen do mikrozkuřavky k InFusion reakční směsi. Následně byl proveden teplotní šok a to inkubací mikrozkuřavky v termobloku při 42 °C 1 min a poté opět na ledové lázni 20 min. Po skončení inkubace byla suspenze přenesena na agarovou misku s ampicilinem o koncentraci 100  $\mu$ g/ml a inkubována přes noc při 37 °C.

#### **4.1.7 PCR z kolonií**

PCR z kolonií narostlých na agarové misce sloužila k ověření úspěšného vložení požadovaného genu do plazmidu, kterým byly bakterie transformovány. Do PCR mikrozkuřavky bylo pipetováno do celkového objemu reakce 20  $\mu$ l postupně:

- 2  $\mu$ l přímý primer pCT5seq\_fw
- 2  $\mu$ l zpětný primer pCT5seq\_rev
- 10  $\mu$ l reakční směs Combi PPP
- doplněno 6  $\mu$ l PCR H<sub>2</sub>O

Do této mikrozkušavky byla vložena špička s kolonií vypíchnutou z inkubované kultivační plotny a bakterie byly v reakční směsi resuspendovány. Program termocykléru pro PCR reakci byl nastaven následovně: 5 min při 95 °C, následně 20 cyklů, každý 30 s při 95 °C, 30 s při 67 °C, 1 min při 72°C, poté 10 min při 72 °C a následně byla až do vyjmutí z termocykléru teplota udržována při 4 °C. Výsledek PCR byl vizualizován pomocí agarosové elektroforézy (viz kapitola 4.1.4).

Totožná špička se stejnou vypíchnutou kolonií byla následně vložena do zkumavky s 5 ml SOB média s přidavkem ampicilinu o výsledné koncentraci 100 µg/ml a nedovřená (pro volnou výměnu plynů s okolím) inkubována na třepačce při 37 °C a 200 ot./min přes noc do druhého dne.

#### **4.1.8 Nízkoobjemová izolace plazmidové DNA**

Izolace plazmidové DNA z bakterií byla provedena pomocí komerční soupravy NucleoSpin Plasmid Miniprep Kit dle návodu výrobce. Zkumavka s narostlou kulturou byla centrifugována při 11000 × g, 1 min. Supernatant byl slit a peleta resuspendována v 250 µl pufru A1 obsahujícím RNAsu. Suspenze byla přenesena do čisté mikrozkušavky a doplněna lyzačním pufrem A2 o objemu 250 µl. Tato suspenze nebyla míchána pipetou, pouze lehkým převrácením zkumavky a byla inkubována po dobu 5 min při pokojové teplotě. Poté bylo přidáno 300 µl neutralizačního pufru A3 a suspenze byla centrifugována 5 min při 11000 × g. Poté bylo opatrně odpipetováno 600 µl supernatantu, ten byl přenesen na filtrační kolonku a odstředěn 1 min při 11000 × g. Filtrát byl slit a kolonka byla dvakrát promyta 500 µl pufru AW centrifugací opět 1 min při 11000 × g. Následně bylo přidáno 600 µl pufru A4, kolonka byla centrifugována jako výše a po odstranění filtrátu byla vysušena centrifugací 2 min při 11000 × g. Eluce byla provedena 50 µl pufru AE. Po nanesení na kolonku a inkubaci při pokojové teplotě přibližně 1 min byla provedena finální centrifugace 1 min při 11000 × g.

#### **4.1.9 Příprava vzorku pro DNA sekvenování**

Byly připraveny dva vzorky v mikrozkušavkách, které obsahovaly po 200 ng plazmidové DNA. Do první zkumavky se vzorkem byl přidán přímý primer a do druhé zkumavky zpětný primer (DNA byla sekvenována z obou stran), vždy po 1 µl. Vzorky



byly naředěny na objem 8  $\mu$ l. Sekvenování se uskutečnilo v Laboratoři sekvenace DNA PřF UK. Po získání výsledků byla sekvenace vyhodnocena v programu SnapGene.

#### **4.1.10 Transformace bakterií DH5 $\alpha$**

Princip transformace bakterií *E. coli* DH5 $\alpha$  byl totožný s transformací bakterií *E. coli* TOP10 (viz kapitola 4.1.6). Důvodem použití tohoto kmene bakterií je jejich schopnost významně zmnožit plazmidovou DNA, což je vhodné pro velkoobjemovou produkci plazmidu. Do mikrozkušavky se 100  $\mu$ l rozmrazené buněčné suspenze bylo pipetováno 170 ng (v tomto případě 5,9  $\mu$ l) plazmidové DNA. Po příslušné inkubaci byla suspenze rozetřena na SOB agarovou misku s ampicilinem o koncentraci 100  $\mu$ g/ml a inkubována přes noc při 37  $^{\circ}$ C. Kolonie byly následující špičkou přeneseny do 0,5 l SOB média s ampicilinem o koncentraci 100  $\mu$ g/ml. V této baňce byly inkubovány přibližně 12 hod na třepačce při 37  $^{\circ}$ C a 200 ot./min.

#### **4.1.11 Velkoobjemová příprava plazmidové DNA**

Bakteriální kultura o objemu 0,5 l byla centrifugována ve dvou 250 ml kyvetách v centrifuze předchlazené na 4  $^{\circ}$ C po dobu 15 min při 4000  $\times$  g. Pro izolaci plazmidové DNA byla použita komerční souprava NucleoBond Xtra Maxi dle návodu výrobce. Po centrifugaci buněčné kultury byl supernatant opatrně odstraněn, peleta resuspendována RES pufrem o objemu 12 ml a promíchána na orbitální třepačce. Suspenze buněk byla převedena do čisté 50 ml zkumavky a doplněna o 12 ml lyzačního LYS pufru. Roztok byl krátce opatrně promíchán a inkubován ve stojánku 5 min při pokojové teplotě, postupně nabyl modrou barvu. Mezitím byly do stojánku připraveny speciální kolonky s filtry, které jsou součástí soupravy, a ty byly promyty 25 ml EQU pufru krouživým pohybem podél stěny. Následně bylo do 50 ml zkumavky přidáno 12 ml neutralizačního NEU pufru a zkumavka byla opatrně míchána převrácením, dokud roztok neztratil modrou barvu. Po odbarvení byl roztok převeden na filtrační kolonku a ponechán prokapat. Po přefiltrování roztoku byl filtr kolony omyt 15 ml EQU pufru stejnou technikou jako poprvé, poté byl filtr z kolony odstraněn a kolona byla promyta 25 ml WASH pufru. Do čisté zkumavky byl roztok eluován 15 ml ELU pufru a k eluátu bylo následně přidáno 10,5 ml isopropanolu. Dále byla zkumavka promíchána na orbitální třepačce a promíchaný roztok centrifugován v centrifuze předchlazené na 4  $^{\circ}$ C, 15000  $\times$  g, 30 min. Supernatant byl

odstraněn a k peletě byly přidány 4 ml 70 % ethanolu. Suspenze byla opět centrifugována 20 min při 4 °C a 15000 × g. Zkumavka byla po odlití supernatantu umístěna do rotační vakuové odparky na 5 min při 60 °C. Vysušená peleta obsahující plazmidovou DNA byla rozpuštěna v 1 ml sterilní přefiltrované dH<sub>2</sub>O, promíchána na orbitální třepačce a přenesena pipetou do čisté mikrozskumavky; následně byla změřena koncentrace DNA ve vzorku pomocí spektrofotometru.

#### **4.1.12 Příprava buněčné linie HEK293T pro stabilní transfekci**

HEK293T buněčná suspenze je uchovávána v 1 ml alikvotech s přidavkem 10 % DMSO při -80 °C. Po rozmražení alikvotu byla buněčná suspenze přenesena spolu s 10 ml čistého ExCELL 293 média, předehřátého na 37 °C, do plastové zkumavky a odstředěna 5 min při 100 × g. Po odstranění supernatantu byla peleta resuspendována v 10 ml ExCELL 293 média a přenesena pipetou do sterilní Petriho misky. Po dvou subkultivacích po třech dnech byla kultura přenesena do 100 ml čtverhranné skleněné lahve s prodyšným víčkem, ve které byly buňky následně inkubovány na třepačce při 135 ot./min, 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Celkový objem kultury v médiu ExCELL 293 byl 30 ml. Tato buněčná kultura byla následující dny pravidelně kontrolována, byla počítána koncentrace buněk a v případě potřeby byla prováděna subkultivace s doplňováním čerstvého média. Práce s buněčnou linií probíhala vždy pouze ve sterilním prostředí laminárního boxu.

#### **4.1.13 Transfekce a produkce proteinů v stabilní linii HEK293T**

V lahvičce s buněčnou kulturou byla spočítána koncentrace buněk a dle výsledku byl z kultury odebrán takový objem buněčné suspenze, aby v něm bylo obsaženo 30 milionů buněk (zde při koncentraci 2,9 mil. buněk/ml činil odebraný objem 10,3 ml). Tento objem buněčné suspenze byl přenesen do 15 ml plastové zkumavky a centrifugován 5 min při 100 × g. Supernatant byl odstraněn, buňky resuspendovány v 1,25 ml média ExCELL 293 a přeneseny na 6-jamkovou kultivační destičku. Dále bylo do jamky destičky pipetováno 250 μl přefiltrovaného sterilní transfekční směsi obsahující DNA v PBS-TK pufru a 12 μl IPEI o koncentraci 10 mg/ml (poměr DNA:IPEI 1:4). Transfekce byla prováděna v poměru 1 μg DNA na 1 mil. buněk. Hmotnostní poměr jednotlivých plazmidů použitých pro transfekci vychází z bakalářské práce Bc. Dominiky

Rožové [103] a odpovídá poměru 6,4:1,6:1:1, tzn. čtyřnásobnému množství plazmidu nesoucího gen pro fúzní IL-2 lehký řetězec oproti těžkému řetězci S4B6 mAb. Zbylé dva plazmidy jsou pomocné v rámci produkčního systému piggyBac [104], který umožňuje indukci exprese přidavkem doxycyklinu a sekreci rekombinantního proteinu do kultivačního média. Tabulka 4.1 uvádí obsah transfekční směsi, která byla k této transfekci použita.

**Tabulka 4.1:** Složení transfekční směsi pro přípravu stabilně transfekované HEK293T buněčné linie s pomocí produkčního systému piggyBac.

Plazmidy / pufr	pUT7_L1	pUT7_H2	PBase	PBRB	PBS-TK
Množství DNA [μg]	38,4	9,6	6,0	6,0	-
Pipetované množství [μl]	50,6	14,76	4,36	22,64	907

Destička s buněčnou linií byla inkubována 90 min při 135 ot./min, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Po inkubaci byl obsah destičky přenesen pomocí pipety do 75 ml lahvičky s prodyšným víčkem a doplněn 30 ml média. Lahvička s buněčnou linií byla inkubována na třepačce za stejných podmínek jako v předchozím kroku po dobu 72 hodin.

Selekce stabilně transfekovaných linií probíhala za pomoci antibiotik puromycin a blasticidin. Buňky byly přeneseny do 250 ml lahvičky a doplněny 50 ml čerstvého média a 25 μl roztoků obou zmiňovaných antibiotik o koncentraci 10 mg/ml. Takto byla lahvička inkubována na třepačce za stejných podmínek, jak již bylo zmíněno a byla pravidelně kontrolována viabilita a hustota buněk v kultuře. Bylo-li třeba, byla linie subkultivována, tedy přenesena do čerstvého média ExCELL 293 a doplněna o již zmíněná selekční antibiotika. Kultura byla následně subkultivována do litrové lahve a doplněna do objemu 300 ml médiem ExCELL 293 spolu s penicilinem o výsledné koncentraci 10 U/ml a streptomycinem o výsledné koncentraci 1 μg/ml. Po dosažení buněčné hustoty  $2 \times 10^6$  buněk/ml byla přidavkem doxycyklinu o výsledné koncentraci 1 μg/ml zahájena produkce proteinu. Produkce proteinu trvala 12 dnů.

#### 4.1.14 Zmražení buněčné linie

Buněčná suspenze byla centrifugována 5 min při  $100 \times g$  a resuspendována čerstvým ExCELL 293 médiem tak, aby 1 ml alikvot obsahoval  $5 \times 10^6$  buněk/ml,

příčemž médium by mělo tvořit 90 % roztoku a 10 % by měl tvořit DMSO jako kryoprotektivní činidlo. Alikvoty byly umístěny do mrazícího kontejneru a ponechány v mrazícím boxu při -80 °C.

#### **4.1.15 Sklizení buněčné kultury**

Nejprve byla kultura rozlita do 250 ml kyvet a centrifugována 10 min na  $100 \times g$ , bylo dbáno na to, aby se buňky centrifugací nepoškodily. Supernatant byl převeden do čistých kyvet a ponechán pro další zpracování. Peleta vzniklá centrifugací byla vymyta. Supernatant byl v 250 ml kyvetách znovu centrifugován, nyní při  $25000 \times g$ , 15 °C, 1 hod. Supernatant byl přefiltrován přes 0,22  $\mu\text{m}$  filtr, zředěn 80 ml  $10\times$  koncentrovaného HBS pufru a takto připraven pro purifikaci.

#### **4.1.16 Afinitní chromatografie**

Pro afinitní chromatografii byla využita kolona Ni-NTA ExCell, která byla připojena k HPLC systému ÄKTA basic. Pro vyloučení kontaminace bakteriálními lipopolysacharidy byla kolona nejprve promyta 0,1 M NaOH při průtoku 0,5 ml/min, dále 0,5 M NaOH při průtoku 0,75 ml/min a následně ponechána v NaOH do druhého dne. Poté byla kolona převedena nejprve do  $\text{H}_2\text{O}$  a poté do HBS pufru. Před použitím kolony bylo nutné nastavit tlakový limit na 0,5 MPa a maximální průtok na 10 ml/min. Nanášení filtrátu s cílovým proteinem probíhalo rychlostí 6 ml/min, roztok s proteiny byl sbírán do lahvičky a uschován v lednici. Následovalo promytí 10 objemy kolony HBS pufrem do ustálení křivek na chromatogramu.

Eluce nečistot probíhala pomocí 25 mM imidazolu v HBS, který byl na kolonu nanášen průtokem 2-4 ml/min. Při nárůstu absorbance byly jímány frakce do zkumavek, k této prvotní eluci bylo využito cca 40 ml 25 mM imidazolu v HBS. K vlastní eluci kýžného proteinu s histidinovou kotvou byl použit 250 mM imidazol v HBS nanášený na kolonu průtokem 2 ml/min. Při nárůstu absorbance chromatogramu byly jímány frakce do čistých zkumavek, dokud se křivka absorbance opět neustálila. Po skončení chelatační afinitní chromatografie byla kolona regenerována 50 ml octanového pufru, promyta  $\text{H}_2\text{O}$  a nakonec převedena do 20% ethanolu, ve kterém byla uchovávána v lednici.

#### **4.1.17 Koncentrování proteinů**

Eluát obsahující purifikovaný protein byl převeden do koncentrátoru Amicon Ultra Centrifugal Filter Unit (15000 MWCO) a centrifugován při  $4000 \times g$ ,  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 10 min. Supernatant byl odstraněn a zkumavka s koncentrátorem doplněna eluátem s proteinem, promíchána pomocí pipety a dále byla zkumavka opět centrifugována za stejných podmínek jako v předchozím případě. Celý postup byl několikrát opakován, dokud se objem eluátu nesnížil na cca 250  $\mu\text{l}$ . Před nástřikem na kolonu byl vzorek přenesen do mikrozkušavky a centrifugován 5 min při  $20000 \times g$ .

#### **4.1.18 Gelová permeační chromatografie**

Gelová permeační chromatografie byla prováděna na koloně Superdex 200 Increase 10/300 GL zapojené do HPLC systému ÄKTA basic. Systém byl převeden do HBS pufru a poté byl vzorek nanesen do smyčky, která byla před tím řádně promyta HBS pufrům. Pracovní průtok byl 0,5 – 0,75 ml/min. Jednotlivé frakce byly sbírány do mikrozkušavek po 1 ml. Po ukončení chromatografie byla koncentrace proteinu ve frakcích stanovena spektrofotometricky při 280 nm s pomocí teoretického extinkčního koeficientu získaného výpočtem dle známé aminokyselinové sekvence a teoretické molekulové hmotnosti.

#### **4.1.19 Analytická gelová permeační chromatografie**

Z vybraných frakcí byly provedeny analytické nástřiky na vysokotlaké silikagelové koloně Biozen dSEC-2 (3  $\mu\text{m}$ ) pro ověření stability jednotlivých frakcí po gelové permeační chromatografii. Kolona byla opět připojena k HPLC systému ÄKTA basic a kalibrována dle pokynů výrobce. 30  $\mu\text{l}$  vzorku bylo přefiltrováno přes 0.1  $\mu\text{m}$  Ultrafree PVDF filtr a následně aplikováno do nástřikové smyčky, izokratická eluce v HBS pufru byla provedena při průtoku 1 ml/min.

#### **4.1.20 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu**

Pro vizualizaci jednotlivých frakcí z analytických nástřiků byl použit 15ti jamkový 10 % polyakrylamidový gel se zaostřovací a rozdělovací částí. Gel byl připraven dle rozpisu uvedeného v Tabulce 4.2. K 10  $\mu\text{l}$  vzorku bylo přidáno vždy 2,5  $\mu\text{l}$  5 $\times$  koncentrovaného vzorkového pufru (redukujícího či neredukujícího), následně byl vzorek 5 min zahříván v termobloku při teplotě  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  a centrifugován 1 min při

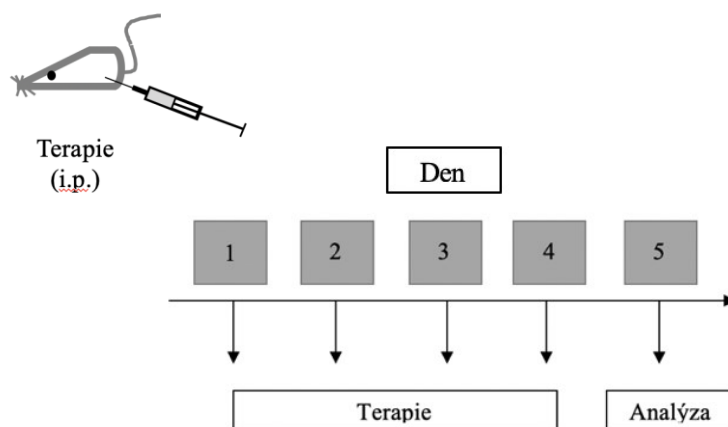
11000 × g. Do jamek gelu bylo pipetováno 5 µl příslušného vzorku dané frakce proteinu a standard molekulových hmotností (Spectra br multicolor protein ladder). Elektroforéza probíhala přibližně 40 min při napětí 200 V. Po skončení elektroforézy byl gel vyjmut z držáků, obarven a odbarven roztoky pro barvení, resp. odbarvování gelů z SDS-PAGE, vyfocen a uchován v deionizované vodě.

**Tabulka 4.2:** Příprava gelů pro SDS polyakrylamidovou elektroforézu.

	Množství pro 10 % rozdělovací gel (µl)	Množství pro zaostřovací gel (µl)
dH <sub>2</sub> O	1600	700
30 % AA	1330	250
Tris (pH 8,8)	1000	-
Tris (pH 6,8)	-	125
10 % SDS	40	10
10 % APS	40	10
TEMED	2	1,5

## 4.2 Stanovení biologické aktivity (c) imunokomplexu IL-2/S4B6 a imunocytokinů S4B6 IC LN20

### 4.2.1 Přehled experimentu – EXP1



**Obrázek 4.1:** Schéma znázorňující časovou osu a úkony prováděné v dané dny. Terapie byla aplikována první až čtvrtý den, analýza proběhla pátý den 24 hod po aplikaci poslední dávky terapeutik.

Tento experiment měl za úkol sledovat vliv komerčního imunokomplexu mIL-2/S4B6 a již dříve purifikovaného imunocytokinů S4B6 IC LN20 na expanzi

efektorových a regulačních T buněk a NK buněk v biologických modelech. Experimenty byly prováděny na myších inbredního kmene C57BL/6 (CCP, ÚMG AV ČR), konkrétně na samcích 8–14 týdnů starých. Myši byly chovány v SPF (Specific Patogen Free) podmínkách, krmeny standardní dietou bez omezení pitného režimu. Byly dodrženy všechny podmínky pro šetrné zacházení s pokusnými zvířaty vyžadované zákonem a v souladu se schváleným projektem pokusů opravňujícím k jeho provedení.

Nejprve byly myši zváženy ve zvěřinci na přestýlací jednotce v digestoři za pomoci digitálních vah. Každá myš byla označena v oblasti ušních boltců (kombinace drobných perforací) za pomoci značkovacích kleští a jejich váha pečlivě zaznamenána do tabulky. Dle váhy byly myši rozřazeny do homogenních skupin jedinců s podobnou hmotností. Myši byly rozděleny do 3 skupin po 3 jedincích, celá skupina tedy čítala 9 myší. Každé skupině byla přidělena terapeutikum, buď IL-2/S4B6 nebo S4B6 IC LN20, které jim bylo po 4 dny aplikováno. Kontrolní skupina byla ponechána bez terapie. Pátý den proběhla pitva sleziny a měření imunitních buněk na průtokovém cytometru (Obr. 4.1, Tab. 4.3).

**Tabulka 4.3: Schéma rozřazení myší do skupin a příslušná terapie.** Každá skupina byla tvořena 3 myšmi, kterým byly v rámci experimentu aplikovány imunokomplexy či imunocytokiny. Experiment zahrnoval také kontrolní skupinu, která byla ponechána bez terapie, c – imunokomplex byl připraven z komerčně dostupných reagensů. Množství imunocytokinu (8,20 µg) odpovídá množství IL-2 a mAb v imunokomplexu.

Terapie	Protein [µg]	Myš	Skupina
Kontrola (Naive)	-	1, 2, 3	1
IL-2/S4B6 (c)	4 × 1,50 µg IL-2	4, 5, 6	2
S4B6 IC LN20	8,20 µg	7, 8, 9	3

#### 4.2.2 Příprava terapeutik k aplikaci biologickým modelům

Vzorky byly rozmrazeny a centrifugovány 2 min při 12000 × g. Supernatant byl v laminárním boxu sterilně převeden do nových zkumavek tak, aby nedošlo k nasátí pelety agregovaného proteinu a poté byly vzorky proměřeny na spektrofotometru. Ze zjištěné absorbance, měřené při 280 nm, známé molekulární hmotnosti a extinkčního koeficientu proteinu byla dopočítána koncentrace proteinu ve vzorku. Koncentrace daných substancí byla zohledněna při výpočtu ředění jednotlivých terapeutických dávek, zohledněna byla také průměrná váha myší v konkrétní skupině.

Vzorky k terapii myším modelům byly připravovány vždy čerstvé v den aplikace tak, aby pro jednu skupinu 3 myši vycházel objem na 3 a ½ dávky. Ředění znázorňuje tabulka 4.4. V laminárním boxu se do 1,5 ml mikrozkušavek pipetovaly příslušné objemy daných substancí a poté byly doplněny PBS. U tvorby komplexu komerčního mIL-2 a S4B6 (IL-2/S4B6) vždy doplnění PBS předcházela 15 min inkubace S4B6 s mIL-2, aby komplexace řádně proběhla.

**Tabulka 4.4: Schéma ředění terapeutik.** První řádek odpovídá výsledné substanci a její koncentraci, každá byla pipetována do samostatné zkumavky (celkem 2). Sloupce vyobrazují substance a jejich objemy, které připadnou na příslušnou zkumavku. Pipetované substance jsou uváděny v  $\mu\text{l}$ , c – imunokomplex byl připraven z komerčně dostupných reagentů. Uváděné objemy odpovídají 3 a ½ dávky. Na jednu dávku potom připadne 1,5  $\mu\text{g}$  IL-2.

	Koncentrace [g/l]	S4B6 IC LN20 [ $\mu\text{l}$ ]	IL-2/S4B6 (c) [ $\mu\text{l}$ ]
S4B6 IC_LN20	0,50	59,00	
mIL-2 (c)	0,10		59,12
S4B6 mAb	8,98		2,77
PBS	-	816,00	813,00

Na podané dávky jednotlivých proteinů v rámci experimentu odkazuje tabulka 4.3. Ředění bylo prováděno tak, aby jak v imunokomplexu, tak v imunocytokinu připadlo 1,5  $\mu\text{g}$  IL-2 na 1 dávku.

#### 4.2.3 Aplikace substancí myším modelům

Aby se zamezilo styku zvířat s jakýmkoli cizorodými antigeny (patogeny), vstupovalo se do zvěřince vždy v čistém oblečení přes vzduchovou sprchu a veškeré pomůcky vnášené do chovu byly řádně vydesinfikovány. Dle příslušných skupin bylo myším aplikováno intraperitoneálně (i.p.) 250  $\mu\text{l}$  terapeutických substancí injekční stříkačkou. Myš byla uchopena za kůži v oblasti týlu a přidržována za ocas. Aplikace probíhala i.p., kůže byla před aplikací ošetřena desinfekčním přípravkem. Následně byla myš vrácena zpět do klece. Takto probíhala terapie 4 dny, látky byly vždy čerstvě namíchány v den užití a myši byly pokaždé zváženy na digitálních vahách a hodnoty zaznamenány do tabulek.



#### 4.2.4 Odběr sleziny a příprava buněk pro průtokovou cytometrii

Pátý den experimentu (24 hodin po aplikaci poslední dávky imunokomplexu nebo imunocytokinů) byly myši naposledy zváženy a poté usmrčeny cervikální dislokací. Před zahájením pitvy byly připraveny 2 sady zkumavek po 9 kusech označených tak, aby číslo na zkumavce odpovídalo jedné konkrétní myši. První sada tvořila 50 ml zkumavky, druhá sada čítala 9 kusů 1,5 ml mikrozkušavek.

Na pitevní podložce byla myším modelům odebrána slezina, která byla přenesena na Petriho misku do 70  $\mu\text{m}$  buněčného sítko, doplněna o 2 ml FACS roztoku a homogenizována. Po důkladném rozmělnění bylo sítko i s materiálem přeneseno na 50 ml zkumavku, obsah Petriho misky převeden na buněčné sítko a po volném přefiltrování bylo sítko omyto 1 ml čistého FACS roztoku.

Zkumavky byly centrifugovány 5 min při  $300 \times g$ . Poté byl supernatant opatrně odstraněn, peleta zůstala zachována ve zkumavce. Peleta byla dále resuspendována 3 ml lyzačního pufru ACK a roztok byl 10 min inkubován při pokojové teplotě. Poté bylo do zkumavky přidáno 30 ml FACS roztoku (obsah byl  $10\times$  naředěn), čímž byl proces lýzy zastaven.

Zkumavky byly následně centrifugovány při stejném programu jako v předchozím případě, supernatant odstraněn a peleta resuspendována 1 ml FACS roztoku. Obsah zkumavky byl převeden přes 30  $\mu\text{m}$  buněčné sítko do 1,5 ml mikrozkušavky. Tyto zkumavky nesly označení odpovídající předchozím zkumavkám s větším objemem. Následovala centrifugace 5 min při  $300 \times g$  v centrifuze předchlazené na 4 °C. Supernatant byl opět odstraněn a peleta resuspendována 1 ml FACS roztoku. Následující postupy byly již prováděny na ledu.

Jednotlivé vzorky byly pipetovány do příslušných jamek na 96ti jamkové destičce s jamkami tvaru V. Schéma pipetování odpovídá Obr. 4.2, str. 51. Vzorků od myších kontrol (1 – 3) bylo pipetováno 80  $\mu\text{l}$ , ostatních 6 vzorků bylo pipetováno v objemu 20  $\mu\text{l}$  na jamku. Směsného vzorku tzn. čisté kontroly bylo pipetováno 100  $\mu\text{l}$ , ostatních směsných vzorků pro kontrolu navázání protilátek s fluorochromy bylo pipetováno po 25  $\mu\text{l}$ . Směsný vzorek vznikl smísením 150  $\mu\text{l}$  vzorku od každé kontrolní myši, tedy 450  $\mu\text{l}$  celkem. Destička byla centrifugována 4 min při  $300 \times g$  a 4 °C, supernatant byl vyklepnut. Destička byla osušena pomocí připravené papírové utěrky a následně byl do jamek přidán

mix příslušných protilátek s fluorochromy, vždy po 10 µl/vzorek. Náhled na schéma značení zobrazuje tabulka 4.5.

**Tabulka 4.5:** Přehled značení povrchových a vnitřních (intra) molekul T efektorových (Teff), T regulačních (Treg) a NK a  $\gamma\delta$ -T buněk fluorochromy (Fluoro) pro průtokovou cytometrii.

<b>Teff</b>	CD molekula	Fluoro	<b>Treg</b>	CD molekula	Fluoro	<b>NK + <math>\gamma\delta</math></b>	CD molekula	Fluoro
	CD3	pe-cy7		CD3	ef450		CD3	V500
	CD8	V500		CD4	PerCP		DX5	PE
	CD4	PerCp		CD25	APC		NK1.1	APC
	CD44	APC		PD1	FITC		PD1	FITC
	CD122	PE		CD8	V500		$\gamma\delta$	ef450
	PD1	FITC		FVD	ef780		FVD	ef780
	CD62L	ef450	intra	Ki67	A700	intra	Ki67	A700
	FVD	ef780	intra	FoxP3	PE			
intra	Ki67	A700						

Inkubace protilátek probíhala 30 min bez přístupu světla na ledu. Po inkubaci byly jamky promyty 200 µl FACS roztoku a centrifugovány na stejný program jako v předchozím případě, promytí se opakovalo celkem dvakrát. K fixaci bylo využito 100 µl Fix/Perm roztoku z komerční sady pro značení Foxp3 transkripčního faktoru (eBioscience Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set), inkubace trvala 30 min za stejných podmínek jako předchozí. K následnému promytí bylo použito 100 µl pufru Perm/Wash z totožné komerční sady. Destička byla odstředěna na totožný program, supernatant byl vyklepnut a promytí bylo zopakováno s 200 µl Perm/Wash pufru. Po promytí bylo do příslušných jamek pipetováno 100 µl směsi protilátek pro intracelulární barvení (mAb naředěny v Perm/Wash pufru) s inkubací 30 minut, opět na ledu a bez přístupu světla. Jako dříve následovalo promytí Perm/Wash puftrem nejdříve 100 µl a poté 200 µl. K finálním peletkám buněk bylo pipetováno 200 µl FACS roztoku, jamky resuspendovány a dle stejného schématu přeneseny na 96ti jamkovou destičku s jamkami ve tvaru U. Tento tvar je vhodnější pro měření vzorků na HTS (high-throughput sampler) jednotce průtokového cytometru BD Fortessa. Takto byla destička se vzorky připravena ke zpracování na průtokovém cytometru.

#### 4.2.5 Počítání buněk

K počítání buněk v jednotlivých vzorcích myších splenocytů byla využita automatická počítáčka buněk EVE (NanoEntek). Buňky musely být 100× naředěny FACS roztokem k dosažení vhodné koncentrace pro měření na tomto přístroji založeném na snímání CCD kamerou. Příliš hustý vzorek není možné analyzovat, respektive je výrazně snížena přesnost získaných hodnot. 10 µl suspenze buněk bylo pipetováno do mikrozkušavky a doplněno 990 µl FACS roztoku. Z této suspenze bylo pipetováno do další zkumavky 10 µl suspenze s přidáním 10 µl trypanové modři. Roztok byl pipetován na speciální skličko a vyhodnocen programem přístroje.

#### 4.2.6 Průtoková cytometrie

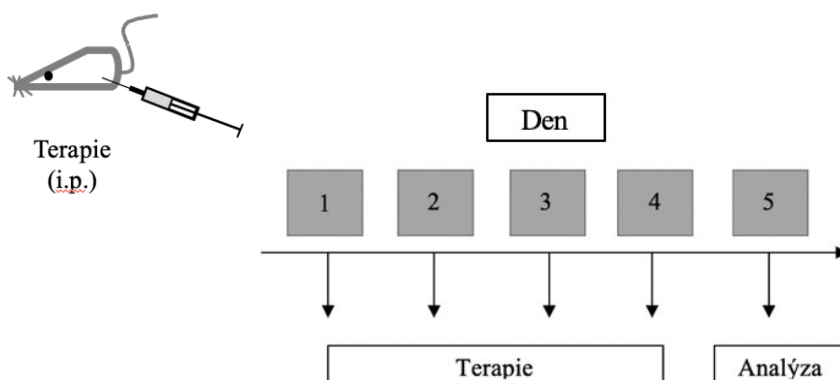
Analýza (200000 živých lymfocytů/singletů) byla provedena podle strategie uvedené níže (Obr. 4.2, str. 51) za použití programu BD FACS Diva. Jako kontrola pro nastavení parametrů přístroje byly použity zcela čisté (nebarvené) buňky a jednobarevné kontroly, tj. buňky inkubované vždy pouze s jedinou zvolenou protilátkou značenou daným fluorochromem. Vyhodnocení dat z průtokového cytometru bylo provedeno pomocí program FlowJo X.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	čisté buňky	SS											
B	Teff	Kontroly		Teff	S4B6/mIL-2		Teff	S4B6/mIL-2 IC LN20					
C													
D	Treg	Kontroly		Treg	S4B6/mIL-2		Treg	S4B6/mIL-2 IC LN20					
E													
F	NK+γδ	Kontroly		NK+γδ	S4B6/mIL-2		NK+γδ	S4B6/mIL-2 IC LN20					
G													
H													

**Obrázek 4.2: Rozložení vzorků pro FACS analýzu na 96ti jamkové destičce.** Jamka A1 odpovídá neznačeným buňkám, které sloužily jako negativní kontrola. Do jamek A2 – A10 byly pipetovány buňky značené pouze jednou protilátkou s fluorochromem (tzv. „single-stain“, SS). V sektoru označeném Teff odpovídala jedna jamka jednomu vzorku konkrétní myši s příslušným značením pro dané Teff buňky (viz tabulka 4.5, str. 49). U sektorů Treg a NK + γδ byl princip obdobný.

### 4.3 Stanovení biologické aktivity imunocytokinů S4B6 IC LN35

#### 4.3.1 Přehled experimentu – EXP2



**Obrázek 4.3:** Schéma znázorňující časovou osu a úkony prováděné v dané dny. Terapie byla aplikována první až čtvrtý den, analýza proběhla pátý den 24 hod po aplikaci poslední dávky terapeutik.

Tato studie probíhala za stejných podmínek jako studie předchozí (viz kapitola 4.2). Rozdílem bylo, že nyní se pracovalo se 4 skupinami myší po 3 jedincích, celkově tedy s 12 experimentálními zvířaty. Jednalo se opět o samce inbredního kmene C57BL/6 (CCP, ÚMG AV ČR) staré 8 – 14 týdnů, chované v SPF podmínkách. Myšim bylo po 4 dny aplikováno 250  $\mu$ l totožných substancí jako v předchozím experimentu (viz Tab. 4.3), nyní navíc s imunocytokinem se spojkou prodlouženou na 35 aminokyselin (S4B6 IC LN35), který byl vyráběn a purifikován dle postupu popsáno v kapitole 4.1.

#### 4.3.2 Příprava terapeutik k aplikaci biologickým modelům

Rozřazení myší do skupin je popsáno v tabulce 4.6; příprava léčiv probíhala v laminárním boxu dle tabulky 4.7. Obsah jednotlivých složek byl dopočítán z naměřených koncentrací proteinů ve vzorcích a průměrných vah konkrétních skupin myší. Při tvorbě komplexu mIL-2/S4B6 předcházela doplnění PBS 15 min inkubace protilátky S4B6 mAb s mIL-2.

**Tabulka 4.6: Rozřazení myši do skupin a příslušná terapie.** Každá skupina byla tvořena 3 myšmi, kterým byly v rámci experimentu aplikovány imunokomplexy anebo imunocytokiny. Experiment zahrnoval také negativní kontrolu (Skupina 1), které byly ponechány bez terapie, c – imunokomplex byl připraven z komerčně dostupných reagensií. Množství proteinu imunocytokinu (pro LN20 8,20 µg, pro LN35 8,10 µg) odpovídá množství IL-2 a mAb v imunokomplexu.

Terapie	Protein	Myš	Skupina
Kontrola (Naive)	-	1, 2, 3	1
IL-2/S4B6 (c)	4 × 1,5 µg IL-2	4, 5, 6	2
S4B6 IC LN20	8,20 µg	7, 8, 9	3
S4B6 IC LN35	8,10 µg	10, 11, 12	4

**Tabulka 4.7: Schéma ředění terapeutik.** První řádek odpovídá výsledné substanci a její koncentraci, každá byla pipetována do samostatné zkumavky (celkem 2). Sloupce vyobrazují substance a jejich objemy, které případnou na příslušnou zkumavku. Pipetované substance jsou uváděny v µl, c – imunokomplex byl připraven z komerčně dostupných reagensií. Uváděné objemy odpovídají 3 a ½ dávky. Na jednu dávku potom připadne 1,5 µg IL-2.

	Koncentrace [g/l]	S4B6 IC LN35 [µl]	S4B6 IC LN20 [µl]	IL-2/S4B6 (c) [µl]
S4B6IC LN35	3,82	10,11		
S4B6IC LN20	2,62		14,31	
mIL-2 (c)	0,10			68,25
S4B6 mAb	5,20			5,52
PBS	-	865	861,00	801,00

### 4.3.3 Odběr sleziny a příprava buněk

Zpracování vzorků se neliší od předchozího experimentu (kapitola 4.2.4), nyní jen stručné shrnutí. C57BL/6 myši byly usmrceny cervikální dislokací 24 h po aplikaci poslední dávky zvoleného imunokomplexu nebo imunocytokinů a následně jim byla odebrána slezina. Jednotlivé sleziny byly homogenizovány a byla připravena buněčná suspenze splenocytů za pomoci disociátoru GentleMACS Octo, zvolený program se nazýval m\_spleen\_01. Splenocyty byly centrifugovány při 300 × g, 5 min, 20 °C, přečezeny přes 70 µm buněčná síťka pro 50 ml kyvety a resuspendovány v 3 ml ACK lyzačního roztoku. Po 10 min inkubaci při 20 °C byly buňky zality 30 ml FACS roztoku a opětovně centrifugovány. Po odstranění supernatantu byly pelety splenocytů znovu

resuspendovány v 1 ml FACS roztoku, filtrovány přes 30 µm buněčná sítko pro 15 ml kyvety a mikrozkuřavky a umístěny na led.

#### 4.3.4 Počítání buněk a průtoková cytometrie

Buňky byly odstředěny 5 min při 300 × g, 4 °C, promyty 1 ml FACS roztoku a spočítány. Do 96ti jamkové destičky s jamkami do tvaru V bylo do zvolených jamek pipetováno 10<sup>6</sup> buněk ve 100 µl FACS roztoku a destička byla poté centrifugována 4 min při 300 × g, 4 °C. Následně bylo ke každé peletě buněk přidáno 10 µl mixu protilátek pro značení povrchových znaků v FACS roztoku (viz tabulka 4.5). Po inkubaci 30 min na ledu a bez přístupu světla byly buňky opět dvakrát promyty 200 µl FACS roztoku, odstředěny a bylo k nim přidáno 100 µl Fix/Perm roztoku. Po inkubaci 30 min na ledu bez přístupu světla byly buňky promyty nejdříve 100 µl a poté 200 µl Perm/Wash pufrem. Dále byl přidán mix protilátek pro značení intracelulárních znaků v 100 µl PERM roztoku. Po inkubaci 30 min na ledu bez přístupu světla byly buňky dvakrát promyty (nejdříve 100 µl a poté 200 µl) Perm/Wash roztokem, centrifugovány a nakonec resuspendovány v 200 µl FACS roztoku, přeneseny do 96-jamkové destičky s jamkami do U a do 1 hod analyzovány na průtokovém cytometru.

Analýza (200000 živých lymfocytů/singletů) byly provedena podle strategie uvedené níže (Obr. 4.4, str. 54) za použití programu BD FACS Diva. Jako kontrola pro nastavení parametrů přístroje byly použity zcela čisté (nebarvené) buňky a jednobarevné kontroly, tj. buňky inkubované vždy pouze s jedinou zvolenou protilátkou značenou fluorochromem. Vyhodnocení dat z průtokového cytometru bylo provedeno pomocí programu FlowJo X.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	čisté buňky					SS						
B	Teff	Kontroly		Teff	S4B6/mIL-2		Teff	S4B6/mIL-2 IC LN20		Teff	S4B6/mIL-2 IC LN35	
C												
D	Treg	Kontroly		Treg	S4B6/mIL-2		Treg	S4B6/mIL-2 IC LN20		Treg	S4B6/mIL-2 IC LN35	
E												
F	NK+yd	Kontroly		NK+yd	S4B6/mIL-2		NK+yd	S4B6/mIL-2 IC LN20		NK+yd	S4B6/mIL-2 IC LN35	
G												
H												

**Obrázek 4.4: Rozložení vzorků pro FACS analýzu na 96ti jamkové destičce.** Jamka A1 je tvořena směsným vzorkem neznačených buněk. SS (tzv. „single-stain“) jsou buňky značené pouze jedním fluorochromem – kompenzace. Barevné sektory znázorňují rozložení vzorků dle značených skupin hledaných buněk.

## 5 Výsledky

### 5.1 Produkce imunocytokinů S4B6 IC LN35

#### 5.1.1 Konstrukty lehkého a těžkého řetězce S4B6IC a plazmid pUT7

Návrh konstruktů byl zvolen dle dřívější úspěšné produkce imunocytokinů S4B6IC LN20\_light Bc. Dominikou Rožovou [103], kde uspořádání genů v plazmidu bylo stejné, pouze aminokyselinová glycin-serinová spojka nesoucí mIL-2 byla o 15 aminokyselin kratší než v této práci (LN20 místo nynějšího LN35). Pro expresi byly zvoleny konstrukty L1 a H2 s následující aminokyselinovou sekvencí:

#### L1: mIL-2-LN35-S4B6-LC

```
ITGAPSSSTSSSTAEAQQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRL  
TFKFYLPKQATELKDLCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLK  
GSDNTFECQFDDESATVVDFLRRWIAFCQSIHSTSPQGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG  
GGGGSGGGGSGGGGSDIQVTQSPASLSASLEEIVTITCQASQDIGNYLSWYQQKLGKSP  
QLLIHSATSLADGVPSRFSGSRSGTQYSLKINRLQVEDTGIYYCLQHYSTPYTFGAGT  
KLELKRADAAPTVSIFPPSTEQLATGGASVVCLMNNFYDPDISVKWKIDGTERRDGVL  
DSVTDQDSKDYSTYSMSSTLSLT KADYESHNLYTCEVVHKTSSSPVVKSFNRNEC*
```

**Obrázek 5.1:** Aminokyselinová sekvence konstruktů L1. Počáteční černý úsek znázorňuje zbytek sekrečního signálu a zbytek po štěpení restriční endonukleázou. Zeleně je označena sekvence mIL-2. Modře je vyznačena sekvence GS spojky (linker LN35) a červeně lehký řetězec protilátky S4B6.

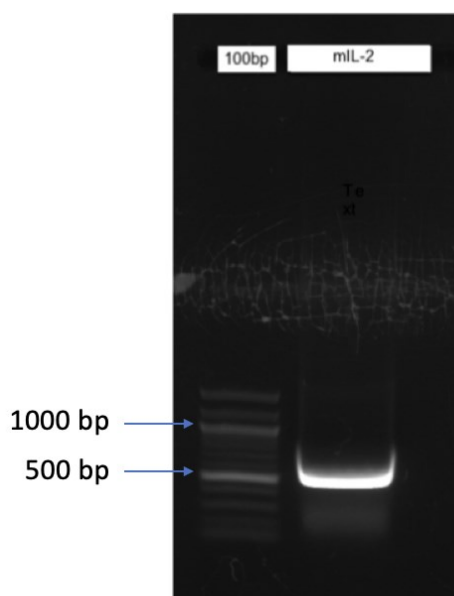
#### H2: S4B6-HC-His

```
ITGEVQLQESGAELVRPGTSVKLSCKVSGDTITAYYLHFVRQRPQGGLWIGRI  
DPEDDSTKYAENFKNKATFTADASSNTAYLRLSSLTSEDATYFCTTVTFYYSR  
ELRWFAYWGQGLTVTVSSAETTAPSVYPLAPGTALKSNMVTLGCLVKGYFPE  
PVTVTWNSGALSSGVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTVPSSWSSQAVTCNVAHPAS  
STKVDKIVPRECNPCGCTGSEVSSVFIFPPKTKDVLITLTPKVTVCVVVDISQND  
PEVRFSWFIDDEVHTAQTHAPEKQSNSTLRSVSELPIVHRDWLNGKTFKCKVN  
SGAFPAPIEKSIKPEGTPRGPQVYTMAPPKEEMTQSQVSITCMVKGFYPPDIYT  
EWKMNGQPQENYKNTPTMDTDGSYFLYSKLNVKKTWQQGNTFTCSVLHE  
GLHNHHTKSLSHSPGKGTTHHHHHHHHG *
```

**Obrázek 5.2:** Aminokyselinová sekvence konstruktů H2. Žlutý úsek znázorňuje aminokyselinovou sekvenci pro těžký řetězec protilátky, černě jsou označeny pozůstatky po štěpení restričními endonukleázami. Fialově je označena histidinová kotva, která byla do sekvence vložena pro snazší purifikaci proteinu.

Jako výchozí plazmid zde byl použit pUT7\_LN20\_L2, na kterém pracovala Bc. Dominika Rožová [103]. Z tohoto plazmidu byla pomocí PCR za použití oligonukleotidů pCT5K\_FW a IL2\_merge\_REV amplifikována oblast s genem pro mIL-2. PCR produkt byl následně vizualizován agarosovou elektroforézou (Obr. 5.3). Druhá část genu pro lehký řetězec fúzní protilátky S4B6\_LN35\_light (linker LN35 + lehký řetězec) byla syntetizována komerčně. Uspořádání v plazmidu viz Obr. 5.4, str. 57.

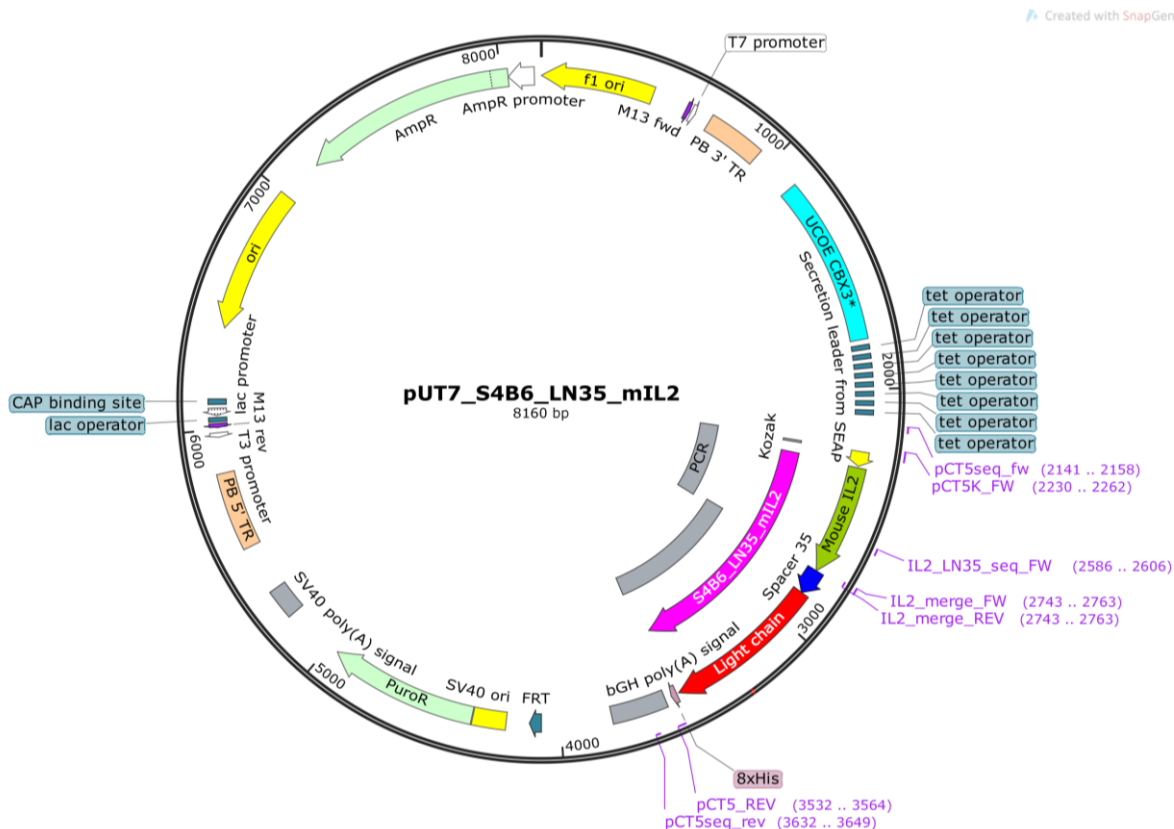
Plazmid pUT7 byl linearizován restrikcí endonukleázami, aby do něj mohl být vnesen gen pro lehký řetězec protilátky S4B6 spojený 35ti aminokyselinovou GS spojkou



**Obrázek 5.3: Agarosová elektroforéza amplifikovaného mIL-2.** V první dráze se nachází 100 bp standard, ve druhé dráze amplifikovaný mIL-2 o velikosti 534 bp, přímý primer byl pCT5K\_FW, zpětný primer IL2\_merge\_REV.

s mIL-2. Vyznačené oligonukleotidy mají navíc schopnost amplifikovat jednotlivé úseky genu tak, aby vznikly přesahy pro následující tzv. „overlap-extension“ PCR, kdy dojde ke spojení obou DNA fragmentů. Takovýmto plazmidem dále byly transformovány bakterie *E. coli* TOP10 a následně DH5 $\alpha$ .





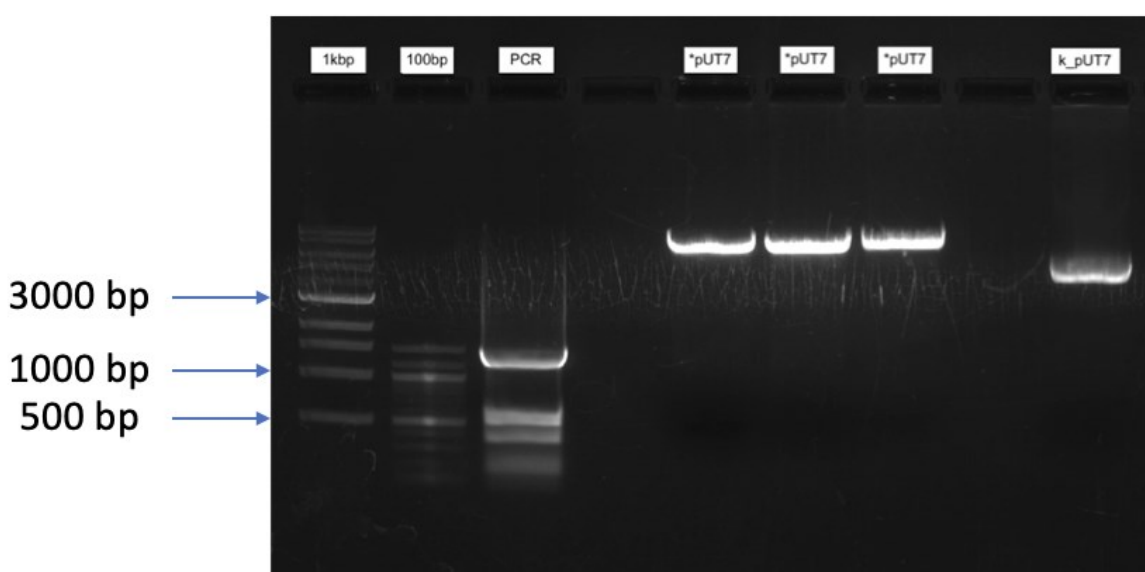
**Obrázek 5.4: Plazmid pUT7\_S4B6/mIL-2\_LN35.** Plazmid pUT7 nesoucí oblast genů pro myší interleukin 2 (mIL-2) (zeleně), glycin-serinovou spojku dlouhou 35 aminokyselin (modře) a lehký řetězec protilátky (červeně). Vhodný pro transformaci bakterií a transfekci savčích buněčných linií. Úsek označený PCR pro mIL-2 byl amplifikován v laboratoři, zbylá část genu (linker + lehký řetězec) byla syntetizována komerčně.

### 5.1.2 Příprava inzertu DNA

Viz kapitola 4.1.1, po extrakci PCR produktu (pro DNA nesoucí gen pro mIL-2) z gelu byla změřena koncentrace DNA na spektrofotometru 62 ng/μl, do reakce tedy pro 50 ng DNA bylo přidáno 0,8 μl produktu. Komerčně syntetizovaný konstrukt byl dodán v koncentraci 1100 ng/μl, pro pracovní koncentraci 100 ng/μl byl naředěn 11 μl PCR H<sub>2</sub>O, do PCR reakce pro 50 ng DNA bylo přidáno 0,5 μl směsi. Výsledek „overlap-extension“ PCR, gen pro mIL-2/S4B6\_LN35\_light, byl vizualizován na agarosové elektroforéze (Obr. 5.5). Tento gen byl následně přenesen do plazmidu pUT7 s pomocí InFusion reakce. Vnesení genu do plazmidu zprostředkovaly nukleotidové přesahy na obou koncích inzertu, které byly na inzert zaneseny pomocí zmíněných oligonukleotidů.

### 5.1.3 Štěpení plazmidu pUT7

Plazmid pUT7 byl štěpen pomocí restričních endonukleáz NheI a PmeI, aby do něj mohl být vložen gen získaný z PCR reakce v předchozím kroku. Plazmid slouží jako vektor nesoucí genetickou informaci dále do bakterií, které jím budou transformovány, ale především do výsledného hostitelského organismu, resp. buněčné linie, zamýšlené k produkci kóženého proteinu, v našem případě tedy buněčné linie HEK293T. Aby byla linearizace plazmidu potvrzena, byla provedena agarosová elektroforéza (Obr. 5.5). Kontrola úspěšné linearizace zde byla zajištěna pomocí neštěpeného plazmidu k\_pUT7 přidaného do poslední dráhy elektroforézy.



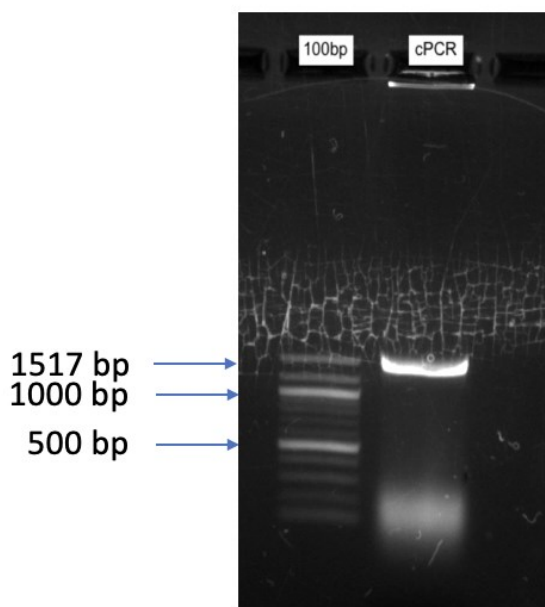
**Obrázek 5.5: Elektroforéza výsledků štěpení plazmidu a „overlap-extension“ PCR S4B6/mIL-2\_LN35\_light.** V první pozici zleva se nachází 1 kb standard, v následující jamce 100 bp standard. Třetí jamka odpovídá lehkému řetězci fúzní protilátky s navázanou myší protilátkou mIL-2/S4B6\_LN35\_light (PCR) o velikosti 1335 bp, byly zde použity oligonukleotidy pCT5K\_FW a pCT5\_REV. Následující tři pozice odpovídají štěpenému plazmidu pUT7 (\*pUT7). V poslední dráze je kontrolní neštěpený plazmid pUT7 (k\_pUT7).

Po kontrole elektroforézou byly produkty extrahovány z gelu metodou popsanou v kapitole 4.1.1 a dále použity v InFusion reakci. Jejich koncentrace byla změřena na spektrofotometru:

- štěpený plazmid pUT7: 74,76 ng/μl
- DNA S4B6/mIL-2\_LN35\_light: 52,61 ng/μl

#### 5.1.4 Vnesení genu do linearizovaného plazmidu a produkce proteinu S4B6IC

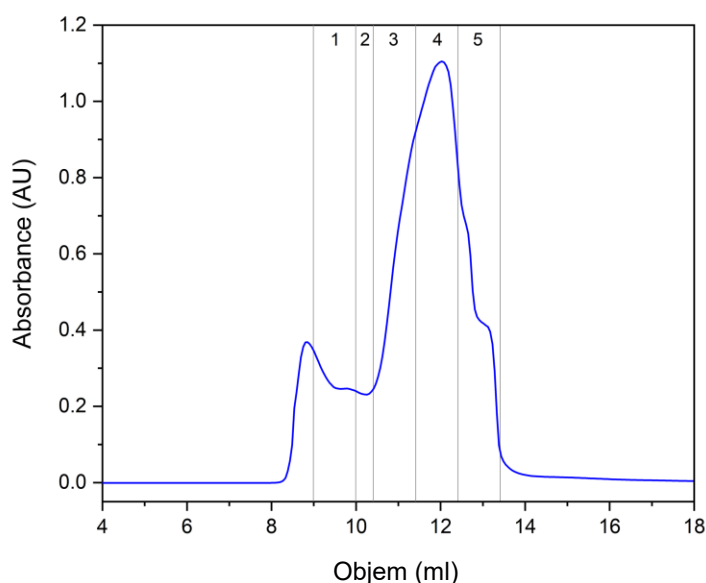
Pro vnesení inzertu do vektoru (plazmidu) sloužily 15 bp nukleotidové přesahy, které byly amplifikovány jako součást DNA získané z „overlap extension“ PCR pomocí zvolených oligonukleotidů. Po provedené InFusion reakci a následné transformaci byly bakterie *E. coli* TOP10 natřeny na agarovou plotnu s ampicilinem. Plazmid pUT7 jako součást své genetické informace obsahuje, mimo jiné, rezistenci na ampicilin, a tak v případě, že byla InFusion reakce i transformace bakterií úspěšná, mohly na plotně růst kolonie i pod selekcí tímto antibiotikem. Následovala PCR z kolonií (Obr. 5.6) pro ověření, zda byl gen skutečně vnesen do plazmidu. Následně byla provedena nízkobjemová produkce plazmidu, z něhož byly vytvořeny vzorky pro sekvenaci, následovaná transformací bakterií *E. coli* DH5 $\alpha$  a velkoobjemovou přípravou plazmidu. Koncentrace plazmidu před transformací bakterií byla změřena spektrofotometricky jako 1500 ng/ $\mu$ l. Konstrukt s prodlouženou spojkou byl použit pro ustavení stabilně transfekované buněčné linie HEK293T s použitím systému piggyBac, který umožňuje indukovatelnou expresi proteinu sekretovaného do produkčního média (viz kapitola 4.1.13), a následně byla provedena produkce proteinu v celkovém objemu 800 ml kultivačního média.



**Obrázek 5.6: PCR z kolonií.** V první jamce se nachází 100 bp standard, ve druhé dráze produkt PCR z kolonie (cPCR) nesoucí DNA plazmidu pUT7 s vloženým genem pro konstrukt mL-2/S4B6\_LN35 o velikosti 1509 bp. Pro reakci byly použity oligonukleotidy pCT5seq\_FW a pCT5seq\_REV.

### 5.1.5 Purifikace proteinu S4B6IC

Chelatační afinitní chromatografie byla provedena na koloně Ni-NTA ExCell, eluát z hlavní eluce byl zkoncentrován a nanesen na kolonu Superdex 200 Increase 10/300 GL (Obr. 5.7). Z preparativní gelové permeační chromatografie S4B6IC byly jímány označené frakce, kde svislé čáry znázorňují počátek a konec sbírání dané frakce, a následně byla stanovena koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích (Tab. 5.1). Celkový výtěžek činil přibližně 12,31 mg proteinu S4B6IC z 800 ml HEK293T buněčné kultury.

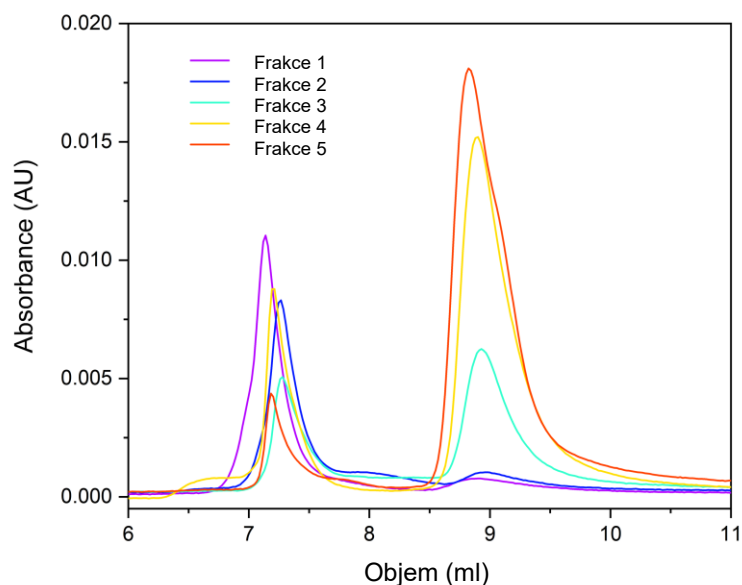


**Obrázek 5.7: Preparativní gelová permeační chromatografie konstruktů S4B6/mIL-2\_LN35\_light.** Chromatografie na koloně Superdex 200 Increase 10/300 GL, byly jímány označené frakce. Ze všech frakcí poté byly provedeny analytické nástřiky (viz Obr. 5.8).

**Tabulka 5.1: Koncentrace imunocytokinů S4B6/mIL-2\_LN35\_light.** Bylo sbíráno celkem pět frakcí. Koncentrace proteinu byla změřena spektrofotometricky.

Frakce	Koncentrace [mg/ml]
1	1,28
2	1,09
3	1,64
4	4,71
5	3,59

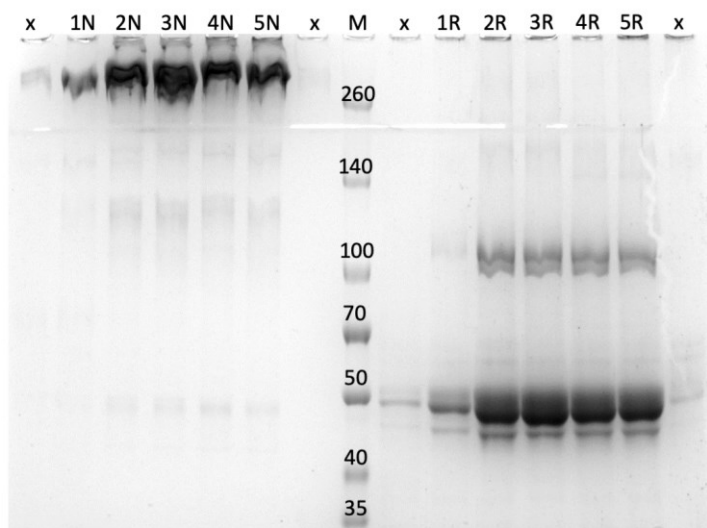
Z jednotlivých frakcí byly následně provedeny analytické nástřiky na vysokotlaké silikagelové koloně Biozen dSEC-2 (3  $\mu\text{m}$ ), která je vhodná pro posouzení rozsahu zastoupení agregovaných či oligomerních forem S4B6IC (Obr. 5.8). Pro testování biologické aktivity S4B6IC *in vivo* byly použity pouze frakce odpovídající monomeru celého S4B6IC (tj. disulfidický dimer sestávající ze dvou těžkých řetězců mAb S4B6 a k nim připojeným dvěma lehkým řetězcům mAb S4B6 ve fúzi s řetězcem mL-2\_LN35).



**Obrázek 5.8: Analytická gelová permeační chromatografie konstruktů S4B6/mL-2\_LN35\_light.** Chromatografie na koloně Biozen dSEC-2 (3  $\mu\text{m}$ ) byla provedena pro ověření zastoupení agregovaných či oligomerních forem S4B6IC.

Sbírané frakce byly dále vizualizovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 5.9). V neredukujícím prostředí bychom očekávali proužek okolo 190-200 kDa, nicméně v porovnání se standardem molekulových hmotností vykazuje S4B6IC poněkud abnormální mobilitu, patrně v důsledku přítomnosti N- i O-glykosylace. I přes to je vidět, že se protein ve frakcích nachází a nepozorujeme zde žádnou výraznou kontaminaci. Slabý proužek u 140 kDa v neredukujícím prostředí by mohl značit přítomnost imunocytokinů pouze s jedním lehkým řetězcem ve fúzi s mL-2. V redukující části gelu jsme očekávali proužek u 50 kDa odpovídající těžkému řetězci S4B6 mAb a dále u 43 kDa, který potvrzuje přítomnost lehkého řetězce s fúzním mL-2. Zdáni rozmytých proužků v oblasti 40-50 kDa s největší pravděpodobností značí přítomnost různých glykosylovaných forem těchto řetězců, což je v tomto případě známý jev. Proužky okolo

90-100 kDa mohou značit přítomnost dimerů těžkých řetězců či navázání jen jednoho lehkého a těžkého řetězce dohromady, za předpokladu nedostatečné redukce či denaturace těchto forem při přípravě vzorků pro SDS-PAGE.

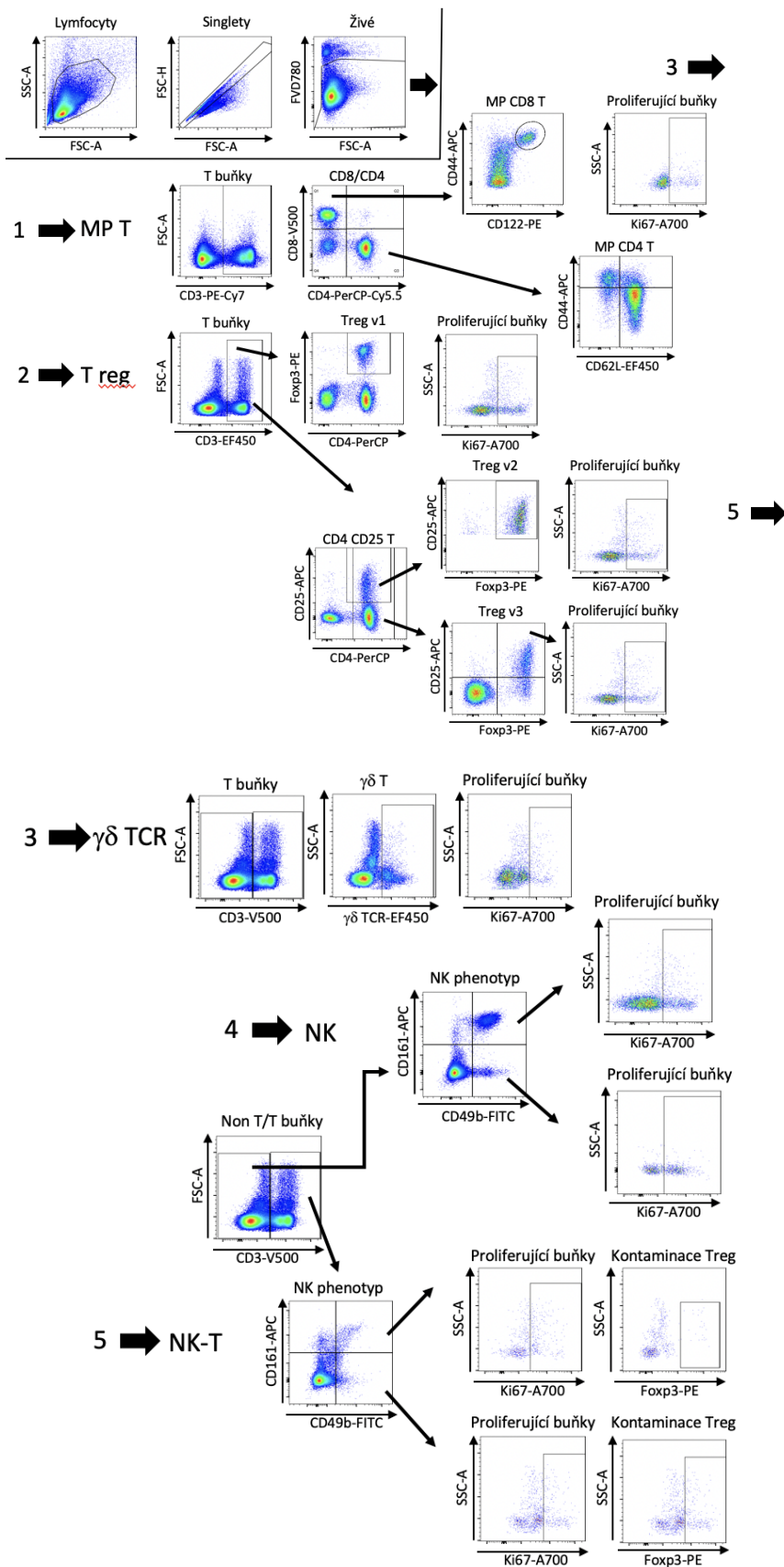


**Obrázek 5.9: SDS-PAGE konstruktů S4B6/mIL-2\_LN35\_light po gelové permeační chromatografii.** Dráhy odpovídají frakcím sbíraným při preparativní gelové permeační chromatografii (viz Obr. 5.7). N – neredukující, R – redukující prostředí. M – standard molekulových hmotností (kDa), x – frakce, které nebyly použity pro další experimenty. Předpokládané hmotnosti proteinu, resp. jednotlivých řetězců: S4B6/mIL-2\_LN35\_light 187,51 kDa v neredukujícím prostředí, mIL-2\_LN35\_S4B6 lehký řetězec 43,18 kDa a S4B6 těžký řetězec 50,60 kDa v redukujícím prostředí; ve všech případech je třeba uvažovat přítomnost N- i O-glykosylace dále zvyšující pozorovanou molekulovou hmotnost.

## 5.2 Stanovení biologické aktivity imunokomplexu IL-2/S4B6 (c) a imunocytokinů S4B6IC LN20 a S4B6IC LN35

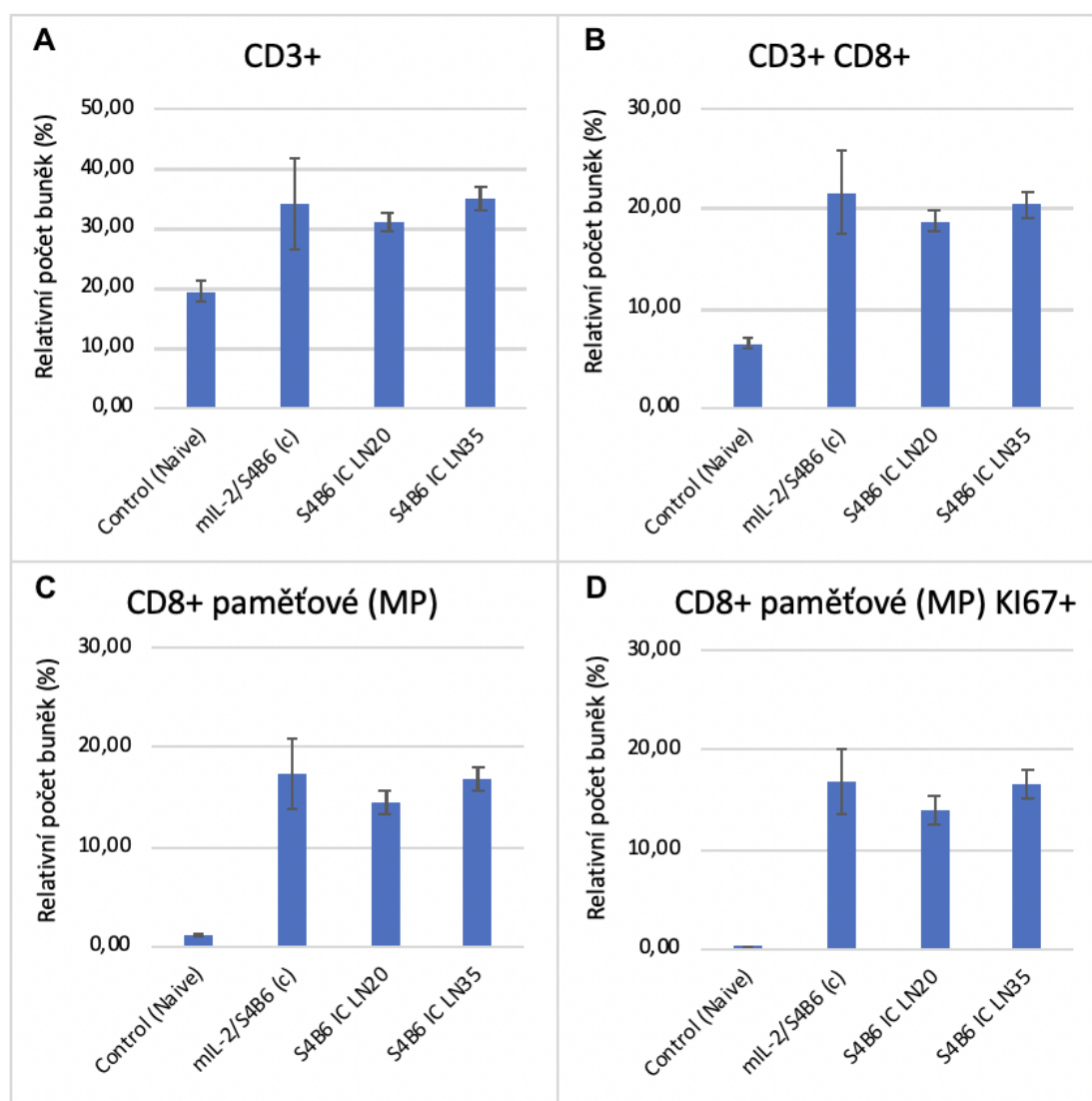
Kontrolní skupina myši byla ponechána bez terapie, ostatním myším byla podávána terapie dle Tab. 4.3 a 4.6. Značení jednotlivých povrchových a intracelulárních molekul odpovídá Tab. 4.5. Číselná data jsou vždy průměrem 3 vzorků ze 3 myši ve skupině. Procentuální zastoupení jsou uváděna v tzv. „Frequency of Total“, které vždy udává procento buněk v konkrétní populaci z celkového původního počtu všech buněk ve vzorku. Výsledky z *in vivo* experimentů EXP1 a EXP2 byly v podstatě shodné, uvádím proto pouze výsledky z EXP2 (postup viz kapitoly 4.2 a 4.3).

## 5.2.1 Strategie FACS analýzy buněčných populací



**Obrázek 5.10: Schéma strategie FACS analýzy buněčných populací.** Analýza myších splenocytů byla provedena průtokovou cytometrií (FACS). Analyzované buňky byly nejprve tříděny podle parametrů rozptylu světla (FSC-A a SSC-A) na lymfocyty a samostatné buňky (singlety, v rámečku, vlevo nahoře). Následně byly tyto buňky s pomocí komerčních fluorescenčně značených protilátek dále tříděny podle zvolených povrchových či intracelulárních znaků (viz kapitola 3.6 a Tab. 4.5), nejprve dle životnosti (FVD780 negativní) a poté na: 1) paměťové T buňky, 2) T regulační buňky, 3) gama-delta T buňky, 4) NK a 5) NK-T buňky. Výsledky analýzy jsou zobrazeny pomocí tzv. „pseudo-dot plot“ grafů dle vyhodnocení v programu FlowJo X.

## 5.2.2 CD8<sup>+</sup> T efektorové buňky



**Obrázek 5.11: Relativní počet CD8<sup>+</sup> T buněčných populací ve slezině.** (A) relativní počet T lymfocytů (CD3<sup>+</sup>), (B) relativní počet CD8<sup>+</sup> T lymfocytů, (C) relativní zastoupení CD8<sup>+</sup> paměťových T lymfocytů a (D) relativní počet aktivně proliferujících CD8<sup>+</sup> paměťových T lymfocytů. Všechny hodnoty jsou vyjádřeny v parametru „Frequency of



Total“ s vyjádřenou směrodatnou odchylkou. Počet vzorků ve skupině byl roven třem. Hodnoceno v programu FlowJo X dle strategie znázorněné na Obr. 5.10.

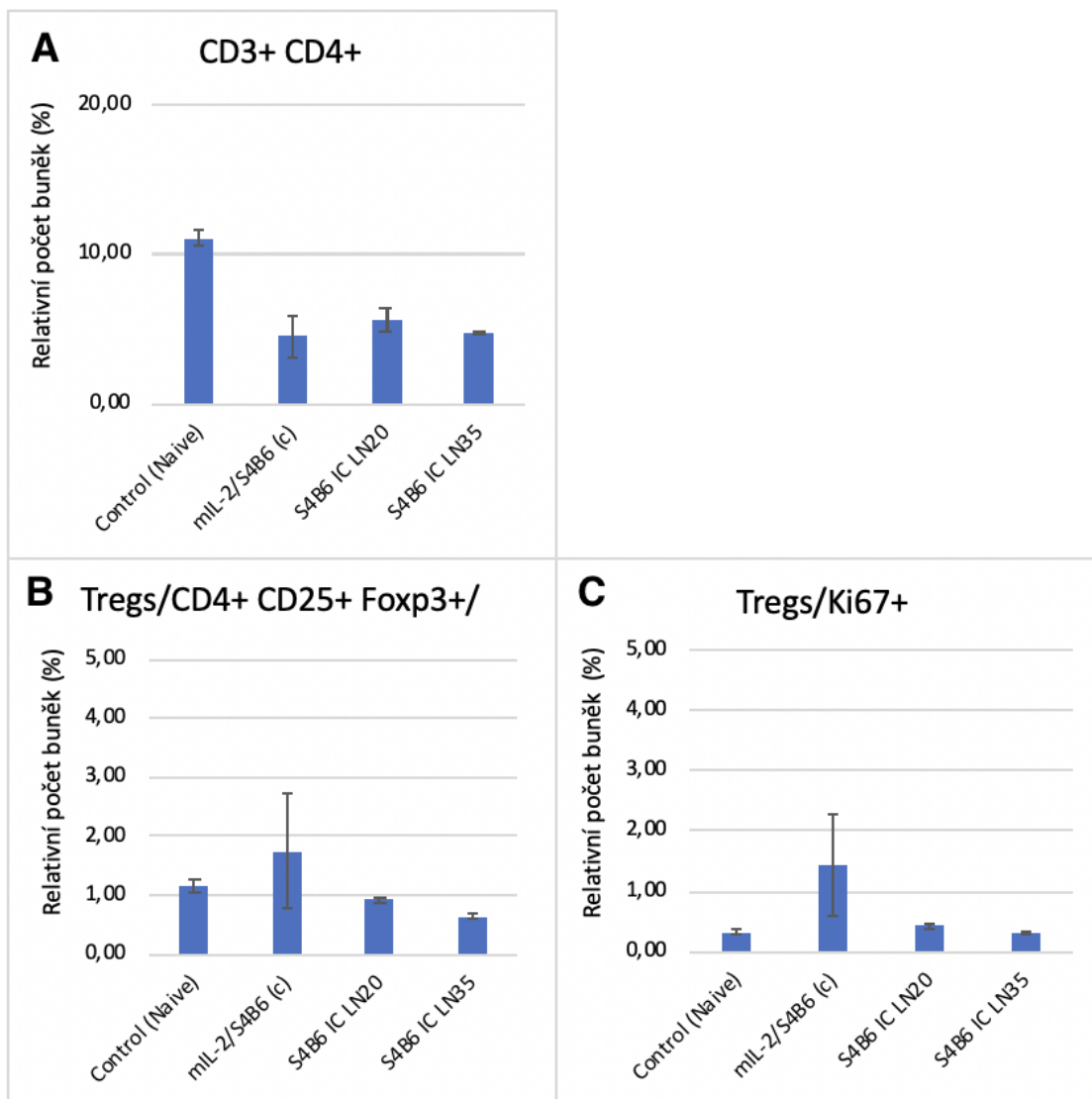
**Tabulka 5.2: Relativní zastoupení Teff lymfocytů.** Číselné výsledky FACS analýzy zobrazené na Obr. 5.11.

Měřená buněčná populace	Skupina myši	Relativní počet buněk (%)
CD3 <sup>+</sup>	Control (Naive)	19,50
	mIL-2/S4B6 (c)	34,13
	S4B6 IC LN20	31,07
	S4B6 IC LN35	35,13
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	Control (Naive)	6,46
	mIL-2/S4B6 (c)	21,63
	S4B6 IC LN20	18,70
	S4B6 IC LN35	20,37
CD8 <sup>+</sup> paměťové (MP)	Control (Naive)	1,06
	mIL-2/S4B6 (c)	17,33
	S4B6 IC LN20	14,47
	S4B6 IC LN35	16,90
CD8 <sup>+</sup> paměťové (MP) KI67 <sup>+</sup>	Control (Naive)	0,15
	mIL-2/S4B6 (c)	16,87
	S4B6 IC LN20	13,93
	S4B6 IC LN35	16,47

Z výsledků (Obr. 5.11, Tab. 5.2) je patrné, že v porovnání s kontrolní skupinou (Control Naive) proliferace T lymfocytů proběhla. Nejvíce pak ve skupině, které byl podán imunocytokin s GS spojkou 35 aminokyselin (S4B6 IC LN35). Nárůst cytotoxických CD8<sup>+</sup> T lymfocytů byl patrný u všech skupin, kterým byla podávána terapie. Největší procentuální nárůst buněk je pozorován u skupiny, které byl podáván komerční imunokomplex IL-2/S4B6. Expanze paměťových CD8<sup>+</sup> T lymfocytů byla oproti negativní kontrole velmi markantní, zvláště u skupin IL-2/S4B6 a imunocytokin S4B6 IC LN35. Expanze proliferujících paměťových CD8<sup>+</sup> MP Ki67<sup>+</sup> T lymfocytů nebyla u negativní kontroly téměř znatelná. Oproti tomu byl pozorován značný nárůst této populace u skupin IL-2/S4B6 a imunocytokin S4B6 IC LN35. Celkově lze z těchto

výsledků konstatovat, že aplikace imunocytokinů S4B6 IC LN35, tj. IC s prodlouženou spojkou, vedla ve zvoleném *in vivo* schématu k výraznému navýšení relativního počtu buněčné populace velmi relevantní pro eradikaci nádorů.

### 5.2.3 CD4<sup>+</sup> T regulační buňky



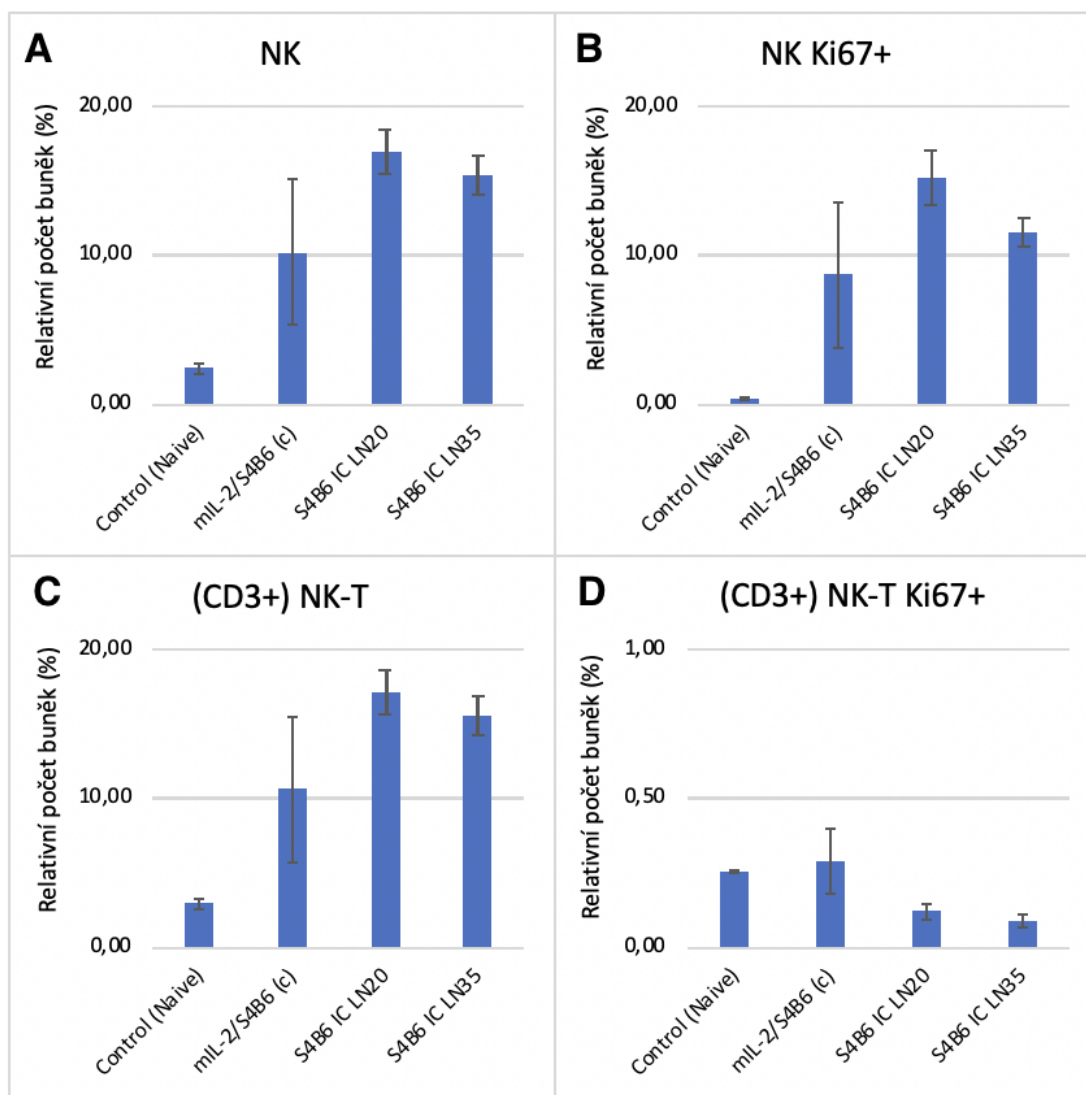
**Obrázek 5.12: Relativní počet Treg buněk ve slezině.** (A) relativní počet všech Th lymfocytů (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), (B) Relativní zastoupení Treg buněk (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> a Foxp3<sup>+</sup>), (C) relativní počet aktivně proliferujících Ki67<sup>+</sup> Treg. Všechny hodnoty jsou vyjádřeny v parametru „Frequency of Total“ s vyjádřenou směrodatnou odchylkou. Počet vzorků ve skupině byl roven třem. Hodnoceno v programu FlowJo X dle strategie znázorněné na Obr. 5.10.

**Tabulka 5.3: Relativní zastoupení Th a Treg lymfocytů.** Číselné výsledky FACS analýzy zobrazené na Obr. 5.12.

Měřená buněčná populace	Skupina myši	Relativní počet buněk (%)
Th(CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> )	Control (Naive)	11,10
	mIL-2/S4B6 (c)	4,56
	S4B6 IC LN20	5,63
	S4B6 IC LN35	4,77
Treg(CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> )	Control (Naive)	1,16
	mIL-2/S4B6 (c)	1,75
	S4B6 IC LN20	0,92
	S4B6 IC LN35	0,64
Treg/Ki67 <sup>+</sup>	Control (Naive)	0,32
	mIL-2/S4B6 (c)	1,43
	S4B6 IC LN20	0,43
	S4B6 IC LN35	0,32

Z výsledků (Obr. 5.12, Tab. 5.3) je patrné, že nárůst buněčné populace CD4<sup>+</sup> Th lymfocytů je znatelný zejména u kontrolní skupiny (Control Naive), která byla ponechána bez terapie. Nárůst Treg buněk byl ve všech ostatních skupinách velmi podobný, největší expanze této buněčné populace byla pozorována u skupiny stimulované komerčním imunokomplexem mIL-2/S4B6 a stejně tak pro tento imunokomplex byla pozorována značná expanze aktivně proliferujících Treg buněk. Naproti tomu imunocyto­kiny S4B6 IC LN20 a LN35 expanzi těchto Treg buněk téměř neindukovaly. Z těchto výsledků proto lze soudit, že aplikace imunocytokinů LN20 a LN35 je v protinádorové terapii vhodnější než léčba imunokomplexem IL-2/S4B6, protože imunocyto­kiny nepotencují expanzi pronádorových Treg buněk v takové míře, jako imunokomplex.

## 5.2.4 NK / NK-T buňky



**Obrázek 5.13: Relativní počet NK buněk a NK-T buněk ve slezině.** (A) relativní počet všech NK buněk, (B) relativní zastoupení NK buněk, které aktivně proliferují (NK/Ki67<sup>+</sup>), (C) relativní počet (CD3<sup>+</sup>) NK-T buněk, (D) relativní počet aktivně proliferujících (CD3<sup>+</sup>) NK-T Ki67<sup>+</sup> buněk. Všechny hodnoty jsou vyjádřeny v parametru „Frequency of Total“ s vyjádřenou směrodatnou odchylkou. Počet vzorků ve skupině byl roven třem. Hodnoceno v programu FlowJo X dle strategie znázorněné na Obr. 5.10.

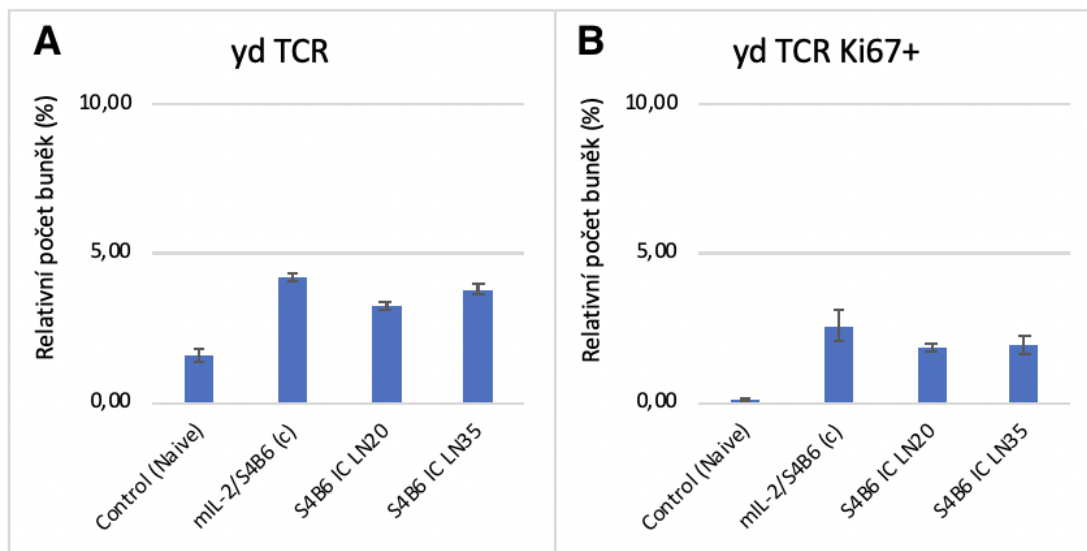
**Tabulka 5.4: Relativní zastoupení NK a NK-T buněk.** Číselné výsledky FACS analýzy zobrazené na Obr. 5.13.

Měřená buněčná populace	Skupina myši	Relativní počet buněk (%)
NK	Control (Naive)	2,41
	mIL-2/S4B6 (c)	10,24
	S4B6 IC LN20	16,96
	S4B6 IC LN35	15,40
NK Ki67 <sup>+</sup>	Control (Naive)	0,35
	mIL-2/S4B6 (c)	8,69
	S4B6 IC LN20	15,20
	S4B6 IC LN35	11,57
(CD3 <sup>+</sup> )NK-T	Control (Naive)	2,96
	mIL-2/S4B6 (c)	10,61
	S4B6 IC LN20	17,17
	S4B6 IC LN35	15,60
(CD3 <sup>+</sup> )NK-T Ki67 <sup>+</sup>	Control (Naive)	0,25
	mIL-2/S4B6 (c)	0,29
	S4B6 IC LN20	0,12
	S4B6 IC LN35	0,09

Z výsledků (Obr. 5.13, Tab. 5.4) je patrné, že NK buňky expandovaly nejvíce ve skupině stimulované imunocytokinem S4B6 IC LN20, tento imunocytokin s GS spojkou délky 20 aminokyselin také nejvíce potencoval expanzi aktivně proliferujících Ki67<sup>+</sup> NK buněk. Srovnatelný výsledek poskytla také skupina stimulovaná S4B6 IC LN35. Pro imunocytokin LN20 je také znatelný nejvyšší procentuální nárůst buněčné populace NK-T buněk a stejně tak značná expanze buněčné populace aktivně proliferujících NK-T buněk. Obdobné množství NK-T Ki67<sup>+</sup> buněk bylo naměřeno u skupiny stimulované imunocytokinem se spojkou LN35, v porovnání se skupinou imunokomplexu IL-2/S4B6 ale nedosahovaly takové expanze. Z výsledků lze konstatovat, že aplikace imunocytokinů LN20 i LN35 by mohla být nejslibnějším nástrojem pro stimulaci NK a NK-T buněčných populací, které jsou pro své protinádorové funkce v imunoterapii

nádorů velmi žádoucí, a to zvláště v porovnání s negativní kontrolou, která nevykazovala téměř žádnou expanzi aktivně proliferujících NK a NK-T buněk.

### 5.2.5 $\gamma\delta$ -T buňky



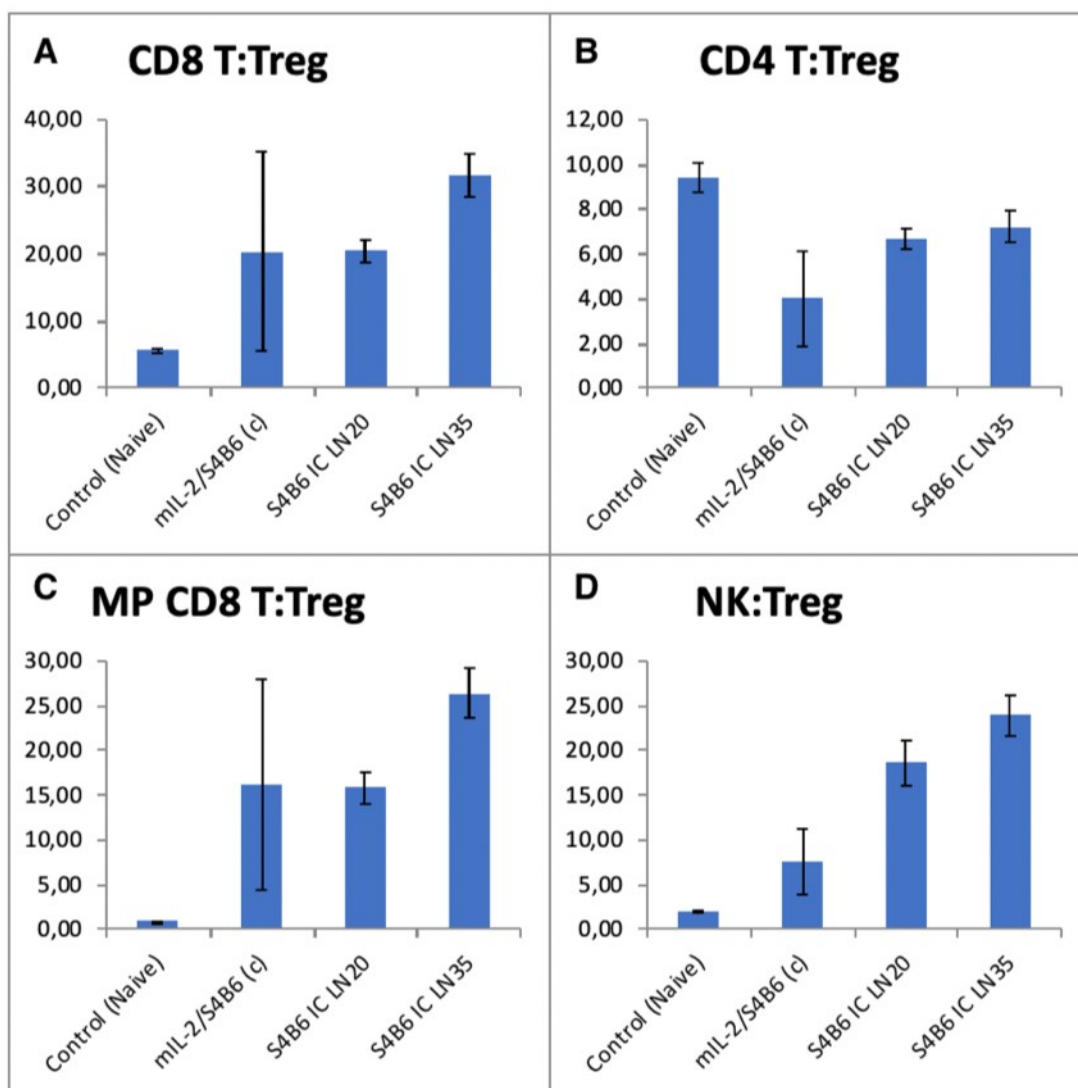
**Obrázek 5.14: Relativní zastoupení  $\gamma\delta$ -T buněk (exprimujících TCR receptor) ve slezině. (A) relativní zastoupení  $\gamma\delta$ -T buněk ve vzorku, (B) relativní počet aktivně proliferujících Ki67<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ -T buněk. Všechny hodnoty jsou vyjádřeny v parametru „Frequency of Total“ s vyjádřenou směrodatnou odchylkou. Počet vzorků ve skupině byl roven třem. Hodnoceno v programu FlowJo X dle strategie znázorněné na Obr. 5.10.**

**Tabulka 5.5: Relativní zastoupení  $\gamma\delta$ -T buněk. Číselné výsledky FACS analýzy zobrazené na Obr. 5.14.**

Měřená buněčná populace	Skupina myši	Relativní počet buněk (%)
$\gamma\delta$ -TCR	Control (Naive)	1,58
	mIL-2/S4B6 (c)	4,21
	S4B6 IC LN20	3,24
	S4B6 IC LN35	3,80
$\gamma\delta$ -TCR Ki67 <sup>+</sup>	Control (Naive)	0,12
	mIL-2/S4B6 (c)	2,57
	S4B6 IC LN20	1,89
	S4B6 IC LN35	1,95

Výsledky (Obr. 5.14, Tab. 5.5) ukazují, že největší expanze  $\gamma\delta$ -T buněk byla pozorována ve skupině stimulované komerčním imunokomplexem mIL-2/S4B6. Tímto léčivem se také dosáhlo největší stimulace aktivně proliferujících  $\gamma\delta$ -T buněk. Stimulace imunocytokiny zde byla obdobná pro oba konstrukty. V porovnání s kontrolou měla všechna aplikovaná terapeutika biologický účinek, protože právě v kontrolní skupině nebyl zaznamenán téměř žádný nárůst  $\gamma\delta$ -T aktivně proliferujících buněk.

## 5.2.6 Poměrné zastoupení jednotlivých buněčných populací



**Obrázek 5.15: Zastoupení efektorových buněčných populací v poměru k Treg.** (A) poměrné zastoupení  $CD8^+$  T lymfocytů oproti Treg, (B) poměrné zastoupení všech  $CD4^+$  Th lymfocytů oproti Treg, (C) poměrné zastoupení paměťových (MP)  $CD8^+$  T lymfocytů oproti Treg, (D) poměrné zastoupení NK buněk oproti Treg. Počet vzorků ve skupině byl roven třem. Hodnoceno v programu FlowJo X dle strategie znázorněné na Obr. 5.10.

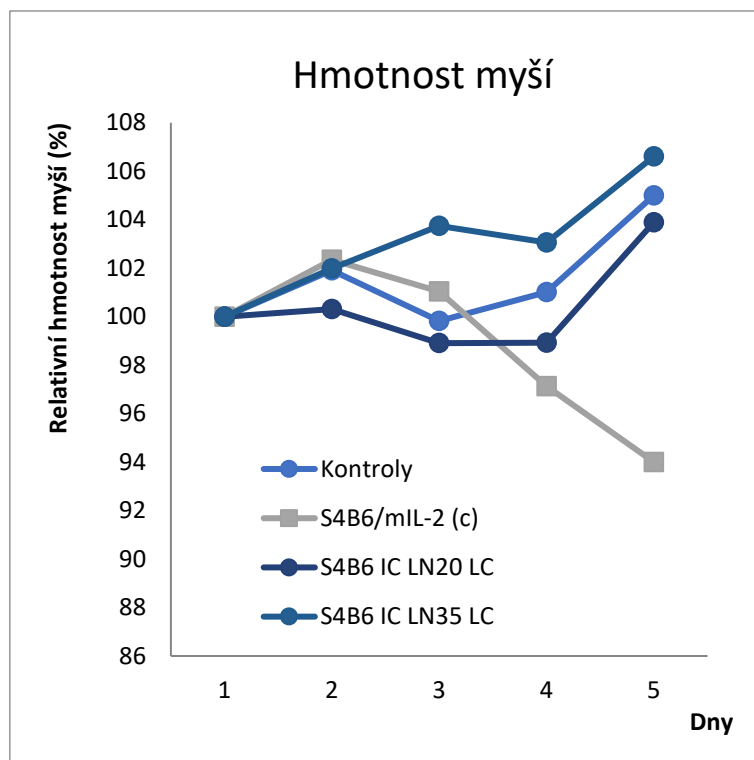
Nejvyšší poměrné zastoupení  $CD8^+$  T buněk oproti Treg je patrné u myší skupiny stimulované S4B6 IC LN35, tj. imunocytkinem s prodlouženou spojkou. U dalších dvou skupin stimulovaných imunokomplexem mIL-2/S4B6 a imunocytkinem S4B6 IC LN20 byla expanze  $CD8^+$  T buněk podobná, ale jednoznačně vyšší než u negativní kontroly (Obr. 5.15A).



Z výsledků zobrazujících expanzi všech CD4<sup>+</sup> Th lymfocytů oproti Treg (Obr. 5.15B) lze pozorovat, že v kontrolní skupině, která byla ponechána bez terapie, je pozorován výrazný nárůst populace CD4<sup>+</sup> T lymfocytů oproti skupinám stimulovaných terapeutiky, zejména pak komerčním imunokomplexem mIL-2/S4B6. V této skupině je patrné vyšší poměrné zastoupení Treg oproti skupinám myši stimulovaných imunocytokiny. Výsledky na Obr. 5.15C ukazují, že u skupiny stimulované S4B6 IC LN35 je patrná velmi výrazná expanze paměťových (MP, z angl. memory phenotype) CD8<sup>+</sup> T lymfocytů. Naproti tomu u kontroly nebyly MP CD8<sup>+</sup> T lymfocyty exprimovány téměř vůbec. Populace NK buněk jsou oproti Treg výrazně zvýšeny u myších skupin stimulovaných především imunocytokiny S4B6 IC LN35 a S4B6 IC LN20 (Obr. 5.15D).

Souhrnně tyto výsledky ukázaly, že všechna aplikovaná terapeutika jsou *in vivo* biologicky aktivní. Dále také, že imunokomplex mIL-2/S4B6 se výrazně podílí na stimulaci Treg a proto je oproti imunocytokinům s mIL-2 kovalentně navázaným na anti-IL-2 mAb méně vhodný pro protinádorovou imunoterapii než zmíněné IC. V neposlední řadě lze z výsledků konstatovat, že imunocytokin s prodlouženou aminokyselinovou GS spojkou S4B6 IC LN35, nově připravený v této diplomové práci, má ze všech terapeutik nejsilnější stimulační efekt na efektorové buňky (CD8<sup>+</sup> T, MP CD8<sup>+</sup> T a NK), lze jej tedy považovat za velmi slibný nástroj pro eradikaci nádorů.

### 5.2.7 Hmotnost myší

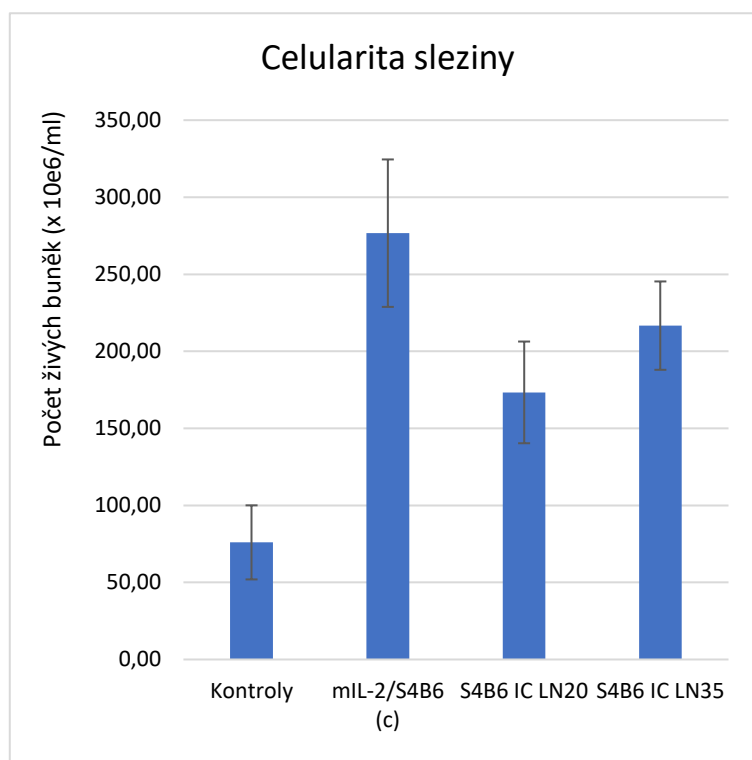


**Obrázek 5.16: Hmotnost myší v průběhu experimentu.** Myši byly váženy každý den experimentu přibližně ve stejnou dobu, vždy před aplikací imunokomplexů a imunocytokinů. Pátý den byly váženy 24 hodin po poslední dávce terapie a poté byly usmrceny cervikální dislokací a jejich sleziny následně zpracovány. Zobrazeny jsou průměrné váhy ve skupině, počet myší ve všech skupinách byl roven třem.

Vážení myší probíhalo na standardních digitálních vahách, celkově se jednalo o kolekci větších a silných samců. Myši měly přístup ke krmení a vodě bez omezení a ve většině skupin byl zaznamenán nárůst váhy (Obr. 5.16). Výrazný úbytek váhy oproti kontrolní skupině byl zaznamenán u jedinců, kterým byl podáván imunokomplex mIL-2/S4B6, tedy imunokomplex s komerčně dostupným mIL-2 a S4B6 mAb. Tito jedinci mohli být ovlivněni vysokou dávkou IL-2 ve formě komplexu s mAb, kterou během terapie dostali, což vedlo k úbytku jejich váhy jakožto ukazatelem systémové toxicity IL-2. Taková toxicita je však běžná a až do 15 % ztráty z původní váhy, což je hranice obecně chápána pro maximální tolerovanou dávku (MTD), je akceptovatelná [105–107]. U IC žádného typu nebyla systémová toxicita zaznamenána.

## 5.2.8 Celularita sleziny

Poté, co byly sleziny myším vyjmuty, homogenizovány a standardně zpracovány, byl na automatické počítačce buněk změřen počet živých imunitních buněk ve vzorcích od jednotlivých myší. U myší, kterým byla aplikována terapie, byly sleziny morfologicky výrazně zvětšené oproti slezinám od myších neléčených kontrol. V rámci jedné skupiny se zde porovnávají průměrné absolutní počty imunitních buněk na slezinu (Obr. 5.17).



**Obrázek 5.17: Celularita sleziny.** Je zobrazen průměrný absolutní počet živých buněk na slezinu v rámci vybrané skupiny myší. Data jsou vždy průměrem vzorků od jednotlivých myší ve skupině, počet myší ve všech skupinách byl roven třem.

U myší v kontrolní skupině nebyl pozorován a ani očekáván extrémní nárůst splenocytů ( $76 \times 10^6$  buněk), jelikož jim nebyla podávána žádná terapie. U ostatních myší ve skupinách byly sleziny abnormálně zvětšené a počet buněk více než dvojnásobný, jak u skupiny S4B6 IC LN20 ( $173 \times 10^6$  buněk), tak u S4B6 IC LN35 ( $217 \times 10^6$  buněk). Nejvyšší nárůst živých buněk na slezinu byl zaznamenán u skupiny, které byla podávána terapie imunokomplexem mIL-2/S4B6 ( $277 \times 10^6$  buněk).

## 6 Diskuze

V rámci této diplomové práce jsme se věnovali optimalizaci konstruktů imunocytokinů na bázi mAb S4B6 a mIL-2. Na základě predikce vycházející z krystalové struktury mIL-2:S4B6 imunokomplexu [109] jsme se rozhodli prodloužit glycin-serinovou spojku mezi mIL-2 a anti-IL-2 mAb S4B6 z 20 aminokyselin na 35. Pro tento účel byla navržena klonovací strategie, kde část konstruktů byla syntetizována *de novo* a druhá část amplifikována pomocí PCR. Následně byly oba fragmenty spojeny a vloženy do plazmidu vhodného pro tvorbu stabilně transfekovaných savčích linií. Tato strategie se mohla zdát problematická vzhledem k omezenému počtu kodonů pro GS spojku a s tím spojené repetitivitě bází. Klonování nakonec bylo úspěšné a spojku mezi IL-2 a lehkým řetězcem S4B6 mAb se podařilo prodloužit na 35 aminokyselin. Nový konstrukt s prodlouženou spojkou byl použit pro ustavení stabilní transfekované linie použitím systému piggyBac, který navíc umožňuje indukovatelnou expresi proteinu. K transfekci jsme použili lidskou buněčnou linii HEK293T. Po úspěšné transfekci i selekci na antibiotika jsme takto vytvořenou stabilní linii zmrazili, a tak vytvořili zálohu pro budoucí snadnou a rychlou produkci imunocytokinů. Následovala exprese konstruktů s LN35 z čerstvé stabilní linie.

Oproti dřívějším výtěžkům imunocytokinů s GS spojkou dlouhou 20 aminokyselin, kde se výtěžky pohybovaly v jednotkách mg z 1 litru buněčné kultury [103], konstrukt s prodlouženou spojkou měl výtěžek 31 mg na 1 litr kultury. Je ovšem třeba počítat s tím, že u vzorku dochází k částečné multimerizaci, pravděpodobně díky křížovému zapojení mIL-2 do vazebného místa sousední mAb, nikoliv jen v rámci své vlastní molekuly. Proto jsme pro další experimenty pracovali pouze s monomerní frakcí, která čítá přibližně 80 % z celkového výtěžku. Gelová permeační chromatografie na koloně Superdex 200 Increase 10/300 GL ukázala kromě hlavního vrcholu při elučním objemu 12 ml také další menší vrcholy o elučním objemu 8-10 ml, jde právě o zmiňované oligomerní formy imunocytokinů, které jsou kvůli vyšší molekulární hmotnosti eluovány při nižším objemu. Z jednotlivých frakcí byly následně provedeny analytické nástřiky na vysokotlaké silikagelové koloně Biozen dSEC-2 (3  $\mu$ m), která posloužila k ověření rozsahu oligomerizace imunocytokinů v jednotlivých frakcích. Z výsledků je jasně patrné, že nejvíce monomerní formy obsahovala frakce 5, tedy poslední eluovaná až kolem 12-14 ml, tato frakce byla i z tohoto důvodu dále použita pro biologické testování.

SDS elektroforéza ukázala v neredukujícím prostředí pro všechny frakce proužky okolo 260 kDa, vzhledem k molekulové hmotnosti imunocytokinů S4B6 IC LN35 (187,51 kDa) jsme očekávali proužky spíše v oblasti 190-200 kDa, je však třeba vzít v úvahu ještě přítomnost N- i O-glykosylace, která se na produkovaném imunocytokinů také nachází. V budoucnu by bylo vhodnější využít gradientové gely, například s gradientem 4-12 % akrylamidu, kde by došlo k lepšímu a přesnějšímu rozdělení neredukovaných forem imunocytokinů. Nicméně i tak lze usuzovat, že se cílový protein ve frakcích nachází v poměrně čisté a intaktní formě. U 140 kDa lze pozorovat pouze velmi slabé proužky, které jsou nejspíše formou imunocytokinů jen s jedním mIL-2 fúzním lehkým řetězcem. V redukující části gelu jsme očekávali proužek u 50 kDa, který značí přítomnost těžkého řetězce a dále u 43 kDa, který potvrzuje přítomnost lehkého řetězce s navázaným IL-2. Rozmyté proužky v oblasti 50 kDa s největší pravděpodobností naznačují přítomnost různých forem proteinů s odlišnou glykosylací, což je pro tento typ imunocytokinů poměrně běžné. Proužky okolo 90-100 kDa mohou značit přítomnost dimerů těžkých řetězců či navázání pouze jednoho lehkého a těžkého řetězce dohromady.

V rámci testování biologické aktivity námi připravených rekombinantních imunocytokinů a komerčního imunokomplexu mIL-2/S4B6 jsme se zaměřili v podstatě na dvě populace imunitních buněk. První z nich byly buňky imunostimulační, tj. efektorové, které vykonávají v organismu cytotoxické funkce a jsou součástí obrany organismu před vnějšími patogeny a také, v to našem případě především, před vznikem a množением nádorových buněk. Zaměřili jsme se zejména na CD8<sup>+</sup> T lymfocyty a jejich paměťovou subpopulaci, NK, NK-T buňky a  $\gamma\delta$ -T buňky. Druhou populací pak byly buňky imunoinhibiční, respektive regulační, které imunitní reakce tlumí a jsou důležité pro udržení homeostázy, přispívají však i k úniku nádorových buněk před imunitním systémem. V rámci této skupiny jsme se orientovali primárně na Treg, tj. populaci nejzásadnější a také nejlépe prozkoumanou na poli regulačních buněk. Po získání myších slezin, označení sledovaných buněk vybranými protilátkami s fluorochromy a analýze buněčných populací pomocí průtokové cytometrie, byla v programu FlowJo X navržena strategie pro vyhodnocování získaných dat. Tímto způsobem se podařilo získat data vypovídající o velikosti jednotlivých populací imunitních buněk, které byly v rámci naší imunoterapie ovlivněny.

Ve srovnání s negativní kontrolou (myši, které byly ponechány bez jakékoli stimulace imunokomplexem IL-2/S4B6 či imunocytokiny), je z výsledků patrné, že jak imunokomplex IL-2/S4B6, tak imunocytokiny se spojkou LN20 i LN35 potencují nárůst efektorových buněk imunitního systému, jsou tedy biologicky aktivní. Naše data dále ukazují, že tyto konstrukty stimulují imunitní buňky myši, což se projeví nárůstem všech T lymfocytů ( $CD3^+$ ). Expanze  $CD3^+CD8^+$  populací (cytotoxické T lymfocyty) byla po stimulaci imunokomplexem či imunocytokinem oproti negativní kontrole ve všech případech více než dvojnásobná. Nárůst paměťových  $CD8^+$  T buněk byl oproti negativní kontrole dokonce více než desetinásobný. Porovnájí-li se oba imunocytokiny mezi sebou, je patrné, že optimalizovaný imunocytokin s GS spojkou LN35 má vyšší biologickou aktivitu než imunocytokin s kratší spojkou. To by mohlo být způsobeno tím, že kratší spojka LN20 není dostatečně dlouhá, aby umožnila mIL-2 dostat se ideálně do svého vazebného místa na protilátce. V důsledku toho se IL-2 váže raději do vazebného místa sousední protilátky za vzniku oligomerů, které ztrácí či nedosahují plnou biologickou aktivitu, respektive může docházet k jiným obstrukcím během interakce mIL-2 a S4B6 mAb. Do budoucna by bylo velmi vhodné provést krystalizaci a strukturní analýzu obou proteinů, která by mohla zásadně přispět k pochopení tohoto problému.

Buňky Treg ( $CD3^+CD4^+CD25^+Foxp3^+$ ) patří mezi rozsáhlou populaci  $CD4^+$  pomocných T lymfocytů. Jedná se o zásadní imunoregulační populaci, u které navíc IL-2 hraje důležitou roli a oba tak mají společně značný vliv v regulaci zánětlivých procesů v organismu a podpoře procesů opravy tkání. Z literatury je známo, že nízké dávky IL-2 spolehlivě stimulují expanzi Treg a tím mohou být nápomocné při léčbě autoimunitních onemocnění či při transplantaci tkání díky jejich schopnosti tlumit imunitní odpověď [108]. To je ovšem v protinádorové terapii nežádoucím fenoménem. IL-2 je malý protein a vyznačuje se krátkým poločasem cirkulace v krevním oběhu, z tohoto důvodu je v případě terapie nádorů nutná aplikace vysokých dávek IL-2. Ta má ovšem zase za následek značnou toxicitu v organismu, projevující se například VLS syndromem. Toxicita způsobena vysokými dávkami IL-2 může vést až k multiorgánovému selhání. Cílem terapie imunokomplexy a imunocytokiny na bázi IL-2 a anti-IL-2 mAb je pokud možno expanze pouze efektorových a paměťových T a NK buněčných populací za současně co nejmenší stimulace populace Treg.

Jak je vidět na výsledcích analýzy populací Treg, největší expanzi sledujeme u myší stimulovaných pomocí komerčního imunokomplexu, imunocytokiny způsobují expanzi Treg menší, a to za srovnatelné současné expanze efektorových populací. Jedním z vysvětlení, proč tomu tak je, je skutečnost, že v imunokomplexu není IL-2 vázán na protilátku pevnou kovalentní vazbou, ale je s ní spojen pouze skrze vzájemnou afinitu IL-2 a mAb. IL-2 tak může difundovat od protilátky a působit v organismu jako volná molekula. Spojení IL-2 s protilátkou tak, jak je zamýšleno a realizováno v imunocytokinech, může zajistit řadu výhod. Jednou z nich je zacílení terapie na stimulaci konkrétní buněčné populace buď efektorových buněk nebo Treg v závislosti na specifické oblasti IL-2, na kterou se protilátky navážou. Námi používaná anti-IL-2 protilátka S4B6 váže mIL-2 takovým způsobem, že umožňuje selektivní interakci s IL-2 receptorem beta (IL-2R $\beta$ /CD122) a expanzi CD8<sup>+</sup> T buněk a NK buněk [109]. Tento fenomén je již známý z IL-2/anti-IL-2 mAb imunokomplexů typu IL-2/S4B6, imunocytokiny ale nabízí i další benefity. Právě kovalentní vazba IL-2 jim umožňuje vyhnout se komplikacím spojeným se situací, kdy je IL-2 asociováno s mAb pouze na základě nekovalentní interakce, a v důsledku tedy umožňuje nižší celkové dávky IL-2 ekvivalentu, které budou plně využity a nebude docházet k volnému pohybu samostatného IL-2 v krevním oběhu. Samotná mAb nemá v organismu žádnou terapeutickou funkci.

Slibnou alternativou pro dosažení selektivní stimulace efektorových populací za současného snížení expanze Treg se v současné době jeví použití mutantních variant IL-2. V těchto formách IL-2 byly na základě studií identifikovány potenciální aminokyselinové substituce, které by snížily afinitu vazby IL-2 na IL-2R $\alpha$  (CD25) bez ovlivnění afinity vůči IL-2R $\beta$  a  $\gamma$ . Studie Dehghan R. *et al.*, 2022 ukazuje, že použití mutantní varianty IL-2 výrazně upřednostňuje stimulaci CD8<sup>+</sup> T a NK buněk za snížené interakce s Treg a endoteliálními buňkami oproti přirozenému (WT, z angl. wild-type) IL-2 [110]. *In vivo* testování na indukované nádorové tkáni u myší ukázalo, že při lokálním podávání rekombinantních proteinů IL-2 byla kontrola růstu nádoru mutantní variantou IL-2 účinnější než u WT IL-2. Mutantní IL-2 jsou tedy jistě slibným prostředkem pro nádorovou imunoterapii. Potenciálně by bylo zajímavé tento přístup kombinovat, respektive zahrnout je do dalšího studia imunocytokinů ohledně posílení jejich terapeutického potenciálu.

U NK a NK-T buněk bylo kromě potvrzené výrazně silnější biologické aktivity imunokomplexu i imunocytokinů v porovnání s negativní kontrolou navíc zjištěno, že v rámci působení na tyto efektorové buňky by mohly být imunocytokiny biologicky aktivnější než samotný imunokomplex IL-2/S4B6. To s sebou nese značné benefity, zejména lepší využitelnost IL-2 ve formě imunocytokinů při nižších koncentracích a tím pádem také nižší toxicitu pro organismus u NK-dependentních modelů nebo diagnóz nemocí. Obdobně jako v předchozích případech byla potvrzena biologická aktivita imunokomplexu a imunocytokinů i u  $\gamma\delta$ -T buněk.

Jak bylo řečeno výše, cílem terapie imunocytokiny je selektivní expanze efektorových a paměťových populací imunitních buněk za neexistující nebo co nejmenší stimulace Treg. Data získaná výpočty poměrů těchto buněk v závislosti na použitém imunocytokinů a/nebo imunokomplexu ukazují, že u efektorových populací buněk ( $CD8^+$  T, MP  $CD8^+$  T, NK) imunocytokiny efektivitou převyšují imunokomplex a optimalizovaný konstrukt imunocytokinů s prodlouženou GS spojkou LN35 má vyšší biologickou aktivitu než imunocytokin s kratší GS spojkou LN20. Navíc imunokomplex IL-2/S4B6 selektivně stimuloval populaci Treg mnohem více než oba imunocytokiny.

V rámci experimentů byly myši každý den váženy a námi získaná data ukazují, že myši, kterým byla podávána terapie imunocytokiny na váze neztrácely a trend křivek je obdobný skupině naivních kontrol. Naproti tomu myši ve skupině, která podstoupila terapii komerčním imunokomplexem viditelně na váze ztrácely a navíc vykazovaly oproti ostatním myším skupinám viditelný diskomfort (naježená srst, snížená tělesná aktivita). Toto pozorování spolu se získanými daty o jejich hmotnosti může být důkazem vznikající toxicity, která je u léčby imunokomplexy v těchto dávkách známá. Nicméně ztráta hmotnosti do 15 % je obecně považována za akceptovatelnou a nepřekračuje definovanou hranici MTD. V neposlední řadě, získaná data o celularitě sleziny nám poskytla informace o průměrném počtu živých buněk (splenocytů) ve vzorcích z jednotlivých myších skupin. Dle očekávání byly hodnoty oproti negativní kontrole zvýšené, což jen potvrzuje již výše diskutované nárůsty buněčných populací efektorových a Treg a dále prohlubuje selektivitu stimulace efektorové části imunity. Zvětšení sleziny bylo pozorovatelné už pouhým okem.



## 7 Závěr

V rámci diplomového projektu se podařilo optimalizovat konstrukt imunocytokinů mIL-2 S4B6 IC LN35, stabilně jej produkovat za pomoci buněčné linie HEK293T a purifikovat frakce tohoto proteinu vhodné pro biologické testování.

Biologické testování na myších modelech potvrdilo výrazně posílenou biologickou aktivitu tohoto imunocytokinů s prodlouženou glycin-serinovou 35ti aminokyselinovou spojkou. Tento imunocytokin indukuje především efektorové a paměťové T buněčné populace za současné relativně nízké indukce populace Treg. Srovnáním dvou imunocytokinů s GS spojkami v délce 20 a 35 aminokyselin ukázalo, že prodloužená spojka koreluje s lepší biologickou aktivitou imunocytokinů, a to nejspíše z důvodu možnosti vhodnějšího strukturního uspořádání fúzního proteinu.

Ve srovnání s imunokomplexem mIL-2/S4B6 je míra potenciace Treg populace daleko nižší při zachování vysoké stimulace efektorových populací. To činí námi připravený imunocytokin vhodnější pro nádorovou terapii, která bude předmětem dalšího zkoumání.

## 8 Přehled použité literatury

1. Hořejší V, Bartůňková J. *Základy Imunologie*. 3. Triton; 2005. ISBN: 80-7254-686-4
2. Warrington R, Watson W, Kim HL, Antonetti FR. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 2011;7(S1):S1.
3. Brillantes M, Beaulieu AM. Memory and Memory-Like NK Cell Responses to Microbial Pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020;10:102.
4. Raza Y, Salman H, Luberto C. Sphingolipids in Hematopoiesis: Exploring Their Role in Lineage Commitment. *Cells*. 2021;10(10):2507.
5. Kumar B v., Connors TJ, Farber DL. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*. 2018;48(2):202-213.
6. Cohen IR. Activation of benign autoimmunity as both tumor and autoimmune disease immunotherapy: a comprehensive review. *J Autoimmun*. 2014;54:112-117.
7. Rosenberg SA. Decade in review-cancer immunotherapy: entering the mainstream of cancer treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(11):630-632.
8. Punt J, Stranford SA, Jones PP, Owen JA. *Kuby Immunology*. 8. Macmillan Education; 2019. Accessed April 6, 2022.
9. Zhu X, Zhu J. CD4 T Helper Cell Subsets and Related Human Immunological Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(21):8011.
10. Miyauchi K, Sugimoto-Ishige A, Harada Y, et al. Protective neutralizing influenza antibody response in the absence of T follicular helper cells. *Nature Immunology*. 2016;17(12):1447-1458.
11. Gurram RK, Zhu J. Orchestration between ILC2s and Th2 cells in shaping type 2 immune responses. *Cellular & Molecular Immunology*. 2019;16(3):225-235.
12. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*. 2000;101(5):455-458.
13. Li Y, Strick-Marchand H, Lim AI, et al. Regulatory T cells control toxicity in a humanized model of IL-2 therapy. *Nature Communications*. 2017;8(1):1762.
14. Sakaguchi S, Sakaguchi 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(3):1151-1164.
15. Fan MY, Low JS, Tanimine N, et al. Differential Roles of IL-2 Signaling in Developing versus Mature Tregs. *Cell Reports*. 2018;25(5):1204-1213.e4.
16. Wan YY, Flavell RA. How Diverse--CD4 Effector T Cells and their Functions. *Journal of Molecular Cell Biology*. 2009;1(1):20-36.
17. Höfer T, Krichevsky O, Altan-Bonnet G. Competition for IL-2 between Regulatory and Effector T Cells to Chisel Immune Responses. *Frontiers in Immunology*. 2012;3.
18. Feng P, Navaratna M. Role of regulatory T cells on a simple tumor-immune interaction system. *Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation*. 2021;98:105765.

19. Wissinger E. CD8+ T Cells. *British Society For Immunology*
20. Laugel B, Cole DK, Clement M, Wooldridge L, Price DA, Sewell AK. The multiple roles of the CD8 coreceptor in T cell biology: opportunities for the selective modulation of self-reactive cytotoxic T cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 2011;90(6):1089-1099.
21. Cole DK, Laugel B, Clement M, Price DA, Wooldridge L, Sewell AK. The molecular determinants of CD8 co-receptor function. *Immunology*. 2012;137(2):139.
22. Sigal LJ. Activation of CD8 T Lymphocytes during Viral Infections. *Encyclopedia of Immunobiology*. 2016;4:286.
23. Rajagopalan A, Berezhnoy A, Schrand B, Pupilampu-Dove Y, Gilboa E. Aptamer-Targeted Attenuation of IL-2 Signaling in CD8 + T Cells Enhances Antitumor Immunity. *Molecular Therapy*. 2017;25(1):54-61.
24. Robbins PF, Dudley ME, Wunderlich J, et al. Cutting Edge: Persistence of Transferred Lymphocyte Clonotypes Correlates with Cancer Regression in Patients Receiving Cell Transfer Therapy. *The Journal of Immunology*. 2004;173(12):7125-7130.
25. Han J, Khatwani N, Searles TG, Turk MJ, Angeles C v. Memory CD8+ T cell responses to cancer. *Seminars in Immunology*. 2020;49:101435.
26. Wang LX, Kjaergaard J, Cohen PA, Shu S, Plautz GE. Memory T Cells Originate from Adoptively Transferred Effectors and Reconstituting Host Cells after Sequential Lymphodepletion and Adoptive Immunotherapy. *The Journal of Immunology*. 2004;172(6):3462-3468.
27. Zangemeister-Wittke U, Kyewski B, Schirmmacher V. Recruitment and activation of tumor-specific immune T cells in situ. CD8+ cells predominate the secondary response in sponge matrices and exert both delayed-type hypersensitivity-like and cytotoxic T lymphocyte activity. *J Immunol*. 1989;143(1):379-385.
28. Mitchell DM, Ravkov E v., Williams MA. Distinct roles for IL-2 and IL-15 in the differentiation and survival of CD8+ effector and memory T cells. *J Immunol*. 2010;184(12):6719.
29. Surh CD, Sprent J. Homeostasis of Naive and Memory T Cells. *Immunity*. 2008;29(6):848-862.
30. Pol JG, Caudana P, Paillet J, Piaggio E, Kroemer G. Effects of interleukin-2 in immunostimulation and immunosuppression. *Journal of Experimental Medicine*. 2020;217(1).
31. Berezhnoy A, Castro I, Levay A, Malek TR, Gilboa E. Aptamer-targeted inhibition of mTOR in T cells enhances antitumor immunity. *Journal of Clinical Investigation*. 2014;124(1):188-197.
32. Melandri D, Zlatareva I, Chaleil RAG, et al. The  $\gamma\delta$ TCR combines innate immunity with adaptive immunity by utilizing spatially distinct regions for agonist selection and antigen responsiveness. *Nature Immunology*. 2018;19(12):1352-1365.
33. Yazdanifar M, Barbarito G, Bertaina A, Airoidi I.  $\gamma\delta$  T Cells: The Ideal Tool for Cancer Immunotherapy. *Cells*. 2020;9(5):1305.
34. Brandes M, Willimann K, Moser B. Professional Antigen-Presentation Function by Human  $\gamma\delta$  T Cells. *Science (1979)*. 2005;309(5732):264-268.

35. Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nature Medicine*. 2015;21(8):938-945.
36. Minculescu L, Sengeløv H. The Role of Gamma Delta T Cells in Haematopoietic Stem Cell Transplantation. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2015;81(6):459-468.
37. Dieli F, Vermijlen D, Fulfaro F, et al. Targeting Human  $\gamma\delta$  T Cells with Zoledronate and Interleukin-2 for Immunotherapy of Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Cancer Research*. 2007;67(15):7450-7457.
38. Bedard M. *Natural Killer Cells*.
39. Kumar S. Natural killer cell cytotoxicity and its regulation by inhibitory receptors. *Immunology*. 2018;154(3):383.
40. Sharma R, Das A. IL-2 mediates NK cell proliferation but not hyperactivity. *Immunologic Research*. 2018;66(1):151-157. doi:10.1007/s12026-017-8982-3
41. Pfefferle A, Jacobs B, Haroun-Izquierdo A, Kveberg L, Sohlberg E, Malmberg KJ. Deciphering Natural Killer Cell Homeostasis. *Frontiers in Immunology*. 2020;11.
42. Terabe M, Berzofsky JA. Tissue-Specific Roles of NKT Cells in Tumor Immunity. *Front Immunol*. 2018;9:1838. doi:10.3389/fimmu.2018.01838
43. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Kaer L van. NKT cells: what's in a name? *Nature Reviews Immunology*. 2004;4(3):231-237.
44. Stetson DB, Mohrs M, Reinhardt RL, et al. Constitutive Cytokine mRNAs Mark Natural Killer (NK) and NK T Cells Poised for Rapid Effector Function. *Journal of Experimental Medicine*. 2003;198(7):1069-1076.
45. Mousset CM, Hobo W, Woestenenk R, Preijers F, Dolstra H, van der Waart AB. Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry. *Cytometry Part A*. 2019;95(6):647-654.
46. Wingender G, Krebs P, Beutler B, Kronenberg M. Antigen-Specific Cytotoxicity by Invariant NKT Cells In Vivo Is CD95/CD178-Dependent and Is Correlated with Antigenic Potency. *The Journal of Immunology*. 2010;185(5):2721-2729.
47. Metelitsa LS, Naidenko O v., Kant A, et al. Human NKT Cells Mediate Antitumor Cytotoxicity Directly by Recognizing Target Cell CD1d with Bound Ligand or Indirectly by Producing IL-2 to Activate NK Cells. *The Journal of Immunology*. 2001;167(6):3114-3122.
48. Crowe NY, Smyth MJ, Godfrey DI. A Critical Role for Natural Killer T Cells in Immunosurveillance of Methylcholanthrene-induced Sarcomas. *Journal of Experimental Medicine*. 2002;196(1):119-127.
49. Smyth MJ, Wallace ME, Nutt SL, Yagita H, Godfrey DI, Hayakawa Y. Sequential activation of NKT cells and NK cells provides effective innate immunotherapy of cancer. *Journal of Experimental Medicine*. 2005;201(12):1973-1985.
50. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol*. 2007;37 Suppl 1:S34-45.
51. Conlon KC, Miljkovic MD, Waldmann TA. Cytokines in the Treatment of Cancer. *J Interferon Cytokine Res*. 2019;39(1):6-21.
52. Liu C, Chu D, Kalantar-Zadeh K, George J, Young HA, Liu G. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Advanced science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany)*. 2021;8(15):e2004433

53. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2009;78(6):539-552.
54. Secombes CJ, Wang T, Bird S. The interleukins of fish. *Dev Comp Immunol*. 2011;35(12):1336-1345.
55. Brocker C, Thompson D, Matsumoto A, Nebert DW, Vasiliou V. Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. *Hum Genomics*. 2010;5(1):30-55.
56. Vaillant AAJ, Qurie A. Interleukin. *StatPearls*. Published online August 30, 2021. Accessed April 6, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499840/>
57. Tomala J, Kovar M. IL-2/anti-IL-2 mAb immunocomplexes: A renaissance of IL-2 in cancer immunotherapy? *OncoImmunology*. 2016;5(3):e1102829.
58. Tomala J. *Immunocomplexes of IL-2 and Anti-IL-2 MAbs as a Novel Class of Selective and Extremely Potent Immunostimulators*. 2012.
59. MacDonald A, Wu TC, Hung CF. Interleukin 2-Based Fusion Proteins for the Treatment of Cancer. *J Immunol Res*. 2021;2021:7855808.
60. Malek TR. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:453-479.
61. Rosenberg SA. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J Immunol*. 2014;192(12):5451-5458.
62. Rosenberg SA. Cell transfer immunotherapy for metastatic solid cancer--what clinicians need to know. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(10):577-585.
63. Henney CS, Kuribayashi K, Kern DE, Gillis S. Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature*. 1981;291(5813):335-338.
64. Liao W, Lin JX, Leonard WJ. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(5):598-604
65. Malek TR, Castro I. Interleukin-2 Receptor Signaling: At the Interface between Tolerance and Immunity. *Immunity*. 2010;33(2):153-165.
66. Schwartz RH. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell*. 1992;71(7):1065-1068.
67. Jain J. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Current Opinion in Immunology*. 1995;7(3):333-342.
68. Arenas-Ramirez N, Woytschak J, Boyman O. Interleukin-2: Biology, Design and Application. *Trends Immunol*. 2015;36(12):763-777.
69. Spolski R, Li P, Leonard WJ. Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy. *Nature Reviews Immunology*. 2018;18(10):648-659.
70. Dong S, Hiam-Galvez KJ, Mowery CT, et al. The effect of low-dose IL-2 and Treg adoptive cell therapy in patients with type 1 diabetes. *JCI Insight*. 2021;6(18).
71. Graßhoff H, Comdühr S, Monne LR, et al. Low-Dose IL-2 Therapy in Autoimmune and Rheumatic Diseases. *Front Immunol*. 2021;12:648408.
72. Horak I, Löhler J, Ma A, Smith KA. Interleukin-2 deficient mice: a new model to study autoimmunity and self-tolerance. *Immunol Rev*. 1995;148:35-44.
73. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature Reviews Cancer*. 2012;12(4):298-306.

74. MacDonald A, Wu TC, Hung CF. Interleukin 2-Based Fusion Proteins for the Treatment of Cancer. *J Immunol Res.* 2021;2021:7855808.
75. Pachella LA, Madsen LT, Dains JE. The Toxicity and Benefit of Various Dosing Strategies for Interleukin-2 in Metastatic Melanoma and Renal Cell Carcinoma. *J Adv Pract Oncol.* 2015;6(3):212-221.
76. Mazumder A, Rosenberg SA. Successful immunotherapy of natural killer-resistant established pulmonary melanoma metastases by the intravenous adoptive transfer of syngeneic lymphocytes activated in vitro by interleukin 2. *Journal of Experimental Medicine.* 1984;159(2):495-507.
77. Rosenberg SA, Mulé JJ, Spiess PJ, Reichert CM, Schwarz SL. Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin 2. *Journal of Experimental Medicine.* 1985;161(5):1169-1188.
78. Rosenberg SA. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J Immunol.* 2014;192(12):5451-5458. doi:10.4049/jimmunol.1490019
79. Dansokho C, Ait Ahmed D, Aid S, et al. Regulatory T cells delay disease progression in Alzheimer-like pathology. *Brain.* 2016;139(4):1237-1251.
80. Pérol L, Piaggio E. New Molecular and Cellular Mechanisms of Tolerance: Tolerogenic Actions of IL-2. In: ; 2016:11-28.
81. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nature Immunology.* 2005;6(11):1142-1151.
82. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature Reviews Immunology.* 2012;12(3):180-190.
83. Franzke A, Peest D, Probst-Kepper M, et al. Autoimmunity resulting from cytokine treatment predicts long-term survival in patients with metastatic renal cell cancer. *J Clin Oncol.* 1999;17(2):529-533. doi:10.1200/JCO.1999.17.2.529
84. Xue D, Hsu E, Fu YX, Peng H. Next-generation cytokines for cancer immunotherapy. *Antib Ther.* 2021;4(2):123-133.
85. Lotze MT, Matory YL, Ettinghausen SE, et al. In vivo administration of purified human interleukin 2. II. Half life, immunologic effects, and expansion of peripheral lymphoid cells in vivo with recombinant IL 2. *J Immunol.* 1985;135(4):2865-2875.
86. Wrangle JM, Patterson A, Johnson CB, et al. IL-2 and Beyond in Cancer Immunotherapy. *Journal of Interferon & Cytokine Research.* 2018;38(2):45-68.
87. Létourneau S, van Leeuwen EMM, Krieg C, et al. IL-2/anti-IL-2 antibody complexes show strong biological activity by avoiding interaction with IL-2 receptor  $\alpha$  subunit CD25. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2010;107(5):2171-2176.
88. Boyman O, Kovar M, Rubinstein MP, Surh CD, Sprent J. Selective Stimulation of T Cell Subsets with Antibody-Cytokine Immune Complexes. *Science (1979).* 2006;311(5769):1924-1927.
89. Rojas G, Cabrera Infante Y, Pupo A, Carmenate T. Fine epitope specificity of antibodies against interleukin-2 explains their paradoxical immunomodulatory effects. *MAbs.* 2014;6(1):273-285.
90. Tomala J, Chmelova H, Mrkvan T, Rihova B, Kovar M. In Vivo Expansion of Activated Naive CD8<sup>+</sup> T Cells and NK Cells Driven by Complexes of IL-2 and

- Anti-IL-2 Monoclonal Antibody As Novel Approach of Cancer Immunotherapy. *The Journal of Immunology*. 2009;183(8):4904-4912.
91. Boyman O, Kovar M, Rubinstein MP, Surh CD, Sprent J. Selective Stimulation of T Cell Subsets with Antibody-Cytokine Immune Complexes. *Science (1979)*. 2006;311(5769):1924-1927.
  92. Tomala J, Chmelova H, Strohalm J, et al. Antitumor activity of IL-2/anti-IL-2 mAb immunocomplexes exerts synergism with that of *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer-bound doxorubicin conjugate due to its low immunosuppressive activity. *International Journal of Cancer*. 2011;129(8):2002-2012.
  93. Kamimura D, Sawa Y, Sato M, Agung E, Hirano T, Murakami M. IL-2 In Vivo Activities and Antitumor Efficacy Enhanced by an Anti-IL-2 mAb. *The Journal of Immunology*. 2006;177(1):306-314.
  94. Verdeil G, Marquardt K, Surh CD, Sherman LA. Adjuvants targeting innate and adaptive immunity synergize to enhance tumor immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(43):16683.
  95. Kamimura D, Bevan MJ. Naive CD8<sup>+</sup> T cells differentiate into protective memory-like cells after IL-2–anti–IL-2 complex treatment in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*. 2007;204(8):1803.
  96. Votavova P, Tomala J, Kovar M. Increasing the biological activity of IL-2 and IL-15 through complexing with anti-IL-2 mAbs and IL-15R $\alpha$ -Fc chimera. *Immunology Letters*. 2014;159(1-2):1-10.
  97. Neri D. Antibody-Cytokine Fusions: Versatile Products for the Modulation of Anticancer Immunity. *Cancer Immunol Res*. 2019;7(3):348-354.
  98. Fukuda M, Horibe K, Furukawa K. Enhancement of in vitro and in vivo anti-tumor activity of anti-GD2 monoclonal antibody 220-51 against human neuroblastoma by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor. *Int J Mol Med*. 1998;2(4):471-475.
  99. Hornick JL, Khawli LA, Hu P, Sharifi J, Khanna C, Epstein AL. Pretreatment with a monoclonal antibody/interleukin-2 fusion protein directed against DNA enhances the delivery of therapeutic molecules to solid tumors. *Clin Cancer Res*. 1999;5(1):51-60.
  100. Xiang R, Lode HN, Dolman CS, et al. Elimination of established murine colon carcinoma metastases by antibody-interleukin 2 fusion protein therapy. *Cancer Res*. 1997;57(21):4948-4955.
  101. Craiu A, Barouch DH, Zheng XX, et al. An IL-2/Ig fusion protein influences CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in naive and simian immunodeficiency virus-infected Rhesus monkeys. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001;17(10):873-886.
  102. Tomala J, Kovarova J, Kabesova M, et al. Chimera of IL-2 linked to light chain of anti-IL-2 mAb mimics IL-2/anti-IL-2 mAb complexes both structurally and functionally. *ACS Chemical Biology*. 2013;8(5):871-876.
  103. Rožová D. *Příprava Myšního Interleukinu 2 Spojeného s Monoklonální Protilátkou S4B6*. Bakalářská práce. PřF UK; 2020.
  104. Li Z, Michael IP, Zhou D, Nagy A, Rini JM. Simple piggyBac transposon-based mammalian cell expression system for inducible protein production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(13):5004-5009.

105. Van S, Das SK, Wang X, et al. Synthesis, characterization, and biological evaluation of poly(L- $\gamma$ -glutamyl-glutamine)- paclitaxel nanoconjugate. *Int J Nanomedicine*. 2010;5(1):825-837.
106. Stutchbury TK, Al-Ejeh F, Stillfried GE, et al. Preclinical evaluation of <sup>213</sup>Bi-labeled plasminogen activator inhibitor type 2 in an orthotopic murine xenogenic model of human breast carcinoma. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(1):203-212.
107. Staffhorst RWHM, van der Born K, Erkelens CAM, et al. Antitumor activity and biodistribution of cisplatin nanocapsules in nude mice bearing human ovarian carcinoma xenografts. *Anticancer Drugs*. 2008;19(7):721-727.
108. Abbas AK, Trotta E, R Simeonov D, Marson A, Bluestone JA. Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. *Sci Immunol*. 2018;3(25).
109. Spangler JB, Tomala J, Luca VC, et al. Antibodies to Interleukin-2 elicit selective T cell subset potentiation through distinct conformational mechanisms. *Immunity*. 2015;42(5):815.
110. Dehghan R, Parikhani AB, Zeinali S, et al. Efficacy and antitumor activity of a mutant type of interleukin 2. *Scientific Reports*. 2022;12(1):5376.