

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Tereza Hnízdilová**

*Komplexy cytokin/anti-cytokin mAb a jejich biologická aktivita*  
*Cytokine/anti-cytokine mAb complexes and their biological activity*

Bakalářská práce

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

Praha, 2017

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Marku Kovářovi, Ph.D. za vstřícný přístup a cenné rady a připomínky k mé bakalářské práci. Velký dík patří také mé rodině za podporu při studiu. V neposlední řadě chci poděkovat svému příteli za jeho trpělivost se mnou při psaní této bakalářské práce.

**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, 12.5.2017

Podpis.....

Tereza Hnízdilová

# Abstrakt

*In vivo* biologická aktivita některých cytokinů může být paradoxně zvýšena tvorbou komplexu cytokinu s některými svými monoklonálními protilátkami (mAb) rozpoznávajícími tento cytokin. Proloužení poločasu eliminace z cirkulace je hlavním mechanismem této potenciace biologické aktivity cytokinu. Zájem vzbuzují zejména IL-2/anti-IL-2 mAb komplexy, neboť v závislosti na použitém klonu mAb dochází k selektivní stimulaci buď CD25<sup>high</sup> (IL-2/JES6-1 komplex), nebo CD122<sup>high</sup> (IL-2/S4B6 komplex) buněk. Díky výrazné stimulaci NK buněk a paměťových CD8<sup>+</sup> T lymfocytů a pouze mírné stimulaci Treg buněk by IL-2/S4B6 imunokomplexy mohly v budoucnu nahradit konvenční IL-2 v protinádorové imunoterapii. IL-2/JES6-1 imunokomplexy by se svou vysoce selektivní stimulací Treg buněk naopak mohly uplatnit při léčbě autoimunitních onemocnění a transplantacích. Potenciálně klinicky využitelné jsou dále IL-3/anti-IL-3 mAb komplexy díky stimulaci žírných buněk, IL-4/anti-IL-4 mAb komplexy, které stimulují aktivované B lymfocyty a produkci IgE plazmatickými buňkami či IL-7/anti-IL-7 mAb komplexy pro svou schopnost potencovat proliferaci a přežívání T lymfocytů. Imunokomplexy mohou být tvořeny také cytokinem a jeho solubilním receptorem. IL-15/IL-15R $\alpha$  komplexy představují generaci IL-15 superagonistů, které mohou být díky stimulaci expanze NK buněk a paměťových CD8<sup>+</sup> T lymfocytů využity jako protinádorová imunoterapeutika.

**Klíčová slova:** IL-2, IL-15, anti-cytokin mAb, imunokomplexy, imunoterapie, IL-2/S4B6 komplexy, IL-2/JES6-1 komplexy, IL-15/IL-15R $\alpha$  komplexy

# Abstract

Immune complexes formed by a cytokine and particular clone of monoclonal antibody (mAb) have been shown to paradoxically exert higher biological activity in comparison to the cytokine alone *in vivo*. The main mechanism of this phenomenon *in vivo* is due to the prolongation of the cytokine half-life in circulation. IL-2/anti-IL-2 mAb complexes are especially interesting since they can selectively stimulate either CD25<sup>high</sup> (IL-2/JES6-1 complexes), or CD122<sup>high</sup> cells (IL-2/S4B6) depending on the clone of mAb used. IL-2/S4B6 immune complexes have high stimulatory activity for NK cells and memory CD8<sup>+</sup> T cells and they could thus replace the conventional IL-2 in cancer immunotherapy. On the other hand, IL-2/JES6-1 highly selectively stimulate Treg cells and they could be potentially useful for transplantations and in treatment of autoimmune diseases. Other immune complexes could find their medicinal use, including IL-3/anti-IL-3 mAb complexes for their potent stimulatory activity for mast cells, IL-4/anti-IL-4 complexes for their ability to stimulate IgE production, or IL-7/anti-IL-7 mAb complexes for their capacity to augment T cell proliferation and survival. The potentiation of cytokine activity is not restricted to anti-cytokine antibodies only. Soluble cytokine receptors can exert similar feature as above mentioned anti-cytokine mAbs. IL-15/IL-15R $\alpha$  complexes represent a generation of IL-15 superagonists, which could be used in cancer immunotherapy for their ability to expand NK cells and memory CD8<sup>+</sup> T cells.

**Key words:** IL-2, IL-15, anti-cytokine mAbs, immune complexes, immunotherapy, IL-2/S4B6 complexes, IL-2/JES6-1 complexes, IL-15/IL-15R $\alpha$  complexes

## Seznam zkratek

AICD	activation-induced cell death	aktivaci indukovaná buněčná smrt
CD	cluster of differentiation	diferenční skupina
CFU	colony-forming unit	jednotky tvořící kolonie
DNP	dinitrophenol	dinitrofenol
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis	experimentální autoimunitní encefalomyelitida
FDA	Food and Drug Administration	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FcRn	neonatal Fc receptor	neonatální Fc receptor
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor	faktor stimulující granulocytární kolonie
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor	faktor stimulující granulocytární a makrofágové kolonie
HSV	herpes simplex virus	herpes simplex virus
IL	interleukin	interleukin
ILC2	innate lymphoid cells type 2	vrozené lymfoidní buňky druhého typu
INF- $\gamma$	interferon gamma	interferon gamma
JAK	Janus kinase	Janus kináza
mAb	monoclonal antibody	monoklonální protilátka
MAPK	mitogen-activated protein kinase	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MHC	major histocompatibility complex	hlavní histokompatibilní komplex
NK	natural killer	přirozený zabíječ
NSG	NOD scid gamma	NOD scid gamma
PI3K	phosphatidylinositide 3-kinase	fosfatidylinositol-3-kináza
R	receptor	receptor
SCF	stem cell factor	faktor kmenových buněk
SRBC	sheep red blood cells	ovčí erytrocyty
STAT	signal transducer and activator of transcription	přenašeč signálu a aktivátor
TCGF	T cell growth factor	růstový faktor T lymfocytů
Th	T helper cell	pomocná T buňka
TIL	tumor infiltrating lymphocytes	tumor infiltrující lymfocyty
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor alpha	faktor nádorové nekrózy alfa
Treg	regulatory T cell	regulační T lymfocyt
VLS	vascular leak syndrome	syndrom „prosakujících“ kapilár

# Obsah

Úvod.....	1
1. Biologie IL-2.....	2
1.1 Funkce a zdroje IL-2 v organismu.....	2
1.2 IL-2 receptor.....	3
1.3 Využití IL-2 v imunoterapii.....	4
2. Biologie IL-15.....	5
2.1 IL-15 receptor.....	5
2.2 Funkce a zdroje IL-15 v organismu.....	5
2.3 Využití IL-15 v imunoterapii.....	6
3. Komplexy cytokin/anti-cytokin mAb.....	6
3.1 IL-2/anti-IL-2 mAb komplexy.....	7
3.1.1 Biologická aktivita IL-2 imunokomplexů.....	7
3.1.2 Komplexy IL-2/S4B6.....	8
3.1.3 Komplexy IL-2/JES6-1.....	9
3.1.4 Mechanismus selektivity IL-2 imunokomplexů.....	10
3.2 IL-3/anti-IL-3 mAb komplexy.....	10
3.3 IL-4/anti-IL-4 mAb komplexy.....	11
3.4 IL-5/anti-IL-5 mAb komplexy.....	12
3.5 IL-6/anti-IL-6 mAb komplexy.....	13
3.6 IL-7/anti-IL-7 mAb komplexy.....	13
3.7 IL-15/IL-15R $\alpha$ komplexy.....	14
3.7.1 IL-15/IL-15R $\alpha$ -Fc komplexy.....	15
3.7.2 RLI.....	16
3.7.3 ALT-803.....	17
3.8 G-CSF/anti-G-CSF mAb komplexy.....	18
3.9 TNF- $\alpha$ /anti-TNF- $\alpha$ mAb komplexy.....	18
Závěr.....	20
Seznam literatury.....	21

# Úvod

Imunoterapie je vedle chemoterapie, chirurgické léčby a radioterapie jedním z terapeutických přístupů v léčbě onkologických pacientů. Jejím cílem je aktivace imunitního systému pacienta za účelem indukce či posílení protinádorové odpovědi. Té se prostřednictvím NK buněk, makrofágů a neutrofilních granulocytů, potažmo cytotoxických a T<sub>H</sub>1 lymfocytů, účastní mechanismy nespecifické i specifické imunity. Prezentace nádorového antigenu T lymfocytům je předpokladem vzniku adaptivní protinádorové imunitní reakce.

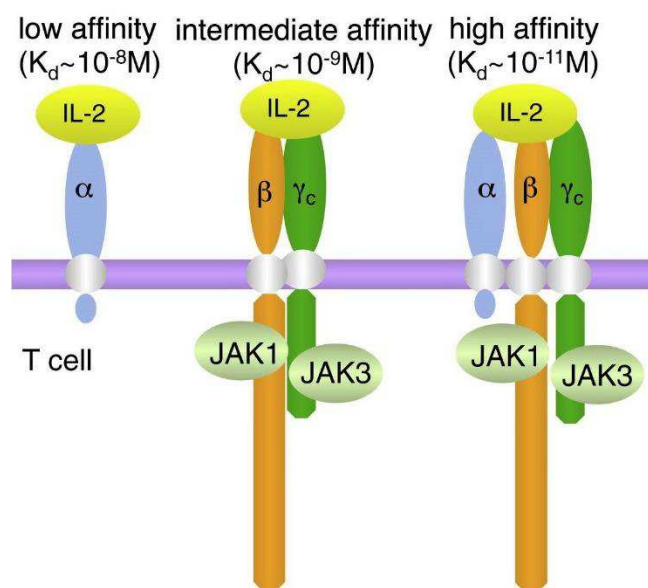
Imunoterapie umožňuje modulovat pacientův imunitní systém různými přístupy, které zahrnují adoptivní přenos modifikovaných leukocytů, aplikaci protilátek proti nádorovým antigenům nebo regulačním mechanismům imunitní odpovědi či podávání nádorových vakcín. Další možností nespecifické aktivace imunitního systému onkologického pacienta je podávání cytokinů, které v organismu podporují protinádorovou odpověď. Jedním z hlavních cytokinů stimulujících proliferaci, přežívání a vývoj efektorových funkcí T lymfocytů je IL-2. T lymfocyty pak mohou přímo zabít nádorové buňky. IL-2 také zvyšuje cytotoxicitu NK buněk. Proliferace a expanze klíčových buněk protinádorové imunitní reakce v odpovědi na podání IL-2 lze využít jako podpůrnou léčbu u pacientů s některými nádorovými onemocněními. Biologická aktivita IL-2 může být zesílena tvorbou komplexu IL-2 s některými klony anti-IL-2 monoklonální protilátky (mAb). Tento překvapivý efekt vykazuje celá řada dalších imunokomplexů cytokinů se svou anti-cytokin mAb. Dalšími slibnými protinádorovými imunoterapeutiky mohou být komplexy IL-15/IL-15R $\alpha$ .

Tato práce si klade za cíl vyjmenovat cytokiny, které v komplexu s některou ze svých anti-cytokin mAb vykazují zvýšení své biologické aktivity a popsat jejich potenciální využití. Práce rovněž popíše biologii IL-2 a IL-15, tedy dvou interleukinů, které svým působením aktivují efektorové buňky imunitního systému, a hrají tudíž roli v posílení protinádorové odpovědi organismu onkologických pacientů.

# 1. Biologie IL-2

## 1.1 Funkce a zdroje IL-2 v organismu

IL-2 je glykoprotein s molekulovou hmotností 15,5 – 16 kDa, tvořený jedním polypeptidovým řetězcem složeným ze čtyř  $\alpha$  helixů.<sup>1</sup> Patří spolu s IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 a IL-21 do rodiny  $\gamma_c$  cytokinů. Jedná se o interleukin s pleiotropními účinky, mezi něž patří zejména stimulace proliferace, diferenciace a přežívání aktivovaných B a T lymfocytů.<sup>2</sup> Paradoxně stimuluje a udržuje homeostázu jak efektorových T lymfocytů, tak i imunosupresivních  $CD4^+$  T regulačních lymfocytů (Treg).<sup>3</sup> Stimuluje rovněž cytotoxické funkce NK buněk. IL-2 zesiluje aktivací indukovanou buněčnou smrt (AICD), která představuje důležitý regulační mechanismus imunitní odpovědi.<sup>4</sup> Spolu s polarizačními cytokiny stimuluje diferenciaci naivních  $CD4^+$  T lymfocytů v  $T_H1$ ,  $T_H2$  T lymfocyty, a naopak brání jejich polarizaci v  $T_H17$  či folikulární  $T_H$  T lymfocyty. V organismu jsou jeho hlavním zdrojem aktivované T lymfocyty,<sup>2</sup> dále NK a NKT buňky, dendritické buňky a makrofágy.<sup>5</sup>



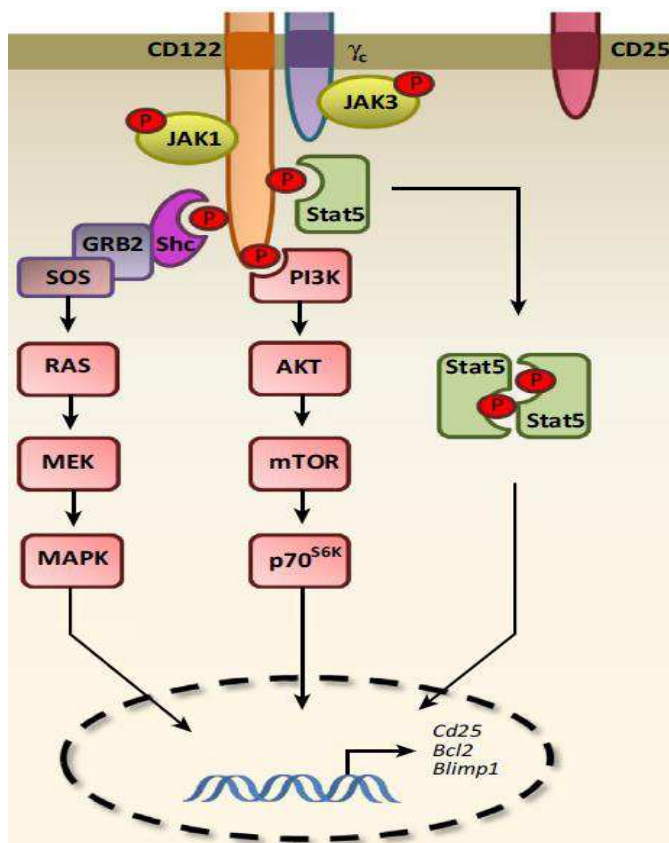
**Obrázek č. 1:** IL-2 receptory, jejich kompozice a afinita k IL-2. IL-2R $\alpha$  (CD25) váže IL-2 s poměrně nízkou afinitou ( $K_d \sim 10^{-8} M$ ) a z důvodu velmi krátké intracelulární domény neindukuje IL-2 signalizaci. Dimerní IL-2R (IL-2R $\beta/\gamma$ , CD122/132) váže IL-2 se střední afinitou ( $K_d \sim 10^{-9} M$ ). CD122 je ve vysokých hladinách exprimován NK buňkami a paměťovými  $CD8^+$  T lymfocyty a CD122/132 je dominantní formou IL-2R v těchto buňkách. Trimerní IL-2R (IL-2R $\alpha/\beta/\gamma$ , CD25/122/132) váže IL-2 s vysokou afinitou ( $K_d \sim 10^{-11} M$ ) a je exprimován aktivovanými T lymfocyty a Treg buňkami. Převzato a upraveno dle Liao a kol., Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy. Immunity, 2013.



## 1.2 IL-2 receptor

IL-2 signalizace se uskutečňuje prostřednictvím IL-2 receptoru (IL-2R), který může být na buněčných površích exprimován ve formě monomeru, dimeru či trimeru (Obrázek č. 1). Monomerní IL-2R představuje IL-2R $\alpha$  (CD25), který váže IL-2 s relativně nízkou afinitou ( $K_d \sim 10^{-8}$  M). Interakce IL-2 s CD25 nevede k transdukci signálu, neboť CD25 má jen velmi krátkou intracelulární část a neobsahuje tudíž žádné vazebné motivy pro molekuly signální transdukce.<sup>6</sup> K uskutečnění signalizace je zapotřebí interakce IL-2 buď se středně afinním dimerním ( $K_d \sim 10^{-9}$  M), či vysoko afinním trimerním IL-2R ( $K_d \sim 10^{-11}$  M). Dimerní IL-2R je složen z IL-2R $\beta$  (CD122) a IL-2R $\gamma$  (CD132,  $\gamma_c$ ) a je silně exprimován paměťovými CD8<sup>+</sup> T lymfocyty a NK buňkami. Paměťové CD4<sup>+</sup> T lymfocyty a naivní T buňky pak exprimují nižší hladiny CD122/132. Pokud dojde k antigenní aktivaci T lymfocytů (TRC signál), začnou tyto buňky exprimovat CD25 za vzniku vysoko afinního trimerního CD25/122/132. Vysoká míra exprese CD25 je pak udržována IL-2 signalizací, jedná se tedy o pozitivní zpětnovazebnou regulaci. Vysokou míru exprese CD25 spolu se střední mírou exprese CD122/132 vykazují taktéž CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg buňky, které jsou tudíž schopny pro svůj vývoj a homeostázu využívat klidovou koncentraci IL-2, která je příliš nízká na to, aby mohla stimulovat buňky exprimující středně afinní receptor CD122/132.<sup>2,5</sup> Konstitutivní exprese CD122 byla zaznamenána také u dalších buněčných populací, jako jsou monocyty či neutrofilní granulocyty.<sup>7</sup> CD133 je pak konstitutivně exprimován splenocyty a thymocyty, zahrnujícími různé leukocytární populace.<sup>8</sup>

Za pleiotropními účinky IL-2 na různé lymfocytární subpopulace stojí možnost přenosu extracelulárního IL-2 signálu do jádra skrze tři různé signální kaskády – JAK-STAT, fosfatidylinositol-3-kinázovou (PI3K) a mitogenem aktivovanou proteinkinázovou (MAPK) kaskádu (Obrázek č. 2).<sup>5</sup> Po navázání IL-2 na IL-2R dochází k heterodimerizaci cytoplazmatických domén CD122 a CD133, která aktivuje tyrozinkinázy z rodiny Janus kináz JAK1 a JAK3, které fosforylují tyrozin na pozici 338 (u lidí; u myši na pozici 341) na CD122. Tato fosforylace rekrutuje SHC adaptorový protein, který umožňuje asociaci dalších proteinů Ras-MAPKinázové signální dráhy, vedoucí k aktivaci, proliferaci a podpoře růstu buňek.<sup>9,10</sup> Fosforylace tyrozinu na CD122 také rekrutuje transkripční faktory z rodiny STAT, zejména STAT5, které po aktivaci fosforylací dimerizují a migrují z cytoplasmy do jádra, kde se vážou na DNA a ovlivňují rozličné buněčné funkce, zahrnující například proliferaci a diferenciaci.<sup>10</sup> IL-2 signalizace také vede přes PI3K kaskádu, kdy fosforylací dochází k postupné aktivaci PI3K, proteinkinázy B (Akt), mTOR a p70 S6 kinázy, která přímo ovlivňuje proteosyntézu a indukuje zejména buněčnou proliferaci.<sup>11</sup>



**Obrázek č. 2:** IL-2 signalizace. Po navázání IL-2 na IL-2R CD25/122/132 či CD122/132 dochází k heterodimerizaci CD122 a CD132. K cytoplazmatickým doménám CD122/132 jsou rekrutovány Janus kinázy (JAK1, JAK3), které fosforylují CD122, a tím umožňují aktivaci SHC adaptorového proteinu. SHC protein je prvním členem Ras-Mek-MAPK signální kaskády. Fosforylovaná CD122 rekrutuje také STAT5, který po fosforylaci a homodimerizaci putuje do jádra, kde se uplatňuje jako transkripční faktor. IL-2 signalizace dále probíhá přes fosfatidylinositol-3-kinázovou (PI3K) – Akt – mTOR – p70 S6 dráhu. Převzato dle Arenas-Ramirez a kol., Interleukin-2: Biology, Design and Application. Trends in Immunology, 2015.

### 1.3 Využití IL-2 v imunoterapii

IL-2 byl v roce 1976 popsán jako potentní růstový faktor T lymfocytů (TCGF) *in vitro*.<sup>12</sup> Později se zjistilo, že IL-2 má protinádorovou aktivitu v některých myších nádorových modelech, pročež byl rekombinantní IL-2 záhy zkoumán coby protinádorové imunoterapeutikum.<sup>13</sup> IL-2 imunoterapie měla úspěchy zejména v léčbě metastazujícího renálního tumoru a metastazujícího melanomu, a proto byla v devadesátých letech americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) schválena pro léčbu pacientů s těmito typy nádorů. Kompletní regrese nádoru po IL-2 imunoterapii byla zaznamenána u 6,6 % pacientů s metastazujícím melanomem a 9,3 % pacientů s metastazujícím nádorem ledvin.<sup>14</sup> IL-2 imunoterapie byla dále testována u pacientů s HIV, avšak bez výrazného terapeutického efektu.<sup>15</sup> Dalším imunoterapeutickým přístupem je podání IL-2 spolu s adoptivním přenosem autologních *ex vivo* expandovaných tumor infiltruujících lymfocytů (TIL) v kombinaci s léčbou chemoterapeutiky.<sup>16</sup>

Velkou nevýhodou IL-2 terapie je však její značná toxicita, která se projevuje zejména život ohrožujícím syndromem „prosakujících“ kapilár (VLS). Podávání vysokých dávek IL-2 totiž vede ke zvýšené propustnosti kapilár, neboť podávaný IL-2 stimuluje endotelové buňky k produkci prozánětlivých mediátorů, které působí na zvýšení permeability cévní stěny. Intravaskulární tekutina se tak dostává do extravaskulárních prostor a její hromadění ve tkáních může způsobovat edém plic či mozku za současného poklesu krevního tlaku, který může vést až k srdečnímu selhání.<sup>17</sup> Nová studie prokázala, že edém plic po podání vysoké dávky IL-2 je způsoben zejména plicními endoteliálními buňkami, které exprimují CD25/122/132. Tyto buňky v reakci na zvýšenou hladinu IL-2 zvýší expresi CD25, aby snížily hladinu IL-2 v plicích a zabránily jejich přílišné imunitní stimulaci.<sup>18</sup> Další vedlejší účinky podávání vysokých dávek IL-2 zahrnují hypotenzi, trombocytopenii, tachykardii, neurologické poruchy a zvýšení bilirubinu a dalších jaterních enzymů, indikující hepatotoxicitu.<sup>17</sup> Velkou nevýhodou IL-2 protinádorové terapie je kromě rychlého poločasu eliminace podaného IL-2 z krevního oběhu<sup>19</sup> také fakt, že tento cytokin příznivě ovlivňuje homeostázu a supresivní kapacitu imunosupresivních Treg buněk.<sup>3</sup>

## 2. Biologie IL-15

### 2.1 IL-15 receptor

IL-15 patří do rodiny  $\gamma_c$  cytokinů. S IL-2 ho kromě strukturní podobnosti pojí ještě společná IL-2/IL-15R $\beta$  (CD122) receptorová podjednotka.<sup>20</sup> Stejně jako u IL-2R obsahuje kompletní IL-15 receptor (IL-15R) kromě CD122 a CD132 ještě podjednotku  $\alpha$  (CD215). Na rozdíl od IL-2, kdy v nepřítomnosti CD122 a CD132 váže samotná IL-2R $\alpha$  příslušný cytokin s relativně nízkou afinitou, je afinita IL-15R $\alpha$  k IL-15 vysoká ( $K_d \sim 10^{-11}$  M). Pokud má proběhnout IL-2 signalizace pomocí vysoce afinního IL-2R, musí být buňce přítomen heterotrimer CD25/122/132. IL-15 signalizace probíhá odlišným způsobem. Buňka exprimující IL-15 zároveň exprimuje IL-15R $\alpha$  a IL-15 se váže na IL-15 $\alpha$  již intracelulárně v Golgiho komplexu. Tento IL-15/IL-15R $\alpha$  komplex buňka „vystaví“ na svém povrchu, který zde in trans prezentuje okolním buňkám exprimujícím CD122/132. K signalizaci dochází juxtakrinně kontaktem komplexu IL-15/IL-15R $\alpha$  na signalizující buňce s CD122/132 na buňce signál přijímající.<sup>21</sup> Součástí IL-15R $\alpha$  je extracelulární sushi doména, která má rozhodující podíl na vazbě IL-15.<sup>22</sup>

### 2.2 Funkce a zdroje IL-15 v organismu

Mezi IL-15 responzivní buňky, tedy buňky exprimující CD122/132, patří NK buňky a některé subpopulace T lymfocytů, jako jsou paměťové CD8<sup>+</sup> T lymfocyty.<sup>22</sup> Hlavními IL-15 produkujícími a trans-prezentujícími buňkami jsou dendritické buňky, monocyty a makrofágy.<sup>23</sup> IL-15 je klíčovým

cytokinem pro vývoj, maturaci a homeostázu NK buněk, neboť IL-15<sup>-/-</sup> myším tyto buňky zcela chybí. NKT a paměťové CD8<sup>+</sup> T lymfocyty se u těchto myší nachází ve výrazně redukováných počtech. IL-15 deficientní myši nedokážou vyvinout úspěšnou imunitní odpověď proti virům, v prostředí bez patogenů však zůstávají zdravé.<sup>24</sup> Ačkoliv IL-15Rα<sup>-/-</sup> myši mají normální vývoj B i T lymfocytů, vykazují lymfopenii, která je způsobena sníženou proliferací IL-15α<sup>-/-</sup> lymfocytů a jejich nedostatečným uvolňováním z thymu do krevního oběhu.<sup>25</sup>

## 2.3 Využití IL-15 v imunoterapii

Díky svým protinádorovým účinkům představuje IL-15 slibnou molekulu pro použití v imunoterapii nádorů. IL-15 má klíčové role v imunitním systému, které tkví ve stimulaci proliferace a aktivace NK buněk a paměťových CD8<sup>+</sup> T lymfocytů. IL-15 je tak klíčovou molekulou v homeostáze těchto dvou populací imunokompetentních buněk, které mají centrální postavení v protinádorové imunitě. Použití IL-15 pro imunoterapii nádorových onemocnění má na rozdíl od IL-2 několik výhod: jeho aplikace nevyvolává VLS, a navíc nemá vliv na homeostázu Treg buněk.<sup>23</sup> IL-15 má však také své nevýhody. Mezi nepříznivé vedlejší účinky jeho aplikace patří hypotenze, trombocytopenie, horečka, poruchy jaterních funkcí a kožní vyrážky. IL-15 má navíc, stejně jako IL-2, krátký poločas eliminace daný jeho nízkou molekulovou hmotností. Vzhledem k tomu, že *in vivo* dochází k efektivní signalizaci díky intracelulární preasociaci IL-15 s IL-15Rα a trans prezentací IL-15 ve formě IL-15/IL-15Rα, je pro dosažení farmakologického efektu zapotřebí aplikovat IL-15 ve velmi vysokých dávkách.<sup>20,26</sup> Dostupnost volného IL-15Rα může být limitujícím faktorem úspěšnosti podávání samotného IL-15, neboť pokud není v organismu dostupný volný IL-15Rα, na který se cytokin váže za účelem trans prezentace IL-15 responzivním buňkám, nemůže podávání samotného cytokinu, byť ve vysokých dávkách, dosáhnout plného terapeutického potenciálu.<sup>21</sup>

## 3. Komplexy cytokin/anti-cytokin mAb

Cytokiny jsou mediátory imunitního systému, jejichž obecným posláním je regulace specifické a nespecifické imunity.<sup>27</sup> Vyřazení endogenního cytokinu z funkce aplikací neutralizující mAb nebo rozpustného cytokinového receptoru se jeví jako ideální terapie v případech, kdy konkrétní cytokin přispívá ke zhoršení patofyziologických jevů v organismu, jako jsou například akutní záněty či sepse.<sup>28</sup> Terapie založená na neutralizaci biologické aktivity cytokinů pomocí mAb musí však počítat s tím, že podání některých mAb nejenže nevede v případě některých cytokinů k neutralizaci jejich aktivity; vytvořený imunokomplex cytokin/anti-cytokin mAb může paradoxně zesilovat biologickou aktivitu cytokinu.<sup>27</sup> Agonistické působení některých klonů anti-cytokin mAb či solubilních cytokinových

receptorů po vytvoření imunokomplexu bylo popsáno u mnohých cytokinů včetně IL-2,<sup>29</sup> IL-3,<sup>30</sup> IL-4,<sup>31</sup> IL-5,<sup>32</sup> IL-6,<sup>33</sup> IL-7,<sup>34</sup> IL-15,<sup>22</sup> G-CSF,<sup>35</sup> a TNF- $\alpha$ .<sup>36</sup>

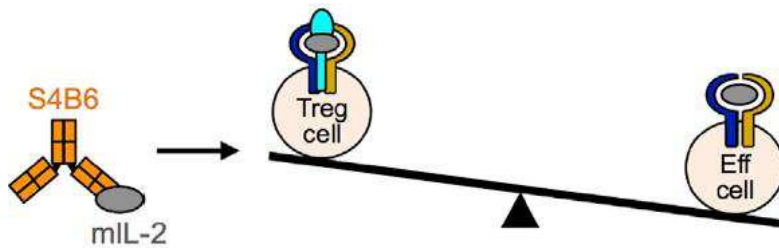
Úplný mechanismus tohoto jevu není stále zcela objasněn. Jedním z pravděpodobných vysvětlení je mnohokrát experimentálně ověřený fakt, že tvorba cytokin/anti-cytokin mAb imunokomplexu prodlužuje poločas eliminace cytokinu z krevního oběhu (řádově z minut na hodiny) a cytokin je v imunokomplexu déle chráněn před degradací.<sup>27,37,34</sup> U některých imunokomplexů hraje zřejmě v potenciaci biologické aktivity cytokinu roli vazba anti-cytokin mAb na neonatální Fc receptor (FcRn), který váže imunokomplexy a zabráňuje jejich lysozomální degradaci tím, že je recykluje zpět do extracelulárního prostoru.<sup>38</sup>

## 3.1 IL-2/anti-IL-2 mAb komplexy

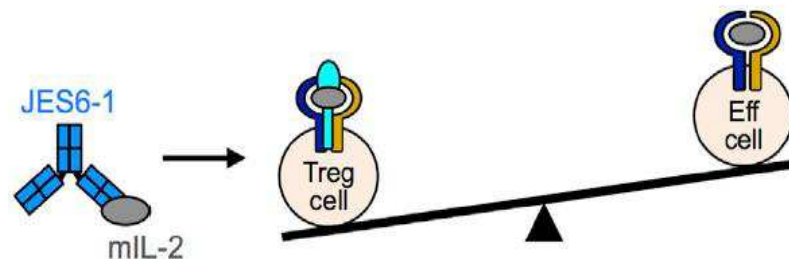
### 3.1.1 Biologická aktivita IL-2 imunokomplexů

V porovnání s volným IL-2 mají komplexy IL-2 s určitými klony anti-IL-2 mAb výhodné vlastnosti z hlediska jejich terapeutického použití. Práce Boymana a kol.<sup>29</sup> poprvé ukázala, že IL-2/anti-IL-2 mAb imunokomplexy mají schopnost potencovat biologickou aktivitu IL-2 *in vivo*, a to zejména díky tomu, že jejich poločas eliminace z krevního oběhu je oproti samotnému IL-2 značně zvýšen (řádově z několika minut na 3,5-4 hodiny).<sup>19</sup> Významnou vlastností IL-2 imunokomplexů je to, že jsou v závislosti na použitém klonu mAb schopny do určité míry selektivně stimulovat buď paměťové CD8<sup>+</sup> T lymfocyty a NK buňky, nebo Treg buňky (Obrázek č. 3). Imunokomplex myšního IL-2 s mAb S4B6 (IL-2/S4B6) má po podání myším za následek zejména expanzi CD122<sup>high</sup> buněk, tedy NK buněk a paměťových CD8<sup>+</sup> T lymfocytů. V menší míře působí IL-2/S4B6 stimulačně také na proliferaci Treg buněk. Analogické vlastnosti vykazují imunokomplexy tvořené myším IL-2 a mAb JES6-5H4 a imunokomplexy lidského IL-2 a MAB602. Imunokomplex myšního IL-2 s mAb JES6-1 (IL-2/JES6-1) na rozdíl od předchozích komplexů vysoce selektivně stimuluje proliferaci pouze CD25<sup>+</sup> buněk. Po aplikaci IL-2/JES6-1 tudíž v myších dochází k expanzi Treg buněk. Funkčním analogem JES6-1 je lidská mAb 5344.<sup>29</sup> Oba dva zmíněné IL-2 imunokomplexy, (tj. IL-2/S4B6 a IL-2/JES6-1) jsou schopny stimulovat proliferaci aktivovaných T lymfocytů, přičemž IL-2/JES6-1 je v tomto ohledu potentnější než IL-2/S4B6.<sup>19</sup>

a.



b.



**Obrázek č. 3:** IL-2/anti-IL-2 imunokomplexy a jejich selektivní stimulace různých buněčných populací. (a) IL-2/S4B6 komplex stimuluje CD122<sup>high</sup> buňky, jeho podání má za tedy následek zvýšení relativního počtu efektorových buněk (paměťových CD8<sup>+</sup> T lymfocytů a NK buněk); Treg buňky jsou stimulovány méně (b) IL-2/JES6-1 komplex stimuluje výhradně CD25<sup>high</sup> buňky, jeho podání má tedy za následek zvýšení relativního počtu regulačních Treg buněk. Převzato dle Spangler a kol., Antibodies to Interleukin-2 Elicit Selective T Cell Subset Potentiation through Distinct Conformational Mechanisms. *Immunity*, 2015

### 3.1.2 Komplexy IL-2/S4B6

IL-2/S4B6 komplexy vykazují vysokou stimulační aktivitu pro CD122<sup>high</sup> NK buňky a paměťové CD8<sup>+</sup> T lymfocyty *in vivo*. Indukují ustavení robustní a funkční populace CD44<sup>high</sup> CD8<sup>+</sup> paměťových buněk z naivních CD8<sup>+</sup> T lymfocytů.<sup>19,39</sup> Jejich stimulační aktivita není závislá na expresi CD25.<sup>19</sup> Na paměťové CD4<sup>+</sup> T lymfocyty a B220<sup>+</sup> B lymfocyty mají IL-2/S4B6 imunokomplexy minimální vliv.<sup>29</sup>

Díky masivní stimulaci expanze NK a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů coby klíčových efektorových buněk protinádorové imunity, jsou tyto imunokomplexy intenzivně zkoumány s ohledem na jejich potenciální využití v imunoterapii nádorů. Protinádorová aktivita IL-2/S4B6 byla potvrzena na různých myších nádorových modelech.<sup>19,40,41,42</sup> Jediná dávka IL-2/S4B6 myším nesoucím B16 melanom měla za následek významnou redukci plicních metastáz oproti myším léčeným jednou dávkou volného IL-2.<sup>40</sup> Opakované podání IL-2/S4B6 myším s BCL1 leukemií vedlo na rozdíl od podání samotného IL-2 u některých myší k úplnému vyléčení.<sup>19</sup> U myší nesoucích renální karcinom RENCA byla oproti neléčeným myším v nádoru detekována zvýšená přítomnost tumor infiltrujících lymfocytů v případě, že byl myším po dobu čtyř týdnů obden aplikován IL-2/S4B6. Léčba imunokomplexy nicméně v tomto případě nebyla dostačující k výraznějšímu potlačení růstu nádoru oproti neléčeným kontrolám.<sup>42</sup>

Kromě vyšší protinádorové aktivity je nespornou výhodou IL-2/S4B6 imunokomplexů v porovnání s volným cytokinem také fakt, že léčba IL-2/S4B6 imunokomplexy u myší způsobuje mírnější vedlejší

účinky.<sup>43</sup> Oproti standardní léčbě pomocí IL-2, nedochází při léčbě IL-2/S4B6 u myši nesoucích renální karcinom dvacátý osmý den po aplikaci nádorových buněk k VLS.<sup>42</sup>

Léčba pomocí IL-2/S4B6 se u myši ukazuje jako efektivní nejen v případě nádorových onemocnění, ale také v případě bakteriálních a virových infekcí.<sup>44,45</sup> Aplikace IL-2/S4B6 imunokomplexu, který způsobil vyšší produkci granzymu B cytotoxickými T lymfocyty a INF- $\gamma$  NK buňkami, poskytovala naivním myším dlouhotrvající ochranu proti akutní infekci *Listeria monocytogenes*.<sup>44</sup> Podání IL-2/S4B6 myším podporovalo jejich imunitní odpověď proti HSV-1 viru. Kožní léze byly u těchto myši oproti neléčeným myším výrazně zredukovány.<sup>45</sup>

### 3.1.3 Komplexy IL-2/JES6-1

Na rozdíl od IL-2/S4B6 je nutnou podmínkou responzivity buněk na IL-2/JES6-1 imunokomplex kromě exprese CD122 a CD132 především vysoká exprese CD25. IL-2/JES6-1 imunokomplex tedy stimuluje proliferaci CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg buněk a aktivovaných T lymfocytů.<sup>19</sup> Další buněčnou subpopulací, jejichž expanzi IL-2/JES6-1 stimuluje, jsou antigenně nespecifické lymfoidní buňky druhého typu (ILC2), neboť také exprimují trimerický IL-2R. Kromě stimulace proliferace ILC2, indukuje IL-2/JES6-1 také zvýšenou produkci IL-5 těmito buňkami.<sup>46,47</sup>

Stejně jako IL-2/S4B6 mají i IL-2/JES6-1 imunokomplexy slibný potenciál klinického využití. Vzhledem k jejich selektivní stimulaci Treg buněk by tyto imunokomplexy mohly být využity k léčbě autoimunitních onemocnění.<sup>29</sup> Webster a kol.<sup>48</sup> prokázal, že aplikace IL-2/JES6-1 chrání myši před rozvojem experimentální autoimunitní encefalomyelitidy (EAE), která je myším modelem lidské roztroušené sklerózy. Těchto terapeutických účinků je však dosaženo pouze tehdy, je-li IL-2/JES6-1 aplikován před indukci EAE. V opačném případě může podání IL-2/JES6-1 urychlit progresi onemocnění.<sup>48</sup> Expanze Treg populace vyvolaná aplikací IL-2/JES6-1 před allogenní transplantací rovněž příznivě ovlivňuje přijetí štěpu. Allogenní transplantát byl přijat u 82 % zvířat, která byla předléčena IL-2/JES6-1. U všech IL-2 předléčených a naivních myši došlo k rejekci štěpu.<sup>48</sup> Nedávná studie<sup>49</sup> poukazuje na příznivé účinky IL-2/JES6-1 na zotavení myši po infarktu myokardu. Treg buňky expandované podáním imunokomplexu zamezují infiltraci prozánětlivých makrofágů fenotypu M1, a naopak stimulují polarizaci makrofágů fenotypu M2, které působí antiapoptoticky na buňky myokardu a zabraňují vzniku zánětlivé reakce.<sup>49</sup> Terapeutický efekt IL-2/JES6-1 komplexů byl prokázán také u DSS indukované kolitidy.<sup>3</sup> U myši, u kterých indukci kolitidy předcházelo podání IL-2/JES6-1, byl zaznamenán několikanásobně vyšší relativní počet Treg buněk než u zvířat předléčených PBS. Histologie střeva byla navíc u myši, kterým byl aplikován IL-2/JES6-1, v podstatě shodná se zdravým zvířetem; u PBS předléčených myši vykazovala závažnou patologii. Komplex IL-2/JES6-1 podaný apolipoprotein E deficientním myším krměným stravou s velkým obsahem tuků výrazně zbrzdil progresi aterosklerózy díky selektivní expanzi Treg buněk.<sup>50</sup> Terapeutický účinek IL-2/JES6-1 byl u

myší prokázán na dalších modelech chorob včetně experimentální myastenie<sup>51</sup> či Duchennovy muskulární dystrofie.<sup>52</sup>

### 3.1.4 Mechanismus selektivity IL-2 imunokomplexů

IL-2 imunokomplexy se oproti volnému IL-2 vyznačují zejména zvýšenou biologickou aktivitou *in vivo* a schopností selektivně stimulovat buď CD25<sup>high</sup>, nebo CD122<sup>high</sup> buněčné populace. Zvýšená biologická aktivita imunokomplexů oproti IL-2 je důsledkem delšího poločasu eliminace z cirkulace. Zatímco IL-2 je coby malá molekula velmi rychle z oběhu odstraněn a degradován, asociací IL-2 s S4B6 či JES6-1 mAb dochází k mnohonásobnému prodloužení poločasu eliminace z cirkulace.<sup>19</sup> Zejména u IL-2/JES-6 hraje v prodloužení poločasu eliminace z cirkulace roli vazba mAb na FcRn.<sup>37</sup>

Selektivita IL-2 imunokomplexů se na základě experimentálních dat jeví jako důsledek toho, že se protilátky S4B6 a JES6-1 vážou v molekule IL-2 na odlišná vazebná místa.<sup>29</sup> S4B6 mAb svou vazbou na IL-2 překrývá epitop pro vazbu CD25 tohoto cytokinu, a proto je exprese CD25 irelevantní ke schopnosti využít IL-2 signál ve formě IL-2/S4B6. IL-2/S4B6 imunokomplex tudíž stimuluje všechny buňky exprimující středně afinní dimerický CD122/132. Po navázání S4B6 na IL-2 navíc dochází ke konformační změně C helixu v molekule IL-2, která má za následek zvýšenou afinitu IL-2 v IL-2/S4B6 komplexu k CD122.<sup>3,53</sup>

Vazba JES6-1 mAb na IL-2 naopak stericky brání navázání IL-2/JES6-1 komplexu na CD122 a CD132. Vazbou JES6-1 mAb dochází k alosterické změně molekuly IL-2, která má za následek sníženou afinitu k CD25. CD25<sup>+</sup> buňky jsou schopny využít IL-2/JES6-1 komplexy, i když pro proběhnutí signalizace musí (na rozdíl od IL-2/S4B6) dojít k disociaci IL-2 a protilátky. Tuto disociaci IL-2/JES6-1 komplexu je schopna zajistit právě CD25, přičemž efektivita disociace IL-2/JES6-1 komplexu pozitivně koreluje s mírou exprese CD25. Proto aby došlo k přerušení vazby mezi IL-2 a JES6-1 a následné signalizaci v dostatečném počtu událostí, musí být CD25 recipientní buňkou exprimováno ve velkém množství, které je nezbytné k disociaci imunokomplexu a nahrazení JES6-1 mAb vazbou IL-2 na CD25 a umožnění vazby IL-2 na CD122/132. Selektivní stimulace proliferace CD25<sup>high</sup> buněk působením IL-2/JES6-1 komplexů je dále umocněna pozitivní zpětnovazebnou smyčkou, kdy v IL-2/JES6-1 responzivních buňkách dochází ke zvýšení exprese CD25, a tedy ještě větší responzivitě těchto buněk na IL-2/JES6-1.<sup>3</sup>

## 3.2 IL-3/anti-IL-3 mAb komplexy

IL-3 je důležitým růstovým faktorem hematopoetických buněk a jeho hlavním zdrojem jsou T lymfocyty. IL-3 je možno využít k podpoře proliferace a diferenciaci buněk kostní dřeně v klinické



praxi například po myeloablaci, která může nastat po intenzivní chemoterapii např. při léčbě leukémie.<sup>30</sup> IL-3 se také spolu s SCF a IL-9 podílí na regulaci diferenciaci a proliferaci žírných buněk.<sup>54</sup>

Nevýhodou použití tohoto cytokinu pro terapeutické účely je zejména jeho rychlé vylučování z krevního oběhu renální filtrací.<sup>30</sup> K překonání tohoto problému lze použít komplexy IL-3 s určitými klony anti-IL-3 mAb, neboť bylo popsáno, že vytvořením takovýchto komplexů dochází k zesílení IL-3 signalizace a prodloužení poločasu eliminace z cirkulace.<sup>30, 27</sup>

Jones a kol.<sup>30</sup> ve svých pokusech používali imunokomplexy složené z myšičího rekombinantního IL-3 a anti-IL-3 králičí protilátky, jejichž intravenózní podání vedlo u experimentálních myší k výraznému zvýšení biologické aktivity IL-3. Ta se manifestovala 3-5krát zvýšeným počtem prekurzorů žírných buněk v kostní dřeni u myší léčených imunokomplexy oproti myším, kterým byl podán samotný IL-3. Počet zralých mastocytů ve slezině byl rovněž signifikantně zvýšen, ačkoliv nebyl pozorován v mízních uzlinách, játrech, plicích ani lačnicku myší. Efekt zvýšené biologické aktivity IL-3 nebyl pozorován v *in vitro* podmínkách; zde naopak docházelo k neutralizaci biologické aktivity IL-3. Z toho autoři usuzují, že mechanismem zvýšené biologické aktivity IL-3 je prodloužení poločasu eliminace IL-3 z krevního oběhu, jehož příčinou je právě vytvoření imunokomplexu IL-3 s anti-IL-3 mAb. Molekulární hmotnost komplexu IL-3/ anti-IL-3 mAb je mnohonásobně vyšší než molekulární hmotnost samotného IL-3, a tudíž dochází ke snížení renální clearance IL-3 při podání imunokomplexů v porovnání s podáním samotného IL-3.<sup>30</sup>

Obdobné výsledky jako Jones uvádí i Finkelman a kol.,<sup>27</sup> kteří porovnávali schopnost myšičího rekombinantního IL-3 v komplexu s „neutralizační“ anti-IL-3 mAb stimulovat proliferaci žírných buněk v porovnání s volným IL-3. U myší, kterým byl první a čtvrtý den experimentu intravenózně aplikován samotný cytokin, nedošlo osmý den od zahájení experimentu ke změně počtu mastocytů v tenkém střevě oproti kontrole. Výrazný nárůst počtu žírných buněk v jejunu byl zaznamenán u myší, kterým byl podle stejného dávkovacího schématu injikován IL-3/anti-IL-3 mAb komplex. Zde se počet mastocytů v jejunu zvýšil šestnáctkrát oproti kontrole.<sup>27</sup>

### 3.3 IL-4/anti-IL-4 mAb komplexy

IL-4 je cytokin, mezi jehož hlavní producenty patří aktivované CD4<sup>+</sup> T lymfocyty, žírné buňky a bazofilní granulocyty.<sup>55</sup> Mezi účinky IL-4 patří indukce T<sub>H</sub>2 imunitní odpovědi,<sup>55</sup> a také stimulace proliferace a diferenciaci B lymfocytů. Stimuluje rovněž B lymfocyty k izotypovému přesmyku na produkci IgE a indukuje zvýšení MHC II.<sup>31</sup> IL-4 signalizace se uskutečňuje po vytvoření ternárního komplexu složeného z IL-4 a dvou podjednotek IL-4 receptoru: IL-4R $\alpha$  (CD124) a CD132.<sup>56</sup>

Bylo prokázáno, že myšičí rekombinantní IL-4 má zhruba pětinašobně vyšší aktivitu ve smyslu stimulace exprese Ia antigenu (myšičí MHC II) na B lymfocytech ve slezině myší, pokud je myšičí podán ve formě

komplexu s anti-IL-4 mAb 11B11 oproti podání samotného IL-4. Maximální stimulace exprese Ia antigenu splenocyty bylo dosaženo třetí den po intravenózním podání imunokomplexu. U myši, kterým byl podán samotný cytokin, nebyla třetí den po aplikaci zvýšená exprese Ia antigenu detekována.<sup>27</sup>

Za určitých podmínek nemusí jako agonisté IL-4 vystupovat pouze komplexy IL-4 s určitými klony anti-IL-4 mAb, ale také s rozpustným CD124 (sCD124). Tvorba IgE indukovaná IL-4 může být *in vivo* podpořena či naopak blokována podáním IL-4/anti-IL-4 mAb či IL-4/sCD124. K popsání biologické aktivity sCD124 byl použit model, kdy byla myším napřed za účelem aktivace B lymfocytů a stimulace polyklonální IgE imunitní odpovědi díky IL-4 produkovanému aktivovanými B lymfocyty podána anti-IgD protilátka. Výsledkem podávání sCD124 bylo až 85% snížení IgE imunitní odpovědi. Ještě efektivněji potlačovalo IgE odpověď podání anti-IL-4 mAb. Pokud však byl myším podán sCD124 nebo anti-IL-4 mAb v komplexu spolu s exogenním rIL-4, nejenže nedošlo ke snížení IgE odpovědi, ale produkce IgE v porovnání s produkcí IgE v myších injikovaných pouze anti-IgD protilátkou byla až trojnásobná. Stimulační efekt komplexů je závislý na relativních koncentracích sCD124 či anti-IL-4 mAb vůči IL-4. Nejvýraznější stimulace produkce IgE bylo dosaženo použitím komplexu, který v jedné dávce obsahoval IL-4 a sIL-4R v molárním poměru 1:30.<sup>31</sup>

Biologickou aktivitu vykazuje komplex IL-4/sCD124 také *in vitro*, kdy opět v závislosti na molárním poměru cytokinu ku rozpustnému receptoru dochází k neutralizaci či naopak potenciaci biologické aktivity IL-4, která byla pozorována jako snížená produkce INF- $\gamma$  aktivovanými T lymfocyty.<sup>55</sup>

### 3.4 IL-5/anti-IL-5 mAb komplexy

IL-5 je homodimerní cytokin, jehož biologická aktivita je podmíněna přítomností dvou cysteinových zbytků v jeho molekule, které stabilizují strukturu IL-5 disulfidickou vazbou. IL-5 signalizace se uskutečňuje navázáním cytokinu na IL-5R, který je složen z  $\alpha$  (CD125) a  $\beta$  řetězce (CD131), též označovaného  $\beta_c$ , neboť je sdílen s IL-3 a GM-CSF. Významnou funkcí IL-5 je stimulace proliferace a maturace eozinofilních granulocytů v kostní dřeni. Eozinofilie je typickým průvodním jevem alergických reakcí. Patologická role eozinofilů se uplatňuje například při eozinofilním astmatu, kdy se pod kontrolou IL-5 zvyšuje počet eozinofilů v dýchacích cestách, což vede k zánětům a hyperreaktivě bronchů.<sup>32</sup>

Vzhledem k důležité roli eozinofilů v indukcii zánětu u pacientů s astmatem a dalšími alergickými onemocněními se jako vhodná terapeutická strategie jeví zablokování funkce IL-5 přidáním neutralizační anti-IL-5 mAb, která znemožní jeho vazbu na IL-5R, a tudíž nedojde k signalizaci vedoucí k aktivaci, maturaci a migraci eozinofilů.<sup>57</sup>

Zabeau a kol.<sup>32</sup> svými pokusy však dokazuje, že některé mAb proti IL-5 nemají neutralizační funkci, ale vytvořený komplex IL-5/anti-IL-5 mAb naopak aktivitu cytokinu zesiluje. Za účelem stanovení

biologické aktivity imunokomplexů složených z lidského hIL-5 a jednoho ze tří testovaných klonů anti-IL-5 mAb (5A5, 1E1, 1F1) byl do linie myších myeloidních prekurzorů FDC-P1 transfekován chimerní (zčásti lidský a zčásti myší) CD125. Po působení IL-5/anti-IL-5 mAb imunokomplexů na tyto IL-5 responzivní buňky autoři zjistili, že komplexy IL-5/anti-IL-5 mAb mohou v závislosti na použité mAb a molárním poměru mAb ku IL-5 podporovat proliferaci FDC-P1 buněk exprimujících CD125 *in vitro*.<sup>32</sup>

### 3.5 IL-6/anti-IL-6 mAb komplexy

IL-6 je typický prozánětlivý cytokin. Mezi jeho funkce patří také stimulace přeměny aktivovaných B lymfocytů na plazmatické buňky a stimulace produkce protilátek plazmocyty. Podílí se na indukcii tvorby fibrinogenu, C-reaktivního proteinu a dalších proteinů akutní fáze v hepatocytech. Je rovněž růstovým faktorem pro některé myelomy a hybridomy.<sup>58</sup>

Imunokomplexy složené z IL-6 a některých klonů anti-IL-6 mAb mohou potencovat biologickou aktivitu IL-6 *in vivo*, ačkoliv *in vitro* aktivitu IL-6 blokuje.<sup>58,33</sup> Podávání komplexu hIL-6 a anti-IL-6 mAb MH166 v šesti po sobě jdoucích dnech myším, které byly den před prvním podáním imunizovány buď dinitrofenolem (DNP), nebo ovčími erytrocyty (SRBC), mělo za následek značné zvýšení produkce anti-DNP i anti-SRBC IgG a IgM v porovnání s myši, kterým byl podáván samotný IL-6. Imunokomplex IL-6/MH166 inhiboval aktivitu IL-6 *in vitro*, neboť jeho přidání k myším B lymfocytům tvorbu protilátek potlačilo. Hladina IL-6 v séru zvířat, kterým byl podán samotný IL-6 nebyla po 24 hodinách od aplikace detekovatelná, zatímco v séru myší injikovaných IL-6/MH166 byla stále vysoká.<sup>58</sup>

Studie provedená Mayem a kol.<sup>33</sup> dokazuje, že komplexy IL-6 s anti-IL-6 mAb mohou v závislosti na molárním poměru anti-IL-6 mAb ku IL-6 neutralizovat či naopak potencovat účinek IL-6 na hepatocyty, měřený jako produkce fibrinogenu. Tento efekt byl pozorován na myších a pavíanech. Podání samotné anti-IL-6 mAb vždy působilo inhibičně na IL-6 zprostředkované zvýšení produkce fibrinogenu jaterními buňkami.<sup>33</sup>

### 3.6 IL-7/anti-IL-7 mAb komplexy

IL-7 patří (stejně jako například IL-2) do rodiny hematopoetických cytokinů, které signalizují prostřednictvím společného gamma řetězce (CD132). Hlavním zdrojem IL-7 v organismu jsou stromální a epiteliální buňky thymu a kostní dřeň.<sup>59</sup> Ačkoliv u myší byla prokázána nezbytnost IL-7 pro správný vývoj T i B lymfocytů z lymfoidních prekurzorů,<sup>60</sup> a také pro homeostázu obou těchto maturovaných buněčných typů, u lidí IL-7 reguluje přežívání pouze maturovaných T a nikoliv B lymfocytů.<sup>61</sup>

IL-7 patří mezi nadějně molekuly protinádorové imunoterapie, neboť podporuje přežívání cytotoxických T lymfocytů a zvyšuje frekvenci jejich infiltrace do nádoru.<sup>62</sup> Treg buňky exprimují nízké hladiny IL-7R $\alpha$  (CD127) a jejich přežívání tak není na IL-7 závislé.<sup>34</sup>

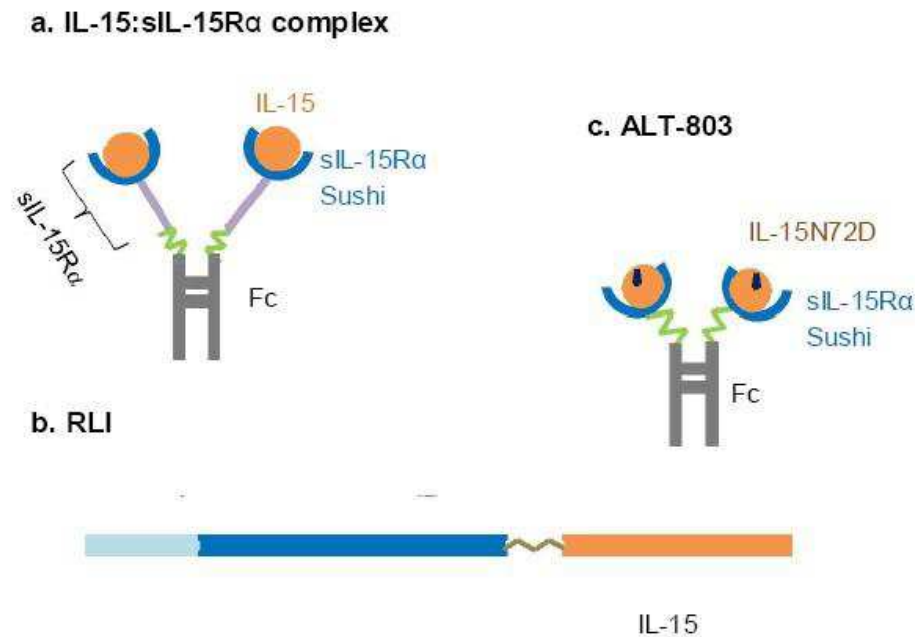
Biologická aktivita IL-7 *in vivo* může být podpořena tvorbou komplexu IL-7 s anti-IL-7 mAb.<sup>27,63,34,38</sup> Práce Finkelmana a kol.<sup>27</sup> poukazuje na vyšší potenciál imunokomplexů stimulovat vývoj B lymfocytů myši oproti volnému IL-7. Procentuální zastoupení pre-B B220<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup> buněk ve slezině myši se po aplikaci imunokomplexu zvýšilo ze 2 % na 38 %. Podání samotného IL-7 nemělo na tyto buňky žádný efekt. K signifikantnímu zvýšení procentuálního zastoupení B220<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup> buněk v reakci na imunokomplexy došlo rovněž v kostní dřeni. Ani v tomto případě nebylo podání samotného IL-7 dostačující k navození stimulace proliferace těchto buněk.<sup>27</sup> Také další pokusy dokazují, že na časný vývoj B lymfocytů myši má větší stimulační efekt IL-7, které je podáno formou imunokomplexu než jako samostatný cytokin.<sup>63,34</sup>

U myši, kterým byl první, třetí a pátý den experimentu intraperitoneálně podán rhIL-7 v komplexu s anti-IL-7 mAb M25, došlo k expanzi naivních i paměťových CD8<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup> buněk. Nejmasivnější expanze byla zaznamenána u CD44<sup>high</sup> CD8<sup>+</sup> buněk. Podobné výsledky jako normální B6 myši vykazovaly rovněž myši, kterým byl odstraněn thymus, což vede k myšlence, že tyto imunokomplexy nepůsobí na zrání a export T lymfocytů z thymu do krevního oběhu, nýbrž stimulují proliferaci již maturovaných T lymfocytů. MAb M25 potencuje biologickou aktivitu IL-7 *in vivo* pouze v případě, že je aplikován *ex vivo* připravený komplex rIL-7 s M25 mAb, kde ani M25 mAb, ani IL-7 není v nadbytku.<sup>34</sup>

### 3.7 IL-15/IL-15R $\alpha$ komplexy

Unikátní role IL-15R $\alpha$  v IL-15 signalizaci vede k tomu, že zvýšená pozornost při vývoji imunoterapeutik s IL-15 pro klinické využití se obrací nikoliv na komplexy cytokinu/anti-cytokin mAb jako u IL-2 a dalších výše popsaných interleukinů, nýbrž právě na komplexy IL-15/IL-15R $\alpha$  coby superagonistů IL-15 (Obrázek č. 4). Tyto komplexy totiž oproti volnému IL-15 vykazují značně zvýšenou biologickou aktivitu, neboť mají zvýšenou afinitu k CD122/132. Pokud jsou navíc dále

fúzovány s nosičovým proteinem (např. Fc částí IgG), vykazují taktéž významně prodloužený poločas eliminace z cirkulace.<sup>22,21</sup>



**Obrázek č. 4:** Superagonisté IL-15. (a) IL-15/IL-15R $\alpha$ -Fc komplex složený z dvou molekul IL-15 navázaných na sIL-15R $\alpha$  fúzovaných s Fc fragmentem IgG (b) fúzní protein RLI složený z IL-15 připojeného flexibilní spojkou na sushi doménu sIL-15R $\alpha$  (c) ALT-803 složený ze dvou molekul mutovaného IL-15 (IL-15N72D) navázaných na sushi doménu IL-15R $\alpha$ , fúzovanou s Fc fragmentem IgG. Převzato a upraveno dle Wu a kol., IL-15 Agonists: The Cancer Cure Cytokine. J Mol Genet Med, 2013.

### 3.7.1 IL-15/IL-15R $\alpha$ -Fc komplexy

Komplex rekombinantního myšního IL-15 se solubilním myším IL-15R $\alpha$  fúzovaným s Fc fragmentem lidské IgG1 protilátky (IL-15R $\alpha$ -Fc) je jedním z přístupů, jak modifikovat IL-15 tak, aby došlo k výrazné potenciaci jeho biologické aktivity. Práce Rubinsteina a kol.<sup>22</sup> jako první popisuje signifikantně zvýšenou biologickou aktivitu IL-15/IL-15R $\alpha$ -Fc komplexů v porovnání s IL-15, která se projevuje *in vitro* i *in vivo*. Komplexy IL-15/IL-15R $\alpha$ -Fc byly schopné indukovat intenzivní proliferaci purifikovaných CD44<sup>high</sup> CD122<sup>high</sup> CD8<sup>+</sup> paměťových T lymfocytů a CD122<sup>high</sup> NK buněk *in vitro*. Při použití vysokých koncentrací IL-15 pak IL-15R $\alpha$ -Fc komplex navíc indukoval i proliferaci CD44<sup>low</sup> CD122<sup>low</sup> CD8<sup>+</sup> naivních T lymfocytů. Komplexy IL-15/IL-15R $\alpha$ -Fc vykazovaly ve srovnání s IL-15 dramaticky vyšší potenciál stimulovat proliferaci paměťových CD8<sup>+</sup> T lymfocytů a NK buněk *in vivo*. V případě paměťových CD8<sup>+</sup> T lymfocytů došlo po aplikaci IL-15/IL-15R $\alpha$ -Fc komplexu myším k padesátinásobné expanzi těchto buněk na rozdíl od myši, kterým byl podán samotný IL-15. Podání jediné dávky IL-15/IL-15R $\alpha$ -Fc komplexu IL-15R $\alpha$ <sup>-/-</sup> myším bez paměťových CD8<sup>+</sup> T lymfocytů (nebo jen s minimálním počtem) a NK buněk, vedlo k znovuustavení těchto buněčných populací. Podání samotného IL-15 nebylo k vyvolání podobného efektu dostačující.<sup>22</sup>

Výsledky Rubinsteina a kol. potvrzuje Stoklasek a kol.<sup>21</sup> Podání IL-15/IL-15R $\alpha$ -Fc vedlo nejen k výrazné expanzi paměťových CD8<sup>+</sup> lymfocytů a NK buněk, ale také k aktivaci naivních CD8<sup>+</sup> T lymfocytů, které se vlivem komplexů přeměnily v efektorové buňky a paměťové buňky s plně zachovanými efektorovými funkcemi. Na modelu myšního B16 metastazujícího melanomu navíc autoři dokázali, že podání IL-15/IL-15R $\alpha$ -Fc komplexu myším má díky expanzi efektorových CD8<sup>+</sup> T lymfocytů a NK buněk výrazný protinádorový efekt. U devíti myší z deseti, které byly po podání nádorových buněk léčeny komplexem IL-15/IL-15R $\alpha$ -Fc, došlo k rejekci nádoru. V případě aplikace samotného IL-15 byla vyléčena pouze jediná myš.<sup>21</sup>

Také další studie prokazují, že podání komplexu IL-15/IL-15R $\alpha$ -Fc vede k masivní expanzi NK buněk.<sup>64,26</sup> U myší starších patnácti měsíců, které měly z důvodu pokročilého věku snížené počty zralých NK buněk v krvi, slezině, kostní dřeni a uzlinách, stimulovaly komplexy proliferaci NK buněk, z nichž ovšem většina zůstala nezralá a neposkytovala starým myším dostatečnou obranyschopnost proti viru myších neštovic. Podíl CD27<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> maturovaných NK buněk ze všech NK buněk ve slezině se u starých myší po aplikaci IL-15/IL-15R $\alpha$ -Fc komplexu dokonce snížil. Komplexy IL-15/IL-15R $\alpha$ -Fc u starých myší tedy výrazně expandovaly nezralé NK buňky, nenavozovaly však jejich maturaci.<sup>64</sup>

S ohledem na možnost klinického využití IL-15 agonistů pro imunoterapii nádorů je důležitá toxicita IL-15/IL-15R $\alpha$ -Fc komplexů. U zdravých myší, kterým bylo čtyři po sobě jdoucí dny aplikováno IL-15/IL-15R $\alpha$ -Fc (ekvivalent 2 $\mu$ g IL-15), byly zaznamenány vedlejší účinky, které zahrnovaly hypotermii, zvýšení jaterních enzymů indikujících poškození jater a výrazný pokles tělesné hmotnosti. Dvě z deseti myší tento experiment nepřežily.<sup>26</sup>

### 3.7.2 RLI

Potentním superagonistou IL-15 se ukázal být také fúzní protein, kde je IL-15 navázaný flexibilní peptidickou spojkou na sushi doménu IL-15R $\alpha$ .<sup>65</sup> Tento konstrukt byl nazván RLI a vykazuje slibný terapeutický potenciál. V porovnání s volným IL-15 i IL-15/IL-15R $\alpha$ -Fc komplexem měl RLI větší stimulační efekt na proliferaci CD122<sup>high</sup> buněk *in vivo* a byl efektivnější v redukci plicních a jaterních metastáz a přežívání myší nesoucích B16F10 melanom. Aplikace RLI dokázala výrazně inhibovat růst lidského kolorektálního karcinomu HCT-116 u nunu myší. Po dobu dvaceti osmi dnů byly myši s implantovanými nádorovými buňkami léčeny třikrát týdně podáním PBS či 2 $\mu$ g RLI. V době ukončení experimentu se nádor kontrolních myší v 59,3 % případů nacházel ve IV. stadiu onemocnění, zatímco v I. stadiu bylo pouze 3,7 % myší. U myší léčených RLI bylo 18,5 % nádorů ve IV. stadiu a 55,6 % ve stadiu I.<sup>20</sup> Protinádorová aktivita RLI může být dále zvýšena vznikem nové generace imunocytokinů, ve které je RLI kovalentně připojeno na protilátku proti gangliosidu GD2, který je typickým antigenem exprimovaným buňkami mnoha neuroektodermálních nádorů jako je melanom, gliom či neuroblastom. RLI je díky anti-GD2 mAb dopraven přímo k nádorovým buňkám, kde může plně rozvinout svůj protinádorový potenciál.<sup>66</sup>

### 3.7.3 ALT-803

Slibným novým superagonistou IL-15 je ALT-803, který se skládá ze dvou molekul mutovaného IL-15 (IL-15N72D) kovalentně navázaných na sushi doménu IL-15R $\alpha$  spojenou s Fc fragmentem IgG1. Mutace v IL-15 spočívá v aminokyselinové záměně na pozici 72, kdy je místo asparaginu zařazen aspartát. Tato bodová mutace vede ke zvýšené afinitě mutovaného IL-15 k CD122 oproti nemutovanému cytokinu. ALT-803 je schopno indukovat expanzi NK buněk a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů v tak nízkých dávkách, ve kterých je podání IL-15 bez jakéhokoliv efektu.<sup>67,68</sup> Po aplikaci ALT-803 došlo ke zvýšení počtu NK buněk, paměťových CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů, neutrofilů a monocytů v periferní krvi makaků.<sup>23</sup> V rámci populace NK buněk dochází k nejvýznamnější expanzi subpopulace vysoce cytotoxických a migrace schopných CD27<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> efektorových NK buněk.<sup>69</sup> Farmakokinetická analýza ukázala, že tento IL-15 superagonista vykazuje poločas eliminace z cirkulace myši 25 hodin, což je v porovnání s IL-15, jehož poločas eliminace nepřekračuje 40 minut, výrazný nárůst.<sup>68</sup> ALT-803 stimuluje zvýšenou produkci INF- $\gamma$ , zatímco hladiny ostatních prozánětlivých cytokinů zůstávají nezměněny.<sup>23</sup>

ALT-803 se osvědčil jako účinné imunoterapeutikum v různých nádorových myších modelech. U myši s mnohočetným myelomem 5T33P došlo po podání 0,2 mg/kg ALT-803 k 90% redukcii počtu nádorových buněk v kostní dřeni oproti myším, které byly léčeny PBS. Aplikace ekvimolárního množství IL-15 vyvolala pouze 53% redukcii buněk mnohočetného myelomu oproti neléčené kontrole. Osm z deseti myší léčených ALT-803 dlouhodobě přežívalo 192. den od zahájení experimentu. Žádná z myší léčených PBS nepřežila. Přeživším vyléčeným myším byly třetí měsíc od zahájení experimentu opět injikovány 5T33P buňky, které ale nebyly schopny vyvolat onemocnění. *In vivo* depleční experimenty prokázaly, že za protinádorovým účinkem ALT-803 v modelu myšního mnohočetného myelomu stojí CD8<sup>+</sup> T lymfocyty, neboť jejich deplece vedla k potlačení protinádorového účinku ALT-803. Deplece NK1.1<sup>+</sup> buněk neměla na protinádorovou aktivitu ALT-803 vliv. Paměťové CD8<sup>+</sup> T lymfocyty, které byly po aplikaci ALT-803 výrazně stimulovány, exprimovaly ve zvýšené míře NKG2D, zatímco exprese CD25 a PD-1 zvýšena nebyla.<sup>70</sup> Neméně nadějně výsledky v podobě redukce nádorové masy a prodloužení přežívání vykazuje léčba ALT-803 také při terapii B16F10 myšního melanomu, CT26 myšního kolorektálního karcinomu,<sup>23</sup> myšního GL261-luc glioblastomu,<sup>71</sup> chemicky indukovaného nádoru močového měchýře<sup>72</sup> a lidského MA148-luc ovarálního karcinomu, který byl spolu s lidskými NK buňkami aplikován imunodeficientní NOD scid gamma (NSG) myši.<sup>73</sup> Zajímavým faktem je, že protinádorová odpověď vyvolaná ALT-803 je v různých nádorových modelech zprostředkována aktivací různých populací lymfocytů. V případě mnohočetného myelomu jsou to paměťové CD8<sup>+</sup> T lymfocyty, u glioblastomu jak CD4<sup>+</sup>, tak i CD8<sup>+</sup> T lymfocyty a u nádoru močového měchýře a vaječnicků NK buňky.<sup>70,71,72,73</sup>

ALT-803 je díky svým slibným protinádorovým účinkům v různých myších nádorových modelech momentálně testován v první fázi klinických studií u pacientů s mnohočetným myelomem (NCT02099539), pokročilým solidním nádorem (melanom, renální karcinom, nemalobuněčný karcinom plic, spinocelulární karcinom hlavy a krku) (NCT01946789) a recidivujícím hematologickým nádorovým onemocněním po transplantaci kmenových buněk (NCT01885897).<sup>23</sup>

### 3.8 G-CSF/anti-G-CSF mAb komplexy

G-CSF je cytokin, který se používá v klinické praxi u pacientů s neutropenií, protože jednou z jeho funkcí je právě stimulace produkce neutrofilních granulocytů a jejich myeloidních prekurzorů. Dostatečný počet neutrofilů je důležitý i u pacientů s nádorovými onemocněními, neboť tyto buňky snižují riziko oportunistické bakteriální infekce během protinádorové terapie.<sup>35</sup>

Rubinstein a kol.<sup>35</sup> uvádí, že podání G-CSF/anti-G-CSF mAb vedlo k selektivní expanzi CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> myeloidních buněk ve slezině, kostní dřeni a krvi myši, zatímco podání samotného cytokinu nemělo na tyto buňky výrazný stimulační efekt v žádném z těchto orgánů. Nárůst počtu buněk této subpopulace myeloidních prekurzorů v krvi nepotlačil ani jinak neovlivnil CD8<sup>+</sup> T-buněčnou odpověď. Komplexy G-CSF/anti-G-CSF mAb dále poskytly myším zvýšenou obranyschopnost proti bakteriální infekci vyvolanou *Listerií monocytogenes*. V porovnání se zvířaty, kterým bylo podáno samotné G-CSF, došlo u myši léčených imunokomplexy ke stonásobnému snížení počtu bakteriálních CFU třetí den po infekci.<sup>35</sup>

### 3.9 TNF- $\alpha$ /anti-TNF- $\alpha$ mAb komplexy

TNF- $\alpha$  je cytokin produkovaný zejména aktivovanými makrofágy a efektorovými T lymfocyty a jeho role spočívá především v podpoře zánětlivé reakce během infekce. Bylo prokázáno, že jeho podání může mít pozitivní efekt u některých onkologických pacientů. Jeho využití v klinické praxi je ale výrazně omezeno řadou nepříznivých vedlejších účinků, mezi něž patří zejména poruchy srážení krve, které jsou způsobeny vazbou TNF- $\alpha$  na jeho receptory na buňkách endotelu.<sup>36</sup>

Komplex TNF- $\alpha$  a anti-TNF- $\alpha$  mAb MAb 32 dokázal *in vitro* blokovat vazbu TNF- $\alpha$  na receptory na bovinních endotelových buňkách za současného zachování vazby k receptorům na nádorových buňkách (WEHI-164). TNF- $\alpha$  se tedy v komplexu TNF- $\alpha$ /MAb 32 může selektivně vázat jen na některé subtypy TNF- $\alpha$ R. U experimentálních myši, které nesly WEHI-164 fibrosarkom, došlo po aplikaci komplexu TNF- $\alpha$ /MAb 32 k 50% regresi velikosti nádoru oproti myším, kterým byl podán pouze TNF- $\alpha$ . U myši léčených komplexem TNF- $\alpha$ /MAb 32 navíc na rozdíl od myši léčených TNF- $\alpha$  autoři nepozorovali vedlejší účinky spojené s poruchami srážení krve. Z toho plyne, že TNF- $\alpha$  v tomto



imunokomplexu byl schopen *in vivo* vázat receptory na buňkách fibrosarkomu; jeho vazba na receptory endotelových buněk ale byla protilátkou blokována, čímž došlo k inhibici prokoagulační aktivity TNF- $\alpha$  při současném zachování jeho protinádorového účinku. Druhá testovaná anti-TNF- $\alpha$  mAb, MAb 47, v komplexu s TNF- $\alpha$  inhibovala interakci TNF- $\alpha$  s buňkami endotelu i nádoru, neboť podání komplexu TNF- $\alpha$ /MAb 47 nevykazovalo žádný cytotoxický efekt na nádorové buňky a neproběhla ani TNF- $\alpha$  signalizace v endotelových buňkách *in vitro*. Na rozdíl od MAb 32 se tedy MAb 47 jeví jako typicky neutralizační mAb.<sup>36</sup>

## Závěr

Vytvoření imunokomplexu cytokinu s jeho anti-cytokin mAb není zárukou neutralizace biologické aktivity daného cytokinu. V případě komplexu složeného IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-15, G-CSF či TNF- $\alpha$  s některými klony anti-cytokin mAb (či solubilním cytokinovým receptorem v případě IL-4 a IL-15) může dojít k potenciaci biologické aktivity cytokinu. Manifestace neočekávaného agonistického efektu „neutralizačních“ mAb je závislá na vzájemném molárním poměru cytokinu ku mAb. Tento jev se zpravidla projevuje *in vivo*, nicméně u některých cytokinů byl pozorován také *in vitro*.

Úplné vysvětlení daného jevu zůstává zatím nejasné. Jeho hlavním mechanismem je skutečnost, že anti-cytokin mAb vazbou na cytokin zvyšuje molekulovou hmotnost cytokinu a zabraňuje tak rychlé eliminaci či degradaci cytokinu, což má za následek mnohonásobně delší poločas eliminace cytokinu z cirkulace.

Pochopení a zkoumání účinků anti-cytokin mAb na příslušný cytokin je klíčové pro klinickou praxi, kdy se v případě některých prozánětlivých cytokinů podávají pacientům se zánětlivými onemocněními anti-cytokin mAb za účelem neutralizace cytokinu, a tudíž zmírnění zánětlivé reakce. Vzhledem k možnosti vytvoření imunokomplexu s paradoxním stimulačním efektem by taková léčba mohla být neúčinná či ještě více zhoršovat pacientův stav. Potenciace biologické aktivity cytokinu po vytvoření komplexu s mAb a prodloužení poločasu eliminace cytokinu z cirkulace mohou však být také užitečné. Zejména komplexy IL-2/anti-IL-2 mAb a IL-15/IL-15R $\alpha$  představují do budoucna slibné využití coby protinádorová imunoterapeutika. V případě IL-2 komplexů je z klinického hlediska navíc nesmírně výhodná selektivní stimulace odlišných buněčných populací v závislosti na použité mAb. Zatímco IL-2/S4B6 mají díky selektivní stimulaci CD122<sup>high</sup> buněk výrazný protinádorový potenciál, IL-2/JES6-1, které stimulují CD25<sup>high</sup> buňky, se naopak mohou uplatnit v léčbě autoimunitních chorob či při transplantacích. Možnosti budoucího klinického využití IL-2 imunokomplexů nahrává také fakt, že v porovnání s volným interleukinem vykazují komplexy nižší toxicitu.

# Seznam literatury

Review označeny \*

1. Smith KA. Interleukin-2: Inception, Impact and Implications. *Science*. 1988;240(4856):1169-1176.
2. Wang X, Rickert M, Garcia C. Structure of the Quarternary Complex of Interleukin-2 with Its alpha, beta and gamma Receptors. *Science*. 2005;310(5751):9-12.
3. Spangler JB, Tomala J, Luca VC, et al. Antibodies to Interleukin-2 Elicit Selective T Cell Subset Potentiation through Distinct Conformational Mechanisms. *Immunity*. 2015;42(5):815-825.
- \*4. Lenardo M, Chan FK, Hornung F, et al. Mature T lymphocyte apoptosis - Immune Regulation in a Dynamic and Unpredictable Antigenic Environment. *Annu Rev Immunol*. 1999;17(2):221-253.
- \*5. Arenas-Ramirez N, Woytschak J, Boyman O. Interleukin-2 : Biology , Design and Application. *Trends Immunol*. 2015;36(12):763-777.
6. Wang BYH, Smith K a. The Intereukin-2 Receptor - Functional Consequences of its Bimolecular Structure. *J Exp Med*. 1987;166(4):1055-1069.
7. Kim H-P, Kim B-G, Letterio J, Leonard WJ. Smad-dependent cooperative regulation of interleukin 2 receptor alpha chain gene expression by T cell receptor and transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*. 2005;280(40):34042-34047.
8. Cao X, Kozak CA, Liu YJ, Noguchi M, O'Connell E, Leonard WJ. Characterization of cDNAs encoding the murine interleukin 2 receptor (IL-2R) gamma chain: chromosomal mapping and tissue specificity of IL-2R gamma chain expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(18):8464-8468.
9. Boussiotis VA, Barber DL, Nakarai T, et al. Prevention of T Cell Anergy by Signaling Through the yc Chain of the IL-2 Receptor. *Science*. 1994;266(5187):1039-1042.
10. Friedmann MC, Migone TS, Russell SM, Leonard WJ. Different interleukin 2 receptor beta-chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(5):2077-2082.
11. Brennan P, Babbage JW, Thomas G, Cantrell D. p70(s6k) integrates phosphatidylinositol 3-kinase and rapamycin-regulated signals for E2F regulation in T lymphocytes. *Mol Cell Biol*. 1999;19(7):4729-4738.
12. Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R. Selective in vitro Growth of Lymphocytes from Normal human Bone Marrows. *Science*. 1976;193(4257):1007-1008.
13. Papa MZ, Mulé JJ, Rosenberg SA. Antitumor Efficacy of Lymphokine-activated Killer Cells and Recombinant Interleukin 2 in Vivo: Successful Immunotherapy of Established Pulmonary Metastases from Weakly Immunogenic and Nonimmunogenic Murine Tumors of Three Distinct Histological Types. *Cancer Res*. 1986;46(10):4973-4978.
14. Rosenberg SA, Yang JC, White DE, Steinberg SM. Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response. *Ann Surg*. 1998;228(3):307-319.
15. Sereti I, Anthony KB, Martinez-wilson H, 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;104(3):775-780.

16. Baars JW, Fonk JCM, Scheper RJ. Treatment with tumor infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in patients with metastatic melanoma: A pilot study. *Biotherapy*. 1992;4(4):289-297.
17. Alwan LM, Grossmann K, Sageser D, Van Atta J, Agarwal N, Gilreath JA. Comparison of acute toxicity and mortality after two different dosing regimens of high-dose interleukin-2 for patients with metastatic melanoma. *Target Oncol*. 2014;9(1):63-71.
18. Krieg C, Létourneau S, Pantaleo G, Boyman O. Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(26):11906-11911.
19. 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;183(8):4904-4912.
20. Bessard A, Solé V, Bouchaud G, Quéméner A, Jacques Y. High antitumor activity of RLI, an interleukin-15 (IL-15)-IL-15 receptor alpha fusion protein, in metastatic melanoma and colorectal cancer. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(9):2736-2745.
21. Stoklasek TA, Schluns KS, Lefrancois L. Combined IL-15/IL-15Ralpha Immunotherapy Maximizes IL-15 Activity In Vivo. *J Immunol*. 2006;177(9):6072-6080.
22. Rubinstein MP, Kovar M, Purton JF, et al. Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15Ra. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(24):9166-9171.
23. Rhode PR, Egan JO, Xu W, et al. Comparison of the super agonist complex, ALT-803, to IL-15 as cancer immunotherapeutics in animal models. *Cancer Immunol Res*. 2016;4(1):49-60.
24. Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, et al. Reversible Defects in Natural Killer and Memory CD8 T Cell Lineages in Interleukin 15–Deficient Mice. *J Exp Med*. 2000;191(5):771-780.
25. Lodolce JP, Boone DL, Chai S, et al. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity*. 1998;9(5):669-676.
26. Guo Y, Luan L, Rabacal W, et al. IL-15 Superagonist-Mediated Immunotoxicity: Role of NK Cells and IFN- $\gamma$ . *J Immunol*. 2015;195(5):2353-2364.
27. Finkelman FD, Madden KB, Morris SC, et al. Anti-cytokine antibodies as carrier proteins. Prolongation of in vivo effects of exogenous cytokines by injection of cytokine-anti-cytokine antibody complexes. *J Immunol*. 1993;151(3):1235-1244.
- \*28. Klein B, Brailly H. Cytokine-binding proteins: stimulating antagonists. *Immunol Today*. 1995;16(5):216-220.
29. Boyman O, Kovar M, Rubinstein MP, Surh CD, Sprent J. Selective Stimulation of T Cell Subsets with Antibody-Cytokine Immune Complexes. *Science*. 2006;311(4):1924-1927.
30. Jones AT, Ziltener HJ. Enhancement of the biologic effects of interleukin-3 in vivo by anti-interleukin-3 antibodies. *Blood*. 1993;82(4):1133-1141.
31. Sato TA, Widmer MB, Finkelman FD, et al. Recombinant soluble murine IL-4 receptor can inhibit or enhance IgE responses in vivo. *J Immunol*. 1993;150(7):2717-2723.
32. Zabeau L, Van der Heyden J, Broekaert D, et al. Neutralizing monoclonal antibodies can potentiate IL-5 signaling. *Eur J Immunol*. 2001;31(4):1087-1097.
33. May LT, Neta R, Moldawer LL, Kenney JS, Patel K, Sehgal PB. Antibodies Chaperone Circulating Il-6 - Paradoxical Effects of Anti-Il-6 Neutralizing Antibodies in-Vivo. *J Immunol*. 1993;151(6):3225-3236.

34. Boyman O, Ramsey C, Kim DM, Sprent J, Surh CD. IL-7/anti-IL-7 mAb complexes restore T cell development and induce homeostatic T Cell expansion without lymphopenia. *J Immunol.* 2008;180(11):7265-7275.
35. Rubinstein MP, Salem ML, Doedens AL, et al. G-CSF/anti-G-CSF antibody complexes drive the potent recovery and expansion of CD11b+Gr-1+ myeloid cells without compromising CD8+ T cell immune responses. *J Hematol Oncol.* 2013;6(1):75-86.
36. Rathjen DA, Furphy LJ, Aston R. Selective enhancement of the tumour necrotic activity of TNF-alpha , with monoclonal antibody. *Br J Cancer.* 1992;65(6):852-856.
37. Létourneau S, van Leeuwen EMM, Krieg C, et al. IL-2/anti-IL-2 antibody complexes show strong biological activity by avoiding interaction with IL-2 receptor alpha subunit CD25. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(5):2171-2176.
38. Martin CE, van Leeuwen EMM, Im SJ, Roopenian DC, Sung YC, Surh CD. IL-7/anti-IL-7 mAb complexes augment cytokine potency in mice through association with IgG-Fc and by competition with IL-7R. *Blood.* 2013;121(22):4484-4492.
39. 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;204(8):1803-1812.
40. Kamimura D, Sawa Y, Sato M, Agung E, Hirano T, Murakami M. IL-2 In Vivo Activities and Antitumor Efficacy Enhanced by an Anti-IL-2 mAb. *J Immunol.* 2006;177(1):306-314.
41. Verdeil G, Marquardt K, Surh CD, Sherman L a. Adjuvants targeting innate and adaptive immunity synergize to enhance tumor immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(43):16683-16688.
42. Han K-H, Kim KW, Yan J-J, et al. Effects of stimulating interleukin -2/anti- interleukin -2 antibody complexes on renal cell carcinoma. *BMC Urol.* 2016;16(1):225-268.
43. Krieg C, Létourneau S, Pantaleo G, Boyman O. Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;109(26):11906-11911.
44. Hamilton SE, Schenkel JM, Akue AD, Jameson SC. IL-2 Complex Treatment Can Protect Naive Mice from Bacterial and Viral Infection. *J Immunol.* 2010;185(11):6584-6590.
45. Rajasagi NK, Rouse BT. IL-2 complex treatment amplifies CD8+ T cell mediated immunity following herpes simplex virus-1 infection. *Microbes Infect.* 2016;18(12):735-746.
46. Roediger B, Kyle R, Yip KH, et al. Cutaneous immuno-surveillance and regulation of inflammation by group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol.* 2013;14(6):564-573.
47. Van Gool F, Molofsky AB, Morar MM, et al. Interleukin-5 - Producing group 2 innate lymphoid cells control eosinophilia induced by interleukin-2 therapy. *Blood.* 2014;124(24):3572-3576.
48. Webster KE, Walters S, Kohler RE, 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;206(4):751-760.
49. Zeng Z, Yu K, Chen L, Li W, Xiao H, Huang Z. Interleukin-2 / Anti-Interleukin-2 Immune Complex Attenuates Cardiac Remodeling after Myocardial Infarction through Expansion of Regulatory T Cells. *J Immunol Res.* 2016;110(2):150-163.
50. Dinh TN, Kyaw TS, Kanellakis P, et al. Cytokine therapy with interleukin-2/anti-interleukin-2 monoclonal antibody complexes expands CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells and attenuates development and progression of atherosclerosis. *Circulation.* 2012;126(10):1256-1266.

51. Liu R, Zhou Q, La Cava A, Campagnolo DI, Van Kaer L, Shi FD. Expansion of regulatory T cells via IL-2/anti-IL-2 mAb complexes suppresses experimental myasthenia. *Eur J Immunol*. 2010;40(6):1577-1589.
52. Villalta SA, Rosenthal W, Martinez L, et al. Regulatory T cells suppress muscle inflammation and injury in muscular dystrophy. *Sci Transl Med*. 2014;6(258):338-348.
53. Levin AM, Bates DL, Ring AM, et al. Exploiting a natural conformational switch to engineer an interleukin-2 superkine. *Nature*. 2012;484(7395):529-533.
- \*54. Jamur MC, Oliver C. Origin, maturation and recruitment of mast cell precursors. *Front Biosci*. 2011;15(10):1390-1406.
55. Jung T, Wagner K, Neumann C, Heusser CH. Enhancement of human IL-4 activity by soluble IL-4 receptors in vitro. *Eur J Immunol*. 1999;29(3):864-871.
56. Shulgin B, Helmlinger G, Kosinsky Y. A generic mechanism for enhanced cytokine signaling via cytokine-neutralizing antibodies. *PLoS One*. 2016;11(2):111-115.
- \*57. Tarantini F, Baiardini I, Passalacqua G, Braido F, Canonica GW. Asthma treatment: "Magic bullets which seek their own targets." *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2007;62(6):605-610.
58. Mihara M, Koishihara Y, Fukui H, Yasukawa K, Ohsugi Y. Murine anti-human IL-6 monoclonal antibody prolongs the half-life in circulating blood and thus prolongs the bioactivity of human IL-6 in mice. *Immunology*. 1991;74(1):55-59.
- \*59. Fry TJ, Mackall CL. Interleukin-7: From bench to clinic. *Blood*. 2002;99(11):3892-3904.
60. von Freeden-Jeffrey U, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SE, Murray R. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med*. 1995;181(4):1519-1526.
61. Rosenberg SA, Sportes C, Ahmadzadeh M, Fry TJ, Ngo LT, Schwartz SL. IL-7 Administration to Humans Leads to Expansion of CD8+ and CD4+ Cells but a Relative Decrease of CD4+ T-Regulatory Cells. *J Immunother*. 2006;29(3):313-319.
62. Gao J, Zhao L, Wan YY, Zhu B. Mechanism of action of IL-7 and its potential applications and limitations in cancer immunotherapy. *Int J Mol Sci*. 2015;16(5):10267-10280.
63. Valenzona HO, Dhanoa S, Finkelman FD, Osmond DG. Exogenous interleukin 7 as a proliferative stimulant of early precursor B cells in mouse bone marrow: efficacy of IL-7 injection, IL-7 infusion and IL-7-anti-IL-7 antibody complexes. *Cytokine*. 1998;10(6):404-412.
64. Nair S, Fang M, Sigal LJ. The natural killer cell dysfunction of aged mice is due to the bone marrow stroma and is not restored by IL-15/IL-15Ralpha treatment. *Aging Cell*. 2015;14(2):180-190.
65. Mortier E, Quémener A, Vusio P, et al. Soluble interleukin-15 receptor alpha (IL-15R alpha)-sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15R beta/gamma: Hyperagonist IL-15:IL-15R alpha fusion proteins. *J Biol Chem*. 2006;281(3):1612-1619.
66. Vincent M, Bessard A, Cochonneau D, et al. Tumor targeting of the IL-15 superagonist RLI by an anti-GD2 antibody strongly enhances its antitumor potency. *Int J Cancer*. 2013;133(3):757-765.
67. Zhu X, Marcus WD, Xu W, et al. Novel Human Interleukin-15 Agonists. *J Immunol*. 2009;183(4):3598-3607.
68. Han K, Zhu X, Liu B, et al. IL-15:IL-15 receptor alpha superagonist complex: High-level co-expression in recombinant mammalian cells, purification and characterization. *Cytokine*.

2011;56(3):804-810.

69. Kim PS, Kwilas AR, Xu W, et al. IL-15 superagonist/IL-15RaSushi-Fc fusion complex (IL-15SA/ IL-15RaSu-Fc; ALT-803) markedly enhances specific sub-populations of NK and memory CD8 + T cells, and mediates potent anti-tumor activity against murine breast and colon carcinomas. *Oncotarget*. 2016;7(13):16130-16145.
70. Xu W, Jones M, Liu B, et al. Efficacy and Mechanism-of-Action of a Novel Superagonist Interleukin-15: Interleukin-15 Receptor  $\alpha$ /Fc Fusion Complex in Syngeneic Murine Models of Multiple Myeloma. *Cancer Res*. 2013;73(10):3075-3086.
71. Mathios D, Park C-K, Marcus WD, et al. Therapeutic administration of IL-15 superagonist complex ALT-803 leads to long-term survival and durable antitumor immune response in a murine glioblastoma model. *Int J Cancer*. 2016;138(1):187-194.
72. Gomes-Giacoia E, Miyake M, Goodison S, et al. Intravesical ALT-803 and BCG treatment reduces tumor burden in a carcinogen induced bladder cancer rat model; a role for cytokine production and NK cell expansion. *PLOS ONE*. 2014;9(6):101-111.
73. Felices M, Chu S, Kodal B, et al. IL-15 super-agonist (ALT-803) enhances natural killer (NK) cell function against ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2017;210(1):115-124.