

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Šárka Hnilicová

***In vivo* biologická aktivita a terapeutický potenciál imunokomplexů IL-2/anti-IL-2 mAb**

**Biological activity of IL-2/anti-IL-2 mAb immunocomplexes *in vivo* and their
therapeutical potential**

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Marek Kovář, Ph.D.
Praha, 2016

Prohlášení

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

V Praze, 11. 5. 2016

Chtěla bych upřímně poděkovat svému školiteli RNDr. Markovi Kovářovi, Ph.D. za pomoc při vypracování bakalářské práce a hlavně za jeho značnou trpělivost při konzultacích. Dále bych chtěla poděkovat všem lidem z Laboratoře nádorové imunologie za cenné rady a zkušenosti, které mi poskytli.

Abstrakt

Interleukin-2 patří spolu s interleukiny 4, 7, 9, 15 a 21 do rodiny γ_c cytokinů, která funguje v organismu jako hlavní regulátor homeostázy a funkce lymfocytů. Tyto cytokiny mají schopnost indukovat a podporovat proliferaci a přežívání lymfocytů, čímž významně ovlivňují hlavně adaptivní imunitní odpověď. Interleukin-2 (IL-2) je produkován převážně aktivovanými T buňkami a působí jak autokrinně, tak parakrinně. Kupodivu lze jeho aktivitu zvýšit vytvořením komplexu s určitými anti-IL-2 monoklonálními protilátkami. Takové IL-2/anti-IL-2 mAb imunokomplexy selektivně stimulují proliferaci různých populací imunitních buněk, v závislosti na použitém typu anti-IL-2 mAbs. Imunokomplexy IL-2/S4B6 jsou vysoce stimulační pro CD122^{high} populace (paměťové CD8⁺ T buňky a NK buňky) a o něco méně i pro CD25⁺ populace (Treg a aktivované T buňky), zatímco IL-2/JES6-1 imunokomplexy aktivují výhradně CD25⁺ buňky. Tato protilátkami způsobená vyšší účinnost a selektivita působení IL-2 může mít významný potenciál v terapeutickém využití, a to jak v imunoterapii nádorů, tak i v autoimunitních onemocněních, vakcinaci nebo transplantologii.

Klíčová slova

Interleukin-2, anti-IL-2 monoklonální protilátky, cytokin, imunokomplex, imunoterapie nádorů

Abstract

IL-2 belongs to the family of γ_c cytokines (IL-2, 4, 7, 9, 15, and 21) which are key regulators of lymphocyte homeostasis and function. They have the potential to promote lymphocyte proliferation and survival and thus overall enhance dominantly adaptive immune response. IL-2 is an autocrine/paracrine soluble factor produced mainly by activated T cells. Interestingly, the in vivo biological activity of IL-2 can be dramatically increased through complexing with certain anti-IL-2 mAbs and such IL-2/anti-IL-2 mAbs immunocomplexes selectively stimulate proliferation of distinct population of immune cells, depending on the clone of anti-IL-2 mAb used. IL-2/S4B6 mAb immunocomplexes are highly stimulatory for CD122^{high} populations (memory CD8⁺ T and NK cells) and intermediately also for CD25⁺ populations (Treg and activated T cells), while IL-2/JES6-1 mAb immunocomplexes enormously expand solely CD25⁺ cells. Thus, IL-2 immunocomplexes possess a broad spectrum of potential therapeutic applications like tumor immunotherapy, vaccination, autoimmune diseases or transplantology.

Key words

Interleukin-2, anti-IL-2 monoclonal antibodies, cytokin, immunocomplex, tumor immunotherapy

Obsah

I.	Úvod.....	1
II.	Cíle práce	2
III.	Interleukin-2.....	2
IV.	IL-2 receptor.....	3
1.	IL-2 a imunoterapie	5
V.	Imunokomplexy IL-2: S4B6 versus JES6-1 mAb	6
2.	Selektivita IL-2 imunokomplexů: interakce IL-2/S4B6 a IL-2/JES6-1 s IL-2 receptorem.....	7
3.	Mechanismy potenciace biologické aktivity IL-2 pomocí anti-IL-2 mAb <i>in vivo</i>	8
3.1.	Biologická aktivita IL-2/S4B6.....	8
3.2.	Potenciál imunokomplexů IL-2/S4B6 pro terapeutické použití	12
3.3.	Biologická aktivita IL-2/JES6-1.....	13
3.4.	Potenciál imunokomplexů IL-2/JES6-1 pro terapeutické použití	14
VI.	Závěr	16
VII.	Seznam použité literatury.....	18

Seznam použitých zkratek

AICD	activation-induced cell death
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
APC	antigen presenting cell
Blimp-1	B lymphocyte-induced maturation protein-1
CIA	collagen-induced arthritis
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis
EAMG	experimental autoimmune myasthenia gravis
FasL	Fas ligand
FDA	Food and Drug Administration
HPMA	N-(2-hydroxypropyl)methacrylamid
IFN	interferon
IL	interleukine
IL-R	receptor pro interleukin
Jak	Janus kinase
KLRG1	killer-cell lectin like receptor G1
mAb	monoclonal antibody
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MHC	major histocompatibility complex
MHV	mouse hepatitis virus
NK	natural killer
NOD	non-obese diabetic

PI3K	phosphatidylinositol- 3-kinase
Stat5	signal transducer and activator of transcription 5
TCGF	T cell growth factor
TCR	T cell receptor
T _H	T helper
TNF	tumor necrosis factor
Treg	T regulatory

I. Úvod

Imunitní systém je souborem mnoha typů buněk, mimobuněčných struktur a molekul. Pro zajištění jeho funkce je nutná schopnost komunikace mezi buňkami. Aby systém fungoval spolehlivě, musí být komunikace přesná a specifická. Z toho důvodu nacházíme v imunitním systému obrovské množství signálních molekul, ať už membránově vázaných, nebo rozpustných. Jednou ze skupin těchto přenašečů zpráv jsou cytokiny. Jedná se o malé signální glykoproteiny, které jsou produkovány buňkami imunitního systému (lymfocyty, makrofágy, žírnými buňkami, NK buňkami, aj.), ale také například endoteliálními buňkami, fibroblasty nebo stromálními buňkami. Mohou být rozpustné i membránově vázané s parakrinní i autokrinní funkcí. V této práci bych se zaměřila na interleukin-2 (IL-2), což je cytokin, který byl objeven jako růstový faktor pro T buňky. IL-2 však má v imunitním systému více rolí – stimuluje T buňky a NK buňky k růstu a proliferaci, zajišťuje tvorbu a homeostázu Treg buněk a pomáhá při sensitizaci T buněk k apoptóze po sekundárním rozpoznání antigenu (AICD – activation-induced cell death). Díky svým stimulačním účinkům je používán pro léčbu nádorů, konkrétně rakoviny ledvin a kůže. Má však jen omezený účinek a navíc značnou toxicitu, takže se využívá spíše okrajově.

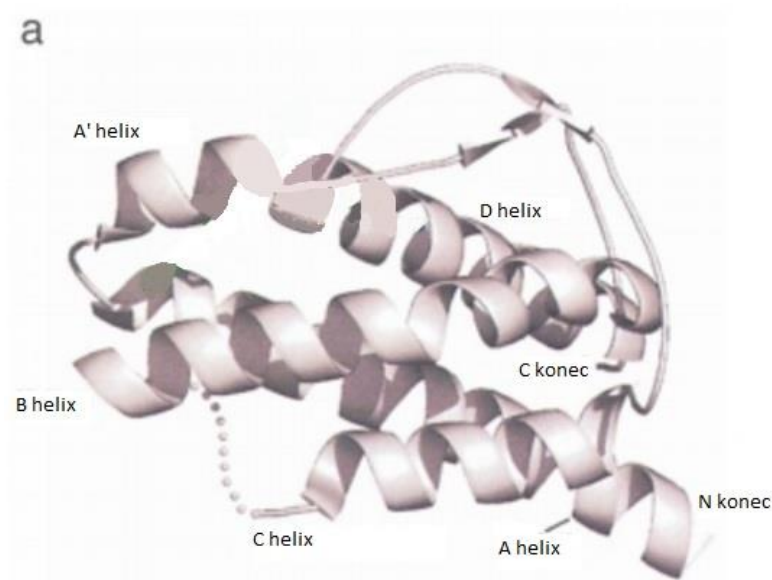
Boyman et al. při zkoumání aktivity paměťových CD8⁺ T buněk zjistili, že anti-IL-2 protilátka *in vivo* nezpůsobuje neutralizaci IL-2, ale naopak zesiluje jeho aktivitu. Toto zjištění bylo poněkud překvapující, protože bylo známo, že *in vitro* tyto protilátky IL-2 neutralizují a tím ruší jeho účinek (1). Toto poznání vedlo k dalšímu výzkumu funkce a struktury imunokomplexů IL-2. Velký zájem o tyto imunokomplexy je způsoben jejich potenciálem pro využití v léčbě nádorů nebo autoimunitních nemocí. Tato práce má poskytnout přehled jednotlivých typů známých IL-2 imunokomplexů a jejich funkce v organismu, vysvětlení mechanismu působení těchto imunokomplexů na různé typy buněk a také nastínění možného terapeutického využití.

II. Cíle práce

- I. Přehledně shrnout vlastnosti, biologickou aktivitu a mechanismy účinku imunokomplexů IL-2/S4B6 a IL-2/JES6-1.
- II. Diskutovat možné terapeutické využití těchto IL-2 imunokomplexů a uvést, v jakých experimentálních modelech byly doposud testovány a s jakými výsledky.

III. Interleukin-2

Interleukin-2 je jedním z cytokinů, skupiny malých glykoproteinů (Obr. 1), které mají v imunitním systému signální a regulační funkci. IL-2 patří mezi cytokiny typu I a do rodiny γ_c cytokinů (spolu s IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 a IL-21). Má v imunitním systému řadu funkcí, od aktivace buněk přes udržování homeostázy až po regulaci imunitní odpovědi. Jeho primární funkce spočívá především v regulaci adaptivní imunitní odpovědi. Objeven byl v roce 1976 jako růstový faktor T buněk (T cell growth factor TCGF) (2). Lidský IL-2 byl poprvé izolován a purifikován v roce 1982 (3).



Obr. 1 Struktura lidského IL-2. Převzato a upraveno podle Arkin et al. (4).

IL-2 je produkován hlavně aktivovanými CD4⁺ T buňkami v sekundárních lymfoidních orgánech, a také aktivovanými CD8⁺ T buňkami, dále pak v naprosto minimální míře natural killer (NK) buňkami, natural killer T (NKT) buňkami a dendritickými buňkami (5-7).

IL-2 zastává v organismu různé funkce, které se mohou jevit i jako protichůdné. Objeven byl jako růstový faktor pro T buňky (8), což je také jeho hlavní funkce. Stimuluje aktivované CD4⁺ a CD8⁺ T buňky, NK buňky a dále také aktivované B buňky k růstu a diferenciaci (9-11). Naopak zabraňuje vývoji T_H17 buněk a produkci IL-17 (12). Mezi jeho další funkce patří indukce tvorby CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg buněk a také zajištění jejich homeostázy (13). Tyto buňky brání v autoreaktivní aktivitě těch T buněk, které unikly negativní selekci v thymu (14). IL-2 je také zásadní pro regulační aktivitu Treg buněk, bez IL-2 nejsou tyto buňky schopné potlačit aktivitu autoreaktivních T buněk. K nejvýznamnějším mechanismům této suprese patří kompetice o IL-2 s autoreaktivními T buňkami (15). Při nedostatku IL-2 nebo jeho úplném odstranění z organismu dochází v pokusných myších k těžkým autoimunitním onemocněním, a ne k imunodeficienci, jak se původně předpokládalo (16, 17). Další důležitou úlohou IL-2 je senzitivace T buněk k apoptóze (AICD – activated-induced cell death) v případě, že jsou podruhé aktivovány antigenem přes TCR receptor nebo chybí kostimulace přes CD28. T buňky exprimují Fas receptor neboli tzv. „death receptor“ a za přítomnosti IL-2 začnou exprimovat i FasL, který se na Fas receptor naváže a spustí tak apoptózu buňky. Tato senzitivace k apoptóze je důležitou součástí udržování tolerance k vlastním antigenům (18). Negativní selekce T buněk při vývoji v thymu však i bez přítomnosti IL-2 probíhá normálně (13).

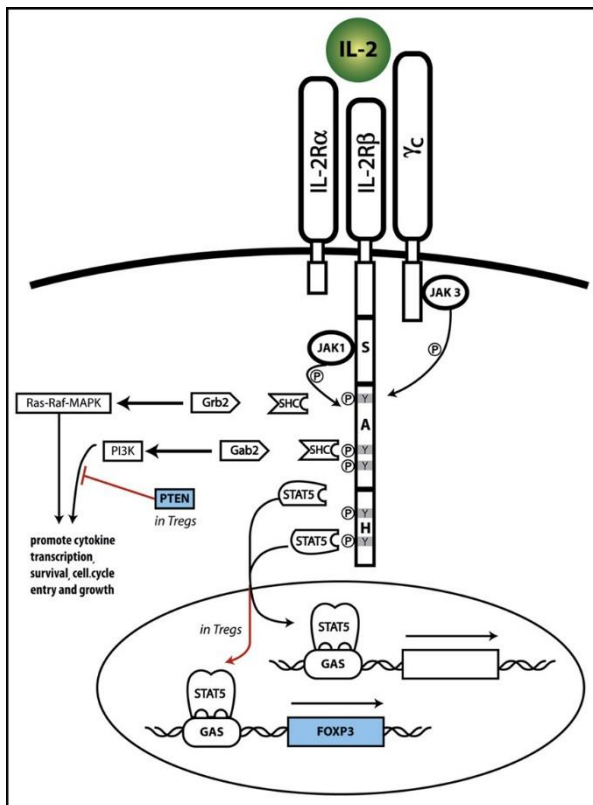
IV. IL-2 receptor

Vysoko afinní IL-2 receptor se skládá ze tří řetězců, IL-2R α (p55, CD25), IL-2R β (p75, CD122), a IL-2R γ (p65, CD132) (11, 19, 20). IL-2R β a IL-2R γ podjednotky jsou přítomny konstitutivně na klidových lymfocytech (21, 22), IL-2R α je oproti tomu na lymfocytech exprimován pouze po jejich stimulaci (11, 19, 23). Podjednotka IL-2R γ je společná pro receptory IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 a IL-21,

zatímco IL-2R β (CD122) je stejný jen s receptorem pro IL-15 (24). Receptor složený z IL-2R β a IL-2R γ podjednotek je pro IL-2 středně afinní ($K_d \sim 10^{-9}$ M), avšak při spojení s IL-2R α se receptor stává vysoko afinním ($K_d \sim 10^{-11}$ M) (25-28), takže IL-2R α reguluje citlivost aktivovaných lymfocytů na IL-2. Samotná podjednotka IL-2R α je pro IL-2 nízko afinní ($K_d \sim 10^{-8}$ M) a není schopna signalizace (27). Přítomnost IL-2R α je typickým znakem populace CD4⁺ Treg buněk v thymu a v periferních lymfoidních orgánech. Aktivované CD4⁺ a CD8⁺ T buňky exprimují IL-2R α jen přechodně, zatímco na Treg buňkách je exprimován konstantně (29).

Přenos signálu z IL-2R do jádra buňky probíhá přes několik drah, avšak klíčová je aktivace transkripčního faktoru Stat5. Navázáním IL-2 na receptor dochází k fosforylaci kinázy Jak1 na IL-2R β podjednotce a Jak3 na IL-2R γ podjednotce. Fosforylace vede k navázání adaptorového proteinu Shc a k následné fosforylaci Stat5, který dimerizuje, vstupuje do jádra buňky a spouští expresi genů zajišťujících buněčný růst, proliferaci a specifické efektorové funkce. Vazba adaptoru Shc dále umožňuje aktivaci MAPK (mitogen-activated protein kinase) a PI3K (phosphoinositide-3 kinase) dráhy (Obr.2) (27). Při produkci IL-2 se uplatňuje klasická negativní zpětná vazba. Je-li naivní T buňka aktivována, spouští produkci IL-2 a expresi IL-2R α . Produkce IL-2 je však jen přechodná, protože vazba IL-2 na IL-2R aktivuje také transkripční represor Blimp-1, který potlačuje expresi genu pro IL-2 (30, 31).

Huse et al. ve své práci pozorovali, že při kontaktu CD4⁺ T buňky s APC (antigen-prezentující buňkou) dochází ke směrované sekreci IL-2 a IFN γ směrem k APC, do tzv. imunologické synapse, zatímco některé ostatní cytokiny a chemokiny (TNF a CCL3) jsou sekretovány všemi směry. Množství takto sekretovaných cytokinů však nebylo definováno (32).



Obr. 2 Schéma signální dráhy IL-2R. Kinázy Jak1 a Jak3 na cytoplasmatických částech IL-2R β , respektive IL-2R γ , se fosforylují a umožňují navázání adaptorového proteinu Shc. Tento adaptor umožňuje jak fosforylaci transkripčního faktoru Stat5, tak i spuštění MAPK a PI3K dráhy. Převzato a upraveno podle Lan et al. (33).

1. IL-2 a imunoterapie

IL-2 se pro své stimulační účinky na T buňky začal používat při léčbě nádorů už v roce 1984 (34). Byl schválen organizací FDA (U.S. Food and Drug Administration) jako prostředek k léčbě rakoviny ledvin a v roce 1998 i maligních melanomů (35). Byl testován i u pacientů s AIDS, jeho aplikace během antiretrovirální terapie vedla k expanzi naivních (CD45RO⁻ CD27⁺) a paměťových (CD45RO⁺ CD27⁺) CD4⁺ T buněk, ale u efektorových (CD45RO⁺ CD27⁻) CD4⁺ T buněk došlo ke snížení jejich počtu. Tento pokles byl nejspíše způsoben vyšší aktivitou Treg buněk (36). Jiný přístup byl zaujat v případě některých leukemií, transplantací nebo autoimunitních chorob, kde byla uplatněna snaha zablokovat IL-2 signál. K tomu účelu byla využita protilátka proti lidskému

IL-2R α , tzv. daclizumab, která byla organizací FDA schválena jako prostředek pro potlačení rejekce renálních transplantátů (37).

Samotný IL-2 má však jako léčivo četné nevýhody, zejména krátký poločas cirkulace v oběhu (v řádu minut) a výrazně toxické vedlejší účinky, vedoucí k částečné dysfunkci jater a tzv. vascular leak syndromu, který způsobuje život-ohrožující otok plic. Tato reakce v plicích na podání IL-2 je způsobena endoteliálními buňkami exprimujícími CD25 (38). IL-2 tyto buňky stimuluje k produkci NO a jiných prozánětlivých mediátorů, které zvýší permeabilitu cévní stěny, jejímž následkem je plicní edém (38-41). Mezi další nezanedbatelné vedlejší účinky patří vysoká horečka, zimnice, zažívací problémy, snížený krevní tlak, otoky orgánů, oligurie, arytmie srdce, kožní vyrážky aj. (42- 45).

Existuje několik postupů, jak účinnost podávaného IL-2 zvýšit. Jeden z nich je založen na genové terapii, kdy se nádorové buňky upraví tak, aby samy produkovaly IL-2 (46). Další možností je použití tzv. imunocytokinů, fúzního proteinu vytvořeného z IL-2 a monoklonální protilátky proti nádorovým buňkám, což způsobuje jeho delší životnost a účinek především v těsné blízkosti nádorových buněk (47). Delšího poločasu IL-2 v oběhu se dá docílit také vazbou na polymerní nosič, třeba na polyethylenglykol, albumin nebo IgG (48-50). Příkladem je také navázání IL-2 na polymerní nosič N-(2-hydroxypropyl)methacrylamid (HPMA), což rovněž značně prodlužuje poločas cirkulace IL-2 v oběhu a zvyšuje tak biologickou aktivitu (51). Ani jeden z těchto postupů však není dostatečně účinný, a proto jsou intenzivně zkoumány vlastnosti imunokomplexů IL-2/anti-IL-2 mAb, které se zdají být pro terapii nádorů a dalších, nejčastěji autoimunitních, nemocí mnohem vhodnější a především účinnější.

V. Imunokomplexy IL-2: S4B6 versus JES6-1 mAb

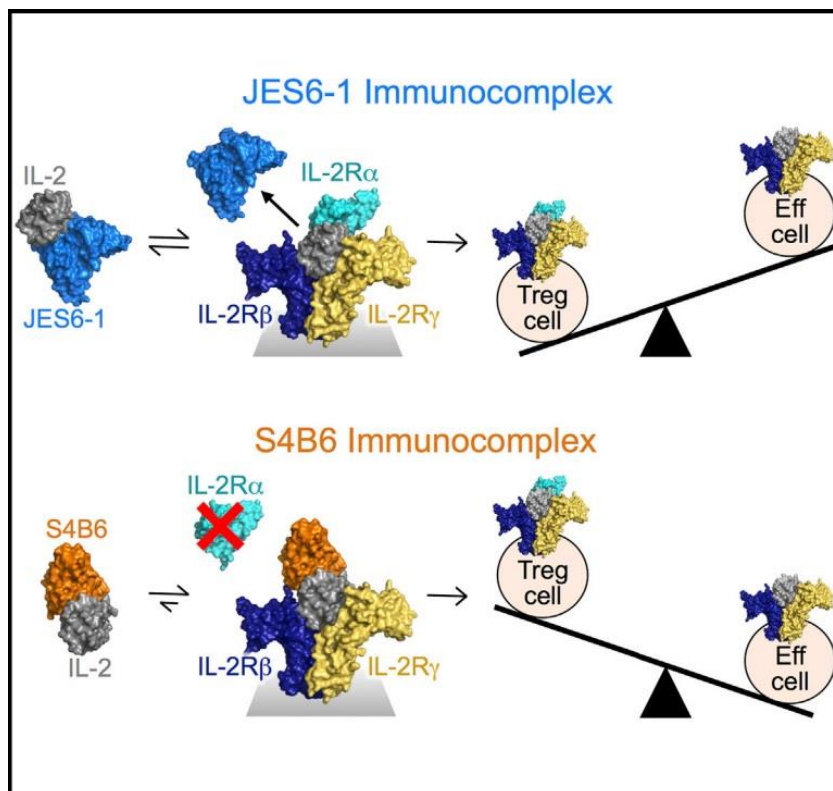
Při snaze o neutralizaci IL-2 se přišlo na to, že má IL-2 vyšší *in vivo* biologickou aktivitu v imunokomplexu s anti-IL-2 monoklonální protilátkou v porovnání se samotným IL-2. Toto zjištění bylo

překvapivé vzhledem k tomu, že ta samá protilátka proti IL-2 snižuje jeho biologickou aktivitu *in vitro*. *In vivo* dokážou tyto imunokomplexy vysoce stimulovat expanzi aktivovaných naivních CD8⁺ T buněk, po aplikaci šesti dávek (1,5 µg IL-2/myš/den) jsou schopny vyvolat až pětisetnásobný nárůst počtu aktivovaných CD8⁺ T buněk během jednoho týdne po aktivaci (52). Pravděpodobně nejdůležitějším mechanismem zodpovědným za velmi vysokou biologickou aktivitu IL-2/anti-IL-2 mAb imunokomplexů je výrazně prodloužený poločas eliminace IL-2 v krevním oběhu (52). Bylo také prokázáno, že imunokomplexy IL-2/anti-IL-2 mAb silně stimulují proliferaci specifických populací imunokompetentních buněk v závislosti na tom, jaká protilátka je použita (53, 54). Existují dva základní typy protilátek a výsledné imunokomplexy mají výrazně odlišnou biologickou aktivitu.

2. Selektivita IL-2 imunokomplexů: interakce IL-2/S4B6 a IL-2/JES6-1 s IL-2 receptorem

Pro vytvoření účinného imunokomplexu s myším IL-2 se používají dvě odlišné protilátky, a to S4B6 a JES6-1 mAb. Téměř stejnou biologickou aktivitu jako S4B6 vykazují i komplexy s protilátkou JES6-5 (anti-myší IL-2), analogicky pak protilátka MAB502 v komplexu s lidským IL-2. Protilátce JES6-1 tvoří funkčně analogické IL-2 komplexy protilátka 5344 (1, 55).

Imunokomplexy IL-2/JES6-1 stimulují proliferaci CD25^{high} buněk, tzn. hlavně Treg buněk, zatímco IL-2/S4B6 stimulují proliferaci všech CD122⁺ buněk, hlavně paměťových CD8⁺ T buněk a NK buněk (Obr. 3) (1). V porovnání s aplikací samotného IL-2 se při pokusech na myších po injekci imunokomplexů IL-2/JES6-1 počet IL-2R α ^{high} Treg buněk významně zvyšuje (v závislosti na dávce), zatímco po injekci imunokomplexů IL-2/S4B6 se dramaticky zvyšuje počet IL-2R α ^{low} paměťových CD8⁺ T buněk (CD3⁺ CD8⁺ CD44^{high} CD122^{high}) a také NK buněk (CD3⁻ NK1.1⁺ DX5⁺) (52, 54).



Obr. 3 Dva nejčastější typy protilátek pro tvorbu IL-2 imunokomplexů: S4B6 a JES6-1. **Nahore:** imunokomplex IL-2/JES6-1 interaguje s vysoko afinním IL-2R $\alpha\beta\gamma$ přičemž protilátka JES6-1 z imunokomplexu disociuje a na IL-2R se váže jen IL-2. Na tyto komplexy tudíž převážně reagují Treg buňky, protože na svém povrchu exprimují vysoké hladiny CD25. **Dole:** imunokomplexy IL-2/S4B6 se váží na středně afinní IL-2R $\beta\gamma$ a stimulují tak CD122^{high} buňky. Převzato a upraveno podle Spangler et al. (54).

3. Mechanismy potence biologické aktivity IL-2 pomocí anti-IL-2 mAb *in vivo*

3.1. Biologická aktivita IL-2/S4B6

Biologická aktivita imunokomplexů IL-2 s protilátkou S4B6 je zkoumána i vzhledem k její vyšší účinnosti při imunoterapii nádorů oproti samotnému IL-2. *In vitro* tato protilátka IL-2 částečně neutralizuje, avšak *in vivo* biologickou aktivitu IL-2 výrazně zvyšuje. Při podání samotné S4B6 protilátky dojde k mírné expanzi CD122^{high} buněk (nejvíce CD8⁺ T buněk) a naopak k redukcii CD25⁺ CD4⁺ Treg buněk (56). Protilátka S4B6 se v organismu váže na volný IL-2, čímž zabrání jeho vazbě na CD25 a způsobí tak redukcii počtu Treg buněk (1). Protilátka S4B6 váže myší IL-2 v místě

rozpoznání IL-2R α podjednotkou (Obr. 4), čímž je zablokována interakce IL-2 s IL-2R α . Kromě toho způsobuje i posun v C helixu navázaného IL-2, čímž mění jeho strukturu. Tyto allosterické změny vedou k vyšší afinitě k IL-2R β (IL-2R β váže imunokomplex IL-2/S4B6 až 6x silněji než samotný IL-2). Blokace vazby na IL-2R α a zároveň zvýšení afinity vazby na IL-2R β vede k tomu, že IL-2/S4B6 signalizuje přes středně afinní IL-2R $\beta\gamma$ a tak spouští proliferaci T a NK buněk, které exprimují IL-2R β a IL-2R γ (54). To také vysvětluje, proč tyto imunokomplexy působí na již existující CD122^{high} buňky, a ne na CD122^{low} prekurzory. U paměťových CD8⁺ T buněk a NK buněk je nárůst počtu tak výrazný, že dochází k markantnímu zvětšení sleziny a lymfatických uzlin (Obr. 5) (1). Takto expandované buňky jsou navíc plně funkční, nejsou defektní v produkci cytokinů a vytváří stabilní populaci paměťových CD8⁺ T buněk (52, 57, 58).

Imunokomplexy IL-2/S4B6 jsou schopné stimulovat dokonce i naivní CD8⁺ T buňky. Takto expandované buňky vytváří populaci efektorových a paměťových CD8⁺ T buněk, ale nejsou plně funkční v produkci cytokinů a v dlouhodobém přežívání (59).

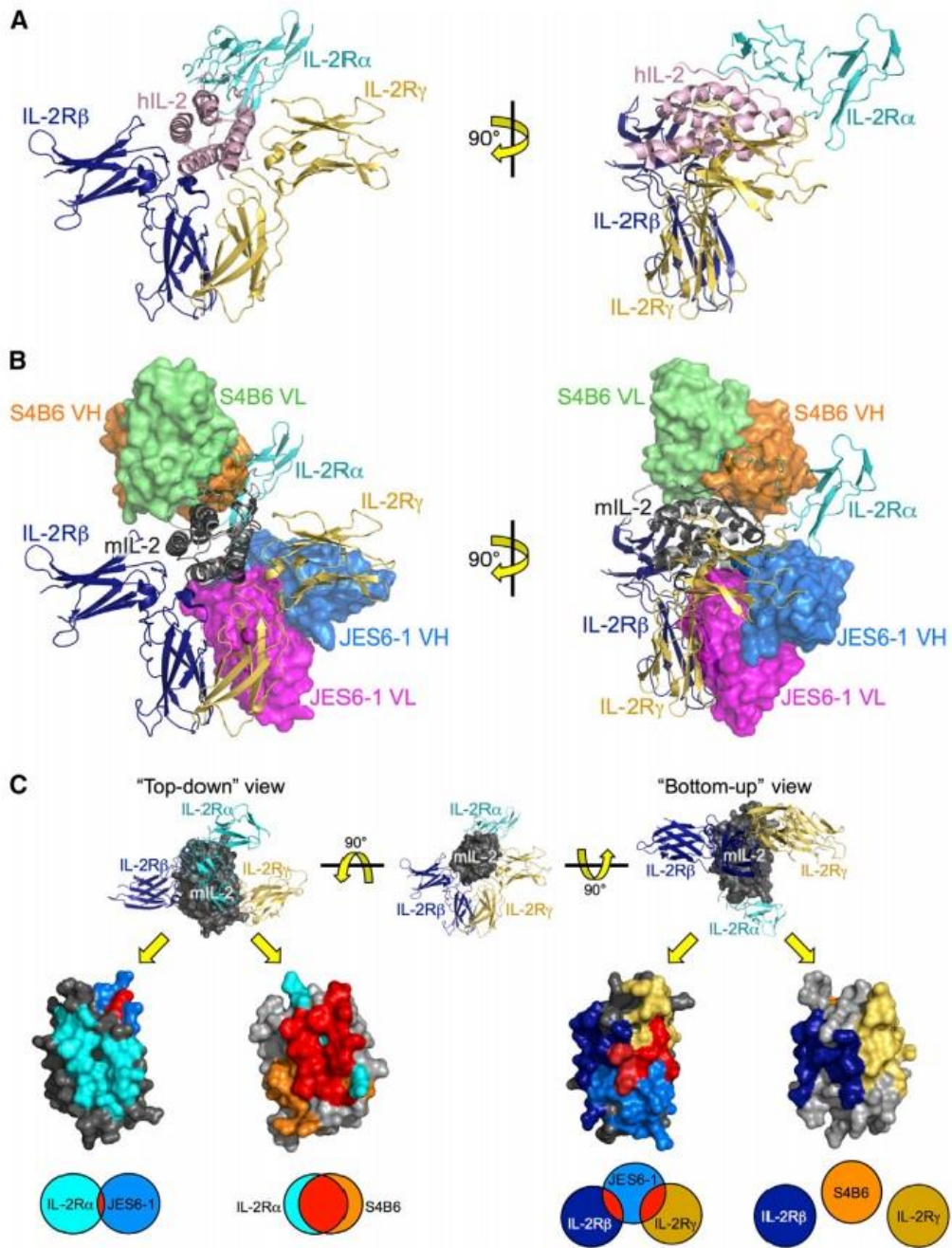
Expanze paměťových CD8⁺ T buněk by mohla být výhodná pro zvýšení efektivity vakcinace. Smith et al. proto na myších zkoumali možnost aplikace IL-2/S4B6 imunokomplexů v návaznosti na vakcinaci adenovirovým vektorem kódujícím epitopy viru Epstein-Barrové. Imunokomplexy byly schopné paměťové CD8⁺ T buňky expandovat, avšak jen pokud byly aplikovány až ve dnech 7, 9, a 11 nebo 28, 30, a 32 po vakcinaci (1,5 μ g IL-2/myš/den). Aplikace imunokomplexů ve dnech 3, 5 a 7 tuto expanzi nezpůsobila, nejspíš proto, že aktivované CD8⁺ T buňky exprimují vysoko afinní IL-2R $\alpha\beta\gamma$, který není schopný vázat imunokomplexy IL-2/S4B6, a ještě stále ale nejsou CD122^{high} (60).

CD8⁺ T buňky stimulované imunokomplexy IL-2/S4B6 se nacházejí v lymfoidních i ostatních tkáňích (slezina, lymfatické uzliny, kostní dřeň, plíce a játra) (61). Kromě CD122^{high} buněk expandují imunokomplexy IL-2/S4B6 také granulocyty a makrofágy, i když v daleko menší míře než T nebo NK buňky (62).

Kromě enormního zvýšení poločasu cirkulace v oběhu a specifické vazby na IL-2R $\beta\gamma$ je možné, že imunokomplexy IL-2/S4B6 působí na CD8⁺ T buňky částečně také zprostředkovaně, a to pomocí indukce exprese 4-1BBL. Signalizace přes 4-1BB/4-1BBL vede ke zvýšení hladiny antiapoptotických molekul Bcl-xL a Bfl-1, což může vést ke zvýšení počtu CD8⁺ T buněk (63, 64).

Podání imunokomplexů IL-2/S4B6 nemá dlouhodobý účinek, pokud není opakované (60). Expanze CD8⁺ T a NK buněk je přímo úměrná dávkám IL-2/S4B6 (52), ale příliš vysoké dávky (více než 2,5 mg/kg) jsou značně toxické (65).

Imunokomplexy IL-2/S4B6 jsou intenzivně zkoumány z důvodu možného využití v imunoterapii nádorů. Protinádorová aktivita IL-2/S4B6 je v závislosti na daném experimentálním modelu mediována buď NK buňkami, nebo CD8⁺ T buňkami. CD4⁺ T buňky ani dendritické buňky v tomto případě nehrají zásadní roli (52, 57).



Obr. 4 Struktura a interakce IL-2/anti-IL-2 komplexů s IL-2R. **(A)** Kvartérní komplex lidského IL-2 (růžová) s IL-2R α (světle modrá), IL-2R β (tmavě modrá) a IL-2R γ (žlutá). **(B)** Vazba imunokomplexů IL-2/JES6-1 a IL-2/S4B6 na IL-2R α . IL-2 vázaný na JES-6 je tmavě šedý, IL-2 vázaný na S4B6 je světle šedý. Jsou zde znázorněny povrchové struktury vždy dvou domén: JES6-1 variabilní těžký (VH; modrá) a lehký (VL; fialová) řetězec a S4B6 variabilní těžký (VH; oranžová) a lehký (VL; zelená) řetězec. **(C)** Pohled na JES6-1/IL-2 (tmavě šedá) a S4B6/IL-2 (světle šedá) komplex s předpokládanými vazebnými epitopy IL-2R α (azurová), IL-2R β (tmavě modrá), IL-2R γ (žlutá), JES6-1 (modrá) a S4B6 (oranžová). Rezidua sdílená mezi IL-2/anti-IL-2 mAb a IL-2/IL-2R α , IL-2/IL-2R β a IL-2/IL-2R γ jsou vyznačena červeně. Převzato a upraveno podle Spangler et al. (54).



Obr. 5 Výrazná a specifická expanze paměťových CD8⁺ T buněk *in vivo* následující po aplikaci IL-2/S4B6 vede k nárůstu počtu buněk a ke zvětšení sleziny a lymfatických uzlin (vpravo orgány po aplikaci IL-2/S4B6, vlevo kontroly). Převzato a upraveno podle Boymana et al. (1).

3.2. Potenciál imunokomplexů IL-2/S4B6 pro terapeutické použití

Imunokomplexy IL-2/S4B6 mají slibný potenciál pro nádorovou imunoterapii, a to jak u solidních nádorů, tak leukemií. Samotný IL-2 má jen omezený účinek na progresi nádorů a přežívání experimentálních myší, přestože je aplikován ve vysokých dávkách. Oproti tomu použití imunokomplexu IL-2/S4B6 vykazuje postatně vyšší protinádorovou aktivitu (52). V modelu myší nesoucích B16F10 melanom, v němž byly myším aplikovány imunokomplexy IL-2/S4B6 v dávkách 2,5 µg/myš/den ve dnech 2, 6 a 10 od inokulace nádorových buněk, došlo k výraznému potlačení růstu nádoru a čtyři ze šesti myší byly zcela vyléčeny (52). U myší s BCL1 leukemií samotný IL-2 jen mírně prodloužil jejich přežití, aniž by některou zcela vyléčil, zatímco imunokomplexy IL-2/S4B6, aplikované v dávkách 2,5 µg/myš/den ve dnech 4 a 8 od indukce leukemie, dvě ze šesti myší zcela vyléčily. V myších s depletovanými CD8⁺ T buňkami se tento efekt vůbec neprojevil, z čehož lze usuzovat, že pro protinádorový účinek imunokomplexu IL-2/S4B6 v modelu BCL1 leukemie jsou esenciální CD8⁺ T buňky, nikoliv NK buňky. Navzdory tomu v modelu B16F10 melanomu se ukázalo, že jak CD8⁺ T buňky, tak i NK buňky jsou potřeba pro protinádorový efekt IL-2/S4B6 imunokomplexů (52).

Kromě imunoterapie nádorů by se potenciálně mohly imunokomplexy IL-2/S4B6 použít i v terapii virových nebo bakteriálních intracelulárních infekcí. Na myším modelu bylo prokázáno, že i krátkodobé podávání imunokomplexů IL-2/S4B6 před indukcí infekce zabránilo bakteriální (*Listeria monocytogenes*) i virové (*Vaccinia virus*) infekci. Výrazně se snížil počet bakterií přežívajících ve slezině a játrech, u virové infekce pak došlo k redukci nakažených buněk ovarií, a to díky vyššímu počtu cytotoxických CD8⁺ T buněk a NK buněk oproti kontrole. Většina kontrolních myší bakteriální infekci nepřežila, zatímco z myší s aplikovanými imunokomplexy IL-2/S4B6 přežily všechny (61). Kromě prevence infekcí se imunokomplexy IL-2/S4B6 osvědčily i v léčbě persistentních virových infekcí (virus MHV). V myším modelu bylo prokázáno, že IL-2/S4B6 obnovily sníženou cytotoxickou aktivitu CD8⁺ T buněk, neboť je stimulovaly k vyšší produkci granzymu B, který je potřebný pro ničení infikovaných buněk (58). Při příliš vysokých dávkách imunokomplexů IL-2/S4B6 (tzn. pět dávek v den 0, 1, 2, 3 a 4, každá obsahující 1 μg rekombinantního myšího IL-2 a 10 μg S4B6) došlo ke snížení anti-infekční aktivity a také k nižší produkci IFN γ CD8⁺ T a NK buňkami (61).

3.3. Biologická aktivita IL-2/JES6-1

Imunokomplexy IL-2 s protilátkou JES6-1 mají *in vivo* dosti odlišnou biologickou aktivitu v porovnání s imunokomplexy IL-2/S4B6. Imunokomplexy IL-2/JES6-1 jsou využívány pouze CD25⁺ buňkami, a to hlavně CD25^{high} CD4⁺ Foxp3⁺ Treg buňkami (66) a dále také aktivovanými CD8⁺ a CD4⁺ T buňkami, protože po aktivaci na svém povrchu exprimují IL-2R $\alpha\beta\gamma$ (47).

Při vazbě na IL-2R α podjednotku imunokomplexy IL-2/JES6-1 na rozdíl od imunokomplexů IL-2/S4B6 disociují a na IL-2R α podjednotku se váže jen IL-2. IL-2R α s navázaným IL-2 pak váže zbylé dvě podjednotky a vytváří tak ternární komplex IL-2R $\alpha\beta\gamma$ /IL-2. JES6-1 svou vazbou na IL-2 blokuje místo pro vazbu IL-2R β a IL-2R γ , a tak je IL-2R α mediovaná disociace imunokomplexu hlavním mechanismem vysoké selektivity jeho biologické aktivity (54).

CD25⁺ buňky na přítomnost imunokomplexů IL-2/JES6-1 reagují proliferací a zvýšením povrchové hustoty IL-2R α (66), (54). Expanze Treg buněk v odpovědi na IL-2/JES6-1 je u myší detekovatelná ve slezině, játrech, plicích, lamina propria střevní stěny a v menší míře i v periferních a mesenterických lymfatických uzlinách, v Peyerových placích a kostní dřeni (67, 66). V thymu však proliferace Treg buněk prokázána nebyla (66). Treg buňky expandované IL-2/JES6-1 jsou minimálně stejně funkční a efektivní v regulaci T buněčné odpovědi, jako přirozeně se vyskytující Treg buňky (68). Někteří autoři se přiklání k teorii, že při expanzi Treg buněk dochází i ke konverzi CD25⁻ CD4⁺ Foxp3⁻ buněk na CD25⁺ CD4⁺ Foxp3⁺ Treg buňky (68-70), avšak tato teorie zatím nebyla potvrzena. U ostatních leukocytů (naivní CD4⁺ T a CD8⁺ T, NK, monocyty, makrofágy, dendritické buňky) imunokomplexy IL-2/JES6-1 proliferaci nevyvolávají (68).

3.4. Potenciál imunokomplexů IL-2/JES6-1 pro terapeutické použití

Pro svůj stimulační účinek na populaci Treg buněk mají imunokomplexy IL-2/JES6-1 značný potenciál pro léčbu autoimunitních onemocnění a v transplantologii.

Imunokomplexy IL-2/JES6-1 byly testovány například na modelu DSS (dextran sodium sulfate) indukovaných kolitid myší, což je model pro nespecifické záněty tlustého střeva. Při aplikaci imunokomplexů IL-2/JES6-1 před indukcí onemocnění došlo v myších k výrazně slabším projevům zánětu (posuzováno na délce a histopatologii střeva) a prodloužení přežití (54).

Liu et al. zkoumali působení imunokomplexů IL-2/JES6-1 v modelu experimentální autoimunitní myasthenia gravis (EAMG) u myší. EAMG je způsobena hlavně interakcí protilátek třídy IgG s acetylcholinovým receptorem. V tomto modelu imunokomplexy IL-2/JES6-1 způsobily zmírnění projevů EAMG (např. ochabnutí svalů), také nižší zastoupení autoreaktivních IgG protilátek a nižší aktivitu autoreaktivních CD4⁺ T_H buněk, i když byly aplikovány až po indukcí EAMG. Tato suprese onemocnění byla způsobena hlavně proliferací Treg buněk, které efektivně potlačily aktivitu CD4⁺ T buněk (68).

Další možné terapeutické uplatnění by imunokomplexy IL-2/JES6-1 mohly najít při léčbě artritid. Kolagenem indukovaná artritida (CIA) je autoimunitní onemocnění, při kterém je vyvolána imunitní reakce proti kolagenu. V myším modelu se ukázalo, že pokud jsou imunokomplexy IL-2/JES6-1 aplikovány před indukcí CIA, dokážou výrazně snížit produkci prozánětlivého interleukinu-17 a tak vzniku onemocnění zabránit nebo významně potlačit jeho patologické projevy. Jedním z možných mechanismů suprese CIA je snížení produkce autoreaktivních protilátek obdobným způsobem jako u modelu EAMG (66).

V myším modelu astmatu se projeví nejen profylaktické účinky imunokomplexů IL-2/JES6-1, ale tyto imunokomplexy dokonce zmírnilly projevy astmatu i v myších, ve kterých bylo astma již indukované. Aplikace imunokomplexů IL-2/JES6-1 vedla k redukci eozinofilie, nižší produkci hlenu pohárkovými buňkami dýchacího traktu a k vyšší produkci interleukinu-10 (71).

Experimentální autoimunitní encefalitida (EAE) se používá jako model roztroušené sklerózy. I u tohoto modelu se ukázalo, že imunokomplexy IL-2/JES6-1 dokáží zabránit vzniku tohoto onemocnění. I krátkodobé (třídenní) podávání těchto imunokomplexů před indukcí EAE úplně zabránilo rozvoji EAE, nebo se EAE projevila jen velmi mírně. Podávání imunokomplexů až po rozvinutí onemocnění však nemělo na jeho vývoj žádný efekt, nejspíš proto, že imunokomplexy IL-2/JES6-1 stimulují i aktivované (a v tomto případě autoreaktivní) CD4⁺ T buňky k proliferaci. Jednou z možností, jak stimulaci autoreaktivních CD4⁺ T buněk zabránit, by mohla být současná aplikace rapamycinu, který inhibuje efektorové CD4⁺ T buňky, ale umožňuje proliferaci Treg buněk. Při současné aplikaci imunokomplexů IL-2/JES6-1 a rapamycinu dva dny po indukcí EAE došlo k výrazné redukci projevů onemocnění (67).

Kromě terapie autoimunitních nemocí by zvýšený počet Treg buněk mohl pomoci i při transplantacích. Imunokomplexy IL-2/JES6-1 byly proto testovány na myším modelu allotransplantace os-

trůvků β buněk pankreatu produkujících inzulin. Aplikace těchto imunokomplexů před transplantací vedla k dlouhodobému přežívání allogenního štěpu ve většině (28 ze 34) experimentálních myší. Tyto transplantované β buňky byly navíc plně funkční a produkovaly dostatek inzulinu pro normalizaci glykémie (67).

Imunokomplexy IL-2/JES6-1 aplikované do NOD (non-obese diabetic) myší v malých dávkách (0,5 μ g IL-2/myš/den) po dobu dvaceti týdnů zabránily vzniku diabetu (73). U lidí je však možné léčit až následky onemocnění, protože diabetes prvního typu bývá diagnostikován až ve stadiu, kdy je většina β buněk zničených. Imunokomplexy IL-2/JES6-1 by tedy mohly být spíše využívány k umožnění přežívání allotransplantátu, než k přímé léčbě nemoci.

VI. Závěr

Tato práce shrnuje dosavadní poznatky o imunokomplexech IL-2/anti-IL-2 mAb. Tvorbou imunokomplexů IL-2/anti-IL-2 mAb se výrazně prodlužuje poločas IL-2 v oběhu (z řádu minut na hodiny), což výrazně zvyšuje jeho *in vivo* biologickou aktivitu oproti volnému IL-2. Další výhodou je to, že IL-2 v komplexu s různou anti-IL-2 protilátkou působí selektivně na odlišné populace imunokompetentních buněk. Imunokomplexy IL-2 s protilátkou S4B6 stimulují v myších hlavně CD122^{high} buňky, tzn. paměťové CD8⁺ T buňky a NK buňky. Buňky, které vzniknou po takovéto indukci, jsou plně funkční a schopné reagovat proti nádorovým buňkám nebo i virovým či bakteriálním intracelulárním infekcím. Oproti tomu imunokomplexy IL-2 s protilátkou JES6-1 jsou vysoce stimulační pro CD25⁺ buňky, tedy hlavně pro CD25^{high} CD4⁺ Foxp3⁺ Treg buňky, ale také pro aktivované T buňky, které rovněž exprimují CD25. Specifita dané protilátky je zajištěna způsobem, jakým se na IL-2 váže. Protilátka S4B6 allostericky brání interakci IL-2 s IL-2R α podjednotkou, zatímco umožňuje vazbu IL-2 na IL-2R $\beta\gamma$. Protilátka JES6-1 naopak brání interakci IL-2 s IL-2R $\beta\gamma$, zatímco interakce IL-2/JES6-1 s IL-2R α podjednotkou umožní disociaci tohoto imunokomplexu a vytvoření ternárního IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$ komplexu.

Imunokomplexům IL-2/anti-IL-2 mAb je věnována značná pozornost z důvodu jejich potenciálu využití v medicíně. Na myších modelech nemocí byly provedeny experimenty s pozitivními a nadějnými výsledky. Pro léčbu solidních nádorů i leukemií se imunokomplexy IL-2/S4B6 zdají být mnohem účinnější a méně toxické než samotný IL-2. U autoimunitních onemocnění se často projevuje snížená hladina nebo aktivita Treg buněk, které tak nejsou schopné potlačovat autoimunitní reakci. Imunokomplexy IL-2/JES6-1 by proto mohly být vhodným nástrojem pro expanzi Treg buněk. Na experimentálních myších modelech autoimunitních onemocnění, jako třeba autoimunitní myasthenia gravis, artritida, astma, roztroušená skleróza, střevní kolitidy apod. se projevily značné profylaktické účinky imunokomplexů IL-2/JES6-1. Dlouhodobá nebo i krátkodobá aplikace těchto imunokomplexů experimentálním myším zabránila vzniku a rozvoji onemocnění, nebo výrazně snížila jeho projevy, a to především díky expanzi Treg buněk. Stimulace Treg buněk imunokomplexy IL-2/JES6-1 by také mohla být využita při transplantacích pro navození dlouhodobého přežívání allogenního štěpu.

VII. Seznam použité literatury

1. Boyman O, Kovar M, Rubinstein MP, Surh CD, Sprent J. Selective Stimulation of T Cell Subsets with Antibody-Cytokine Immune Complexes. *Science*. 2006 Mar 31;311(5769):1924–7.
2. Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science*. 1976 Sep 10;193(4257):1007–8.
3. Welte K, Wang CY, Mertelsmann R, Venuta S, Feldman SP, Moore MAS. Purification of human interleukin 2 to apparent homogeneity and its molecular heterogeneity. *The Journal of Experimental Medicine*. 1982 Aug 1;156(2):454–64.
4. Arkin MR, Randal M, DeLano WL, Hyde J, Luong TN, Oslob JD, et al. Binding of Small Molecules to an Adaptive Protein-Protein Interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(4):1603–8.
5. Granucci F, Vizzardelli C, Pavelka N, Feau S, Persico M, Virzi E, et al. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol*. 2001 Sep;2(9):882–8.
6. Jiang S, Game DS, Davies D, Lombardi G, Lechler RI. Activated CD1d-restricted natural killer T cells secrete IL-2: innate help for CD4+CD25+ regulatory T cells? *Eur. J. Immunol*. 2005 Apr 1;35(4):1193–200.
7. Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *The Journal of Experimental Medicine*. 2005 Mar 7;201(5):723–35.
8. Ruscetti FW, Morgan DA, Gallo RC. Functional and Morphologic Characterization of Human T Cells Continuously Grown in Vitro. *The Journal of Immunology*. 1977 Jul 1;119(1):131–8.
9. Cho J-H, Boyman O, Kim H-O, Hahm B, Rubinstein MP, Ramsey C, et al. An intense form of homeostatic proliferation of naive CD8+ cells driven by IL-2. *The Journal of Experimental Medicine*. 2007 Aug 6;204(8):1787–801.
10. Tigges MA, Casey LS, Koshland ME. Mechanism of Interleukin-2 Signaling: Mediation of Different Outcomes by a Single Receptor and Transduction Pathway. *Science*. 1989;243(4892):781–6.
11. Smith KA. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science*. 1988 May 27;240(4856):1169–76.
12. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, et al. Interleukin-2 Signaling via STAT5 Constrains T Helper 17 Cell Generation. *Immunity*. 2007 Mar 23;26(3):371–81.
13. Malek TR, Yu A, Vincek V, Scibelli P, Kong L. CD4 Regulatory T Cells Prevent Lethal Autoimmunity in IL-2R β -Deficient Mice: Implications for the Nonredundant Function of IL-2. *Immunity*. 2002 Aug;17(2):167–78.
14. Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *The Journal of Experimental Medicine*. 1985 Jan 1;161(1):72–87.
15. De la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol*. 2004 Sep 1;34(9):2480–8.

16. Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell*. 1993 Oct 22;75(2):253-61.
17. Suzuki H, Kundig TM, Furlonger C, Wakeham A, et al. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science*. 1995 Jun 9;268(5216):1472.
18. Refaeli Y, Van Parijs L, London CA, Tschopp J, Abbas AK. Biochemical Mechanisms of IL-2-Regulated Fas-Mediated T Cell Apoptosis. *Immunity*. 1998 May 1;8(5):615-23.
19. Waldmann TA. The interleukin-2 receptor. *J. Biol. Chem*. 1991 Feb 15;266(5):2681-4.
20. Leonard WJ, Noguchi M, Russell SM, McBride OW. The Molecular Basis of X-Linked Severe Combined Immunodeficiency: The Role of the Interleukin-2 Receptor γ Chain as a Common γ Chain, γ_c . *Immunological Reviews*. 1994 Apr 1;138(1):61-86.
21. Siegel JP, Sharon M, Smith PL, Leonard WJ. The IL-2 receptor beta chain (p70): role in mediating signals for LAK, NK, and proliferative activities. *Science*. 1987 Oct 2;238(4823):75-8.
22. Takeshita T, Ohtani K, Asao H, Kumaki S, Nakamura M, Sugamura K. An associated molecule, p64, with IL-2 receptor beta chain. Its possible involvement in the formation of the functional intermediate-affinity IL-2 receptor complex. *J Immunol*. 1992 Apr 1;148(7):2154-8.
23. Taniguchi T, Minami Y. The IL-2/IL-2 receptor system: A current overview. *Cell*. 1993 Apr 9;73(1):5-8.
24. Giri JG, Ahdieh M, Eisenman J, Shanebeck K, Grabstein K, Kumaki S, et al. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J*. 1994 Jun 15;13(12):2822-30.
25. Teshigawara K, Wang HM, Kato K, Smith KA. Interleukin 2 high-affinity receptor expression requires two distinct binding proteins. *J Exp Med*. 1987 Jan 1;165(1):223-38.
26. Wang HM, Smith KA. The interleukin 2 receptor. Functional consequences of its bimolecular structure. *J Exp Med*. 1987 Oct 1;166(4):1055-69.
27. Malek TR. The Biology of Interleukin-2. *Annu. Rev. Immunol*. 2008 Mar 27;26(1):453-79.
28. Taniguchi T, Minami Y. The IL-2/IL-2 receptor system: A current overview. *Cell*. 1993 Apr 9;73(1):5-8.
29. 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 Aug 1;155(3):1151-64.
30. Gong D, Malek TR. Cytokine-Dependent Blimp-1 Expression in Activated T Cells Inhibits IL-2 Production. *J Immunol*. 2007 Jan 1;178(1):242-52.
31. Malek TR, Castro I. Interleukin-2 Receptor Signaling: At the Interface between Tolerance and Immunity. *Immunity*. 2010 Aug 27;33(2):153-65.
32. Huse M, Lillemeier BF, Kuhns MS, Chen DS, Davis MM. T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion. *Nature Immunology*. 2006 Mar;7(3):247-55.
33. Lan RY, Selmi C, Gershwin ME. The regulatory, inflammatory, and T cell programming roles of interleukin-2 (IL-2). *Journal of Autoimmunity*. 2008 Aug;31(1):7-12.

34. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE, et al. Observations on the Systemic Administration of Autologous Lymphokine-Activated Killer Cells and Recombinant Interleukin-2 to Patients with Metastatic Cancer. *N Engl J Med.* 1985 Dec 5;313(23):1485–92.
35. derVliet HJJ van, Koon HB, Yue SC, Uzunparmak B, Seery V, Gavin MA, et al. Effects of the Administration of High-Dose Interleukin-2 on Immunoregulatory Cell Subsets in Patients with Advanced Melanoma and Renal Cell Cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 Apr 1;13(7):2100–8.
36. Sereti I, Anthony KB, Martinez-Wilson H, Lempicki R, Adelsberger J, Metcalf JA, et al. IL-2–induced CD4+ T-cell expansion in HIV-infected patients is associated with long-term decreases in T-cell proliferation. *Blood.* 2004 Aug 1;104(3):775–80.
37. Waldmann TA, Dubois S, Tagaya Y. Contrasting Roles of IL-2 and IL-15 in the Life and Death of Lymphocytes: Implications for Immunotherapy. *Immunity.* 2001 Feb 1;14(2):105–10.
38. Krieg C, Létourneau S, Pantaleo G, Boyman O. Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells. *PNAS.* 2010 Jun 29;107(26):11906–11.
39. W. H.J. Kruit SHG. Clinical experience with the combined use of recombinant interleukin-2 (IL2) and interferon alfa-2a (IFN α) in metastatic melanoma. *British journal of haematology.* 1991;79 Suppl 1(1):84–6.
40. Assier E, Jullien V, Lefort J, Moreau J-L, Santo JPD, Vargaftig BB, et al. NK Cells and Polymorphonuclear Neutrophils Are Both Critical for IL-2-Induced Pulmonary Vascular Leak Syndrome. *J Immunol.* 2004 Jun 15;172(12):7661–8.
41. Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, Aebersold PM, Linehan WM, Seipp CA, et al. Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Ann Surg.* 1989 Oct;210(4):474–85.
42. Lotze MT, Matory YL, Rayner AA, Ettinghausen SE, Vetto JT, Seipp CA, et al. Clinical effects and toxicity of interleukin-2 in patients with cancer. *Cancer.* 1986 Dec 15;58(12):2764–72.
43. Shaker MA, Younes HM. Interleukin-2: Evaluation of routes of administration and current delivery systems in cancer therapy. *J. Pharm. Sci.* 2009 Jul 1;98(7):2268–98.
44. Thompson JA, Lee DJ, Cox WW, Lindgren CG, Collins C, Neraas KA, et al. Recombinant Interleukin 2 Toxicity, Pharmacokinetics, and Immunomodulatory Effects in a Phase I Trial. *Cancer Res.* 1987 Aug 1;47(15):4202–7.
45. Lotze MT, Matory YL, Ettinghausen SE, Rayner AA, Sharrow SO, Seipp CA, 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 Oct 1;135(4):2865–75.
46. Bui LA, Butterfield LH, Kim JY, Ribas A, Seu P, Lau R, et al. In Vivo Therapy of Hepatocellular Carcinoma with a Tumor-Specific Adenoviral Vector Expressing Interleukin-2. *Human Gene Therapy.* 1997 Dec 10;8(18):2173–82.
47. Becker JC, Pancook JD, Gillies SD, Furukawa K, Reisfeld RA. T cell-mediated eradication of murine metastatic melanoma induced by targeted interleukin 2 therapy. *J Exp Med.* 1996 May 1;183(5):2361–6.
48. Katre NV, Knauf MJ, Laird WJ. Chemical modification of recombinant interleukin 2 by polyethylene glycol increases its potency in the murine Meth A sarcoma model. *PNAS.* 1987 Mar 1;84(6):1487–91.

49. Melder RJ, Osborn BL, Riccobene T, Kanakaraj P, Wei P, Chen G, 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.* 2004 Dec 8;54(6):535–47.
50. Letourneau S, Van Leeuwen EMM, Krieg C, Martin C, Pantaleo G, Sprent J, et al. IL-2/anti-IL-2 antibody complexes show strong biological activity by avoiding interaction with IL-2 receptor subunit CD25. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2010 Feb 2;107(5):2171–6.
51. Votavova P, Tomala J, Subr V, Strohalm J, Ulbrich K, Rihova B, et al. Novel IL-2-Poly(HPMA)Nanoconjugate Based Immunotherapy. *Journal of Biomedical Nanotechnology.* 2015 Sep 1;11(9):1662–73.
52. 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 Monoclonal Antibody As Novel Approach of Cancer Immunotherapy. *J Immunol.* 2009 Oct 15;183(8):4904–12.
53. Kamimura D, Sawa Y, Sato M, Agung E, Hirano T, Murakami M. IL-2 In Vivo Activities and Anti-tumor Efficacy Enhanced by an Anti-IL-2 mAb. *J Immunol.* 2006 Jul 1;177(1):306–14.
54. Spangler JB, Tomala J, Luca VC, Jude KM, Dong S, Ring AM, et al. Antibodies to Interleukin-2 Elicit Selective T Cell Subset Potentiation through Distinct Conformational Mechanisms. *Immunity.* 2015 May 19;42(5):815–25.
55. Krieg C, Létoirneau S, Pantaleo G, Boyman O. Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells. *PNAS.* 2010 Jun 29;107(26):11906–11.
56. 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 α -Fc chimera. *Immunology Letters.* 2014 May;159(1–2):1–10.
57. Jin G-H, Hirano T, Murakami M. Combination treatment with IL-2 and anti-IL-2 mAbs reduces tumor metastasis via NK cell activation. *Int. Immunol.* 2008 Jun 1;20(6):783–9.
58. Molloy MJ, Zhang W, Usherwood EJ. Cutting Edge: IL-2 Immune Complexes As a Therapy for Persistent Virus Infection. *J Immunol.* 2009 Apr 15;182(8):4512–5.
59. Kamimura D, Bevan MJ. Naive CD8+ T cells differentiate into protective memory-like cells after IL-2–anti-IL-2 complex treatment in vivo. *J Exp Med.* 2007 Aug 6;204(8):1803–12.
60. Smith C, Martinez M, Peet J, Khanna R. Differential Outcome of IL-2/Anti-IL-2 Complex Therapy on Effector and Memory CD8+ T Cells following Vaccination with an Adenoviral Vector Encoding EBV Epitopes. *J Immunol.* 2011 May 15;186(10):5784–90.
61. Hamilton SE, Schenkel JM, Akue AD, Jameson SC. IL-2 Complex Treatment Can Protect Naive Mice from Bacterial and Viral Infection. *J Immunol.* 2010 Dec 1;185(11):6584–90.
62. Mostböck S, Lutsiak MEC, Milenic DE, Baidoo K, Schlom J, Sabzevari H. IL-2/Anti-IL-2 Antibody Complex Enhances Vaccine-Mediated Antigen-Specific CD8+ T Cell Responses and Increases the Ratio of Effector/Memory CD8+ T Cells to Regulatory T Cells. *J Immunol.* 2008 Apr 1;180(7):5118–29.
63. Lee H-W, Park S-J, Choi BK, Kim HH, Nam K-O, Kwon BS. 4-1BB Promotes the Survival of CD8+ T Lymphocytes by Increasing Expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J Immunol.* 2002 Nov 1;169(9):4882–8.

64. Nam K-O, Kang H, Shin S-M, Cho K-H, Kwon B, Kwon BS, et al. Cross-Linking of 4-1BB Activates TCR-Signaling Pathways in CD8+ T Lymphocytes. *J Immunol.* 2005 Feb 15;174(4):1898-905.
65. Votavova P, Tomala J, Subr V, Strohalm J, Ulbrich K, Rihova B, et al. Novel IL-2-Poly(HPMA)Nano-conjugate Based Immunotherapy. *Journal of Biomedical Nanotechnology.* 2015 Sep 1;11(9):1662-73.
66. Lee S-Y, Cho M-L, Oh H-J, Ryu J-G, Park M-J, Jhun J-Y, et al. Interleukin-2/anti-interleukin-2 monoclonal antibody immune complex suppresses collagen-induced arthritis in mice by fortifying interleukin-2/STAT5 signalling pathways. *Immunology.* 2012 Dec 1;137(4):305-16.
67. Webster KE, Walters S, Kohler RE, Mrkvan T, Boyman O, Surh CD, et al. In vivo expansion of T reg cells with IL-2-mAb complexes: induction of resistance to EAE and long-term acceptance of islet allografts without immunosuppression. *J Exp Med.* 2009 Apr 13;206(4):751-60.
68. Liu R, Zhou Q, La Cava A, Campagnolo DI, Van Kaer L, Shi F-D. Expansion of regulatory T cells via IL-2/anti-IL-2 mAb complexes suppresses experimental myasthenia. *Eur. J. Immunol.* 2010 Jun 1;40(6):1577-89.
69. Davidson TS, DiPaolo RJ, Andersson J, Shevach EM. Cutting Edge: IL-2 Is Essential for TGF- β -Mediated Induction of Foxp3+ T Regulatory Cells. *J Immunol.* 2007 Apr 1;178(7):4022-6.
70. Shin H-J, Baker J, Leveson-Gower DB, Smith AT, Sega EI, Negrin RS. Rapamycin and IL-2 reduce lethal acute graft-versus-host disease associated with increased expansion of donor type CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Blood.* 2011 Aug 25;118(8):2342-50.
71. Wilson MS, Pesce JT, Ramalingam TR, Thompson RW, Cheever A, Wynn TA. Suppression of Murine Allergic Airway Disease by IL-2:Anti-IL-2 Monoclonal Antibody-Induced Regulatory T Cells. *J Immunol.* 2008 Nov 15;181(10):6942-54.
72. Webster KE, Walters S, Kohler RE, Mrkvan T, Boyman O, Surh CD, et al. In vivo expansion of T reg cells with IL-2-mAb complexes: induction of resistance to EAE and long-term acceptance of islet allografts without immunosuppression. *J Exp Med.* 2009 Apr 13;206(4):751-60.
73. Tang Q, Adams JY, Penaranda C, Melli K, Piaggio E, Sgouroudis E, et al. Central Role of Defective Interleukin-2 Production in the Triggering of Islet Autoimmune Destruction. *Immunity.* 2008 May 16;28(5):687-97.