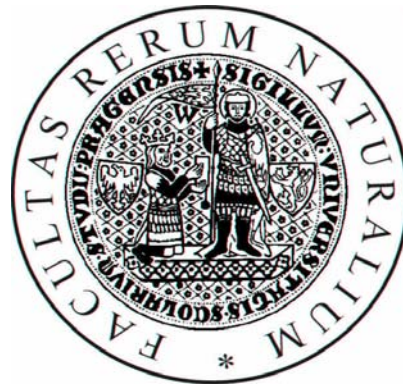


CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE

Faculty of Science

Study program: Immunology



Summary of PhD Thesis

Immunocomplexes of IL-2 and anti-IL-2 mAbs as a novel class of selective and extremely potent immunostimulators

RNDr. Jakub Tomala

2012

Doctoral studies in biomedicine

Charles University in Prague and Academy of Sciences of the Czech republic

Field: Immunology

Chairman of the Supervisory Committee: Doc. RNDr. Vladimír Holář, DrSc.

Supervising Body: Department of Immunology and Gnotobiology

Institute of Microbiology

Vídeňská 1083, 14220, Prague 4 Krč

Author: RNDr. Jakub Tomala

Supervisor: RNDr. Marek Kovář, PhD.

The summary of the PhD Thesis was distributed on

The Defense of the PhD Thesis will be held on.....at.....in the Conference Room of the Institute of Microbiology ASCR, Vídeňská 1083, 14220, Prague 4 Krč.

The PhD Thesis is available at the library of Faculty of Science at the Charles University in Prague.

TABLE OF CONTENTS

Table of contents.....	iii
Abbreviations.....	v
Abstract.....	vi
1. Introduction.....	1
2. Hypothesis and aims	3
2.1 Effects of IL-2/anti-IL-2 mAb immunocomplexes on various populations of immunocompetent cells, with special interest in expansion and biological activity of CD8 ⁺ T cells, NK cells and T _{reg} cells.....	3
2.2 Half-life of IL-2/anti-IL-2 mAb immunocomplexes in circulation in comparison to free IL-2.....	3
2.3 Role of IL-2/anti-IL-2 mAb immunocomplexes in cancer immunotherapy.....	3
2.4 Potential of combinatorial treatment of established progressively growing tumors with HPMA copolymer-bound Dox conjugate and IL-2/anti-IL-2 mAb immunocomplexes.....	3
3. Material and methods.....	3
3.1 Cell Lines	3
3.2 Mice.....	3
3.3 Monoclonal antibodies	4
3.4 Staining of surface antigens	4
3.5 Intracellular staining.....	4
3.6 Flow cytometry.....	4
3.7 CFSE labeling.....	4
3.8 Polymer-bound doxorubicin conjugates.....	5
3.9 IL-2 and IL-15 immunocomplexes.....	5
3.10 NK assay.....	5
3.11 T _{reg} cell expansion	5
3.12 Adoptive transfer of OT-I cells	5
3.13 Depletion of CD8 ⁺ population.....	5
3.14 ¹³¹ I labelling of IL-2	6
3.15 Proliferation assay <i>in vitro</i>	6
3.16 Treatment of BCL1 leukemia and B16F10 melanoma <i>in vivo</i>	6
3.17 Statistical analysis	6
4. Results.....	7
5. Discussion and Conclusions	9
5.1 Robust expansion of T regulatory (T _{reg}) cells during progression of BCL1 leukemia: another immunoescape mechanism employed by BCL1 leukemia...	9
5.2 IL-2 immunocomplexes in expansion of activated CD8 ⁺ T and NK cells with further implications in the cancer treatment.....	9

5.3	Anti-tumor activity of IL-2/S4B6 immunocomplexes synergizes with HPMACopolymer-bound doxorubicin conjugate due to its low immunosuppressive activity	10
6.	References	11
7.	Publications	14

ABBREVIATIONS

A700	Alexa Fluor 700
APC	Allophycocyanin
CD	Cluster of differentiation
Ci	Currie
CO ₂	Carbon dioxide
CTL	Cytotoxic T lymphocytes
Da	Dalton
Dox	Doxorubicin
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FCS	Fetal calf serum
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein isothiocyanate
h	Human
HPMA	<i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methacrylamide
IFN	Interferon
IL	Interleukine
Ly5.1	CD45.1
m	Mouse
mAb	Monoclonal antibody
MP	Memory phenotype
NK	Natural killer
NKT	Natural killer T
PBS	Phosphate buffed saline
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylen glycol
pHPMA	Polymeric HPMA
r	Recombinant
RBC	Red blood cells
TCGF	T cell growth factor
T _{reg}	T regulatory

ABSTRACT

IL-2 has been used in cancer therapy and also for other applications like treatment of chronic viral infections or as an adjuvant for vaccines. However, treatment with IL-2 is rather difficult due to its severe side effects. These toxicities, associated with high-dose treatment necessary for IL-2 to function, have been found the most limiting factor for IL-2 applications. Further, particular anti-IL-2 monoclonal antibodies (mAb) can actually increase biological activity of IL-2 rather than block it. Binding of IL-2 to anti-IL-2 mAb creates a superagonistic immunocomplexes which have dramatically higher and selective biological activity in comparison to free IL-2 *in vivo*. Such approach may finally overcome the difficulties associated with administration of IL-2, thus opening brand new scopes for IL-2 and its application not only in the field of tumor therapy.

We have shown that IL-2 immunocomplexes composed of IL-2 and anti-IL-2 mAb S4B6 (IL-2/S4B6) stimulate predominantly cells expressing CD122 and CD132 (dimeric IL-2 receptor), i.e. NK and MP CD8⁺ T cells, with T_{reg}, $\gamma\delta$ T and NKT cells being expanded as well. IL-2/S4B6 are able to drive the expansion of activated naive CD8⁺ T cells into functional memory-like CD8⁺ T cells. Moreover, these immunocomplexes exert therapeutic potential alone or in combination with novel type of cytostatics based on poly(*N*-hydroxypropyl) metacrylamide) (HPMA) on several experimental tumor models (e.g. BCL1 leukemia and B16F10 melanoma). Prophylactic regimens of IL-2/S4B6 led to survival of one-third (BCL1) or up to two-thirds (B16F10) of tumor bearing mice, depending on the IL-2/S4B6 dosage. Application of HPMA copolymer-bound doxorubicin conjugate followed by repeated IL-2/S4B6 treatment prolongs survival or even completely cures mice with tumors in very late progression stages.

The second kind of immunocomplexes studied, composed of IL-2 and anti-IL-2 mAb JES6.1 (IL-2/JES6.1) and specific for cells expressing CD25, drive expansion of activated CD8⁺ T and T_{reg} cells. We have shown that such increase of T_{reg} cell numbers accelerate BCL1 leukemia progression *in vivo*. Finally, we have also shown that increased biological activity of IL-2 immunocomplexes is probably governed by considerable prolonged half-life in circulation.

In conclusion, our findings have contributed to better knowledge of IL-2 immunocomplexes and their mechanisms of function, which may also result in quicker translation into wide array of possible applications in human medicine.

1. INTRODUCTION

IL-2 was the first interleukin discovered (1965) under the name blastogenic factor [1], followed by term describing his primary and the most apparent function - T cell growth factor (TCGF).

IL-2 [2-3] is a small protein, approximately 15 kDa, and has wide variety of functions in the immune system, mostly as the prototypic autocrine growth factor produced by T cells after activation. This has led to exploiting IL-2 as a potential therapeutic agent. In 1984, recombinant IL-2 was used in cancer therapy for the first time, with novel roles in immune system slowly emerging after its FDA approval. IL-2 was tested not only for cancer immunotherapy, but also for other applications like treatment of chronic viral infections or as an adjuvant for vaccines.

Despite its positive effects, ranging from 5-17% of complete responses in patients with malignant melanoma and renal cell carcinoma [4], treatment with IL-2 is rather difficult due to its severe side effects, ranging from flu-like symptoms to debilitating cytokine storm and vascular leak syndrome [5]. These toxicities, associated with high-dose treatment necessary for IL-2 to function, have been considered the most limiting factor for IL-2 applications.

There have been several efforts to manage or diminish those “limiting” toxicities. One approach was based on gene therapy of the tumor cells, which were transfected to produce IL-2, thus becoming more immunogenic [6]. Other approaches came with the idea of a targeting strategy with immunocytokine [7] (Ab-cytokine fusion protein) or alternatively with ligation of IL-2 to polymeric carrier [8] (PEG) or serum protein [9] (albumin) to increase its half-life in blood.

In 2006, it was discovered that particular anti-IL-2 monoclonal antibodies (mAb) can actually increase biological activity of IL-2 rather than block it [10]. Binding of IL-2 to anti-IL-2 mAb creates superagonistic immunocomplexes which have dramatically higher biological activity than IL-2 alone *in vivo*. Such approach may finally overcome the difficulties associated with administration of IL-2, thus opening brand new scopes for IL-2 and its application not only in the field of tumor therapy.

However, curative effect is hardly achievable by immunotherapy alone in case of tumors [11]. To maximalize the benefits of treatment offered by immunotherapy, the best way is

to combine immunotherapy with some conventional methods, particularly with chemotherapy.

Considering chemotherapy, radiotherapy or surgery, the classical trio in tumor treatment, chemotherapy is indispensable when the disease is systemic, i.e. in the case of metastatic spread. Unfortunately, conventional chemotherapy has considerable limitations due to the serious side-toxicity associated with the use of cytostatic drugs. Moreover, most cytostatic drugs are significantly immunosuppressive and thus they can damage immune system, leading to significant lowering of effectiveness of immunotherapy applied after chemotherapy.

One possible way how to overcome this obstacle is to covalently bind cytostatic drug to a polymeric carrier from which it can be released into its pharmacologically active form preferentially in tumor [12]. Such macromolecular conjugates possess more favorable pharmacokinetic profile and considerably lower side-toxicities than parent free drug.

One of the most widely and successfully used polymeric carrier for cytostatic drugs is based on pHPMA, referring to the polymer consisting of repetitive *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide blocks. Originally developed as a plasma expander “Duxon”, it possesses almost ideal properties as a drug carrier [13]. pHPMA is biocompatible, non-toxic, has multiple reactive groups and is excreted via kidney up to the size of about 40 kDa [14]. When cytostatic drug, for example anthracycline antibiotic doxorubicin (Dox), is conjugated to pHPMA, the conjugate has higher anti-tumor activity *in vivo* in comparison to free Dox. Such conjugates are able to completely cure mice with established syngeneic tumors and ensure establishment of protective and long-lasting anti-tumor immune memory, thus providing resistance to original tumor [15-22]. The very first experience with application of this class of anti-cancer therapeutics in clinical trials also documented much lower hemato- and immunotoxicity and even activation of some parts of immune system was recorded [23].

Therefore, immunotherapy with IL-2/anti-IL-2 immunocomplexes combined with chemotherapy with HPMA-based drug conjugates represents promising approach for tumor therapy.

2. HYPOTHESIS AND AIMS

The general aim of this study was to contribute new findings to the recently established field of complexing cytokines and respective anti-cytokine mAbs, with IL-2 in particular. This main effort can be divided into more specific areas of interest:

- 2.1** Effects of IL-2/anti-IL-2 mAb immunocomplexes on various populations of immunocompetent cells, with special interest in expansion and biological activity of CD8⁺ T cells, NK cells and T_{reg} cells.
- 2.2** Half-life of IL-2/anti-IL-2 mAb immunocomplexes in circulation in comparison to free IL-2.
- 2.3** Role of IL-2/anti-IL-2 mAb immunocomplexes in cancer immunotherapy.
- 2.4** Potential of combinatorial treatment of established progressively growing tumors with HPMA copolymer-bound Dox conjugate and IL-2/anti-IL-2 mAb immunocomplexes.

3. MATERIAL AND METHODS

3.1 CELL LINES

Murine B cell leukemia BCL1, B16F10 melanoma, and CTLL-2 cell lines were purchased from American Type Culture Collection.

3.2 MICE

Female BALB/c and male C57BL/6 (B6) mice were obtained from a breeding colony at the Institute of Physiology (Academy of Sciences of the Czech Republic). Transgenic OT-I mice and B6.SJL (Ly5.1) mice were bred and kept at the genetically modified organism facility of the Institute of Molecular Genetics (Academy of Sciences of the Czech Republic). The mice were used at 9–15 weeks of age. All experiments were approved by the Animal Welfare Committee at the Institute of Microbiology (Academy of Sciences of the Czech Republic).

3.3 MONOCLONAL ANTIBODIES

The following anti-mouse mAbs were used for cell surface staining: CD3-PB, CD3-FITC, CD8-A700, CD8-PerCP-Cy5.5, CD25-APC, CD25-PE, CD44-PE, CD45.1-APC, DX5-PE, IFN- γ -PE mAb, Foxp3-PE (eBioscience), CD4-PerCP, $\gamma\delta$ TCR-PE (BD Pharmingen). CD161-APC and unconjugated anti-IL-2 mAb S4B6 were kindly provided by Dr. Karel Drbal (Institute of Molecular Genetics of ASCR). Unconjugated anti-mIL-2 mAb JES6.1A12 and JES6.5H4 were purchased from eBioscience. Anti-human IL-2 clone MAB602 was from R&D Systems.

3.4 STAINING OF SURFACE ANTIGENS

Single-cell suspension was prepared from spleens. After RBC lysis, cells were resuspended in flow cytometry buffer (PBS, 2% FCS, 2 mmol EDTA, 0.05% NaN₃), blocked by 10% mouse serum for 30 min on ice, and stained with mAbs for 30 min on ice in the dark. When biotinylated mAbs were used, cells were additionally incubated for 10 min on ice with fluorochrome-conjugated streptavidin. Cells were washed twice after each step in flow cytometry buffer and fixed in 4% paraformaldehyde before analysis.

3.5 INTRACELLULAR STAINING

Foxp3 staining buffer set (eBioscience) was used for Foxp3 staining and IC Fixation buffer and Permeabilization buffer (eBioscience) were used for IFN- γ staining. Alternatively, BD Cytofix/Cytoperm staining buffer set (BD Biosciences) was used. Surface antigens were stained as described above. Cells were then resuspended in 100 μ L of Fixation/Permeabilization working solution and incubated for 30 to 60 min on ice followed by washing twice with Permeabilization solution. Afterwards, cells were blocked by 2% mouse serum for 10 min on ice. Next, mAb-PE conjugate was added and cells were incubated for 30 min on ice in the dark. Finally, cells were washed twice in Permeabilization buffer and fixed in 4% paraformaldehyde.

3.6 FLOW CYTOMETRY

Flow cytometry analysis was performed on LSRII (BD Biosciences) and data were analyzed using FlowJo software (Tree Star).

3.7 CFSE LABELING

Labeling the cells with CFSE was carried out as described elsewhere [10]

3.8 POLYMER-BOUND DOXORUBICIN CONJUGATES

All polymer conjugates were synthesized as described previously [24].

3.9 IL-2 AND IL-15 IMMUNOCOMPLEXES

These immunocomplexes [10] were prepared by adding rmIL-2 or rmIL-15 (Prospec) into solution of anti-IL-2 mAb S4B6 or JES6.1 or IL-15R α -Fc at molar ratio 2:1. All reagents were in PBS. After a 15-min incubation at room temperature, the immunocomplexes were diluted with PBS into desired concentration.

3.10 NK ASSAY

B6 mice were injected i.p. with IL-2 or IL-2/S4B6 mAb immunocomplexes or/and IL-12. After 5 days, mice were euthanized and splenocytes were isolated using Histopaque 1083. YAC-1 cells, which are naturally sensitive to cytolytic activity of NK cells, were labeled for 20 h with [³H]-thymidine (3 μ Ci/ml), washed and seeded into 96-well plate with “U-shaped” wells (1×10^4 cells/ml). Different numbers of splenocytes were added to labeled YAC-1 cells and incubated in 5% CO₂ for 4 h at 37°C.

3.11 T_{REG} CELL EXPANSION

To expand T_{reg} cells *in vivo*, BALB/c mice were treated for 7 consecutive days before BCL1 cell inoculation with IL-2/JES6 mAb immunocomplexes. Small sample (50–100 μ l) of peripheral blood was taken from tail vein 24 h after the last injection, and expansion of T_{reg} cells (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) was checked by flow cytometry.

3.12 ADOPTIVE TRANSFER OF OT-I CELLS

Purified OT-I CD8⁺ T cells (Ly 5.2) were labeled with CFSE and injected i.v. into B6.SJL recipients (Ly 5.1) at 1.5×10^6 cells per mouse. Next day the mice were injected i.p. with PBS, SIINFEKL peptide (MBL International) (peptide), peptide plus poly I:C (75 μ g), IL-2 immunocomplexes plus peptide or free IL-2 plus peptide.

3.13 DEPLETION OF CD8⁺ POPULATION

CD8⁺ population was depleted by i.p. injection of 200 μ g of α CD8 mAb (clone 53-6.72, Exbio).

3.14 ¹³¹I LABELLING OF IL-2

rhIL-2 (Peprotech, Rocky Hill, NJ) was labeled with ¹³¹I using IODO-GEN^R Pre-Coated Iodination Tubes (Pierce) and the remaining free iodine was removed by column chromatography (PD-10, Pierce, Rockford, IL). IL-2 was injected i.v. into B6 mice either as a free labeled IL-2 or as IL-2 immunocomplex prepared by pre-mixing the labeled IL-2 with mouse anti-human IL-2 mAb (clone MAB602) at a molar ratio 2:1.

3.15 PROLIFERATION ASSAY *IN VITRO*

Purified OT-I CD8⁺ T cells were seeded into Nunc 96-well flat-bottom plates in 0.2 ml volume and density of 5×10^4 cells/ml, cultured with 10 μ g/ml of soluble anti-CD3 mAb plus titrated amounts of IL-2 pre-mixed with isotype control mAb, S4B6 mAb, JES6.1A12 mAb or both JES6.5H4 and JES6.1A12 mAbs (eBioscience). Alternatively, Concanavalin A, IL-15/IL-15R α -Fc, IL-2 or IL-12 were added and in desired concentration. The plates were then cultured in 5 % CO₂ for 72 h at 37 °C. 18.5 kBq of [³H]-thymidine was added for the final 8 h or 16 h of cultivation before harvesting.

3.16 TREATMENT OF BCL1 LEUKEMIA AND B16F10 MELANOMA *IN VIVO*

5×10^5 BCL1 cells in 0.5 ml of culture medium without serum were i.p. inoculated on day 0 into BALB/c female mice. Polymeric conjugate was injected i.v. via a tail vein and control mice were injected with the same volume (300 μ l) of PBS. IL-2/S4B6 immunocomplexes and IL-12 were injected i.p. and control mice were injected with the same volume (250 μ l) of PBS. Mice surviving day 90 without any signs of BCL1 leukemia were considered as long-term survivors. 1×10^6 B16F10 cells in 0.1 ml of culture medium without serum were s.c. inoculated on day 0 into B6 male mice. Polymeric conjugate, IL-2/S4B6 and IL-12 were injected as described for BCL1 leukemia. Tumor size was measured every 2-4 days.

3.17 STATISTICAL ANALYSIS

The significance of any differences obtained among experimental groups (except tumor growth) was evaluated by the Student's *t*-test and significant difference was considered when $p < 0.05$. Differences in tumor size of multiple groups were compared to the control

group by one-way analysis of variance with Dunnett's multiple comparison test and significant difference was considered when $p < 0.05$.

4. RESULTS

Overcoming immunoescape mechanisms of BCL1 leukemia and induction of CD8⁺ T cell-mediated BCL1-specific resistance in mice cured by targeted polymer-bound doxorubicin. Kovar M., Tomala J., Chmelova H., Kovar L., Mrkvan T., Joskova R., Zakostelska Z., Etrych T., Strohalm J., Ulbrich K., Sirova M. and Rihova B., Cancer Res. 68 (23): 9875-83, 2008.

In this study, we examined the role of T regulatory cell expansion during BCL1 leukemia progression, which was identified as one of the immunoescape mechanisms of this experimental tumor model.

- We have found that IL-2/JES6.1 highly selectively expand T_{reg} cell population *in vivo* and this increase of T_{reg} numbers accelerate BCL1 leukemia progression.

Our data provided evidence that T regulatory cells might be used by tumor to evade immune recognition and thus successfully progress in the host.

In Vivo Expansion of Activated Naive CD8⁺ T Cells and NK Cells Driven by Complexes of IL-2 and anti-IL-2 mAb as novel approach of cancer immunotherapy. Tomala J., Chmelova H., Mrkvan T., Rihova B., Kovar M., J. Immunol. 183: 4904-12, 2009.

Our study was focused on IL-2 immunocomplexes function in terms of their capability to expand activated naive CD8⁺ T cells both *in vitro* and *in vivo*, anti-tumor effect and mechanisms of their increased biological activity in comparison to free IL-2.

We have found that:

- IL-2/S4B6 are able to drive the expansion of activated naive CD8⁺ T cells into functional memory-like CD8⁺ T cells.

- NK cells are dramatically expanded by IL-2/S4B6. They are even more sensitive to stimulation with IL-2/S4B6 than activated CD8⁺ T cells.

- **increased biological activity of IL-2 immunocomplexes is probably governed by considerable prolonged half-life in circulation. However, other mechanisms also play a role, depending on the type of IL-2 immunocomplexes.**

- **IL-2/S4B6 possesses significant anti-tumor effect. Prophylactic regimens (i.e. immunocomplexes applied shortly after tumor cell inoculation) led to survival of one-third (BCL1) or up to two-thirds (B16F10) of tumor bearing mice, depending on the IL-2/S4B6 dosage.**

- **combination of IL-2/S4B6 with doxorubicin was proved to be very potent, even if given late after the tumor cell inoculation (11 days).**

Considering these findings we concluded that IL-2 immunocomplexes are superior to free IL-2 *in vivo* in most aspects and we hypothesized that they could be useful in human medicine.

Antitumor activity of IL-2/anti-IL-2 mAb immunocomplexes synergizes with that of HPMA copolymer-bound doxorubicin conjugate due to its low immunosuppressive activity. Tomala J., Chmelova H., Strohalm J., Ulbrich K., Sirova M., Rihova B., Kovar M., *Int J Cancer* 129 (8): 2002-12, 2011.

In this study, we have further investigated the role of IL-2/S4B6 in expanding populations of immune system and in therapy of tumors.

We have found that:

- **IL-2/S4B6 immunocomplexes also expand T_{reg}, $\gamma\delta$ T and NKT cells.**

- **IL-2/S4B6 alone were confirmed to possess significant anti-tumor effect if given shortly after tumor inoculation.**

- **treatment of established tumors via combination of HPMA copolymer-bound doxorubicin conjugate followed by repeated IL-2/S4B6 treatment prolongs survival or even completely cures mice with tumors in very late progression stages.**

These findings confirmed the superior potential of IL-2/S4B6 in tumor treatment and suggested new effective combination to treat tumor in late state of progression. HPMA copolymer-bound doxorubicin, being far less immunostatic and possessing far greater anti-tumor effect than conventional chemotherapy, seems to be the ideal counterpart.

5. DISCUSSION AND CONCLUSIONS

5.1 ROBUST EXPANSION OF T REGULATORY (T_{REG}) CELLS DURING PROGRESSION OF BCL1 LEUKEMIA: ANOTHER IMMUNOESCAPE MECHANISM EMPLOYED BY BCL1 LEUKEMIA

In this study we showed that progression of BCL1 leukemia is accompanied by gradual increase of T_{reg} cells. Furthermore, we demonstrated that this increase accelerated the progression of BCL1 leukemia and thus could be considered as another immunoescape mechanism employed by BCL1 leukemia. Growing numbers of T_{reg} cells is relatively common for many different types of tumors and can be seen both in humans and rodents [25-26]. However, the evidence that expanded population of T_{reg} cells impedes anti-tumor immunity and thus promotes tumor progression was so far based on the effect seen after depletion of T_{reg} cells. Here we show, to our knowledge for the first time ever, direct evidence that an increase of T_{reg} cells accelerates tumor progression. We provided such evidence because we were able to expand T_{reg} cell population *in vivo*. T_{reg} cells were expanded by daily i.p. injections of immunocomplexes of rmIL-2 and anti-mouse IL-2 mAb JES6-1A12 for 7 consecutive days prior to inoculation of BCL1 cells. Such IL-2 immunocomplexes were previously shown to possess strong stimulatory activity against T_{reg} cells [10, 27].

5.2 IL-2 IMMUNOCOMPLEXES IN EXPANSION OF ACTIVATED $CD8^+$ T AND NK CELLS WITH FURTHER IMPLICATIONS IN THE CANCER TREATMENT

We have reported that IL-2 immunocomplexes can be used to strongly expand activated naïve $CD8^+$ T cells and that such expanded cells are able to form a robust population of memory cells which are functional in terms of effective IFN- γ production upon re-activation. Notably, this is the first report describing the powerful stimulatory activity of IL-2 immunocomplexes for activated naïve $CD8^+$ T cells. These results suggest that IL-2 immunocomplexes could be used as a strong enhancer of $CD8^+$ T cell responses and thus they could significantly improve vaccination protocols aimed to trigger CTL responses or anti-tumor immunity. We also demonstrated that IL-2/S4B6 immunocomplexes are also very potent in expanding NK cells. High expansion of NK cells could be useful in tumor

eradication, especially in case of tumor cells which are known to express low levels of MHC class I.

We have shown in three distinct tumor models (BCL1 leukemia, EL4 lymphoma, B16F10 melanoma) that IL-2/S4B6 prepared *in vitro* under well-defined conditions could efficiently treat these tumors. Supported by significant number of reports showing that both NK cells [28-29] and CD8⁺ T cells [28, 30] are involved in rejection of B16 melanoma cells, with some authors even reporting that NK cells and CD8⁺ T cells work in cooperative manner [31-32], our data imply that IL-2/S4B6 can be useful for cancer immunotherapy.

Extremely short half-life of IL-2 in circulation is well known and thus it is obvious that prolonged half-life was suggested as one of the possible mechanisms explaining increased biological activity of IL-2 immunocomplexes *in vivo*. By using radioactively labeled IL-2, we provided for the first time direct evidence that IL-2 immunocomplexes have much longer half-life in circulation than free IL-2. Two other reports dealing with this hypothesis [10, 33] were published; however, neither of them provides data which would allow direct comparison of pharmacokinetics of IL-2 immunocomplexes versus free IL-2, either because methodology used was not handling IL-2 immunocomplexes half-life *per se* or late timing and low frequency of sampling could lead to incorrect conclusions.

5.3 ANTI-TUMOR ACTIVITY OF IL-2/S4B6 IMMUNOCOMPLEXES SYNERGIZES WITH HPMA COPOLYMER-BOUND DOXORUBICIN CONJUGATE DUE TO ITS LOW IMMUNOSUPPRESSIVE ACTIVITY

There are a limited number of reports investigating the potential of IL-2 immunocomplexes in cancer immunotherapy [34]. Thus, we employed IL-2/S4B6 immunocomplexes and showed that although they have considerable anti-tumor activity when injected soon after tumor cell inoculation, they are almost ineffective when used for treatment of advanced tumors. However, when the mice bearing advanced tumors were first treated with polymeric conjugate based on HPMA copolymers bearing anthracycline drug doxorubicin and IgG molecules, which impairs the immune system to lower extent than free doxorubicin and possesses at least comparable antitumor activity, IL-2/S4B6 immunocomplexes significantly improved the therapeutic outcome. The polymeric conjugate was reported to alter the immunogenicity of tumor cells which could contribute

to induction of an anti-tumor immune response [35]. Such response could be significantly amplified by IL-2/S4B6 immunocomplexes similarly as OT-I CD8⁺ T cell response to a low dose of antigenic peptide. Moreover, we confirmed that 6 out of 7 BALB/c mice cured from BCL1 leukemia were resistant to re-challenge with lethal dose (5×10⁴ i.p.) of BCL1 cells.

6. REFERENCES

1. Gordon, J. and L.D. MacLean, *A lymphocyte-stimulating factor produced in vitro*. Nature, 1965. **208**(5012): p. 795-6.
2. Robb, R.J. and K.A. Smith, *Heterogeneity of human T-cell growth factor(s) due to variable glycosylation*. Mol Immunol, 1981. **18**(12): p. 1087-94.
3. Smith, K.A., K.J. Gilbride, and M.F. Favata, *Lymphocyte activating factor promotes T-cell growth factor production by cloned murine lymphoma cells*. Nature, 1980. **287**(5785): p. 853-5.
4. Rosenberg, S.A., et al., *Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2*. JAMA, 1994. **271**(12): p. 907-13.
5. Chavez, A.R., et al., *Pharmacologic administration of interleukin-2*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1182**: p. 14-27.
6. Fakhrai, H., et al., *Construction and characterization of retroviral vectors for interleukin-2 gene therapy*. J Immunother, 1997. **20**(6): p. 437-48.
7. Yang, R.K., et al., *Intratumoral hu14.18-IL-2 (IC) induces local and systemic antitumor effects that involve both activated T and NK cells as well as enhanced IC retention*. J Immunol, 2012. **189**(5): p. 2656-64.
8. Yang, J.C., et al., *Murine studies using polyethylene glycol-modified recombinant human interleukin 2 (PEG-IL-2): antitumor effects of PEG-IL2 alone and in combination with adoptive cellular transfer*. Lymphokine Cytokine Res, 1991. **10**(6): p. 475-80.
9. Melder, R.J., et al., *Pharmacokinetics and in vitro and in vivo anti-tumor response of an interleukin-2-human serum albumin fusion protein in mice*. Cancer Immunol Immunother, 2005. **54**(6): p. 535-47.

10. Boyman, O., et al., *Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes*. Science, 2006. **311**(5769): p. 1924-7.
11. Tomala, 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*. Int J Cancer, 2011. **129**(8): p. 2002-12.
12. Rihova, B. and M. Kovar, *Immunogenicity and immunomodulatory properties of HPMA-based polymers*. Adv Drug Deliv Rev, 2010. **62**(2): p. 184-91.
13. Kopecek, J., L. Sprincl, and D. Lim, *New types of synthetic infusion solutions. I. Investigation of the effect of solutions of some hydrophilic polymers on blood*. J Biomed Mater Res, 1973. **7**(2): p. 179-91.
14. Rihova, B., *Biocompatibility and immunocompatibility of water-soluble polymers based on HPMA*. Composites: Part B, 2007. **38** p. 386–397.
15. Etrych, T., et al., *New HPMA copolymers containing doxorubicin bound via pH-sensitive linkage: synthesis and preliminary in vitro and in vivo biological properties*. J Control Release, 2001. **73**(1): p. 89-102.
16. Etrych, T., et al., *Conjugates of doxorubicin with graft HPMA copolymers for passive tumor targeting*. J Control Release, 2008. **132**(3): p. 184-92.
17. Etrych, T., et al., *Biodegradable star HPMA polymer-drug conjugates: Biodegradability, distribution and anti-tumor efficacy*. J Control Release, 2011. **154**(3): p. 241-8.
18. Lammers, T., et al., *Effect of intratumoral injection on the biodistribution and the therapeutic potential of HPMA copolymer-based drug delivery systems*. Neoplasia, 2006. **8**(10): p. 788-95.
19. Seymour, L.W., et al., *Phase II studies of polymer-doxorubicin (PK1, FCE28068) in the treatment of breast, lung and colorectal cancer*. Int J Oncol, 2009. **34**(6): p. 1629-36.
20. Sirova, M., et al., *Treatment with HPMA copolymer-based doxorubicin conjugate containing human immunoglobulin induces long-lasting systemic anti-tumour immunity in mice*. Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(1): p. 35-47.

21. Etrych, T., et al., *Star-shaped immunoglobulin-containing HPMA-based conjugates with doxorubicin for cancer therapy*. J Control Release, 2007. **122**(1): p. 31-8.
22. Jelinkova, M., et al., *Starlike vs. classic macromolecular prodrugs: two different antibody-targeted HPMA copolymers of doxorubicin studied in vitro and in vivo as potential anticancer drugs*. Pharm Res, 2003. **20**(10): p. 1558-64.
23. Rihova, B., et al., *Cytostatic and immunomobilizing activities of polymer-bound drugs: experimental and first clinical data*. J Control Release, 2003. **91**(1-2): p. 1-16.
24. Ulbrich, K. and V. Subr, *Structural and chemical aspects of HPMA copolymers as drug carriers*. Adv Drug Deliv Rev, 2010. **62**(2): p. 150-66.
25. Wolf, A.M., et al., *Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(2): p. 606-12.
26. Chaput, N., et al., *Regulatory T cells prevent CD8 T cell maturation by inhibiting CD4 Th cells at tumor sites*. J Immunol, 2007. **179**(8): p. 4969-78.
27. Boyman, O., C.D. Surh, and J. Sprent, *Potential use of IL-2/anti-IL-2 antibody immune complexes for the treatment of cancer and autoimmune disease*. Expert Opin Biol Ther, 2006. **6**(12): p. 1323-31.
28. Kawarada, Y., et al., *NK- and CD8(+) T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides*. J Immunol, 2001. **167**(9): p. 5247-53.
29. Kumar, V. and M.E. McNerney, *A new self: MHC-class-I-independent natural-killer-cell self-tolerance*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(5): p. 363-74.
30. Dhanji, S. and H.S. Teh, *IL-2-activated CD8+CD44high cells express both adaptive and innate immune system receptors and demonstrate specificity for syngeneic tumor cells*. J Immunol, 2003. **171**(7): p. 3442-50.
31. Kurosawa, S., et al., *Early-appearing tumour-infiltrating natural killer cells play a crucial role in the generation of anti-tumour T lymphocytes*. Immunology, 1995. **85**(2): p. 338-46.
32. Xu, D., et al., *NK and CD8+ T cell-mediated eradication of poorly immunogenic B16-F10 melanoma by the combined action of IL-12 gene therapy and 4-1BB costimulation*. Int J Cancer, 2004. **109**(4): p. 499-506.

33. Phelan, J.D., T. Orekov, and F.D. Finkelman, *Cutting edge: mechanism of enhancement of in vivo cytokine effects by anti-cytokine monoclonal antibodies*. J Immunol, 2008. **180**(1): p. 44-8.
34. Kamimura, D., et al., *IL-2 in vivo activities and antitumor efficacy enhanced by an anti-IL-2 mAb*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 306-14.
35. Rihova, B., et al., *Cytotoxicity and immunostimulation: double attack on cancer cells with polymeric therapeutics*. Trends Biotechnol, 2009. **27**(1): p. 11-7.

7. PUBLICATIONS

Publications *in extenso* related to the present disertation:

Kovar M., **Tomala J.**, Chmelova H., Kovar L., Mrkvan T., Joskova R., Zákostelská Z., Etrych T., Strohalm J., Ulbrich K., Sirova M. and Rihova B.: Overcoming immunoescape mechanisms of BCL1 leukemia and induction of CD8+ T cell-mediated BCL1-specific resistance in mice cured by targeted polymer-bound doxorubicin. Cancer Res. 68 (23): 9875-83, 2008.

IF₂₀₁₁=7,856

Tomala J., Chmelova H., Mrkvan T., Rihova B., Kovar M.: In Vivo Expansion of Activated Naive CD8+ T Cells and NK Cells Driven by Complexes of IL-2 and anti-IL-2 mAb as novel approach of cancer immunotherapy. J. Immunol. 183: 4904-12, 2009.

IF₂₀₁₁=5,788

Tomala J., Chmelova H., Strohalm J., Ulbrich K., Sirova M., Rihova B., Kovar M.: Antitumor activity of IL-2/anti-IL-2 mAb immunocomplexes synergizes with that of HPMA copolymer-bound doxorubicin conjugate due to its low immunosuppressive activity. Int J Cancer 129(8): 2002-12, 2011.

IF₂₀₁₁=5,444

Publications *in extenso* not related to the present dissertation:

Rihova B, Etrych T, Sirova M, **Tomala J**, Ulbrich K, Kovar M. Synergistic effect of EMF-BEMER-type pulsed weak electromagnetic field and HPMA-bound doxorubicin on mouse EL4 T-cell lymphoma. *J Drug Target* 2011; 19: 890-9.

IF₂₀₁₁=2,696

Holubova J, Kamanova J, Jelinek J, **Tomala J**, Masin J., Kosova J, Stanek O, Bumba L, Michalek J, Kovar M and Sebo P: Delivery of large heterologous polypeptides across the cytoplasmic membrane of antigen-presenting cells by the Bordetella RTX hemolysin moiety lacking the adenylyl cyclase domain. *Infect Immun* 2012; 80: 1181-92.

IF₂₀₁₁=4,165

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Imunologie



Autoreferát disertační práce

Imunokomplexy IL-2 a anti-IL-2 monoklonálních protilátek jako nová třída selektivních a extrémně účinných imunostimulátorů

RNDr. Jakub Tomala

2012

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Program: Imunologie

Předseda oborové komise: Doc. RNDr. Vladimír Holář, DrSc.

Školící pracoviště: Oddělení imunologie a gnotobiologie
Mikrobiologický ústav AV ČR v.v.i.
Vídeňská 1083, 14220, Praha 4 Krč

Autor: RNDr. Jakub Tomala

Školitel: RNDr. Marek Kovář, PhD.

Autoreferát disertační práce byl odevzdán

Obhajoba disertační práce se bude konatod.....v konferenční místnosti
Mikrobiologického ústavu AV ČR v.v.i., Vídeňská 1083, 14220, Praha 4, Krč.

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty
Univerzity Karlovy v Praze.

OBSAH

Obsah	iii
Zkratky	v
Souhrn	vi
1. Úvod.....	1
2. Hypotéza a cíle.....	3
2.1 Efekt IL-2/anti-IL-2 mAb imunokomplexů na různé populace imunokompetentních buněk se zvláštním zaměřením na expanzi a biologickou aktivitu CD8 ⁺ T buněk, NK buněk a T _{reg} buněk.....	3
2.2 Doba setrvání IL-2/anti-IL-2 mAb imunokomplexů v oběhu v porovnání s volným IL-2.....	3
2.3 Role IL-2/anti-IL-2 mAb imunokomplexů v protinádorové imunitě a nádorové imunoterapii.....	3
2.4 Možnosti kombinované terapie agresivních nádorů pomocí HPMA vázaného doxorubicinu a IL-2/anti-IL-2 mAb imunokomplexů.....	3
3. Materiál a metody	3
3.1 Buněčné linie.....	3
3.2 Myši.....	3
3.3 Monoklonální protilátky.....	4
3.4 Značení povrchových antigenů	4
3.5 Intracelulární značení	4
3.6 Průtoková cytometrie	5
3.7 CFSE značení	5
3.8 Konjugáty doxorubicinu vázaného na polymer.....	5
3.9 IL-2 a IL-15 imunokomplexy.....	5
3.10 NK TEST.....	5
3.11 Expanze T _{reg} buněk.....	5
3.12 Adoptivní transfer OT-I buněk.....	6
3.13 Deplece CD8 ⁺ populace	6
3.14 ¹³¹ I značení IL-2	6
3.15 <i>In vitro</i> proliferační test.....	6
3.16 Léčba BCL1 leukemie a B16F10 melanomu <i>in vivo</i>	6
3.17 Statistická analýza	7
4. Výsledky	7
5. Diskuze a Závěry	9
5.1 Robustní expanze regulačních T (T _{reg}) buněk během progresu BCL1 leukemie: další z mechanismů úniku před imunitním systémem užívaný BCL1 leukémií 9	
5.2 IL-2 imunokomplexy a jejich role v expanzi aktivovaných CD8 ⁺ T a NK buněk a případné další implikace v léčbě nádorů	10

5.3	Protinádorový efekt IL-2/S4B6 imunokomplexů synerguje s konjugátem doxorubicinu vázaného na HEMA kopolymer díky jeho nízké imunosupresivní aktivitě.....	10
6.	References.....	11
7.	Publications.....	14

ZKRATKY

A700	Alexa Fluor 700
APC	Allofykocyanin
CD	Diferenciační skupina
Ci	Currie
CO ₂	Oxid uhličitý
CTL	Cytotoxické T lymfocyty
Da	Dalton
Dox	Doxorubicin
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
FCS	Fetální telecí sérum
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein isothiocyanát
h	Lidský
HPMA	<i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methacrylamid
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Ly5.1	CD45.1
m	Myší
mAb	Monoklonální protilátka
NK	Přirozený zabíječ
NKT	Přirozený zabíječ T
PBS	Fosfátový pufr
PE	Fykoerytrin
PEG	Polyethylenglykol
r	Rekombinantní
RBC	Červené krvinky
TCGF	T-buněčný růstový faktor
T _{reg}	T regulační

SOUHRN

Interleukin 2 (IL-2) se využívá jak v nádorové terapii, tak v mnoha dalších odvětvích včetně terapie chronických virových onemocnění či jako adjuvans ve vakcínách. Nicméně léčba pomocí IL-2 je limitována vážnými vedlejšími účinky spojenými s nezbytným vysoko dávkovaným léčivem.

Nedávná studie popsala situaci, kde určité anti-IL-2 monoklonální protilátky (mAb) místo blokování funkce IL-2 jeho biologickou aktivitu potencovaly. Výsledkem vazby IL-2 a anti-IL-2 mAb je pak vznik superagonistických imunokomplexů s mnohem vyšší a selektivnější biologickou aktivitou v porovnání s volným IL-2 *in vivo*. Toto zjištění by mohlo v konečném důsledku vést ke zlepšení IL-2 terapií překonáním problémů spojených s jeho podáváním.

Prokázali jsme, že imunokomplexy složené z IL-2 a anti-IL-2 mAb S4B6 (IL-2/S4B6) převážně stimulují buňky exprimující CD122 a CD132 (dimerní IL-2 receptor), i.e. NK a paměťové CD8⁺ T lymfocyty, stejně jako T_{reg}, $\gamma\delta$ T a NKT buňky. IL-2/S4B6 jsou schopné indukovat expanzi aktivovaných naivních CD8⁺ T buněk a následný vznik funkční paměťovým buňkám podobné CD8⁺ T buněčné populace. Navíc mají jasný terapeutický potenciál jak samy o sobě, tak v kombinaci s novým typem cytostatik na bázi poly(*N*-(2-hydroxypropyl) metacrylamidu) (HPMA), což jsme ukázali na nádorovém modelu BCL1 leukémie a B16F10 melanomu. Profylaktické podání IL-2/S4B6 vedlo k přežití jedné třetiny (BCL1) nebo až dvou třetin (B16F10) pokusných myší inokulovaných nádorovými buňkami v závislosti na dávkování IL-2/S4B6. Aplikace HPMA konjugátů s navázaným doxorubicinem následovaná opakovaným podáním IL-2/S4B6 prodloužila dobu přežívání či úplně vyléčila dokonce i myši s nádory ve velmi pozdních stádiích.

Druhý typ imunokomplexů, jímž jsme se ve svých výzkumech zabývali, se skládá z IL-2 a anti-IL-2 mAb JES6.1 (IL-2/JES6.1). Je specifický pro buňky exprimující CD25 a stimuluje expanzi aktivovaných CD8⁺ T a T_{reg} buněk. Takto indukovaný nárůst počtu T_{reg} buněk urychluje progresi BCL1 leukémie *in vivo*.

Ve svých studiích jsme dále ukázali, že zvýšená biologická aktivita IL-2 imunokomplexů je pravděpodobně způsobena značně prodlouženou dobou setrvání komplexů v oběhu.

Naše výsledky by mohly přispět k lepšímu pochopení mechanismu působení IL-2 imunokomplexů a tím pomoci k přenesení jejich užití do klinické praxe.

1. ÚVOD

Interleukin-2 (IL-2) byl prvním objeveným interleukinem (1965). Původní jméno, blastogenní faktor [1], později nahradilo označení T buněčný růstový faktor (TCGF), které lépe odpovídalo jeho prvotně popsané funkci.

IL-2 [2-3] je malý protein o velikosti zhruba 15 kDa, který zastává v imunitním systému velkou škálu funkcí, primárně ale představuje prototyp autokrinního růstového faktoru a je produkován po aktivaci T buňkami. Tato jeho funkce vedla k výzkumu IL-2 jako potenciálního terapeutika. V roce 1984 byl rekombinantní IL-2 poprvé použit v nádorové terapii. Po jeho schválení FDA se na IL-2 zaměřila větší pozornost, což vedlo k objevení jeho dalších funkcí a tedy i jiných aplikací jako je léčba chronických virových onemocnění nebo použití ve vakcínách jako adjuvans.

I přes dobrou účinnost u pacientů s maligním melanomem a renálním karcinomem (5-17 % plně odpovídajících jedinců) [4], je léčba IL-2 problematická kvůli závažným vedlejším účinkům různé intenzity, od mírných chřipce podobných symptomů až po život ohrožující stavy, jako je například prudká cytokinová bouře a edém plic [5]. Tyto komplikace jsou spojeny s vysokým dávkováním nezbytným pro léčbu IL-2 a jsou tak jeho nejvíce limitujícím faktorem.

Jedna z mnoha zkoumaných cest, jak překonat zmíněné komplikace spojené s aplikací IL-2, byla založena na genové terapii. Nádorové buňky byly transfekovány, aby produkovaly IL-2 a tak byly imunogennější [6]. Další z možností bylo využití imunocytokinů [7] (Ab-cytokin fúzní protein) či snaha o zvýšení doby setrvání IL-2 v oběhu pomocí jeho navázání na polymerní nosič [8] (PEG) nebo sérový protein [9] (albumin).

Teprve až objev v roce 2006 otevřel nové možnosti ve výzkumu IL-2 aplikací v klinické medicíně a ukázal cestu, jenž by mohla vést k potlačení problémů spojených s IL-2 léčbou. Bylo popsáno, že určité anti-IL-2 monoklonální protilátky (mAb) jsou schopny místo blokování funkcí IL-2 jeho biologickou aktivitu potencovat [10]. Výsledkem vazby IL-2 a anti-IL-2 je vznik superagonistických imunokomplexů s mnohem vyšší a selektivnější biologickou aktivitou v porovnání s volným IL-2 *in vivo*.

Samotná imunoterapie však k úplnému vyléčení nádorového onemocnění nestačí [11]. Nejčastěji se využívá její kombinace s jinými konvenčními metodami, jako je například chemoterapie.

Mezi klasické tři metody nádorové léčby patří chemoterapie, radioterapie a chirurgické zákrok vedoucí odstranění postižené tkáně. Při systémových postiženích organismu, t.j. v

případě metastatického rozsevu nádorových buněk, je ovšem chemoterapie jediným možným řešením. Konvenční chemoterapie je ale limitována vážnými vedlejšími účinky, které provázejí aplikaci cytostatik. Mimo to je většina těchto léčiv výrazně imunosupresivních a poškozují tak imunitní systém, což vede k významnému snížení efektivity imunoterapie aplikované po chemoterapeutické léčbě.

Jednou z možných cest, jak tyto nevýhody překonat, je kovalentní vazba cytostatika na polymerní nosič, z něhož mohou být uvolněny ve své aktivní formě přímo v prostředí nádorové tkáně [12]. Takové makromolekulární konjugáty mají mnohem menší vedlejší účinky a lepší farmakologické vlastnosti než volné léčivo.

Mezi nejvíce a nejúspěšněji používané patří polymerní nosič cytostatik založený na HPMA. Tento polymer se skládá z repetitivních *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamidových bloků. Původně byl vytvořen jako syntetická náhrada plasmy s komerčním názvem "Duxon", má ovšem téměř ideální vlastnosti jako nosič léčiv [13] – je biokompatibilní, netoxický, má několik reaktivních skupin a až do velikosti okolo 40 kDa je vylučován ledvinami [14]. Pokud je na něj navázáno cytostatikum, jako je například antracyklinové antibiotikum doxorubicin (Dox), získává konjugát vyšší protinádorovou aktivitu *in vivo* v porovnání s volným Dox. Takové konjugáty jsou schopny zcela vyléčit myši se syngenními nádory a zároveň i navodit dlouhotrvající protinádorovou paměť imunitního systému a tak i rezistenci k původnímu nádoru [15-22]. První výsledky získané z klinických studií po aplikaci zmíněných protinádorových terapeutik mimo jiné ukázaly mnohem nižší hemato- a imunotoxicitu a dokonce byla pozorována i aktivace některých částí imunitního systému [23].

Z daných faktů lze tedy usuzovat, že je imunoterapie IL-2/anti-IL-2 imunokomplexy v kombinaci s chemoterapií konjugáty na bázi HPMA dalším možným nástrojem pro léčbu nádorových onemocnění.

2. HYPOTÉZA A CÍLE

Hlavní cíl této studie bylo přispět novými poznatky k nedávno popsané problematice imunokomplexů cytokinů a jejich příslušných anti-cytokinových protilátek, se zvláštním zaměřením na IL-2 imunokomplexy. Hlavní cíle práce lze rozdělit do několika bodů:

- 2.1 Efekt IL-2/anti-IL-2 mAb imunokomplexů na různé populace imunokompetentních buněk se zvláštním zaměřením na expanzi a biologickou aktivitu CD8⁺ T buněk, NK buněk a T_{reg} buněk.
- 2.2 Doba setrvání IL-2/anti-IL-2 mAb imunokomplexů v oběhu v porovnání s volným IL-2.
- 2.3 Role IL-2/anti-IL-2 mAb imunokomplexů v protinádorové imunitě a nádorové imunoterapii.
- 2.4 Možnosti kombinované terapie agresivních nádorů pomocí HPMA vázaného doxorubicinu a IL-2/anti-IL-2 mAb imunokomplexů.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 BUNĚČNÉ LINIE

Myší B buněčná leukemie BCL1, B16F10 melanom a CTLL-2 buněčná linie byly zakoupeny od firmy American Type Culture Collection.

3.2 MYŠI

Samice myší BALB/c a samci myší C57BL/6 (B6) byly získány z myšího chovu Fyziologického Ústavu (Akademie věd České Republiky). Transgenní OT-I myši a B6.SJL (Ly5.1) myši byly chovány v zařízení pro geneticky modifikované organismy na Ústavu Molekulární Genetiky (Akademie věd České Republiky). Věkové rozmezí experimentálních myší bylo 9-15 týdnů. Veškeré experimenty byly schváleny Komisí na ochranu zvířat Mikrobiologického Ústavu (Akademie věd České Republiky).

3.3 MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY

Pro barvení buněčných povrchů byly použity následující myší monoklonální protilátky: CD3-PB, CD3-FITC, CD8-A700, CD8-PerCP-Cy5.5, CD25-APC, CD25-PE, CD44-PE, CD45.1-APC, DX5-PE, IFN- γ -PE mAb, Foxp3-PE (eBioscience), CD4-PerCP, $\gamma\delta$ TCR-PE (BD Pharmingen). CD161-APC a nekonjugovaná anti-IL-2 mAb S4B6 byly poskytnuty Dr. Karlem Drbalem (Ústav Molekulární Genetiky AV ČR). Nekonjugované anti-mIL-2 mAb JES6.1A12 a JES6.5H4 byly koupeny od firmy eBioscience. Monoklonální protilátka proti lidskému IL-2, klon MAB602, byla pořízena od firmy R&D Systems.

3.4 ZNAČENÍ POVRCHOVÝCH ANTIGENŮ

Ze slezin pokusných myší byly připraveny buněčné suspenze. Po RBC lýze byly buňky resuspendovány v roztoku pro průtokovou cytometrii (PBS, 2% FTS, 2 mmol EDTA, 0,05% NaN₃), zablokovány 10% myším sérem po dobu 30 minut na ledu a barveny ve tmě monoklonálními protilátkami po dobu 30 minut na ledu. Při použití biotinylovaných monoklonálních protilátek byly buňky dodatečně inkubovány po dobu 10 minut na ledu se streptavidinem konjugovaným s fluorochromem. Po každém kroku byly buňky dvakrát promyty roztokem pro průtokovou cytometrii a před analýzou byly fixovány 4% paraformaldehydem.

3.5 INTRACELULÁRNÍ ZNAČENÍ

Pro značení Foxp3 byla použita sada pufrů pro Foxp3 barvení (eBioscience) a pro značení IFN- γ byl použit IC fixační pufr a Permeabilizační pufr (eBioscience). Jako alternativa byla použita sada BD Cytotfix/Cytoperm pufrů pro značení buněk (BD Biosciences). Značení povrchových antigenů je popsáno výše. Buňky byly resuspendovány ve 100 μ l Fixačního/Permeabilizačního pracovního roztoku a inkubovány po dobu 30 až 60 minut na ledu. Následně byly dvakrát promyty Permeabilizačním roztokem a zablokovány 2% myším sérem po dobu 10 minut na ledu. K buňkám byl poté přidán konjugát mAb-PE a byly inkubovány ve tmě po dobu 30 minut na ledu. Nakonec byly buňky dvakrát promyty Permeabilizačním pufrům a zafixovány 4% paraformaldehydem.

3.6 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Analýza pomocí průtokové cytometrie byla provedena na přístroji LSRII (BD Biosciences) a získaná data byla zpracována za použití softwaru FlowJo (Tree Star).

3.7 CFSE ZNAČENÍ

Barvení buněk pomocí CFSE bylo provedeno podle postupu popsaného dříve [10].

3.8 KONJUGÁTY DOXORUBICINU VÁZANÉHO NA POLYMER

Syntéza všech polymerních konjugátů byla popsána již dříve [24].

3.9 IL-2 A IL-15 IMUNOKOMPLEXY

Dané komplexy [10] byly připraveny smícháním rmIL-2 nebo rmIL-15 (Prospec) s anti-IL-2 mAb S4B6 nebo JES6.1 či IL-15R α -Fc v molárním poměru 2:1 v prostředí PBS. Po 15-minutové inkubaci za pokojové teploty byly imunokomplexy naředěny PBS na požadovanou koncentraci.

3.10 NK TEST

B6 myši byly i.p. injikovány IL-2 nebo IL-2/S4B6 mAb imunokomplexy a/nebo IL-12. Po 5 dnech byly myši eutanizovány a za pomoci Histopaque 1083 z nich byly vyizolovány splenocyty.

YAC-1 buňky, které jsou senzitivní na cytolytickou aktivitu NK buněk, byly 20 hodin značeny [³H]-thymidinem (3 μ Ci/ml), promyty a nasazeny do 96-jamkové destičky s kulatým dnem (1×10^4 buněk/ml). Ke značeným YAC-1 buňkám byla přidána rozdílná množství splenocytů a byly inkubovány po dobu 4 hodin v 37 °C v 5% CO₂.

3.11 EXPANZE T_{REG} BUNĚK

Pro *in vivo* expanzi T_{reg} buněk byly BALB/c myši injikovány IL-2/JES6 mAb imunokomplexy po dobu 7 po sobě následujících dní před inokulací BCL1 buňkami. Z ocasní žíly byl odebrán malý vzorek (50–100 μ l) periferní krve 24 hodin po poslední dávce a expanze T_{reg} buněk (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) byla ověřena pomocí průtokové cytometrie.

3.12 ADOPTIVNÍ TRANSFER OT-I BUNĚK

Purifikované OT-I CD8⁺ T buňky (Ly 5.2) byly označeny CFSE a i.v. injikovány B6.SJL příjemcům (Ly 5.1) v koncentraci $1,5 \times 10^6$ buněk na myš. Následující den byly myši injikovány PBS, SIINFEKL peptidem (MBL International), peptidem s polyI:C (75 µg), IL-2 imunokomplexy s peptidem nebo volným IL-2 s peptidem.

3.13 DEPLECE CD8⁺ POPULACE

CD8⁺ populace byla depletována i.p. injekcí 200 µg αCD8 mAb (klon 53-6.72, Exbio).

3.14 ¹³¹I ZNAČENÍ IL-2

rhIL-2 (Peprotech) byl označen ¹³¹I za použití IODO-GEN^R Pre-Coated Iodination Tubes (Pierce) a zbylý volný jod byl odstraněn sloupcovou chromatografií (PD-10, Pierce). IL-2 byl následně i.v. injikován do B6 myši buď jako volný značený IL-2, nebo jako IL-2 imunokomplex připravený smícháním značeného IL-2 s myši IL-2 mAb proti lidskému IL-2 (klon MAB602) v molárním poměru 2:1.

3.15 *IN VITRO* PROLIFERAČNÍ TEST

Purifikované OT-I CD8⁺ T buňky byly nasazeny do 96-jamkových destiček s plochým dnem od firmy Nunc v objemu 0,2 ml a hustotě 5×10^4 buněk/ml, kultivovány s 10 µg/ml solubilní anti-CD3 mAb spolu s vytitrovaným množstvím IL-2 smíchaným s izotypovou kontrolní mAb, S4B6 mAb, JES6.1A12 mAb nebo JES6.5H4 a JES6.1A12 mAb dohromady (eBioscience). Alternativně byly přidány v požadované koncentraci konkanavalin A, IL-15/IL-15Rα-Fc, IL-2 či IL-12. Destičky byly kultivovány po dobu 72 hodin při 37 °C v 5% CO₂. Na posledních 8 až 16 hodin kultivace před harvestováním buněk bylo přidáno 18.5 kBq [³H]-thymidinu.

3.16 LÉČBA BCL1 LEUKEMIE A B16F10 MELANOMU *IN VIVO*

Den 0 bylo do samic BALB/c myši i.p. inokulováno 5×10^5 BCL1 buněk v 0,5 ml bezsérového média. Polymerní konjugát byl i.v. injikován ocasní žílou. Kontrolním myším byl stejným způsobem a ve stejném objemu (300 µl) podán PBS. IL-2/S4B6 imunokomplexy a IL-12, případně PBS ve stejném objemu (250 µl) u kontrolních myši,

byly injikovány i.p. Za dlouhodobě přežívající jedince byly prohlášeny myši, které se dožily 90. dne bez jakýchkoli příznaků BCL1 leukemie.

Den 0 bylo do samců B6 myši s.c. inokulováno 1×10^6 B16F10 buněk v 0,1 ml kultivačního bezsérového média. Polymerní konjugát, IL-2/S4B6 a IL-12 byly injikovány dle výše zmíněného popisu pro BCL1 leukemii. Velikost nádorů byla měřena každé 2-4 dny.

3.17 STATISTICKÁ ANALÝZA

Signifikance rozdílů mezi experimentálními skupinami (vyjma růstu nádoru) byla vyhodnocena Studentovým *t*-testem a za signifikantní byly považovány rozdíly při $p < 0,05$. Odlišnosti ve velikosti nádorů skupin byly porovnány s kontrolní skupinou jednostranným Dunettovým testem pomocí analýzy rozptylu. Za signifikantní byly považovány rozdíly při $p < 0,05$.

4. VÝSLEDKY

Overcoming immunescape mechanisms of BCL1 leukemia and induction of CD8⁺ T cell-mediated BCL1-specific resistance in mice cured by targeted polymer-bound doxorubicin. Kovar M., Tomala J., Chmelova H., Kovar L., Mrkvan T., Joskova R., Zakostelska Z., Etrych T., Strohalm J., Ulbrich K., Sirova M. and Rihova B., Cancer Res. 68 (23): 9875-83, 2008.

V této studii jsme se zabývali rolí expanze regulačních T buněk během progresu BCL1 leukemie, jelikož byla identifikována jako jeden z mechanismů úniku daného experimentálního nádorového modelu před imunitním systémem.

- Zjistili jsme, že IL-2/JES6.1 vysoce selektivně expandují T_{reg} buněčnou populaci *in vivo* a že tento nárůst počtu T_{reg} buněk urychluje progresi BCL1 leukemie.

Naše data dokazují, že regulační T buňky mohou být zneužity nádorem, který s jejich pomocí zůstává chráněn před rozpoznáním imunitním systémem a dochází tak k jeho postupné progresi v hostiteli.

In Vivo Expansion of Activated Naive CD8⁺ T Cells and NK Cells Driven by Complexes of IL-2 and anti-IL-2 mAb as novel approach of cancer immunotherapy.

Tomala J., Chmelova H., Mrkvan T., Rihova B., Kovar M., J. Immunol. 183: 4904-12, 2009.

Naše studie se zaměřila na funkci IL-2 imunokomplexů z hlediska jejich schopnosti expandovat aktivované naivní CD8⁺ T buňky *in vitro* a *in vivo*, jejich protinádorového efektu a mechanismů jejich zvýšené biologické aktivity v porovnání s volným IL-2.

Zjistili jsme, že:

- **IL-2/S4B6 jsou schopny indukovat expanzi aktivovaných naivních CD8⁺ T buněk na funkční CD8⁺ T buňky paměťového charakteru.**

- **dochází k dramatické expanzi NK buněk indukované podáním IL-2/S4B6. Mimo to jsou NK buňky dokonce senzitivnější na stimulaci IL-2/S4B6 než aktivované CD8⁺ T buňky.**

- **zvýšená biologická aktivita IL-2 imunokomplexů je pravděpodobně způsobena významným prodloužením jejich doby setrvání v cirkulaci a zřejmě i dalšími mechanismy v závislosti na typu imunokomplexů.**

- **IL-2/S4B6 mají signifiantní protinádorové účinky. Profylaktické podání (t.j. aplikace imunokomplexů krátce po inokulaci nádorovými buňkami) vedlo v závislosti na dávkování imunokomplexů k přežití jedné třetiny (BCL1) až dvou třetin (B16F10) myši nesoucích nádor.**

- **kombinace IL-2/S4B6 s doxorubicinem je velmi účinná i v případě pozdějšího podání po inokulaci nádorovými buňkami (11. den).**

Dané výsledky vedou k závěru, že IL-2 imunokomplexy jsou pro užití *in vivo* lepší než volný IL-2 ve většině aspektů. Předpokládáme, že by mohly najít uplatnění v humánní medicíně.

Antitumor activity of IL-2/anti-IL-2 mAb immunocomplexes synergizes with that of HPMA copolymer-bound doxorubicin conjugate due to its low immunosuppressive activity. Tomala J., Chmelova H., Strohalm J., Ulbrich K., Sirova M., Rihova B., Kovar M., Int J Cancer 129(8): 2002-12, 2011.

V dané studii jsme pokračovali ve zkoumání role IL-2/S4B6 v expanzi buněčných populací imunitního systému a v terapii nádorových onemocnění.

Prokázali jsme, že:

- **IL-2/S4B6 imunokomplexy expandují také T_{reg} , $\gamma\delta$ T a NKT buňky.**
- **IL-2/S4B6 mají samy o sobě významné protinádorové účinky, pokud jsou podány krátce po inokulaci nádorovými buňkami.**
- **léčba již rozvinutého nádoru kombinací konjugátů doxorubicinu vázaného na HPMA kopolymer a následné opakované aplikace IL-2/S4B6 prodlužuje přežití nebo je dokonce schopna plně vyléčit i myši ve velmi pozdním stádiu nádorového onemocnění.**

Tato zjištění potvrdila vysoký potenciál užití IL-2/S4B6 v nádorové terapii a přinesla novou efektivní kombinaci pro léčbu nádorů ve velmi pozdním stadiu. Jako ideální partner se jeví doxorubicin vázaný na HPMA kopolymer, který je mnohem méně imunosupresivní a má mnohem větší protinádorové účinky než konvenční chemoterapie.

5. DISKUZE A ZÁVĚRY

5.1 ROBUSTNÍ EXPANZE REGULAČNÍCH T (T_{REG}) BUNĚK BĚHEM PROGRESE BCL1 LEUKEMIE: DALŠÍ Z MECHANISMŮ ÚNIKU PŘED IMUNITNÍM SYSTÉMEM UŽÍVANÝ BCL1 LEUKÉMIÍ

Prokázali jsme, že progresse BCL1 leukemie je provázána nárůstem počtu T_{reg} buněk a že tento nárůst progresi onemocnění ještě urychluje, čímž se zřejmě řadí mezi únikové mechanismy užívané BCL1 leukemií v obraně před imunitním systémem. Zvýšení množství T_{reg} buněk je relativně běžné pro řadu nádorů a bylo popsáno jak u hlodavců, tak u lidí [25-26]. Důkaz, že tato expanze populace T_{reg} buněk brání protinádorové imunitní odpovědi a tím umožňuje progresi onemocnění, byl nicméně donedávna založen pouze na pozorováních opírajících se o depleci T_{reg} buněk. Poprvé tak předkládáme přímý důkaz, že nárůst T_{reg} buněk urychluje progresi nádoru, a to díky možnosti expandovat T_{reg} populaci *in vivo*. Expanze této populace byla provedena tak, že po dobu sedmi po sobě jdoucích dní před inokulací BCL1 buněk byly i.p. podávány imunokomplexy rmlL-2 a myši anti-IL-2 mAb JES6-1A12, u kterých již dříve bylo prokázáno, že mají silnou stimulační aktivitu vůči T_{reg} buňkám [10, 27].

5.2 IL-2 IMUNOKOMPLEXY A JEJICH ROLE V EXPANZI AKTIVOVANÝCH CD8⁺ T A NK BUNĚK A PŘÍPADNÉ DALŠÍ IMPLIKACE V LÉČBĚ NÁDORŮ

Popsali jsme, že IL-2 imunokomplexy mohou být využity k indukci expanze naivních CD8⁺ T buněk a že takto expandované buňky jsou schopny po reaktivaci utvořit robustní populaci funkčních paměťových buněk produkujících IFN- γ . Jedná se o první publikaci popisující silnou stimulační aktivitu IL-2 imunokomplexů pro aktivované naivní CD8⁺ T buňky. Naše výsledky ukazují, že tyto komplexy mohou být využity k výraznému zesílení CD8⁺ T buněčných odpovědí a vylepšit tak vakcinační protokoly cílené na spuštění CTL odpovědi nebo protinádorové imunity. Dále jsme prokázali, že IL-2/S4B6 imunokomplexy silně expandují NK buňky, což by mohlo být užitečné pro nádorovou imunoterapii, zvláště v případě nádorů exprimujících nízká množství MHC I molekul.

Potenciální aplikaci IL-2/S4B6 imunokomplexů v protinádorové léčbě jsme zkoumali na třech různých nádorových modelech (BCL1 leukemie, EL4 lymfom, B16F10 melanom) za použití IL-2/S4B6 připravených *in vitro* za jasně definovaných podmínek. Spolu s dalšími publikacemi popisujícími nejen zapojení NK buněk [28-29] a CD8⁺ T buněk [28, 30] do rejekce B16 melamu, ale dokonce i jejich spolupráci [31-32], naše data naznačují využitelnost IL-2/S4B6 imunokomplexů v nádorové imunoterapii.

Je známo, že doba setrvání IL-2 v krevním oběhu je extrémně krátká, a proto bylo jako jeden z možných mechanismů zvýšené biologické aktivity IL-2 imunokomplexů *in vivo* navrženo prodloužení doby setrvání v krevním oběhu. Naše data jsou prvním přímým důkazem mnohem delšího setrvání IL-2 imunokomplexů v oběhu než volného IL-2 prostřednictvím radioaktivně značeného IL-2. Byly publikovány dvě další studie zabývající se touto hypotézou [10, 33], nicméně žádná z nich neobsahuje data umožňující srovnání farmakokinetiky IL-2 imunokomplexů s volným IL-2 buď proto, že metodický přístup nezohledňoval setrvání imunokomplexů v cirkulaci jako takových nebo relativně pozdní a málo četné intervaly zvolené pro odběr vzorků pro analýzu mohly vést k mylným závěrům.

5.3 PROTINÁDOROVÝ EFEKT IL-2/S4B6 IMUNOKOMPLEXŮ SYNERGUJE S KONJUGÁTEM DOXORUBICINU VÁZANÉHO NA HPMA KOPOLYMER DÍKY JEHO NÍZKÉ IMUNOSUPRESIVNÍ AKTIVITĚ

Existuje omezené množství publikací věnujících se potenciálu využití IL-2 imunokomplexů v nádorové imunoterapii [33]. Proto jsme se rozhodli využít IL-2/S4B6

imunokomplexy. Ukázali jsme, že ačkoli mají značnou protinádorovou aktivitu při aplikaci brzy po inokulaci nádorovými buňkami, jsou téměř neúčinné při léčbě nádorů v pokročilém stádiu. Když však byl myším nosičem takové nádory nejprve podán polymerní konjugát založený na HPMA kopolymerech s navázaným antracyklinovým léčivem doxorubicinem a IgG molekulami, zlepšily IL-2/S4B6 imunokomplexy signifikantně terapeutický účinek léčby. Daný konjugát oslabuje imunitní systém do menší míry než volný doxorubicin a má přinejmenším stejnou protinádorovou aktivitu. Bylo publikováno, že polymerní konjugát mění imunogenicitu nádorových buněk, což by mohlo přispívat k indukci protinádorové imunitní odpovědi [34]. Ta by mohla být významně amplifikována aplikací IL-2/S4B6 imunokomplexů, podobně jako odpověď OT-I CD8⁺ T buněk odpovídajících na nízké množství antigenního peptidu. Navíc jsme potvrdili, že 6 ze 7 BALB/c myši vyléčených z BCL1 leukemie bylo rezistentních na opakované podání letální dávky (5×10^4 i.p.) BCL1 buněk.

6. REFERENCES

1. Gordon, J. and L.D. MacLean, *A lymphocyte-stimulating factor produced in vitro*. Nature, 1965. **208**(5012): p. 795-6.
2. Robb, R.J. and K.A. Smith, *Heterogeneity of human T-cell growth factor(s) due to variable glycosylation*. Mol Immunol, 1981. **18**(12): p. 1087-94.
3. Smith, K.A., K.J. Gilbride, and M.F. Favata, *Lymphocyte activating factor promotes T-cell growth factor production by cloned murine lymphoma cells*. Nature, 1980. **287**(5785): p. 853-5.
4. Rosenberg, S.A., et al., *Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2*. JAMA, 1994. **271**(12): p. 907-13.
5. Chavez, A.R., et al., *Pharmacologic administration of interleukin-2*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1182**: p. 14-27.
6. Fakhrai, H., et al., *Construction and characterization of retroviral vectors for interleukin-2 gene therapy*. J Immunother, 1997. **20**(6): p. 437-48.
7. Yang, R.K., et al., *Intratumoral hu14.18-IL-2 (IC) induces local and systemic antitumor effects that involve both activated T and NK cells as well as enhanced IC retention*. J Immunol, 2012. **189**(5): p. 2656-64.

8. Yang, J.C., et al., *Murine studies using polyethylene glycol-modified recombinant human interleukin 2 (PEG-IL-2): antitumor effects of PEG-IL2 alone and in combination with adoptive cellular transfer*. *Lymphokine Cytokine Res*, 1991. **10**(6): p. 475-80.
9. Melder, R.J., et al., *Pharmacokinetics and in vitro and in vivo anti-tumor response of an interleukin-2-human serum albumin fusion protein in mice*. *Cancer Immunol Immunother*, 2005. **54**(6): p. 535-47.
10. Boyman, O., et al., *Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes*. *Science*, 2006. **311**(5769): p. 1924-7.
11. Tomala, 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*. *Int J Cancer*, 2011. **129**(8): p. 2002-12.
12. Rihova, B. and M. Kovar, *Immunogenicity and immunomodulatory properties of HPMA-based polymers*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010. **62**(2): p. 184-91.
13. Kopecek, J., L. Sprincl, and D. Lim, *New types of synthetic infusion solutions. I. Investigation of the effect of solutions of some hydrophilic polymers on blood*. *J Biomed Mater Res*, 1973. **7**(2): p. 179-91.
14. Rihova, B., *Biocompatibility and immunocompatibility of water-soluble polymers based on HPMA*. *Composites: Part B*, 2007. **38** p. 386–397.
15. Etrych, T., et al., *New HPMA copolymers containing doxorubicin bound via pH-sensitive linkage: synthesis and preliminary in vitro and in vivo biological properties*. *J Control Release*, 2001. **73**(1): p. 89-102.
16. Etrych, T., et al., *Conjugates of doxorubicin with graft HPMA copolymers for passive tumor targeting*. *J Control Release*, 2008. **132**(3): p. 184-92.
17. Etrych, T., et al., *Biodegradable star HPMA polymer-drug conjugates: Biodegradability, distribution and anti-tumor efficacy*. *J Control Release*, 2011. **154**(3): p. 241-8.
18. Lammers, T., et al., *Effect of intratumoral injection on the biodistribution and the therapeutic potential of HPMA copolymer-based drug delivery systems*. *Neoplasia*, 2006. **8**(10): p. 788-95.

19. Seymour, L.W., et al., *Phase II studies of polymer-doxorubicin (PK1, FCE28068) in the treatment of breast, lung and colorectal cancer*. Int J Oncol, 2009. **34**(6): p. 1629-36.
20. Sirova, M., et al., *Treatment with HPMA copolymer-based doxorubicin conjugate containing human immunoglobulin induces long-lasting systemic anti-tumour immunity in mice*. Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(1): p. 35-47.
21. Etrych, T., et al., *Star-shaped immunoglobulin-containing HPMA-based conjugates with doxorubicin for cancer therapy*. J Control Release, 2007. **122**(1): p. 31-8.
22. Jelinkova, M., et al., *Starlike vs. classic macromolecular prodrugs: two different antibody-targeted HPMA copolymers of doxorubicin studied in vitro and in vivo as potential anticancer drugs*. Pharm Res, 2003. **20**(10): p. 1558-64.
23. Rihova, B., et al., *Cytostatic and immunomobilizing activities of polymer-bound drugs: experimental and first clinical data*. J Control Release, 2003. **91**(1-2): p. 1-16.
24. Ulbrich, K. and V. Subr, *Structural and chemical aspects of HPMA copolymers as drug carriers*. Adv Drug Deliv Rev, 2010. **62**(2): p. 150-66.
25. Wolf, A.M., et al., *Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(2): p. 606-12.
26. Chaput, N., et al., *Regulatory T cells prevent CD8 T cell maturation by inhibiting CD4 Th cells at tumor sites*. J Immunol, 2007. **179**(8): p. 4969-78.
27. Boyman, O., C.D. Surh, and J. Sprent, *Potential use of IL-2/anti-IL-2 antibody immune complexes for the treatment of cancer and autoimmune disease*. Expert Opin Biol Ther, 2006. **6**(12): p. 1323-31.
28. Kawarada, Y., et al., *NK- and CD8(+) T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides*. J Immunol, 2001. **167**(9): p. 5247-53.
29. Kumar, V. and M.E. McNerney, *A new self: MHC-class-I-independent natural-killer-cell self-tolerance*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(5): p. 363-74.

30. Dhanji, S. and H.S. Teh, *IL-2-activated CD8+CD44high cells express both adaptive and innate immune system receptors and demonstrate specificity for syngeneic tumor cells*. J Immunol, 2003. **171**(7): p. 3442-50.
31. Kurosawa, S., et al., *Early-appearing tumour-infiltrating natural killer cells play a crucial role in the generation of anti-tumour T lymphocytes*. Immunology, 1995. **85**(2): p. 338-46.
32. Xu, D., et al., *NK and CD8+ T cell-mediated eradication of poorly immunogenic B16-F10 melanoma by the combined action of IL-12 gene therapy and 4-1BB costimulation*. Int J Cancer, 2004. **109**(4): p. 499-506.
33. Kamimura, D., et al., *IL-2 in vivo activities and antitumor efficacy enhanced by an anti-IL-2 mAb*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 306-14.
34. Rihova, B., et al., *Cytotoxicity and immunostimulation: double attack on cancer cells with polymeric therapeutics*. Trends Biotechnol, 2009. **27**(1): p. 11-7.

7. PUBLICATIONS

Publications in extenso related to the present disertation:

Kovar M., **Tomala J.**, Chmelova H., Kovar L., Mrkvan T., Joskova R., Zákostelská Z., Etrych T., Strohalm J., Ulbrich K., Sirova M. and Rihova B.: Overcoming immunoescape mechanisms of BCL1 leukemia and induction of CD8+ T cell-mediated BCL1-specific resistance in mice cured by targeted polymer-bound doxorubicin. Cancer Res. 68 (23): 9875-83, 2008.

IF₂₀₁₁=7,856

Tomala J., Chmelova H., Mrkvan T., Rihova B., Kovar M.: In Vivo Expansion of Activated Naive CD8+ T Cells and NK Cells Driven by Complexes of IL-2 and anti-IL-2 mAb as novel approach of cancer immunotherapy. J. Immunol. 183: 4904-12, 2009.

IF₂₀₁₁=5,788

Tomala J., Chmelova H., Strohalm J., Ulbrich K., Sirova M., Rihova B., Kovar M.: Antitumor activity of IL-2/anti-IL-2 mAb immunocomplexes synergizes with that of

HPMA copolymer-bound doxorubicin conjugate due to its low immunosuppressive activity. *Int J Cancer* 129(8): 2002-12, 2011.

IF₂₀₁₁=5,444

Publications *in extenso* not related to the present disertation:

Rihova B, Etrych T, Sirova M, **Tomala J**, Ulbrich K, Kovar M. Synergistic effect of EMF-BEMER-type pulsed weak electromagnetic field and HPMA-bound doxorubicin on mouse EL4 T-cell lymphoma. *J Drug Target* 2011; 19: 890-9.

IF₂₀₁₁=2,696

Holubova J, Kamanova J, Jelinek J, **Tomala J**, Masin J., Kosova J, Stanek O, Bumba L, Michalek J, Kovar M and Sebo P: Delivery of large heterologous polypeptides across the cytoplasmic membrane of antigen-presenting cells by the Bordetella RTX hemolysin moiety lacking the adenylyl cyclase domain. *Infect Immun* 2012; 80: 1181-92.

IF₂₀₁₁=4,165