Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Doktorský studijní program: Imunologie





Mgr. Naďa Podzimková (Hradilová)

Imunoterapie nemalobuněčného karcinomu plic založená na vakcíně na bázi dendritických buněk pulsovaných imunogenními nádorovými buňkami

Non-small cell lung cancer immunotherapy based on dendritic cell vaccine pulsed with tumor cells killed by immunogenic cell death

Disertační práce

Školitel: Mgr. Irena Adkins Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Liberci, 29. 3. 2021

Naďa Podzimková

Podpis:

Identifikační záznam:

PODZIMKOVÁ, Naďa. *Imunoterapie nemalobuněčného karcinomu plic založená na vakcíně na bázi dendritických buněk pulsovaných imunogenními nádorovými buňkami [Non-small cell lung cancer immunotherapy based on dendritic cell vaccine pulsed with tumor cells killed by immunogenic cell death].* Praha, 2021. 135 stran, 4 přílohy. Disertační práce (PhD.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav imunologie. Vedoucí závěrečné práce: Adkins, Irena

Poděkování

Děkuji velmi své školitelce Mgr. Ireně Adkins Ph.D. za odborné vedení a podporu během celého doktorského studia, za cenné rady a podněty při plánování a realizaci experimentů, za kritické hodnocení vědecké práce a pomoc při psaní manuskriptů i experimentální práci. Děkuji také všem kolegům a kamarádům z výzkumného a preklinického oddělení biotechnologické společnosti Sotio a.s za přátelské a podnětné prostředí. Zejména bych chtěla poděkovat Kláře Dáňové za inspirativní vědecké a zejména cytometrické diskuse, které nás vždy posunuly dále a za skvělou atmosféru. Dále děkuji prof. MUDr. Radkovi Špíškovi, Ph.D. že mi dal jedinečnou příležitost práci v Sotiu a.s vypracovat a také za cenné rady a připomínky.

Speciální poděkování patří celé mé rodině a zejména mému manželovi Michalu Podzimkovi za neomezenou podporu, motivaci a nezištnou pomoc, vždy když to bylo potřeba.

ABSTRAKT

Karcinom plic patří mezi jedno z nejčastějších nádorových onemocnění na světě, které navíc dlouhodobě vykazuje velmi špatnou prognózou a vysokou mortalitou. Imunoterapie založená na využití vlastního imunitního systému pacienta v boji proti nádorovým onemocněním zažívá v současnosti v onkologii velký rozvoj a s tím i vakcíny na bázi dendritických buněk (DC). DC vakcíny pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic jsou však stále omezeně testovány v klinické vývoji navzdory pokrokům v technikách přípravy těchto vakcín. V této práci jsme se zaměřili na vývoj a charakterizaci DC vakcíny, kde k pulzaci nádorových antigenů byly použity nádorové linie ošetřené vysokým hydrostatickým tlakem (HHP) a cytotoxickou hypertermií (cHT). Obě fyzikální modality indukovaly imunogenní buněčnou smrt nádorových buněk, jejíž molekulární mechanismy jsme podrobně studovali. Nádorové buňky ošetřené cHT navodily částečnou profylaktickou imunitu v myším nádorovém modelu. DC vakcína pulsovaná nádorovými buňkami ošetřenými HHP nebo cHT vykazovala zralý fenotyp, zvýšenou produkci protizánětlivých cytokinů, chemotaktickou migraci a schopnost antigenní prezentace. DC vakcínu je možné vyrobit v mediu bez přídavku séra v GMP režimu pomoci standardizovaných metod. Stanovili jsme optimální hodnotu HHP a cHT ošetření, která zabíjí všechny nádorové buňky, indukuje maximální imunogenní vlastnosti, a zajišťuje dostatečné množství antigenů v nádorových buňkách pro antigenní prezentaci. Takto připravené dendritické buňky prezentují specifické antigeny pocházející z nádorových linií $CD8^+$ a $CD4^+$ T buňkám. V naší práci jsme dále zjistili, že antigenní profil nádorových linií, které byly použité pro výrobu DC vakcíny se překrývá s antigenní profilem primárních nádorů obou subtypů nemalobuněčného karcinomu. Specifické $CD8^+$ a $CD4^+$ T lymfocyty proti 12 nádorově specifickým antigenům obsažených v námi zvolených liniích byly detekovány v krvi pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic, což ukazuje, že DC vakcína by mohla být účinná v navození protinádorové imunity v tomto onemocnění. Význam této práce spočívá hlavně v ustanovení optimálních podmínek pro výrobu léčebného přípravku DCVAC/LuCa na bázi dendritických buněk pulsovaných nádorovými liniemi ošetřenými HHP. DCVAC/LuCa byl testován ve fázi I klinických zkoušek pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic (NCT02470468). Výsledky této klinické studie ukázaly signifikantní zlepšení celkového přežití a přežití bez progrese u pacientů stádia IV nemalobuněčného karcinomu plic léčených DCVAC/LuCa v kombinaci s chemoterapií ve srovnání se skupinou pacientů léčených pouze chemoterapií. Tyto výsledky potvrzují, že imunoterapie

pomocí vakcíny na bázi dendritických buněk je bezpečná a vhodná v kombinaci s chemoterapií pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic.

Klíčová slova: nemalobuněčný karcinom plic, imunogenní buněčná smrt, vysoký hydrostatický tlak, hypertermie, nádorově specifické antigeny, dendritické buňky, T lymfocyty, imunoterapie

ABSTRACT

Lung carcinoma represents the leading cause of cancer mortality worldwide with dismal prognosis. Immunotherapy exploiting the patient's own immune system is booming along with dendritic cell (DC)-based immunotherapy in recent years. The use of DC-based vaccines for treatment of non-small cell lung cancer is, however, still limited with limited clinical efficacy despite the development of various techniques for the vaccine preparation. In this study, we focused on the development and characterization of DC-based vaccine pulsed with multi-antigenic tumor cells killed with high hydrostatic pressure (HHP) and cytotoxic hyperthermia (cHT). Both physical modalities induced immunogenic cell death which leads to DC activation and more efficient onset of antitumor immunity. The molecular apoptotic pathways activated upon HHP and cHT treatment in tumor cells were analyzed and the optimal conditions to achieve high mortality, high immunogenicity and low antigen degradation were identified. We also showed that the prophylactic vaccination of mice with cHT-treated tumor cells significantly delayed tumor growth and prolonged mice survival. DC pulsed with HHP or cHT-treated tumor cells exhibited phenotypic maturation, increased chemotactic migration, higher production of proinflammatory cytokines and increased capacity to present antigens to $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells. We specifically showed that the antigenic profile of cell lines used for the DC vaccine generation overlaps with that of the primary tumors of both subtypes of non-small cell lung cancer, adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. We also detected antigen specific $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells in the blood of non-small cell lung cancer patients which suggest that DC vaccine might be effective in inducing antitumor immunity. Overall, we showed that DC-based vaccine with pulsed with tumor cells treated with HHP or cHT can be generated in serum-free media under standardized conditions thereby fulfilling the GMP criteria for the vaccine manufacture. More importantly, our work set base for the selection of optimal conditions for DC vaccine preparation to generate DCVAC/LuCa active cell/based therapy used for treatment of non-small cell lung patients during the Phase I clinical trial (NCT02470468). The clinical trial results showed a significant benefit in overall survival and progression free survival of stage IV non-small cell lung patients treated with DCVAC/LuCa and chemotherapy in comparison to the chemotherapy treatment group only. Moreover, the combination of DCVAC/LuCa and chemotherapy was well tolerated thus representing a new treatment option for non-small cell lung cancer patients eligible to chemotherapy.

Keywords: non-small cell lung cancer, immunogenic cell death, high hydrostatic pressure, hyperthermia, tumor-specific antigens, dendritic cells, T lymphocytes, immunotherapy

OBSAH

1 ÚVOD 15

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED 17

2.1 Karcinom plic 17

2.1.1 Typy maligních plicních nádorů 17

2.1.2 Epidemiologie a etiologie plicních karcinomů 18

2.2 Léčba nemalobuněčného karcinomu plic 21

2.2.1 Chemoterapie karcinomu plic 22

2.2.2 Cílená terapie nemalobuněčného karcinomu plic 24

2.3 Imunoterapie 27

2.3.1 Imunoterapie karcinomu plic 28

2.3.1.1 Monoklonální protilátky proti PD-1, PD-L1 a CTLA-4 28

2.3.1.2 Imunoterapie pomocí buněčných či rekombinantních vakcín 30

2.3.1.3 Imunoterapeutické vakcíny pro léčbu NSCL 32

2.4 Imunoterapie pomocí vakcín na bázi dendritických buněk 33

2.4.1 Dendritické buňky 34

2.4.2 Příprava dendritických buněk pro výrobu vakcíny 39

2.4.3 Pulzace dendritických buněk nádorovými antigeny 41

2.5 Vakcíny na bázi dendritických buněk v léčbě plicních nádorů 42

2.6 Randomizovaná, otevřená klinické studie fáze I/II založená na autologní imunoterapii pomocí vakcíny na bázi dendritických buněk (DCVAC/LuCa) v kombinaci s karboplatinou/ paklitaxelem u pacientů v pokročilém stádiu nemalobuněčného karcinomu plic 45

2.7 Imunogenní buněčná smrt a její role v protinádorové terapii 46

2.7.1 Znaky a mechanismus imunogenní buněčné smrti 47

2.7.2 Indukce imunogenní buněčné smrti 50

2.7.3 Cytotoxická hypertermie 53

2.7.4 Vysoký hydrostatický tlak 54

3 CÍLE PRÁCE 59

4 SEZNAM POUŽITÝCH METOD 61

5 PUBLIKACE 62

6 VÝSLEDKY A DISKUZE 63

6.1 Příloha 1: Využití vysokého hydrostatického tlaku pro výrobu vakcíny na bázi dendritických buněk pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic 63

6.2 Příloha 2: Vysoký hydrostatický tlak ovlivňuje množství antigenů v nádorových buňkách: význam pro imunoterapii pomocí dendritických buněk. 84

6.3 Příloha 3: Cytotoxická hypertermie indukuje imunogenní smrt nádorových buněk 94

6.4 Příloha 4: Detekce nádorových antigenů a specifických T lymfocytů u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic: korelace T buněčné odpovědi se subtypem nemalobuněčného karcinomu plic 110

7 SOUHRN 120

8 SUMMARY 121

9 ZÁVĚR 122

10 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY 123

SEZNAM ZKRATEK

AC	Adenocarcinoma (adenokarcinom)
AE	Adverse event (nežádoucí účinky)
AKT	Thymomas of AKR mice-protein kinase B
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
ANNEX1	Annexin 1
ATP	Adenosine trifosfát
BAGE	B melanoma antigen
BAK	Bcl-2 homologous antagonist killer
BAP31	B-cell receptor-associated protein 31
BAX	Bcl-2-associated X protein
Bcl	B-cell lymphoma 2
BRAF	Serine/Threonine Kinase B-raf
CALR	Calreticulin (kalretikulin)
CCL	C–C motif chemokine ligand
CD	Cluster of differentiation
cDC	Classical Dendritic Cells (klasické dendritické buňky)
CEA	Carcinoembryonic antigen
cHT	Cytotoxic hyperthermia (cytotoxická hypertermie)
CKI	Cyclin-dependent kinase inhibitor
CLIP	class II-associated invariant chain peptide
CpG	Cytosine - phosphate - Guanine
CRT	Calreticulin
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
CTLs	Cytotoxic T lymphocytes (cytotoxické T lymfocyty)
CXCL1	C-X-C motif chemokine ligand 1
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DC	Dendritic cell (dendrtická buňka)
DDR2	Discoidin domain-containing receptor 2
DNA	Deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
ds RNA	Double stranded Ribonucleic acid (dvouvláknová RNA)
EGFR	Epidermal growth factor receptor

eIF2a	Eucaryotic initiation factor 2
EMA	European medicinal agency (Evropská agentura pro léčivé přípravky)
ER	Endoplasmic reticulum (endoplasmatické retikulum)
FDA	Food and drug agency (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1
FPR1	Formyl peptide receptor 1
GAGE	G antigen
GMP	Good manufacturing practise (správná výrobní praxe)
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HHP	High hydrostatic pressure (vysoký hydrostatický tlak)
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	Human leukocyte antigen
HPV	Human papilloma virus
HSP70, HSP90	Heat shock protein 70, 90
HT	Hyperthermia
hTERT	Human telomerase reverse transcriptase
Hyp-PDT	Hypericin-mediated photodynamic therapy
ICD	Immunogenic cell death (imunogenní buněčná smrt)
ICI	Immune checkpoint inhibitors
IFN	Interferon
IL	Interleukin
JAK	Janus kinase
KRAS	Kirsten rat sarcoma gene
KRT7	Keratin 7
LAMP1	Lysosomal-associated membrane protein 1
LC	Large cell carcinoma (velkobuněčný karcinom)
LPS	Lipopolysacharide
LuCa	Lung Cancer (rakovina plic)
MAGE-A	Melanoma-associated antigen A
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
Mb	Mega base (mega báze)
MET	MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase
Měs.	měsíc

MHC	Major histocompatibility complex (hlavní histokompatibilní komplex)
moDC	Monocyte-Derived Dendritic Cells (monocytické dendritické buňky)
MP1	Matrix protein 1
mRNA	Messenger Ribonucleic acid (Ribonukleová kyselina)
MUC1	Mucinous glycoprotein-1
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
NK	Natural killers (přirození zabíječi, NK buňky)
NLR	NOD-like receptor
NLRP3	NLR family, pyrin domain containing 3
NSCLC	Non-small cell lung cancer
NY-ESO-1	New York esophageal squamous cell carcinoma 1
Obr.	Obrázek
ORR	Overall response rate (celková četnost odpovědí – částečná nebo kompletní)
OS	Overal survival (celkové přežití)
P2RX7	Purinergic Receptor P2X7
P2RY2	Purinergic Receptor P2Y2
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PANX1	Pannexin 1
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell (periferní krevní mononukleární buňky)
PD	Progressive disease (progrese (zhoršení) nemoci)
PD-1	Programmed death 1
pDC	Plasmacytoic dendritic cells (plasmacytoidní dendritické buňky)
PD-L1, PD-L2	Programmed death ligand 1, 2
PERK	Protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase
PFS	Progression-free survival (přežití bez progrese)
PI3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
Poly(I:C)	Polyinosinic:polycytidylic acid
PRAME	Preferentially Expressed Antigen In Melanoma

PRR	Pattern recognition receptor
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RAGE	Receptor for advanced glycation endproduct
RET	Rearranged during transfection
ROCK1	Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1
ROS	Reactive oxygen species (Reaktivní formy kyslíku)
RPI3K	Phosphatidyl inositol 3 kinase
RR	Response rate (četnost odpovědí)
SCC	Squamous cell carcinoma (skvamózní karcinom)
SCLC	Small cell lung carcinoma (malobuněčný plicní karcinom)
SNAP	Synaptosomal-associated protein
SNARE	SNAP receptor
SoC	Standard of care (standardní léčba)
SOX-2	SRY (sex determining region Y)-box 2
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STEAP1	Six-transmembrane epithelial antigen of prostate 1
TAA	Tumor-associated antigens (antigeny asociované s nádory)
Tab.	Tabulka
TCR	T cell receptor (T buněčný receptor)
TIM-3	T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3
TKI	Tyrosine kinase inhibitor
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
Tregs	T regulatory cells (regulační T buňky)
TSA	Tumor specific antigens (nádorově specifické antigeny)
TTF1	Thyreoid transcription factor 1
Tzn.	To znamená
Tzv.	Takzvaný, takzvaně
UPR	Unfolded protein response
UV	Ultraviolet (ultrafialové záření)
VAMP1	Vesicle-associated membrane protein 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor

Wt	Wild type
WT-1	Wilms’ tumor gene 1

1 ÚVOD

Nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC) se svými hlavními subtypy adenokarcinomem (AC; 50 %) a skvamózním karcinomem (SCC; 40 %) se řadí mezi jedno z nejčastějších nádorových onemocnění na světě. Dlouhodobě vykazuje velmi špatnou prognózou a vysokou mortalitou. Možnosti léčby se odvíjí od stádia nemoci, histologickém subtypu a stavu pacienta. Kromě chemoterapie a cílené terapie je nyní stále více zařazována imunoterapeutická léčba. Imunoterapie využívá k potlačení nádorového bujení vlastního imunitního systému pacienta a je indikována hlavně v pokročilých stádiích onemocnění. Imunoterapie založená na vakcínách na bázi dendritických buněk (DC) představuje jednu z možností buněčných terapií. DC reprezentují nejefektivnější buněčný subtyp schopný aktivace naivních T lymfocytů a stimulace protinádorové odpovědi. První DC vakcína Sipuleucel-T (PROVENGE) byla schválena FDA v roce 2010 pro léčbu pacientů s metastatickým kastračně-rezistentním karcinomem prostaty. DC vakcíny pro léčbu NSCLC se nyní nachází ve fázích klinického testování, avšak s limitovaným klinickým účinkem. Vzhledem k tomu, že současné možnosti imunoterapie jsou nedostačující, je zde stále potřeba vývoje a optimalizace nových postupů pro zdokonalení DC vakcín pro léčbu NSCLC. Jednou z možností je zvýšení imunogenních vlastností dendritických buněk. Toho je možné dosáhnout pomocí fagocytózy (tzv. pulzace) zabitých nádorových buněk, které vykazují specifické imunogenní charakteristiky vznikající při procesu imunogenní buněčné smrti. Imunogenní buněčná smrt vede k vystavení a produkci specifických buněčných molekul, které jsou rozpoznávány imunitním systémem a fungují jako alarminy. To vede aktivaci imunitního systému a indukci protinádorové odpovědi, která dokáže být účinnější než aktivace pomocí standartních chemoterapeutik či dalších látek, které imunogenní buněčnou smrt neindukují. Bylo ukázáno, že jen některá chemoterapeutika či fyzikální modality, jakými jsou vysoký hydrostatický tlak (HHP) a fotodynamická terapie, a dále některé onkolytické viry jsou schopné spustit imunogenní buněčnou smrt nádorových buněk. V této práci jsme nově identifikovali cytotoxickou hypertermii (cHT) jako další spouštěč imunogenní buněčné smrti.

V první části této disertační práce je popsán současný stav léčby karcinomu plic se zaměřením na NSCLC. Dále je charakterizován aktuální vývoj a účinnost DC vakcín obecně a specificky v léčbě NSCLC. Hlavním zaměřením teoretické části disertační práce je výroba vakcíny na bázi dendritických buněk spolu s mechanismem imunogenní buněčné smrti nádorových buněk, která významně přispívá k navození efektivní protinádorové imunity. Detailně jsou popsány HHP a cHT jako induktory imunogenní buněčné smrti. Druhou část

disertační práce tvoří prezentace výsledků čtyř hlavních prací publikovaných v mezinárodních časopisech s impakt faktorem. Výsledky jsou diskutovány v širším kontextu imunoterapie založené na dendritických buňkách a imunoterapie NSCLC. Hlavní výsledky randomizované, otevřené klinické studie fáze I/II založené na autologní imunoterapii pomocí vakcíny na bázi dendritických buněk (DCVAC/LuCa) v kombinaci s karboplatinou/paklitaxelem u pacientů v pokročilém stádiu nemalobuněčného karcinomu plic, pro kterou byla tato disertace preklinickým základem, jsou detailně popsány v kapitole 2.6 literárního přehledu.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Karcinom plic

2.1.1 Typy maligních plicních nádorů

Jako karcinom plic je označována velmi nesourodá skupina zhoubných nádorů, které vyrůstají v oblasti průdušnice, ve velkých průduškách, průdušinkách, plicních sklípcích a v plicní tkání. Plicní nádor obsahuje maligní buňky v různém stupni vývoje a může být tvořen i rozdílnými typy nádorové tkáně. Primární plicní nádory jsou odvozeny od epiteliální tkáně, jedná se tedy o karcinom, někdy označován jako bronchogenní nebo bronchiální karcinom (Skřičková et al 2009, Sutherland & Berns 2010, Zhou et al 2019). Z histopatologického hlediska se bronchogenní karcinom dělí na dvě základní skupiny: malobuněčný karcinom (angl. small cell lung cancer – SCLC), který je přestavuje 15-25 % plicních tumorů a nemalobuněčný karcinom (angl. non-small cell lung cancer – NSCLC), který tvoří 75-85 %. Výjimečně se může vyvinout i kombinace SCLC s jiným histologických typem, takový typ se označuje jako kombinovaný. Rozlišení na tyto dva typy je velmi důležité vzhledem k rozdílné biologické povaze, léčbě a prognóze (Lortet-Tieulent et al 2014, Weaver & Coonar 2017). Malobuněčný karcinom (SCLC) se vyvíjí z buněk vykazující neuroendokrinní charakter a je asociován s kouřením. Vyznačuje se vysokou agresivitou, rychlejším růstem a časnou tvorbou metastáz, zejména do kostí, jater a centrální nervové soustavy. Z důvodu rychlého růstu jsou možnosti chirurgické léčby často omezené. Tento typ nádoru reaguje z počátku na léčbu chemoterapií případně radioterapií. Dochází však často recidivě nádoru. Navzdory mnoha klinickým studiím se nepodařilo pokročit na poli imunoterapie a cílené terapie k významnějším výsledkům. Pro tento typ karcinomu je tedy stále jedinou možností léčby chemoterapie a radioterapie (Franklin 2000, Tsoukalas et al 2018).

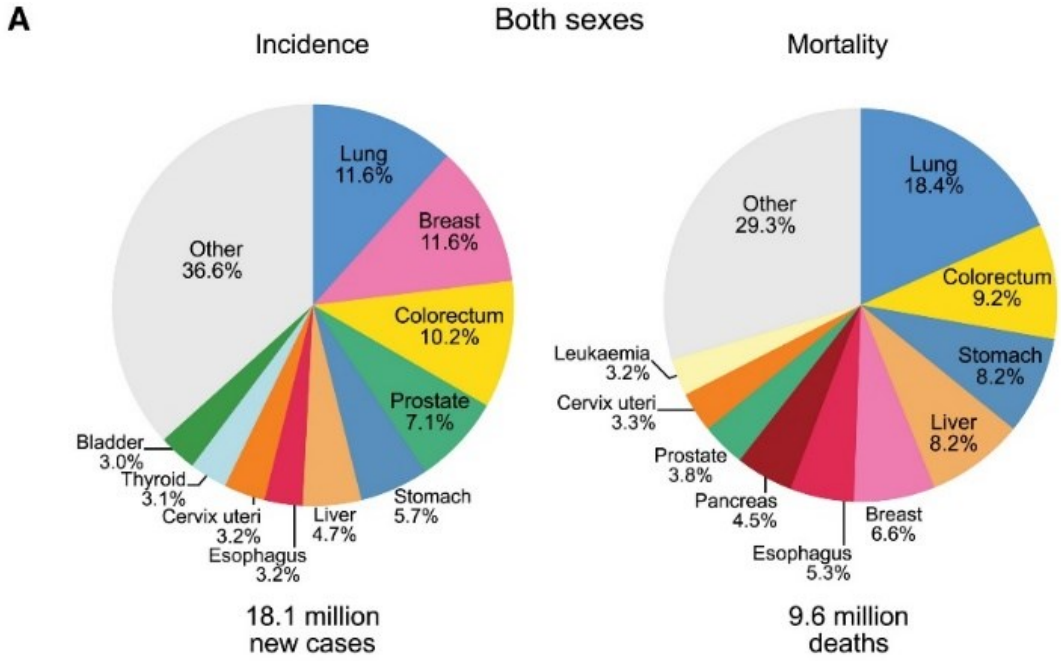
Častějším, a tudíž intenzivněji studovaným typem plicního nádoru je nemalobuněčný karcinom – NSCLC. Jedná se o poměrně heterogenní skupinu plicních nádorů s odlišnou histologií, genetickým pozadím, a tedy i léčbou. Na rozdíl od SCLC tento typ roste obvykle pomaleji a později metastazuje. Po dlouhou dobu se však neobjevují příznaky a nemocný tak často vyhledá lékaře až v pokročilém stadiu nemoci, kdy už je omezená možnost chirurgické resekce (Molina et al 2008). NSCLC se dle histologie dělí na následujících podtypy: adenokarcinom (AC), skvamózní karcinom (SCC) nazývaný také epidermoidní, spinocelulární, skvamocelulární nebo dlaždicobuněčný a třetím nejběžnějším typem je velkobuněčný karcinom (LC). Méně časté jsou adenoskvamozní, sarcomatoidní karcinomy

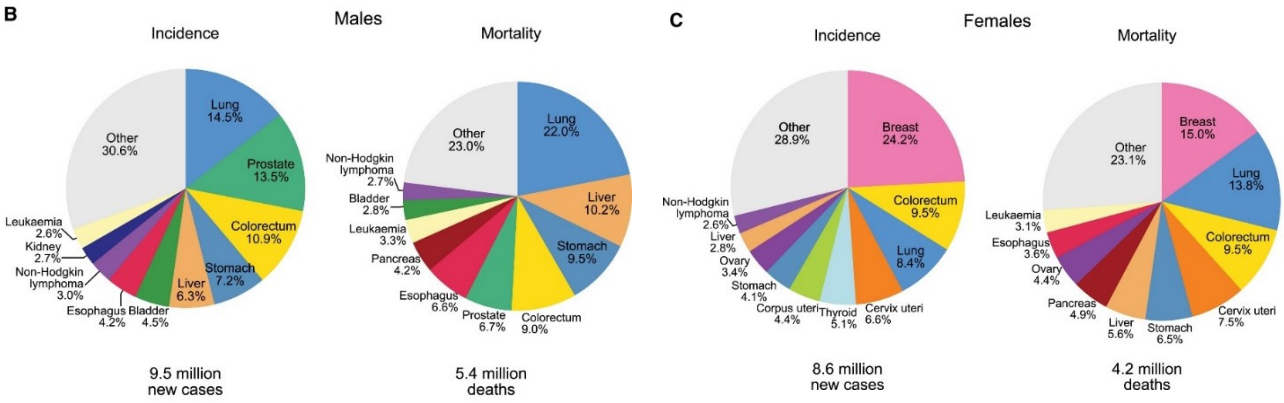
a karcinomy slinných žláz (linkos , Petersen & Warth 2016, Travis et al 2015). AC tvoří přibližně 40 % všech případů rakoviny plic, v rámci NSCLC je to pak 50 %. Druhým nejčastějším typem je SCC, který tvoří 30 % všech případů a 40 % NSCLC. Velkobuněčný typ tvoří přibližně 10 % všech plicních nádorů. Zbylé subtypy pak tvoří 3 % nádorů plic (Dela Cruz et al 2011, Chen et al 2014). Zajímavostí je, že v České republice je stále nejčastějším plicním nádorem SCC, i přesto že v posledních letech významně jeho stoupá incidence AC (Skřičková et al 2016). Obecně lze říci, že AC se vyvíjí v okrajové plicní tkáni ze žlázového epitelu. Exprimuje markery typické právě pro okrajové části plic jako transkripční faktor-1 štítné žlázy (TTF1), keratin 7 (KRT7) a napsin-A. Zatímco SCC se je odvozen od epitelu v horních cestách dýchacích a průdušnici a exprimuje zejména cytokeratin 5/6. Dále se SCC identifikuje dle exprese SRY-Box transkripčního faktoru 2 (SOX-2), p63 a p40 (Chen et al 2014, Inamura 2018). Jak už název napovídá, velkobuněčný karcinom je charakterizován morfologicky velkými buňkami, které nevykazují znaky ani AC ani SCC a nemají ani neuroendokrinní charakter. Až s rutinním využíváním imunohistochemie se daří stále více původně velkobuněčného nádorů řadit specificky dle markérů do jiných podskupin (zejména AC), proto také klesá výskyt velkobuněčného karcinomu. Stále více se ukazuje, že mezi uvedenými podtypy NSCLC jsou významné odlišnosti. Z přesnějšího zařazení nádorů díky zdokonalení imunohistochemického značení spolu s novými daty o molekulárním pozadí plicních karcinomů těží zejména pacienti, kteří tak mohou podstoupit cílenou léčbu dle konkrétního podtypu nádoru (Petersen & Warth 2016, Travis et al 2015).

2.1.2 Epidemiologie a etiologie plicních karcinomů

V roce 2018 byla opět po 6 letech publikována rozsáhlá celosvětová studie GLOBOCAN mapující úmrtnost a incidenci jednotlivých typů maligních onemocnění. Tato studie dokládá, že karcinom plic je stále nejčastější nádorové onemocnění na světe. V roce 2018 bylo nově diagnostikováno přes 2 miliony případů karcinomu plic a průdušek z celkových 18,1 milionů případů, což je 11,6 % všech diagnostikovaných zhoubných nádorových onemocnění. Navíc karcinom plic je nejsmrtelnější nádorové onemocnění, které je velmi špatně léčitelné a má i přes pokroky v medicíně velmi špatnou prognózu. Ze všech úmrtí na nádorová onemocnění tvořil v roce 2018 plicní karcinomu 18,4 %, což je přibližně 1,75 milionů úmrtí. Nejvyšší incidence byla u mužů zaznamenána v Mikronésii/Polynésii (52,2 případů na 100 000), dále ve východní Evropě, kam spadá i Česká republika (téměř 50 případů na 100 000), z čehož úplně nejvyšší počet případů a to 77 na 100 000 obyvatel bylo

registrováno v Maďarsku. Dále se pak na vrcholu drží severní Asie (47,1), severní a jižní Evropa (43) a severní Amerika (39,1). V incidenci u žen opět vede Maďarsko se 41 případy na 100 000 obyvatel, při čemž průměr východní Evropy je 11,9. Dále pak severní Amerika, severní Evropa, Mikronésie/Polynésie a Austrálie/Nový Zéland s 20-30 případy na 100 000 obyvatel. Nejméně případů bylo identifikováno v Africe, ale zde stejně jako v další méně rozvinutých zemích incidence neustále roste. Naopak v rozvinutých státech byl od roku 2012 zaznamenán pokles ve výskytu plicních nádorů. Celosvětově pak od roku 2012 vrostl výskyt plicních tumorů o 1 % (Bray et al 2018, Torre et al 2015). Pětileté přežívání dosahuje celosvětově pouze okolo 15 % (Cheng et al 2016). Ve Spojených státech amerických bylo pětileté přežívání pro rakovinu plic v letech 2006-2012 pouze 18 %, což je ve velký rozdíl oproti 91 % u rakoviny prsu a 99 % u rakoviny prostaty. Tato čísla jsou nízká zejména protože více než polovina případů karcinomu plic je diagnostikována v pokročilém stadiu, u nichž je pětileté přežití pouze 4 % (Siegel et al 2018). Ve Spojených státech amerických, kde jsou statistické údaje týkající se nádorových onemocněních aktualizovány každý rok, se karcinom plic řadí opakovaně na druhé místo nádorových onemocnění u žen i u mužů a tvoří čtvrtinu všech případů úmrtí způsobených maligními onemocněními (Siegel et al 2016, Siegel et al 2017, Siegel et al 2018).





Obr. 1 Procenta nově diagnostikovaných případů nejčastějších typů nádorových onemocnění pro obě pohlaví v roce 2018. Nádory plic se v počtu nově diagnostikovaných případů drží na prvním pro obě pohlaví i pouze u mužů (A, B) a na druhém za nádory prsu u žen (C). karcinom plic a průdušek je na prvním místě v úmrtnosti na nádorová onemocnění u obou pohlaví a u mužů a na druhém místě za nádory prsu u žen (Bray et al 2018).

Hlavním rizikovým faktorem pro vznik NSCLC je kouření. Z retrospektivní analýzy provedené v Kanadě a v Evropě na 13 169 pacientech a 16 010 kontrolách, vyplývá, že z mužů, kteří onemocní jakýmkoliv karcinomem plic, je 97,8 % kuřáků a ženy kuřačky tvoří 75,8 %. Nejvíce je s kouřením asociovaný SCC karcinom, a to zejména u mužů (Pesch et al 2012). Cigaretový kouř obsahuje přibližně 3500 složek, z nich většina jsou karcinogeny, jako například: polycyklické aromatické uhlovodíky, azaareny, N-nitrosaminy, aromatické aminy, nikl, arzén, kadmium nebo polonim-210 (Akhtar & Bansal 2017). U silných kuřáků, kteří kouří krabičku cigaret denně, se možnost vzniku rakoviny zvýší ve 40 letech 11x a v 70 letech je riziko rakoviny až 27,8x vyšší než u nekuřáků. Riziko vzniku plicního karcinomu se zvyšuje s věkem a množstvím vykouřených cigaret (Peto 2012). Dle výzkumu provedeného v Evropě bylo spočítáno, že v průměru 24,4 % těžkých kuřáků mužů a 18,5 % žen onemocní rakovinou plic (Brennan et al 2006). Asociace s kouřením byla potvrzena opakovaně několika korelačními studiemi, kdy zvyšující se počet kuřáku v 70-90. letech 20. století přesně odpovídá zvýšené incidenci NSCLC a karcinomu plic obecně (Dela Cruz et al 2011, Molina et al 2008). Naopak po roce 2000 dochází k postupnému snížení incidence karcinomu plic v USA v důsledku poklesu kouření díky varování a osvětě. Dalším jasným důkazem vlivu kouření je například americká statistika, která ukazuje že, ve státě Kentucky, kde je nejvyšší počet kuřáku je výskyt karcinomu plic 3,5x vyšší než ve státě Utah, kde je počet kuřáku nejnižší (Siegel et al 2017).

Jak už bylo popsáno, nekuřáci muži tvoří pouze 2,1 % případů karcinomu plic, zatímco ženy 24,2 %. Adenokarcinom je nejčastějším typem u žen nekuřaček, u kterých tvoří 70 % nádorů (Pesch et al 2012). Nyní, se snižujícím počtem kuřáků, dochází také ke snižování

výskytu SCC. To je přičítáno i změně složení cigaret, které obsahují méně dehtu a filtr (Wynder & Hoffmann 1994). Naopak roste výskyt AC, a to i u nekuřáků, zejména u žen. Tyto případy jsou často přičítány kombinaci genetických faktorů – časté mutace v receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR), virovým infekcím – zejména HPV 16/18 a HIV, jiným onemocněním plic, vystavení vlivu radonu, azbestu a znečištění vzduchu. U žen je také studován vliv hormonů a to zejména estrogenu, kdy bylo prokázáno, že estrogenové receptory jsou více exprimovány v plicních nádorech a nadbytek estrogenu vede k růstu plicních nádorových linií (Akhtar & Bansal 2017). Dále se stále studuje vliv pasivního kouření, kdy meta-analýza 19 studií ukázala zvýšení výskytu rakoviny plic o 20 % u žen, které byly vystaveny pasivnímu kouření (Vineis et al 2004). Další analýzy vlivu pasivního kouření potvrdily vždy zvýšené riziko vzniku plicního karcinomu, avšak ne tak významné jako v předchozí studii (Rivera & Wakelee 2016). Bylo však prokázáno, že u manželů, kteří žijí ve společné domácnosti z nich jeden z nich je kuřák, tak druhý má o 25-29 % větší riziko karcinomu plic (Boffetta 2002, Taylor et al 2001). Z těchto studií vyplývá, že kouření je nevýznamnějším faktorem přispívajícím ke vzniku a nárůstu karcinomu plic, a to i kouření pasivní.

2.2 Léčba nemalobuněčného karcinomu plic

Léčba NSCLC se vždy odvíjí dle stádia a subtypů. Nejúčinnější léčbou stále zůstává chirurgická resekce. Ta je však možná pouze u stadií I-IIIA. Po resekci nádoru ve stadiu I je pětileté přežívání pacientů 60-70 % a s pokročilejším stadiem se prognóza zhoršuje. Chirurgická resekce je však možná pouze u 25 % pacientů. Dále se rozvíjí také metoda odstranění nádoru pomocí vysokých dávek cílené stereotaktické radioterapie. Poslední poznatky ukazují, že tato metoda má u raných stadií výsledky srovnatelné s chirurgickou léčbou (Bendzsak et al 2011, Hishida et al 2014, Tandberg et al 2018). V pokročilých stadiích nemoci již resekce ani vysoké dávky radioterapie nejsou možné. Z hlediska nasazení co nejefektivnější léčby je důležité nejen správné histologické rozdělí, ale pro cílenou léčbu i molekulární diagnostika mutací a v neposední řadě i testování exprese ligandů tzv. kontrolních bodů imunity (angl. immune checkpoints – ICIs) pro přesné zvolení imunoterapeutického léčiva. Podle těchto kritérií se léčba upravuje mnohem více na míru pacientům, s menšími nežádoucími účinky a větší úspěšností (Pirker 2017). Z důvodu pozdní diagnózy, vyššího věku pacientů i komplikovanosti chirurgických zákroků většina pacientů s karcinomem plic podstupuje systémovou léčbu. Systémová léčba má velký význam pro léčbu pacientů s pokročilého stadiem III a v případě metastazujících nádorů

(stadium IV), což jsou přibližně dvě třetiny diagnostikovaných případů. Dále se využívá i jako podpůrná léčba při chirurgickém zákroku a radioterapii, kde pomáhá snížit riziko recidivy tumoru. Pojem systémová léčba zahrnuje jak chemoterapii, tak cílenou terapii i imunoterapii (Lemjabbar-Alaoui et al 2015, Wakelee et al 2014).

2.2.1 Chemoterapie karcinomu plic

Chemoterapeutická léčba, která následuje po chirurgické resekci tumoru, se nazývá adjuvantní chemoterapie. Jejím účelem je zejména eradikace mikro metastáz a je podávána pacientům ve stadiu II-III, výjimečně ve stadiu IB (Pirker 2017). Adjuvantní chemoterapie byla zařazena do standartní péče o pacienty s pokročilým NSCLC po roce 1995, kdy byla publikována meta-analýza 11 dostupných klinických studií porovnávající podpůrnou péči a cisplatinovou terapii. Benefit cisplatinové terapie byl prokázán zvýšením 5letého přežíváním přibližně o 5 % (Group 1995). Nasazení cisplatinové chemoterapie případně v kombinaci s vinorelbinem po resekci karcinomu zvyšuje dle novějších klinických studií pětileté přežívání pacientů o 4-15 % (Arriagada et al 2004, Arriagada et al 2010, Douillard et al 2006, Winton et al 2005). Dále byla provedena meta analýza dat 4584 pacientů a následně i 8447 pacientů, kteří podstoupili adjuvantní léčbu cisplatinovou chemoterapií. Obě tyto studie potvrdili benefit u pětiletého přežívání o 4-5 %. Největší přínos z adjuvantní terapie měli pacienti ve stadiu II-III naopak u pacientů operovaných ve stadiu IA nevykazuje adjuvantní chemoterapie žádné zlepšení prognózy. Tato adjuvantní léčba však sebou kromě zlepšení prognózy nese i zvýšenou toxicitu (vedlejší účinky) (Group et al 2010, Pignon et al 2008). Na základě těchto výsledků byla adjuvantní chemoterapie zařazena jako standardní léčba pro pacienty po kompletní resekci NSCLC ve stadiu II-III (Pirker 2017).

V případě potřeby zmenšit nádor před operací, zejména u stadia IIIA, je někdy používána tzv. neoadjuvantní chemoterapie. Tento způsob léčby může mít positiva – odstranění celého tumoru, eradikaci mikro metastáz, ale zároveň je zde riziko rezistence na následující léčbu a závažné vedlejší účinky. Nemnohé klinické studie doposud nepotvrdily významný přínos této léčby. Ovšem meta analýza dat poukázala na signifikantní zlepšení pětiletého přežívání o 5% (Goldstraw et al 2011).

Kromě pacientů, kteří podstupují resekci nádoru, je chemoterapie indikována zejména pro léčbu pokročilých stadií IIIB-IV. Jedná se o tzv. paliativní chemoterapii, která nevede k vyléčení, ale zmírňuje obtíže a prodlužuje přežití. Od devadesátých let jsou intensivně testovány kombinace platinových derivátů s dalšími cytostatiky. Neukázalo se, že by některá kombinace měla zásadně lepší účinnost. U všech kombinací bylo dosaženo přibližně stejné

celkové doby přežití (OS – overall survival) 8-10 měsíců a jednoletého přežívání 35 % (**Tab. 1**). Tato léčba je podávána bez rozlišní histologického subtypu (Kelly et al 2001, Schiller et al 2002, Wakelee et al 2014). Novějším cytostatikem je pemetrexed, který se ukázal být účinnější u AC (Scagliotti et al 2008). Při indikaci ostatních chemoterapeutik záleží na stavu pacienta, věku a funkčnosti orgánů. Dle toho je volen terapeutický přístup. Systémová léčba NSCLC je standardně rozdělena do tří linií. Pokud v první linii dojde k progresi onemocnění nebo léčba není tolerována, přistoupí se ke druhé linii léčby a případně ke třetí. K chemoterapeutické léčbě se v první linii přistupuje u pacientů, kteří nejsou indikováni k léčbě pomocí cílené terapie nebo imunoterapie. V první linii léčby se používá kombinace platinového derivátu s cytostatikem III. generace (paklitaxel, docetaxel, gemcitabin, vinorelbin). Případně se nyní využívá stále častěji kombinace chemoterapie, cílené léčby případně imunoterapie (Lemjabbar-Alaoui et al 2015, Waxman 2008). Během posledních let se nepodařilo žádnou kombinací konvenčních cytostatik dosáhnout významného zlepšení prognózy pro pacienty v pokročilém stadiu NSCLC. Výzkum se tedy více zaměřil na molekulární pozadí a signální dráhy a posunul se více k personalizované medicíně.

Studie	N	Typ léčby	RR (%)	OS (měs.)	Přežití 1 rok (%)	2 roky (%)
Kelly/SWOG (2001)	408	Cisplatin/Vinorelbine	28	8	36	16
		Carboplatin/paclitaxel	25	8	38	15
Schiller/ECOG (2002)		Cisplatin/paclitaxel	21	7.8	31	10
		Cisplatin/gemcitabine	22	8.1	36	13
		Cisplatin/docetaxel	17	7.4	31	11
		Carboplatin/paclitaxel	17	8.1	34	11
Gridelli (2003)	501	Gemcitabine/vinorelbine	25	7.4	31	
		Cisplatin/vinorelbine or gemcitabine	30	8.8	37	
Kosmidis (2002)	509	Carboplatin/paclitaxel	28	10.4		
		Gemcitabine/paclitaxel	35	9.8		
Scagliotti (2008)	1,669	Cisplatin/gemcitabine		10.3	41.9	14
		Cisplatin/pemetrexed		10.3	43.5	18.9
Ciuleanu (2009)	663	Platinum therapy × 4 → pemetrexed	N/A	13.4		
		Platinum-based therapy × 4		10.6		

Tab. 1 Vybrané studie hodnotící léčbu chemoterapií v první linii u pokročilého NSCLC. Kombinací chemoterapeutik bylo dosaženo nejdelšího celkového přežití (OS) při použití léčby platinovou chemoterapií a následně premetrexedem a to 13,4 měsíců. Ve studiích, kde bylo hodnoceno 2leté přežívání bylo dosaženo nejlepšího přežití u 18,9 % pacientů při léčbě cisplatinou v kombinaci s premetrexedem. Průměrně bylo celkové přežití 9,2 měsíců a žádná kombinace výrazně toto číslo nepřevyšuje. Převzato a upraveno z (Wakelee et al 2014).

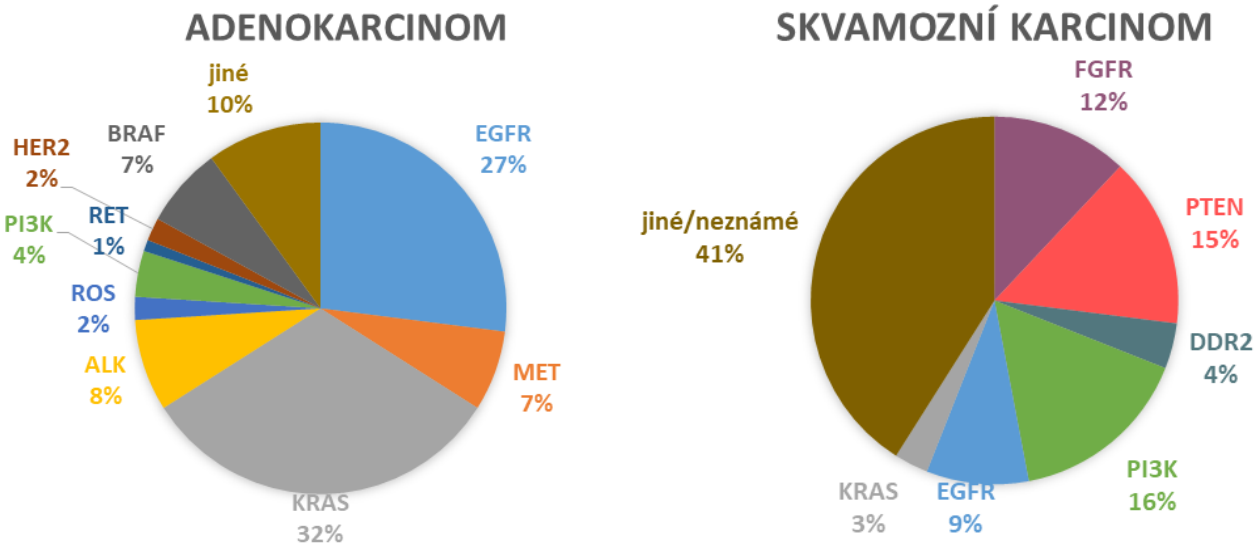
2.2.2 Cílená terapie nemalobuněčného karcinomu plic

Díky rozvoji metod molekulární biologie došlo od začátku 20. století k hlubšímu poznání mechanismů kancerogeneze a odhalení signálních drah, které mají vliv na buněčný cyklus, proliferaci, přežívání buněk a apoptózu. Díky těmto poznatkům mohly být identifkovány nové cíle v léčbě nádorových onemocnění. Léčba, která je zacílena na konkrétní molekulu, ať už je to receptor, kináza nebo ligand se nazývá cílená léčba (angl. targeted therapy), někdy označována jako biologická léčba. Výhodou této léčby je bezesporu nižší toxicita a jak se ukazuje i vyšší účinnost. Zatímco u chemoterapie je indikace kromě pemetrexedu nezávislá na histologickém subtypu u cílené terapie je díky výskytu odlišných mutací značný rozdíl mezi léčbou SCC a AC (Lee 2017, Skřičková et al 2011).

Mezi cílenou léčbu můžeme zařadit inhibitory angiogeneze. Angiogeneze je zásadní pro růst a výživu nádorů. Nádor nad velikost 1-2 cm nedokáže růst bez tvorby nových vlastních cév. Zásadní roli při tomto procesu hraje vaskulární růstový endoteliální faktor (VEGF). Prvním lékem z této oblasti schváleným pro NSCLC, je inhibitor angiogeneze bevacizumab. Monoklonální protilátka bevacizumab se váže na solubilní VEGF a tím znemožní vazbu na jeho receptor (VEGFR). Nedochází tak přenosu signálu pro tvorbu nových cév a také k částečnému zániku cév stávajících. Díky tomu není nádor vyživován a dojde k jeho zmenšení (Ferrara 2002). V klinické studii ECOG E4599 byla prokázána účinnost bevacizumabu v kombinaci s chemoterapií proti samostatné chemoterapii. Celkové přežívání bylo prodlouženo z 10 na 12,3 měsíců a u AC dokonce na 14,3, navíc s menšími vedlejšími účinky (Sandler et al 2006, Sandler et al 2010). Díky těmto positivním výsledkům byl bevacizumab v roce 2006 schválen FDA pro léčbu AC typu NSCLC v první linii v kombinaci s chemoterapií (Cohen et al 2007). Pro druhou linii léčby v kombinaci s docetaxelem byla v roce 2014 schválena monoklonální protilátka ramucirumab. Ramucirumab se váže s vysokou afinitou k extracelulární vazebné doméně receptoru typu 2 pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGFR-2). Znemožní tak vazbu nejenom ligandu VEGFR, ale i případně jiných ligandů, které by mohli spustit signální kaskádu vedoucí k angiogenezi. Léčba ramucirumabem v kombinaci s docetaxelem tak představuje další možnost pro druhou linii léčby NSCLC, a to i skvamózního typu (Garon et al 2012).

Objevení specifických genetických mutaci, které vedou ke karcinogenezi, otevřelo nový prostor k vývoji nových léčiv cílených právě na konkrétní onkogenní mutace a genetické aberace. Tyto poznatky vedou k přesnějšímu dělení nemalobuněčného karcinomu nejenom dle histologického subtypu, ale i dle molekulárního pozadí. U AC byly do této chvíle objevené mutace v genech EGFR, KRAS, HER2, MET, PI3K, BRAF a přeskupení

genů pro ALK, ROS1 a RET (**Obr. 2**). U skvamózního karcinomu je nejčastější mutace v genu pro PI3K, amplifikace genu pro FGFR1 a mutace nebo delece genu PTEN, dále EGFR a DDR2 mutace (Kumarakulasinghe et al 2015).



Obr. 2 Nejčastější mutace NSCLC. Mutace v nádorech NSCL se liší dle subtypu karcinomu plic. U AC jsou nejčastější mutace v genu pro KRAS a EGFR, které tvoří většinu mutací. U SCC jsou nejčastější mutace v genech pro PI3K, PTEN a FGFR. Zdroj: (Cancer Genome Atlas Research 2012, Cancer Genome Atlas Research 2014, Kumarakulasinghe et al 2015)

Aktivační mutace v genu pro receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR) je přítomna přibližně u 27 % AC, ale pouze u méně než 9 % SCC a proti této molekule nejčastěji aplikována cílená léčba (Cancer Genome Atlas Research 2012, Cancer Genome Atlas Research 2014) . EGRF je transmembránový receptor s kinázovou aktivitou. Mutace v tyrosin kinázové doméně vedou k nadměrné proliferaci, angiogenezi a invazivitě nádorových buněk (Wheeler et al 2010). Prvním schváleným cíleným lékem pro NSCLC byl v roce 2003 gefitinib a následně v roce 2007 erlotinib, které reverzibilně inhibují fosforylaci tyrosin-kinázové domény EGFR (Brown & Shepherd 2005, Fukuoka et al 2003, Kris et al 2003, Rosell et al 2012, Thatcher et al 2005). Tyto léky tzv. první generace však byly schválené pro léčbu pokročilých nádorů bez předchozího vyšetření molekulárního pozadí. V dalších studiích se však ukázalo, že léčba nemá dostačenou účinnost u neselektovaný pacientů, proto bylo v USA použití těchto léčiv pozastaveno. Následně se však bylo prokázáno, že vykazují účinnost u pacientů s mutací v EGFR. Na základě dalších klinických studií, FDA v roce 2014 a 2015 opět schválila použití těchto léků v první linii léčby pro pacienty, jejichž tumor nese deleci v exonu 19 nebo mutaci v exonu 21 (L858R) (Kazandjian et al 2016a, Khozin et al 2014). Tento případ jen dokazuje zásadní vliv selekce pacientů pro úspěšnost léčby. Zároveň byly vyvíjeny léky druhé generace afatinib a dacomitinib, což jsou

nereverzibilní inhibitory nejen EGFR receptoru, ale i další receptorů v této rodiny, a to Her2 a Her4. Tyto léky se v některých parametrech zadají být účinnější než inhibitory první generace. Afatinib byl v roce 2013 schválen jako další možnost léčby první linie pro pacienty s NSCLC s delecí v exonu 19 nebo mutací v exonu 21 (L858R) (Dungo & Keating 2013, Park et al 2016, Popat et al 2014, Ramalingam et al 2012). Zásadním problémem léčby cílené na EGFR zůstávají rezistence, které se vyvinou přibližně po 8-13 měsících léčby. U více 50 % než pacientů je za rezistenci zodpovědná sekundární mutace T790M v exonu 20 (Camidge et al 2014). V tomto případě je možná léčba osimertinibem, což je EGFR inhibitor třetí generace, který cílí právě na tuto mutaci a byl v roce 2015 schválen pro léčbu ve druhé linii při vzniku rezistence na první linii léčby EGFR TKI (Greig 2016). Mnoho dalších léčiv cílených na EGFR je ve fázi klinických zkoušek a testování. Vzhledem k častým resistencím na léčbu, heterogenitě mutací, které vznikají i během léčby je stále mnoho možností cílené terapie i kombinací s dalšími terapeutickými přístupy (Diaz-Serrano et al 2018, Lee 2017).

Dalším cílem terapie je aktivní fúzní protein ALK-EML4, který se nachází přibližně u 8 % AC (Cancer Genome Atlas Research 2012). Tento fúzní protein podporuje tumorgenezi skrze aktivaci PI3K-AKT, MAPK, JAK/STAT dráhy. V roce 2011 byl schválen lék crizotinib, což je kompetitivní ATP inhibitor pro kinázy ALK, MET, ROS1 (Kazandjian et al 2014). Ovšem i na tento lék vzniká po čase rezistence a pacienti často podstupují druhou linii léčby léky z další generace jako je ceritinib a alectinib (Kumarakulasinghe et al 2015).

Cílená terapie je oproti chemoterapii šetrný způsob léčby. Je i nadále intenzivně studována a s prohlubujícími znalostmi o pozadí NSCLC jsou stále vyvíjena nová terapeutika. V rámci této práce nelze popsat všechny probíhají studie a nová léčiva. Avšak i na tomto malém výčtu nejčastěji používaných preparátů je zřejmé že, ač cílená terapie přináší zlepšení v léčbě pokročilých NSCLC, je zde stále mnoho úskalí a překážek, které se nedaří překonat. Jedná se zejména o nově vzniklé mutace a rezistence, které se téměř vždy po nějaké době objeví. Dále je cílená terapie mnohem dostupnější pro léčbu AC. Léčba SCC pomocí cílené terapie je spíše minoritní. I přes intenzivní výzkum a mnoho probíhajících studií zatím nebyly schválené žádné léky pro časté mutace jako je např. KRAS, PTEN, MET či BRAF (Halliday et al 2019). Souběžně s cílenou léčbou se rozvíjel výzkum na poli imunoterapie. Díky novým přístupům – cílené léčbě a imunoterapii se podařilo prolomit terapeutické plato přežívání 8 měsíců a zvýšit přežívání u pacientů s neoperabilním NSCLC. Imunoterapie je pro pacienty, kteří nemohou být léčení cílenou terapií, jedinou šetrnější a často účinnější možností léčby.

2.3 Imunoterapie

První hypotézu o roli dohledu imunního sytému na nádorové bujení vyjádřili už v šedesátých letech minulého století Macfarlane Burnet a Lewis Thomas (Burnet 1970, Burnet 1957, Thomas 1959, Thomas 1982). Od té doby byla úloha imunitního systému v karcinogenezi intenzivně studována. Role imunitního systému byla díky používání imunodeficientních myší nedostatečně pochopena, až později bylo experimentálně prokázáno, že imunitní systém se významně účastní boje proti vzniku nádoru (Engel et al 1996, Engel et al 1997). Tyto poznatky vedli k postulátu teorie imunoeditace tří E: v angl. jazyce Elimination, Equilibrium, Escape – eliminace, rovnováha, únik. Dle této teorie dokáže zpočátku tumorogeneze imunitní systém kontrolovat vývoj nádoru a nádorové buňky eliminovat. Následně může nastat rovnovážný stav, kdy imunitní systém buňky stále kontroluje a „drží na uzdě“, ale již nedochází k jejich kompletní eliminaci. Časem však může dojít k úniku nádorových buněk z dohledu imunitního systému a později i k masivnímu rozvoji nádorového bujení a tvorbě metastáz (Dunn et al 2002). Imunitní systém rozeznává nádory díky expresi proteinů/antigenů, které jsou odlišné od proteinů normálních buněk. Proteiny mohou být odlišné díky mutacím DNA, které dají vzniknout nenormálnímu proteinu. Tyto nově mutované proteiny neboli neoantigeny by měl imunitní systém rozeznat a vyhodnotit jako nebezpečné a mělo by tak dojít k likvidaci buněk nesoucí mutovaný protein (Vesely & Schreiber 2013). Avšak imunitní systém může být nádorovým mikroprostředím inhibován. Vlivem nádorových buněk dochází k nárůstu inhibičních receptorů na T lymfocytech i na nádorových buňkách, dále k sekreci inhibičních cytokinů, což vede k útlumu imunitní odpovědi a potencuje to další rozvoj nádorového bujení (Khong & Restifo 2002). Potenciál imunitního systému eliminovat nádorové buňky se snaží využít právě imunoterapie. Imunoterapie se nejčastěji uplatňuje u nádorů s častými somatickými mutacemi, které imunitní systém rozeznává jako cizorodé. Po melanomu se tedy nemalobuněčný karcinom plic jeví jako ideální cíl pro imunoterapii (McGranahan et al 2016, Rizvi et al 2015). Imunoterapie se snaží překonat bariéru, kterou nádor inhibuje imunitní systém a znovu aktivovat imunitní buňky, aby byly schopné identifikovat a zabít nádorové buňky. Největšího pokroku v této oblasti bylo dosaženo ve výzkumu tzv inhibitorů kontrolních bodů imunity (angl. immune checkpoints inhibitors – ICIs), které dokáží odblokovat T lymfocytární odpověď. Další možností je také podpořit imunitní systém pomocí vakcíny, která obsahuje nádorové antigeny, upravené nádorové buňky nebo aktivované T lymfocyty případně dendritické buňky (Malhotra et al 2017).

2.3.1 Imunoterapie karcinomu plic

2.3.1.1 Monoklonální protilátky proti PD-1, PD-L1 a CTLA-4

Díky tomu, že nádorové buňky NSCLC nesou velké množství somatických mutací, které dávají vznik neoantigenům, je tato indikace vhodná pro imunoterapeutickou léčbu. Cytotoxické $CD8^+$ T lymfocyty jsou schopné nádorové buňky nesoucí neoantigen na MHC I molekulách eliminovat (Chalmers et al 2017, Schumacher & Schreiber 2015). U nádorů pacientů s NSCLC však bylo ukázáno, že cytotoxické $CD8^+$ T lymfocyty mají potlačenou cytotoxickou aktivitu a produkci cytokinů. Tato dysfunkce koreluje se zvýšenou expresí povrchové molekuly PD-1, patřící mezi tzv. kontrolní body imunitního systému, jehož zvýšená exprese na T lymfocytech a navázání na ligandy PD-L1 a PD-L2 vede k potlačení imunitní odpovědi. Ligandy PD-L1 a v menší míře PD-L2 jsou exprimovány zejména nádorovými buňkami, ale i na imunitních buňkách (Zhang et al 2010). Je tedy zřejmé, že použití inhibitorů kontrolních bodů imunity je schopno disfunkci imunitního systému odstranit a pomoci nádor eliminovat (**Obr. 3**).

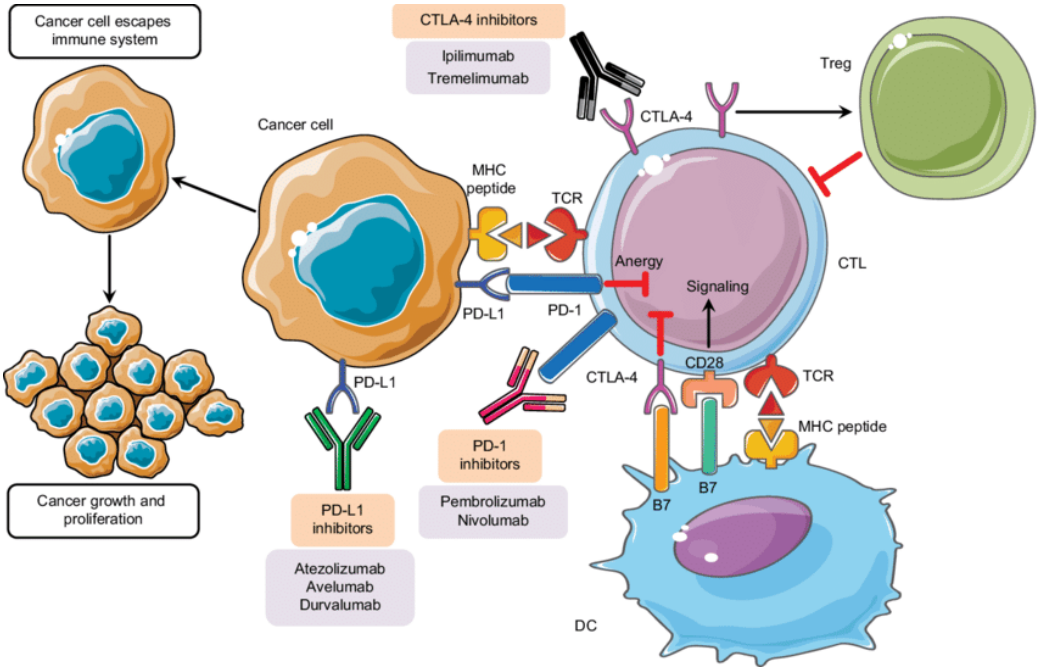
Prvním takovým PD-1 inhibitorem, který byl testován a schválen pro klinické použití je nivolumab, plně humanizovaná monoklonální protilátka. Klinická studie fáze III testující nivolumab (Opdivo) proti klasické léčbě docetaxelem ukázaly, že u obou hlavních subtypů NSCLC vede léčba nivolumabem k prodloužení mediánu přežití u adenokarcinomu i skvamózního karcinomu o 3 měsíce oproti docetaxelu, a navíc bylo evidováno mnohem méně závažných vedlejších účinků (Borghaei et al 2015, Brahmer et al 2015). Nivolumab se podává bez nutnosti testovat expresi ligandu PD-L1 v nádorech, a to i přes to, že se u obou subtypů se ukázalo, že pacienti s detekovanou expresí PD-L1 vykazují lepší odpověď na léčbu. Nivolumab byl na základě těchto výsledků v roce 2015 schválen FDA a v roce 2016 i Evropskou komisí EMA pro použití jako lék druhé linie u pacientů s metastatickým NSCLC, kteří absolvovali neúspěšnou léčbu platinovými deriváty (EMA , Kazandjian et al 2016b). V následné studii, kdy byli pacienti sledováni po tři roky, se ukázalo, že nivolumab má i při dlouhodobém užívání lepší výsledky než docetaxel. Tříleté přežívání pacientů bylo ve skupině léčené nivolumabem 17 % proti 8 % léčených docetaxelem. 4x lepší přežívání bylo zaznamenáno i v případě, že měli pacienti jaterní metastázy (Vokes et al 2018).

Dalším schváleným lékem v této oblasti je pembrolizumab (Keytruda), který je stejně jako nivolumab monoklonální protilátka proti PD-1. Na rozdíl od nivolumabu byl pembrolizumab schválen i pro první linii léčby metastazujícího NSCLC, pokud více než 50 % nádorových buněk vykazuje expresi PD-L1 a nádor je bez mutace EGFR receptoru nebo ALK kinázy. V druhé linii léčby se pembrolizumab může podávat u nádorů, které vykazují

progresi po léčbě chemoterapií s expresí PD-L1 vyšší než 1 %. Následně byl pembrolizumab schválen také v kombinací s chemoterapií (karboplatina, pemetrexed) pro pogradující AC s expresí PD-L1 vyšší než 1 %. Ve všech studiích byl prokázán prodloužení přežití o několik měsíců, v případě pacientů, kteří měli expresi PD-L1 více než 50 % byl medián přežití dokonce více než dvojnásobný to 17,3 měsíce (Reck et al 2016, Sul et al 2016). Dalším možností pro mestastazují pacienty s progresí nemoci po chemoterapii je léčba atezolizumabem. Jedná se protilátku proti molekule PD-L1, která prokázala účinnost oproti léčbě docetaxelem zejména u AC (OS byl 15,6. vs. 11,2 měsíců). Přežívaní pacientů se zvyšovalo čím vyšší byla exprese PD-L1. Pokud byla exprese PD-L1 v nádorech vyšší než 50 % nebo na imunitních buňkách vyšší než 10 %, tak se průměrné přežití zvýšilo na 20,5 měsíce oproti 8,6 měsícům při léčbě docetaxelem (Rittmeyer et al 2017, Weinstock et al 2017).

Dalšími inhibitory kontrolních bodů imunity, které se intenzivně studují jsou inhibitory PD-L1 avelumab a durvalumab a inhibitory CTLA-4 ipilimumab a tremelimumab. Žádná z těchto inhibičních protilátek však neprokázala významnou účinnost u NSCLC (Malhotra et al 2017, Zhang et al 2019). V současné době probíhá mnoho studí zaměřující se na kombinaci více inhibitorů, nebo inhibitorů s chemoterapií, cílenou terapií, a případně i s buněčnými a rekombinantními vakcínami. Kombinace s cílenou terapií nepřinesla zatím uspokojivé výsledky, zejména z důvodu vyšší toxicity (Ahn et al 2017). Zajímavý výsledek však přinesla kombinace inhibitorů PD-1 a CTLA-4 (nivolumab + ipilimumab), kdy pro úspěch léčby nebyla zásadní vysoká exprese PD-L1, ale množství somatických nádorových mutací. Pokud nádory měly více než 10 mutací na Mb, tak tato kombinace vykazovala prodloužení přežití oproti chemoterapii. Při nízké hladině mutací léčba zlepšení nepřinesla (Hellmann et al 2018). Přínos mutací v léčbě inhibitory kontrolních bodů imunity byl prokázán i při monoterapii nivolumabem, pembrolizumabem a atezolizumabem (Carbone et al 2017, Gandara et al 2018, Rizvi et al 2015). Obecně lze říci, že pacienti s vyšší hladinou PD-L1 a/nebo s vyšším počtem somatických nádorových mutací profitují z imunoterapie založené na inhibici kontrolních bodů více. Je tedy další výzvou vyvinout imunoterapii, která by potencovala imunitní systém u pacientů, kteří tento výhodný profil nemají. A ačkoliv jsou výsledky tohoto typu léčby velmi positivní, odpovídá na ni však pouze 10-20 % neselektovaných pacientů. Navíc i přes občasné dlouhotrvající léčebné efekty většina pacientů po 1 až 2 letech si vyvine k léčbě rezistenci (Doroshow et al 2019, Herbst et al 2018). Jak již bylo zmíněno, další možností, jak aktivovat imunitní systém nebo prodloužit

účinnost inhibitorů je kombinační terapie s chemoterapií či použití rekombinantních antigenních nebo buněčných vakcín.



Obr. 3 Schéma působení inhibitorů kontrolních bodů imunity. Neschopnost aktivovat T lymfocyty v nádorovém mikroprostředí může být způsobena, kromě přítomnosti T regulačních lymfocytů, také expresí molekul na T lymfocytech inhibující imunitní odpověď. Mezi nejvíce exprimované molekuly patří PD-1 a CTLA-4. PD-1 se váže na ligand PD-L1, který je exprimován na nádorových buňkách a po této vazbě dochází k utlumení efektorových funkcí T lymfocytů. CTLA-4 se váže na molekulu B7 a tím znemožňuje vazbu molekuly B7 do aktivačního receptoru CD28. Vazba B7 na CTLA-4 potlačuje cytotoxickou aktivitu T lymfocytů. CTLA-4 také zvyšuje aktivitu T regulačních lymfocytů. Farmakologická inhibice kontrolních bodů imunitních pomocí monoklonálních protilátek obnovuje protinádorovou aktivitu cytotoxických T lymfocytů a uvolňuje imunosupresi (Ayoub et al 2019).

2.3.1.2 Imunoterapie pomocí buněčných či rekombinantních vakcín

Na rozdíl od relativně novější terapie pomoci blokujících protilátek proti kontrolním bodům imunity (PD-1, PD-L1 a CTLA-4), představují terapeutické vakcíny v maligních onemocněních „starou zbraň“, která je známá hlavně z boje proti infekčním onemocněním. Koncept vakcíny proti maligním onemocněním spočívá v prezentaci nádorově specifických antigenů či antigenů asociovaných s nádorem cytotoxickým T lymfocytům. V roce 1891, na základě pozorování spontánní regrese sarkomů v pacientech po prodělání infekčních onemocnění, lékař William Coley vyvinul tzv. Coleyův toxin, což byla směs usmrcených bakterií *Streptococcus pyogenes* a *Seratia marcescens* pro terapii sarkomů (McCarthy 2006). Klinické testování vakcín pro léčbu nemalobuněčného karcinomu v posledních 10 letech ukázalo, že jsou bezpečné a dobře snášené, nicméně terapeutický benefit na přežití pacientů

pozorovaný ve fázích II nebyl potvrzen ve fázích III klinického pozorování (Oliveres et al 2018). V současné době jsou schválené pouze dvě vakcíny pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic. CIMAvax schválený na Kubě, v Peru a Venezuele pro léčbu stadia IIIB-IV v progredujících pacientech po první linii chemoterapie (Rodriguez et al 2010, Saavedra & Crombet 2017). CIMAvax je vakcína obsahující chemický konjugát epidermálního růstového faktoru (EGF) a P64 proteinu z *Neisseria meningitis* a navíc obsahuje Montanid ISA 51 jako adjuvans. Druhou schválenou vakcínou avšak pouze v Argentině a na Kubě je Racotumumab, dříve známý jako IE10, používaný jako udržovací terapie po první linii pokročilých stádií onemocnění (Hernandez & Vazquez 2015). Racotumumab je anti-idiotypová myší IgG1 protilátka cílená proti NeuGcGM3 gangliosidu.

Vakcíny pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic využívají nádorové antigeny, které se vyskytují převážně či specificky v této nádorové indikaci. Obecně se nádorové antigeny dělí na 4 skupiny. 1) antigeny asociované s nádory (angl. tumor associated antigens – TAA) kam v případě nemalobuněčného karcinomu plic patří proteiny z rodiny gangliosidů (GM2, GD2, GD3, Fuc-GM1) nebo proteiny nesoucí jedinečnou mutaci normálních genů jakými jsou K-ras, EGFR nebo p53. 2) nádorově specifické antigeny (angl. tumor specific antigens – TSA), jejichž exprese je limitována na nádorovou tkáň jakými jsou např. NY-ESO-1, proteiny ze skupiny MAGE-A, GAGE, BAGE, PRAME apod. Tyto proteiny se také označují jako CT antigeny (angl. cancer testis antigens). 3) antigeny, které jsou exprimované jak ve zdravé tkáni, tak zároveň nadměrně exprimované v tkáni nádorové. Do této skupiny patří známé antigeny, jako jsou MUC1, WT-1, CEA, survivin nebo HER2 (Oliveres et al 2018). Exprese jednotlivých antigenů byla zkoumána a porovnávána mezi jednotlivými subtypy. Bylo ukázáno, že SCC exprimuje širší spektrum nádorových antigenů ve srovnání s AC subtypem nemalobuněčného karcinomu plic (Grunwald et al 2006, Gure et al 2005). 4. skupinou jsou neoantigeny, které vznikají de novo na základě náhodných mutací v nádorových buňkách pacienta. Bylo ukázáno, že rozdílná maligní onemocnění se vyznačují různým množstvím somatických mutací, a to koreluje s účinností imunoterapií (Lawrence et al 2013, Martincorena & Campbell 2015, Martincorena et al 2015). Vakcíny využívající neoantigeny pro indukci imunitní odpovědi jsou příkladem personalizované medicíny, na kterou se v posledních letech zaměřuje vědecké bádání.

Typy testovaných vakcín v různých fázích klinických zkoušek pro terapii nemalobuněčného karcinomu plic jsou ukázány v **Tabulce 2.**

Typ vakcíny	Popis	Testované vakcíny u NSCLC
Alogenní vakcína	Izolované nádorové buňky nádoru nebo buněčné linie jsou usmrceny a podány pacientovi pro navození cytotoxické imunitní odpovědi proti podobnému buněčnému typu NSCLC.	Belagenpumatucel-L, autologní/alogenní plicní buňky plus GM-CSF a line K562 exprimující CD40L
Peptidová nebo proteinová vakcína	Jeden nebo více nádorových antigenů v podobě peptidů nebo proteinů, nejsou připravovány specificky pro jednoho pacienta	CIMAvax EGF, MAGE-A3, Racotumomab, NYESO-1, L-BLP25 anti-MUC1, EP-2101, GV1001
Autologní vakcína z dendritických buněk	Vakcína je připravená specificky pro každého pacienta, imunitní buňky se izolují z pacientovy krve a kultivují se v přítomnosti nádorových buněk nebo antigenů. Nádorové antigeny jsou následně prezentovány na povrchu DC. Buňky jsou poté vpraveny do těla pacienta, kde navodí protinádorovou imunitní odpověď.	WT1 mRNA-loaded DCs, DCVax-L, AGS-003
DNA vakcína	Skládá se z expresního plazmidu nesoucího nádorový antigen	pVAX1-MAGEA3, pVAX1-MAGEA3-sPD1
Vakcína na bázi vektoru	Vektory (např. viry, bakterie, kvasinkové buňky apod.) lze použít ke vpravení nádorových antigenů do těla pacienta	TG4010; GI-4000, GI-6207

Tab. 2 Typy nádorových vakcín pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic. V imunoterapii NSCLC se využívají vakcíny na bázi autologních či alogenních nádorových buněk, peptidů či rekombinantních proteinů, které mohou být podány přímo nebo ve formě DNA či vektorů nebo vakcíny na bázi dendritických buněk. Převzato a upraveno z (Oliveres et al 2018).

2.3.1.3 Imunoterapeutické vakcíny pro léčbu NSCL

Vakcíny pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic jsou založené jednak na využití zabitých alogenních nádorových buněk z primárních nádorů pacientů nebo na využití alogenních nádorových linií. Tyto vakcíny jsou zdrojem širokého spektra nádorových antigenů, které jsou důležité pro stimulaci specifických $CD8^+$ T buněčných odpovědí. Belagenpumatucel-L je příklad alogenní buněčné vakcíny, která se skládá ze čtyř alogenních buněčných linií (H460, RH2, SKLU-1 a H520) pokrývající všechny tři subtypy nemalobuněčného karcinomu a nesoucí plazmid pro transgen TGF-β (Rijavec et al 2015). Belagenpumatucel-L byl testován ve III. fázi klinických zkoušek jako udržovací terapie u 532 pacientech ve stadiu III/IV, kteří progredovali po platinové chemoterapii v první linii. Studie publikovaná v roce 2015 nesplnila svá primární kritéria, nebyl pozorován vliv vakcíny na celkové přežití (angl. overall survival – OS) ve srovnáni s placebo skupinou (20.3 měsíců vs.17.8 měsíců placebo, HR 0.94, P=0.594). Žádný rozdíl nebyl také pozorován v době přežití bez progrese (angl. progression free survival – PFS). Nicméně signifikantní

benefit v přežívání pacientů byl pozorován při podání vakcíny 12 týdnů po chemoterapii a mezi pacienty, kteří byli léčení radioterapií (Giaccone et al 2015).

Dále byly testovány vakcíny využívající směsi antigenních peptidů či rekombinantních proteinů. Zde je antigenní specifita indukovaných $CD8^+$ T lymfocytů omezena daným peptidem či proteinem. Tyto antigeny mohou být dopraveny pro vakcinaci také za pomoci DNA nebo virových vektorů. Příkladem testování takové vakcíny je MAGRIT studie fáze III, ve které byl sledován terapeutický efekt MAGE-A3 vakcíny na 2 312 pacientech (Vansteenkiste et al 2016). Podobně BLP25 liposomální vakcína nesoucí MUC1 antigen (L-BLP25, Tecemotide) byla testována ve studiích fáze III START2 a INSPIRE (Oliveres et al 2018, Wu et al 2011). V žádné klinické studii nebylo dosaženo prodloužení celkové doby přežití. TG410 je vakcínou založenou na virovém vektoru z modifikovaného viru Ankara (MVA), která nese lidský gen pro MUC1 a IL-2 (Limacher & Quoix 2012). Ve fázi IIb/III studie TIME bylo testováno 222 pacientů stadia IV bez předchozí léčby cílené na EGFR mutaci a s potvrzenou expresí MUC1 minimálně na 50 % nádorových buněk. Délka přežití bez progrese byla 5,9 měsíců u pacientů s TG4010 vakcínou a chemoterapií ve srovnání s 5,1 měsíci ve skupině pacientů, kteří byli léčeni pouze chemoterapií (HR 0.74, P=0,019) (Quoix et al 2016). Navzdory výše uvedeným výsledkům, jsou Belagenpumatucel-L a TG4010 vakcíny v současné době testovány v kombinaci s PD-1 a PD-L1 inhibitory kontrolních bodů imunity (Oliveres et al 2018). Dalším typem vakcín pro nemalobuněčný karcinom plic jsou vakcíny na bázi dendritických buněk, které budou diskutovány samostatně v kapitole 2.5. Samostatnou skupinou buněčných terapií v léčbě NSCLC je využití adoptivní T buněčné imunoterapie jako jsou CAR-T buňky, tumor infiltrující lymfocyty (TILs) a TCR upravené T lymfocyty, které jsou momentálně ve časných fázích klinického testování (Oliveres et al 2018). Tyto terapie se ukázaly velmi účinné v léčbě hematologických malignancí, což vedlo i k jejich schválení FDA pro klinické použití. Tento druh terapie pro NSCLC je nicméně na počátku testování, podobně jako další buněčné terapie na bázi NK buněk a jiných imunitních buněk.

2.4 Imunoterapie pomocí vakcín na bázi dendritických buněk

DC vakcíny začaly být vyvíjeny v 90. letech minulého století. Po té co byl objeven v roce 1994 způsob přípravy DC z monocytů a $CD34^+$ progenitorů mohly být DC kultivovány ve velkém počtu a tím mohlo být zahájeno klinické testování (Sallusto & Lanzavecchia 1994). První klinická studie testující DC vakcínu byla spuštěna v rove 1996 a byla aplikována na pacienty s pokročilým karcinomem prsu, ovarií, tlustého střeva,

děložního čípku, plic a pankreatu (NCT00019084). Protokol pro výrobu DC se dále vyvíjel a testoval. A v roce 1998 byla publikována první studie s DC, které byly připravené dle dnes nejvíce používaného protokolu, kdy se DC generují z monocytů za přítomnosti GM-CSF a IL-4 cytokinů. DC z pacientů s maligním melanomem byly pulzovány mixem nádorově specifických antigenů nebo nádorovým lyzátem. Regrese nádoru byla pozorována u 5 z 16 pacientů včetně 2 kompletních regresí po dobu 15 měsíců (Nestle et al 1998). Následovaly desítky dalších klinických studií, nejvíce byly DC vakcíny testovány na pacientech s melanomem, dále s karcinomem prostaty, glioblastomem a renálním karcinomem (Anguille et al 2014). Mnoho klinických studií je prováděno na pacientech v pokročilém stádiu nemoci, což nemusí být pro funkci vakcíny optimální, jelikož imunitní systém může být progresí nemoci více utlumen. Přesto se klinická odpověď pohybuje mezi 7-15 % dle typu nádoru. První DC vakcína byla schválena FDA až v roce 2010. Jedná se o Sipuleucel-T (PROVENGE) firmy Dendreon. DC vakcína je připravená z autologních periferních mononukleárních buněk (PBMC) z krve pacienta. Ty jsou kultivovány 36-44 hodin s rekombinantním fúzním proteinem PA2024, který je složený z prostatické fosfatázy (PAP) a GM-CSF cytokinu, který je důležitý pro aktivaci antigen prezentujících buněk. Vakcína neobsahuje pouze DC, ale i příměs dalších imunitních buněk. V III. fázi klinické studie IMPACT byla potvrzena účinnost u 512 pacientů s metastatickým kastračně-rezistentním karcinomem prostaty. Ačkoliv nebyl zjištěn rozdíl v progresi onemocnění ani v hladině PSA, byl potvrzen statisticky významný rozdíl v přežití léčené skupiny o 4,1 měsíce (25,8 měsíců vs 21,7 měsíců) oproti placebu (Anassi & Ndefo 2011, Kantoff et al 2010). Po 3 letech bylo v léčené skupině o 50 % více živých pacientů než ve skupině kontrolní (31,7 % vs 21,7 %) (Cheever & Higano 2011).

2.4.1 Dendritické buňky

Dendritické buňky (DC) byly prvně popsány jako nový typ buněk v myších orgánech v roce 1973 Ralphem Steinmanem a Zahvilem Cohnem (Steinman & Cohn 1973). O pět let později byly DC uznány jako zásadní součástí mnoha imunitních reakcí (Steinman & Witmer 1978). Ačkoliv toto tvrzení nebylo dlouho dobu některými vědci akceptováno, objevení a popsání DC se stalo jednou ze zásadních událostí v oboru imunologie ve 20. století. Tento objev vedl následně k pochopení propojení a koordinace přirozené a adaptivní imunity. Téměř o 40 let později, v roce 2011, byl Dr. Steinman za objevení a výzkum DC oceněn Nobelovou cenou za fyziologii nebo medicínu (Sabado et al 2017). Nyní je již

dokázáno a všeobecně uznáno, že DC jsou nejúčinnější antigen prezentující buňky a hrají zásadní roli v aktivaci a regulaci imunitních odpovědí.

DC se vyvíjí stejně jako ostatní bílé krvinky z pluripotentního $CD34^+$ progenitoru v kostní dřeni. Z něj následně vzniká progenitor DC, ze kterého se vyvíjí několik typů DC, které jsou definované na základě povrchových markerů, transkripčních faktorů, produkce cytokinů, morfologie a funkce **(Tab. 3)** (Liu & Nussenzweig 2010). Největší podskupinou jsou tzv. konvenční DC (cDC), někdy označované jako myeloidní DC. cDC jsou antigen prezentující buňky s vysokou fagocytickou aktivitou. cDC jednak cirkulují v krvi, ale nachází se ve i tkáních (zejména kůže, plíce, střeva, ledviny, játra) a lymfoidních orgánech. Tyto buňky exprimují myeloidní markery jako CD33, CD11c a CD13, dále vysokou hladinu MHC I a II molekul (Collin et al 2013). cDC se dále mohou dělit podle exprese povrchových molekul na $CD1c^+$ (BDCA-1) a $CD141^+$ (BDCA-3), při čem hlavní populace antigen prezentujících buněk jsou $CD1c^+$ cDC buňky. Avšak $CD141^+$ DC mají lepší schopnost prezentovat antigeny $CD8^+$ T lymfocytům (Haniffa et al 2012). Dalším typem jsou plasmacytoidní DC (pDC), které v klidovém stavu cirkulují v krvi a vyskytují se v lymfoidních orgánech. Podobají se plasmatickým buňkám a nemají výběžky. Pod vlivem zánětlivých faktorů migrují do místa infekce, kde stimulují T lymfocyty, prezentují antigeny a zároveň produkují cytokiny, zejména interferony α, β i λ a tím aktivují i nespecifickou antivirovou imunitní odpověď (Fitzgerald-Bocarsly et al 2008). Dále je popsáno i několik typů kožních rezidentních (tkáňových) DC, které se nachází dermis a epidermis pokožky. Jedná Langerhansovy buňky, což jsou nejvýznamnější antigen presentující buňky v epidermis a jim podobné $CD1a^+$ DC, které se nachází v dermis pokožky. Další typ je odvozený od monocytů a exprimuje CD14 molekulu a dále jsou popsány dva typy podobné cDC buňkám, které exprimují CD1c a CD141 molekuly (Clark et al 2019, Sabado et al 2017). Kromě DC, které se vyvíjejí z progenitoru existuje ještě podtyp DC, který se vyvíjí z monocytů v přítomnosti GM-CSF a IL-4. Tyto monocytární DC (moDC) jsou morfologicky podobné cDC, produkují prozánětlivé cytokiny a mohou aktivovat naivní T lymfocyty. Bakterie, které produkují ligandy TLR jako je LPS dokáží spustit diferenciaci těchto moDC z monocytů. Vzhledem k tomu, že se diferencují pod vlivem zánětlivých faktorů se někdy také nazývají prozánětlivé DC (infDC) (Cheong et al 2010, Segura & Amigorena 2013). Díky k tomu, že tento typ buněk se diferencuje z monocytů, které lze ve velkém množství odebrat z periferní krve, a diferenciace v DC je snadná, začaly se *ex vivo* generované moDC používat při výrobě imunoterapeutických autologních vakcín (Mastelic-Gavillet et al 2019). Vývoj DC a rozdělení na jednotlivé typy je nadále předmětem výzkumu.

Dochází tedy k upřesnění a změnám v klasifikaci na základě nových poznatků molekulární biologie nebo funkčních testů.

	Typ dendritických buněk	Fenotyp	Hlavní funkce a vlastnosti
Krevní DC	Plasmacytoidní DC	Lineage$^-$ CD14$^-$ CD11c$^-$ MHCII$^+$ CD123$^+$ BDCA-2 (CD303)$^+$ BDCA-5 (Nrp)$^+$	Produkce IFN typu I – odpověď na virovou infekci Exprimují vysokou hladinu TLR7 a TLR9
	Konvenční/myeloidní DC		
	CD1c$^+$ myeloidní DC	Lineage$^-$ CD11c$^+$ MHCII$^+$ CD86$^+$ BDCA-1 (CD1)$^+$	Aktivace T lymfocytů Sekrece IL-12 cytokinu
	CD141$^+$ myeloidní DC	Lineage$^-$ CD11c$^+$ MHCII$^+$ CD86$^+$ BDCA-3 (CD141)$^+$ CLEC9A$^+$ XCR1$^+$	Prezentace exogenních antigenů CD8$^+$ lymfocytům Vysoká exprese TLR3 a TLR8
Kožní DC	Langerhansovy buňky	Lineage$^-$ CD11c$^+$ HLA-DR$^+$ CD1a$^+$ Langerin$^+$ E-cadherin$^+$	Hlavní APC v epidermis Aktivují CD4$^+$ a CD8$^+$ T lymfocyty Obsahují Birbeckova granula Způsobují Th-17 zánětlivou odpověď v kůži
	Dermální DC		
	CD1a$^+$ dermální DC	CD1a$^+$ CD14$^-$ HLA-DR$^+$	Mohou aktivovat CD8$^+$ a CD4$^+$ T lymfocyty
	CD14+ dermální DC	CD1a$^-$ CD14$^+$ HLA-DR$^+$	Aktivují humorální odpověď

Tab. 3 Základní subtypy DC, jejich fenotyp a klíčové funkce. DC se dělí na 2 základní skupiny krevní a kožní rezidentní. Nejpočetnější podskupinou krevních buněk jsou konvenční (myeloidní) cDC, jejichž hlavní funkcí je aktivace T lymfocytů. Menší skupinou jsou plasmacytoidní dendritické buňky (pDC), které aktivují protivirovou imunitní odpověď. Mezi kožní DC patří Langeranhsovy buňky a dermální CD11c$^+$ a CD14$^+$ buňky. Převzato a upraveno z (Santos & Butterfield 2018).

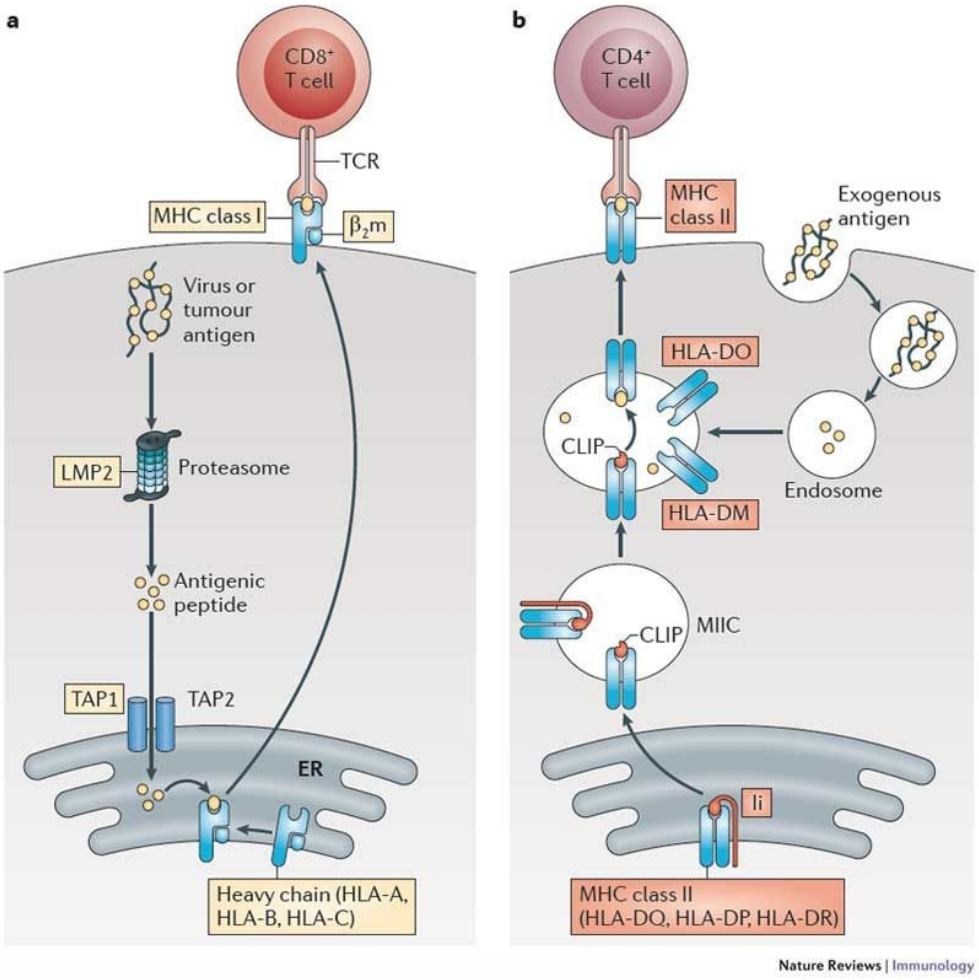
Důležitou vlastností DC je, že dokáží existovat ve dvou stavech – nematurovaném (nezralém) a maturovaném neboli aktivovaném zralém stavu (Mellman & Steinman 2001). Nematurované DC se nacházejí zejména v periferních tkáních, kde vychytávají antigeny a pohlcují je pomocí fagocytózy, pinocytózy případně i receptory zprostředkované endocytózy. Mají poměrně nízkou expresi MHC II molekul a kostimulačních molekul i produkci cytokinů, a tedy malou prezentační kapacitu (Blum et al 2013). Maturace neboli aktivace je jedna z nejdůležitějších funkcí DC. Tento komplexní proces je charakterizován mnoha procesy: zpracování a prezentace antigenů, migrace a stimulace T lymfocytů (Mellman & Steinman 2001). K tomu, aby DC přešla do maturovaného stavu, musí obdržet signál skrze receptory rozeznávající molekulové vzory (angl. pattern recognition receptory – PRR). PRR jsou vysoce konzervované receptory, mezi které patří zejména Toll-like receptory (TLRs), dále lektiny C-typu, Nod-like receptory, RIG-I–like receptory,

scavangerové receptory, integriny ale i Fc receptory. Tyto velmi různorodé receptory detekují širokou škálu molekul typických pro patogeny (angl. pathogen associated molecular patterns - PAMPs), např. bakteriální polysacharid (LPS), endoxiny gramnegativních bakterií, flagelin, peptidoglykany, dsRNA (typická pro viry) nebo nemetylované CpG. Kromě PAMPs , PRR rozeznávají také signály endogenního původu, které značí poškození vlastních buněk tzv. DAMPs molekuly (Matzinger 2002, Nace et al 2012, Takeuchi & Akira 2010). Poté co nematurovaná DC pohltí cizorodý antigen a dostane signál skrze PRR, přechází během 12-24 hodin do maturovaného stavu. Což znamená, že sníží fagocytickou aktivitu, a naopak začne na svém povrchu více prezentovat pohlcené proteiny v komplexu s MHC II molekulami (Mellman 2013).

Antigen může být procesován endogenní dráhou, kdy dojde k rozštěpení proteinu pomocí proteasomu v cytosolu a následně se peptidy transportují peptidovou pumpou do endoplasmatického retikula, kde se naváží do MHC I molekuly. V komplexu jsou poté vystaveny na povrchu buňky a rozeznávány $CD8^+$ T lymfocyty. Takto jsou procesovány zejména intracelulární proteiny buňce vlastní nebo intracelulární viry **(Obr. 4a)**. Avšak i extracelulární peptidy mohou být prezentovány pomocí MHC I molekul (HLA-A, -B, -C) procesem zvaným cross-prezentace a aktivovat tak přímo $CD8^+$ T cytotoxické buňky. Vnější antigeny jsou však vystavovány zejména na MHC II molekulách (HLA-DQ, -DR, -DP), kdy po pohlcení dendritickou buňkou dojde v endosomu k rozložení proteinu na peptidy. Poté se pozdní endosom či lysosom spojí s váčky putující z Golgiho aparátu, ve kterých se nachází formované MHC II molekuly. Následně dochází vlivem kyselého prostředí v pozdním endosomu/lysosomu k obsazení MHC II molekuly extracelulárním peptidem. V tomto komplexu pak dojde k vystavení na povrchu dendritické buňky a k rozeznání receptory $CD4^+$ T lymfocytů **(Obr. 4b)**. Stejně tak jako existuje cross-prezentace v případě MHC I molekul, dochází ke cross-prezentaci MHC II molekul, kdy se intracelulární proteiny dostávají do endosomu pomocí autofagie (Blum et al 2013, Mantegazza et al 2013). Dále DC začne migrovat do sekundárních lymfatických orgánů díky zvýšené expresi CCR7 chemokinových receptorů, které váží chemokiny CCL19 a CCL21. Během maturace také dochází ke zvýšené expresi kostimulačních molekul CD80, CD86 a CD40 a produkci cytokinů (např. IL-12, IL-1, IL-6, IL-12, TNF-α). Maturovaná DC tak s vystavenými MHC molekulami a kostimulačními molekulami doputuje do lymfoidních orgánů, kde může aktivovat $CD8^+$, $CD4^+$ T lymfocyty, ale i B lymfocyty a díky cytokinům také NK buňky a případně i přes neklasické MHC také NKT buňky. DC jsou tedy schopné aktivovat jak buněčnou část imunitní odpovědi, tak protilátkovou, dle typu rozeznaného signálu a

pohlceného peptidu a potencovat tak i nespecifickou část imunitního systému (Sabado et al 2017). Výsledek interakce mezi DC a T lymfocyty však nemusí vždy být aktivace T lymfocytů. Je dán typem antigenu a okolnostmi, za kterých je antigen prezentován, tzn. maturačním stavem DC, cytokinovým prostředím i lokalizací. Během mnohaletého výzkumu se prokázalo, že DC hrají zásadní roli v navození a udržení centrální i periferní tolerance tím, že prezentují vlastní nebo neškodné antigeny bez přítomnosti zánětu. Zároveň také působí na diferenciaci T regulačních lymfocytů a homeostázu. Tolerogenní působení DC zahrnuje nejen produkci cytokinů, ale i interakci s PD-1 případně jinými inhibičními receptory na T lymfocytech (Waisman et al 2017).

Svými vlastnostmi jsou dendritické buňky ideálním nástrojem pro formování imunitní odpovědi. Při správném nastavení lze tedy dendritické buňky naprogramovat, aby zahájili imunitní odpověď specificky i proti nádorovým buňkám a využít je tedy jako formu imunoterapie.



Obr. 4 Zpracování a prezentace antigenu pomocí MHC molekul. a) Intracelulární antigeny jakými mohou být např. virové nebo nádorové antigeny jsou v proteasomu rozštěpené na peptidy. Peptidy jsou následně transportovány do endoplasmatického retikula (ER), kde jsou navázány do předpřipravené MHC I molekuly. Tento komplex je poté transportován na povrch buňky, kde je antigen prezentován $CD8^+$ T

lymfocytům. **b)** Extracelulární antigeny, jakými mohou být např. bakteriální antigeny nebo odumřelé buňky jsou pohlceny a zpracovány v endosomech či lysosomech. Peptidy pocházející z těchto antigenů jsou poté navázány do MHC II molekuly namísto invariantního peptidu CLIP. Peptidy v komplexu s MHC II molekulou jsou presentovány $CD4^+$ T lymfocytům na povrchu buňky (Kobayashi & van den Elsen 2012).

2.4.2 Příprava dendritických buněk pro výrobu vakcíny

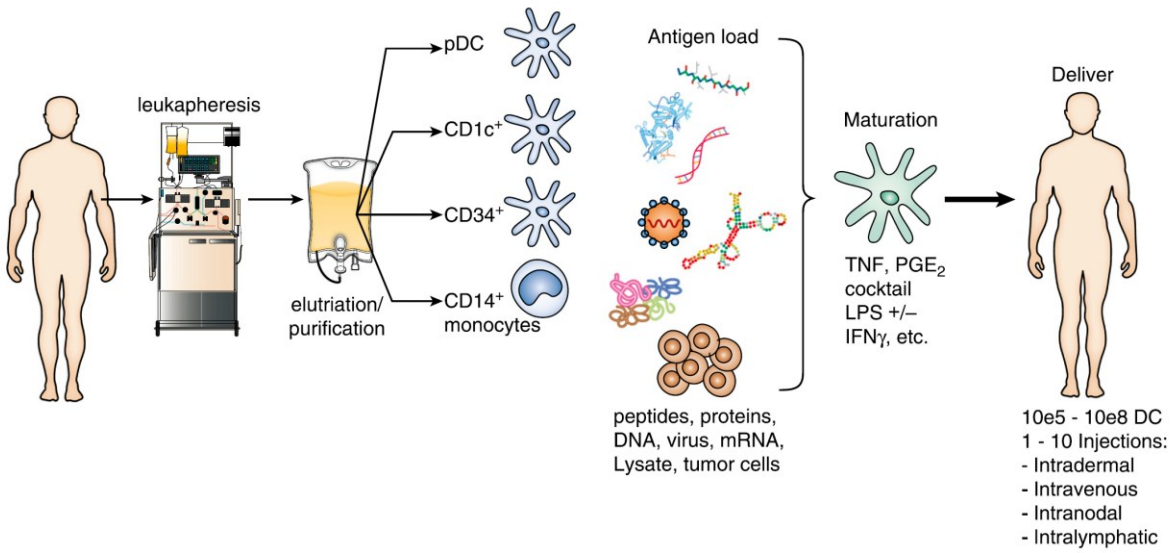
Díky jejich zásadní úloze v zahájení a kontrole imunitní odpovědi se DC jevily jako ideální nástroj v posílení protinádorové odpovědi, a tedy v léčbě maligních onemocnění. Tato teorie byla potvrzena ve studii, kdy byl zdravým kontrolám podán samotný antigen a druhé skupině DC, které antigen prezentovaly. Pouze DC se zpracovaným antigenem byly schopné aktivovat specifickou T buněčnou odpověď *in vivo,* zatímco solubilní antigen nikoliv (Dhodapkar et al 1999). Tento výsledek ukazuje, že DC mohou být *ex vivo* úspěšně pulzovány antigenem a po přenosu zpět do těla jsou schopné zahájit imunitní reakci. Díky možnostem snadno kultivovat a upravovat DC *ex vivo*, se stala imunoterapie na bázi DC slibným a perspektivním přístupem.

Nejvíce využívanou metodou pro výrobu autologní DC vakcíny je kultivace autologních pacientských buněk *ex vivo* (**Obr. 5**). Nejčastěji jsou DC generované z izolovaných $CD14^+$ monocytů, méně často z $CD34^+$ prekursorů. Tento přístup je využíván ve většině klinických studií (Anguille et al 2014). V tuto chvíli neexistuje jasné ustanovení, která z variant je lepší. $CD34^+$ se však nachází v kostní dřeni, tudíž je potřeba pacienta před odebrání stimulovat GM-CSF a by došlo ke většímu vyplavení těchto buněk do oběhu (Banchereau et al 2001). U DC generovaných z $CD34^+$ prekursorů bylo sice ukázáno, že mají o něco větší kapacitu stimulovat T lymfocyty, ale z důvodu menšího výtěžku je tato metoda méně používána. Častěji se využívá kultivace z monocytů, a to z důvodu vyššího obsahu v krvi a tím pádem vyššího výtěžku. Monocyty se separují leukaferézou z pacientské krve a selektují se buďto $CD14^+$ magnetickou separací nebo adherencí na plastik. Kultivace selektovaných monocytů probíhá za přítomnosti IL-4 a GM-CSF, což vede k diferenciaci nematurovaných DC monocytárního typu. (Constantino et al 2016, O'Neill & Bhardwaj 2005). Vývoj DC probíhá obvykle 5-7 dní, ale existují i kratší protokoly, dle kterých lze získat srovnatelně funkční buňky při kultivaci 2 nebo 3 dny (Dauer et al 2005, Truxova et al 2014).

Nematurované DC jsou dále kultivované (pulzované) s antigenem. Pro lepší prezentaci antigenu a aktivaci T lymfocytů jsou pulzované DC následně maturovány po dobu 24-48 hodin. Při použití maturovaných buněk byl prokázána mnohem větší léčebný účinek než u první generace nematurovaných vakcín (Garg et al 2017a). DC mohou maturovány

zánětlivými cytokiny. Klasická maturační směs se skládá z TNF-α, IL-6, IL-1β a prostaglandinu E2. Tato směs zvyšuje expresi kostimulačních molekul CD40, CD80, CD86, CCR7. Generuje velký výtěžek a uniformní populaci DC. Avšak neindukuje produkci cytokinu IL-12p70, který je důležitý pro aktivaci cytotoxických $CD8^+$ T lymfocytů (Lee et al 2002, Williams & Bevan 2007). Dalším hojně používaným maturačním agens jsou agonisté Toll-like receptorů, které více potencují produkci IL-12 cytokinu. Mezi nejčastěji používané patří poly(I:C), což je syntetický ligand TLR3, dále LPS (TLR4 ligand), resiquimoid (TLR7) a imiquimod (TLR7/8) (Constantino et al 2016). V našich podmínkách bylo potvrzeno, že cytokinová směs sice nejlépe potencuje expresi kostimulačních molekul, avšak poly(I:C) má lepší schopnost, aktivovat cytotoxické T lymfocyty než směs cytokinů a LPS (Fucikova et al 2011, Truxova et al 2014). Nyní je testováno mnoho různých maturačních směsí, dalších TLR agonistů a využívají se také genetické manipulace, avšak výše popsaná maturační činidla jsou nejčastěji používaná a byla u nich opakovaně prokázána bezpečnost (shrnuto v (Constantino et al 2016, Sabado et al 2017)). Pro klinické testování je zásadní, aby výroba DC splňovala GMP podmínky. DC musí být kultivovány v médiu bez séra a aktivovány maturačním činidlem schváleným pro klinické použití. V našich laboratořích bylo potvrzeno, že DC pěstované v médiu bez séra mají vyšší výtěžek než v sérovém, a při použití maturačního činidla poly(I:C) nejlépe aktivují specifické T lymfocyty bez nárůstu T regulačních lymfocytů (Fucikova et al 2011, Truxova et al 2014). Maturované DC je možné následně zamrazit a transportovat k pacientovi v požadovaný den a podání opakovat. DC vakcíny mohou být pacientovi podávány různými způsoby – intradermálně, subkutánně, intravenózně, intranodálně nebo i intratumorálně, při čemž optimální podání je předmětem výzkumu a závisí i na typu nádoru. DC vakcína je obvykle podávána opakovaně v pravidelných intervalech pro navození dlouhodobé imunity (Simon et al 2009) .

Méně využívaným přístupem je pak izolace DC z krve pacienta a jejich pulzace a maturace *ex vivo*. Tento způsob se zdá být také bezpečný a proveditelný. Několik klinických studií přineslo i povzbudivé výsledky při léčbě pacientů s pokročilým melanomem a karcinomem prostaty. Je však více problematické získat dostatečný počet T lymfocytů, a navíc není zřejmé, který z podtypů DC, případně jejich kombinace, je pro léčbu nejvhodnější (Garg et al 2017a).



Obr. 5 Schéma výroby vakcíny na bázi dendritických buněk. Schéma znázorňuje základní kroky při výrobě vakcín na bázi DC. Nejdříve je z krve odebráno pomocí leukaferézy velké množství bílých krvinek. Následně jsou purifikovány buňky pro výrobu vakcíny, nejčastěji $CD14^+$ buňky případně $CD34^+$ buňky, které jsou *in vitro* diferenciovány v nematurované DC. Méně často jsou odebrány z pacienta přímo dendritické buňky. K DC jsou následně přidány nádorové antigeny a buňky jsou maturovány pro účinnou prezentaci antigenu pomocí různých maturačních látek. Připravená vakcína je pak v jednotlivých dávkách dlouhodobě podávána pacientovi (Santos & Butterfield 2018).

2.4.3 Pulzace dendritických buněk nádorovými antigeny

Dalším velmi důležitým faktorem pro úspěch terapie na bázi DC je správný výběr a forma antigenu. Aby dendritické buňky zahájily specifickou protinádorovou odpověď, je potřeba, aby na svém povrchu vystavily nádorové antigeny navázané do MHC I a II molekul. Nádorový antigen může pocházet z různých zdrojů. Nejčastěji se používají uměle syntetizované peptidy a proteiny nebo buněčný lyzát z autologního tumoru, případně z buněčné nádorové linie. Dalšími méně používanými a nadále optimalizovanými možnostmi jsou transfekce mRNA kódující antigen, použití virového vektoru či transdukce genu kódujícího nádorový antigen či antigeny. U všech těchto postupů byla prokázána účinnost aktivovat imunitní odpověď bez specifických vedlejších účinků (Constantino et al 2016). Použití krátkých syntetických peptidů (8-15aa) je jednoduché a bezpečné. Využívány jsou individuálně i v kombinaci. Tyto krátké peptidy se váží přímo na MHC I a II molekuly na povrchu buňky bez nutnosti jejich zpracování buňkou jako v případě proteinů. Problémem toho přístupu zůstává malé množství známých s tumorem asociovaných antigenů (TAA), omezený repertoár antigenů, a ne všechny antigeny mohou vyvolat imunitní reakci. Zároveň musí být znám haplotyp MHC molekul, tak aby byl vybrán příslušný peptid, který se váže na konkrétní haplotyp (Zhou et al 2002). Proto jsou testovány i delší syntetické peptidy (28

-35aa), které mohou být buňkou pohlceny a procesovány (Bijker et al 2008, Kenter et al 2008).

Po zjištění, že DC připravené se syntetickými peptidy jsou bezpečné, se začalo testovat použití celých nádorových buněk jako zdroj antigenu. Výhoda použití buněčného lyzátu nebo apoptotických buněk je, že obsahují velké množství různých nádorových antigenů a mohou tak být účinně prezentovány v nezávislosti na haplotypu MHC I a II molekul a aktivovat tak $CD4^+$ i $CD8^+$ T lymfocyty. Imunitní odpověď je tak více komplexní (Schnurr et al 2005). Metaanalýzou 173 studií bylo potvrzeno, že při použití tumorového lyzátu byla klinická odpověď pozorována u 8,3 % pacientů, zatímco při použití peptidů 3,6 % (Neller et al 2008). Zdrojem nádorových buněk může být i autologní tumor. Tento proces ovšem vyžaduje, aby nádor bylo možné odebrat a měl dostatečné množství nádorových buněk. Zároveň je nutné matriál dopravit na místo zpracování. V mnoha případech však autologní nádorové buňky není možné použít, proto se jako zdroj začaly používat nádorové linie. Velkou výhodou tohoto přístupu je, že se dá standardizovat a použít u všech pacientů bez ohledu na typ či velikost nádoru. Nádorové linie se dají snadno testovat na přítomnost antigenů a vybrat tak linii, která bude nejvíce korespondovat s léčeným onemocněním. Nádorové buňky mohou být usmrceny mnoha různými způsoby, ať už pro tvorbu lyzátu nebo pro indukci apoptózy. Právě apoptotické buňky se zadají být vhodnější než lyzované opět z důvodu vyšší aktivace imunitního systému. Apoptotické buňky mohou produkovat DAMPs a více potencovat imunitní systém a protinádorovou dopověď, pokud byly usmrceny imunogenní buněčnou smrtí (angl. Immunogenic cell death – ICD) (Hatfield et al 2008, Kokhaei et al 2004, Zappasodi et al 2010), která bude více diskutována v dalších kapitolách.

2.5 Vakcíny na bázi dendritických buněk v léčbě plicních nádorů

Vzhledem ke stále vysoké úmrtnosti a je vývoj nových terapeutických přístupů pro léčbu karcinomu plic esenciální a imunoterapie pomocí DC je jedním z nich. Historicky nebyl NSLC považován za sensitivní k imunoterapiím. Avšak dosavadní poznatky ukazují, že plicní karcinomy jsou rozpoznávané imunitním systém a imunitní odpověď koreluje s lepším přežíváním. Od roku 1996 bylo zahájeno kolem 40 světových klinických studií DC vakcín pro léčbu NSCLC a zatím žádný přípravek nebyl schválen pro klinické použití, avšak doposud publikované studie přinesly slibné výsledky (Mendoza 2014). Většina DC vakcín je založena na pulzaci DC peptidy nebo rekombinantními proteiny nesoucí nádorově asociované nebo specifickými antigeny. V NSCLC bylo identifikováno mnoho nádorově-

asociovaných antigenů, které byly detekované i u jiných typů tumorů (Mendoza 2014) a jsou podrobněji popsány v kapitole 2.3.1.2.

V roce 2003 byl publikován první výsledek z fáze I klinické studie, kdy byl použit MUC1 nádorový antigen pro pulzování *ex vivo* vygenerovaných dendritických buněk u 5 plicních pacientů. U 3 pacientů došlo ke zlepšení stavu a částečné odpovědi. Zároveň byly v této studii léčeny pacientky s prsním nádorem, u kterých došlo k vymizení plicních metastáz a pleurální efúze a léčba probíhala bez závažných vedlejších účinků (Kontani et al 2003). Následovaly podobné klinické studie fáze I s antigeny WT-1, CEA, MAGE A1 nebo HER2. Všechny tyto studie prokázaly bezpečnost a dobrou snášenlivost bez závažných vedlejších účinků. Studie byly provedené na pacientech ve III. a IV. stadiích nemoci, a i přes to byla ve všech studiích prokázaná klinická případně imunologická odpověď. Ve studii Takahashi et al, kde byl použit WT-1 antigen bylo poprvé prokázáno statisticky významné prodloužení života u pacientů, kteří byli léčeni pulzovanými dendritickými buňkami oproti nepulzovaným (Babatz et al 2006, Perroud et al 2011, Takahashi et al 2013, Ueda et al 2004).

V dalších dvou publikovaných studiích byl použit lyzát z autologních nádorových buněk, který byl připraven několika cykly zmrazením a rozmrazením. Ve studii Chang a kol. jsou použité buňky maligní pleurálního výpotku, a odpověď byla pozorována pouze u 2 z 8 pacientů. Ve studii Um a kol. byl použit autologní nádorový lyzát. Mírná klinická odpověď byla pozorována pouze u 2 z 15 pacientů. Obě studie prokázaly, že takto připravené DC jsou bezpečné a nevyvolávají autoimunitu (Chang et al 2005, Um et al 2010a). Lyzát z melanomové linie DDM-1, která exprimuje širokou škálu nádorových antigenů včetně MAGE-A, byl použit pro přípravu vakcíny MelCancerVac® (DanDrit Biotech, Copenhagen, Denmark). Tato vakcína byla po úspěšných testech na pacientech s kolorektálním karcinomem použita i pro léčbu 22 pacientů s NSCLC ve II. fázi klinické studie. Terapie byla dobře snášena. Stabilní onemocnění bylo pozorováno u 7 pacientů a u 4 z nich byla detekována specifická T buněčná odpověď *in vitro*, zatímco u progredujících pacientů byla zaznamenána pouze u jednoho. Tento výsledek poukazuje na korelaci mezi klinickou a imunitní odpovědí. 5 pacientů vykazovalo navíc neočekávaně delší dobu přežití. Avšak pro potvrzení účinku by bylo potřeba tuto vakcínu otestovat v větších randomizovaných studiích (Engell-Noerregaard et al 2013).

V další studii fáze I je využíván pro pulzaci buněk adenovirový vektor exprimující CCL21. Dendritické buňky jsou podávány intratumorálně. Byla pozorována T buněčná odpověď, kdy 6 pacientů odpovídalo na nádorové antigeny a 56 % pacientů mělo zvýšený počet intratumorálních $CD8^+$ T lymfocytů. Zároveň však bylo u těchto pacientů pozorováno

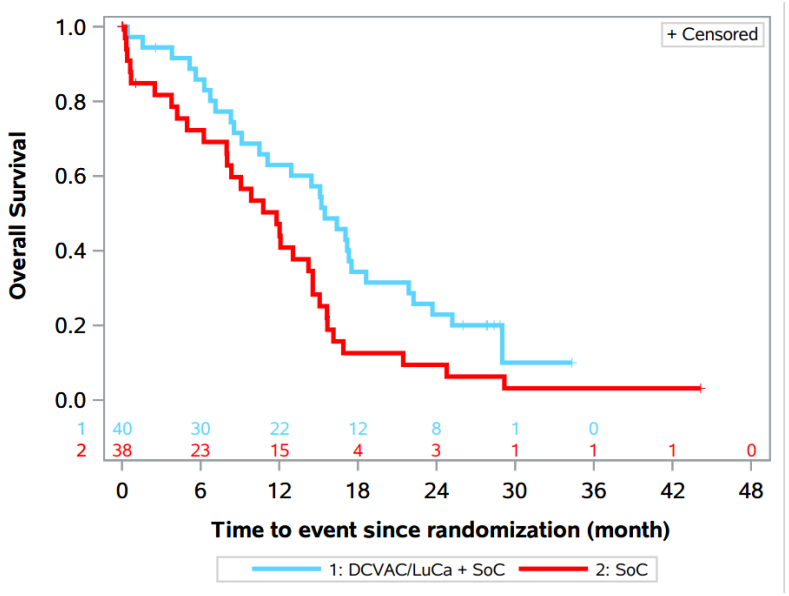
zvýšení PD-L1 exprese. Další studie v kombinaci s pembrolizumabem byla iniciována. Tato studie poukazuje na možný přínos kombinací vakcín na bázi dendritických buněk s inhibitory kontrolních bodů imunity (NCT01574222) (Lee et al 2017).

Překvapivě, z doposud publikovaných prací, pouze jedna skupina využívala jako zdroj antigenů apoptotickou nádorovou linii. Ve třech studiích byla použita plicní linie 1650-TC odvozená adenokarcinomu, která exprimuje antigeny HER2, CEA, MAGE-A2, survivin a NY-ESO-1. Některý z těchto antigenů se vyskytuje u více než 98 % NSCLC. Dendritické buňky byly kultivovány z monocytů za přítomnosti IL-4 a GM-CSF. Nádorová linie byla nejdříve ozářena UVB a poté ozářena gama zářením. Ve všech studiích byla pozorována imunologická odpověď, která nebyla závislá na stadiu nebo předchozí terapii. Klinická odpověď však nebyla závislá na pozorované imunologické odpovědi. (Hirschowitz et al 2007, Hirschowitz et al 2004, Hirschowitz et al 2011). DC byly v první studii maturovány směsí cytokinů z autologních T lymfocytů s přidaným IFN-γ (Hirschowitz et al 2004), ve druhé použity nematurované DC (Hirschowitz et al 2007) a ve třetí studii DC navíc pulzované GM-CSF (Hirschowitz et al 2011), kdy imunitní odpověď byla u všech těchto postupů přibližně stejná. Zároveň bylo publikováno, že dendritické buňky maturované směsí cytokinů z autologních T lymfocytů s přidaným IFN-γ aktivují specifické $CD8^+$ T lymfocyty a ty zahájí *in vitro* specifickou cytotoxickou reakci pouze proti linii 1650-TC nikoliv proti liniím K562, Daudi nebo1650-EBV (Yannelli et al 2005).

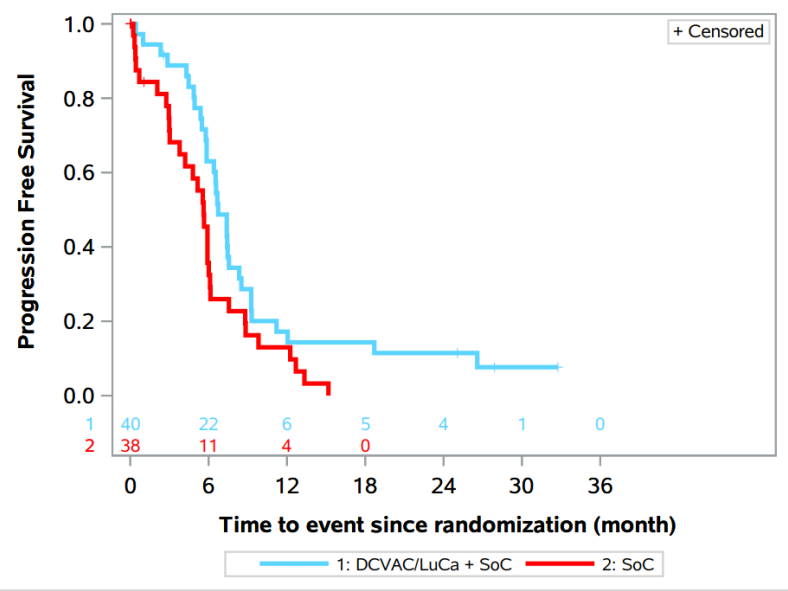
Tyto studie potvrdily, že DC vakcíny mohou být vyráběny v dostatečném množství v podmínkách vyhovujícím správné výrobní praxi (angl. Good manufacturing practice – GMP). Mohou být použity v klinických studiích, nicméně v současné době jsou publikované pro NSCLC pouze klinické fáze I a II. Dále bylo prokázáno, že aktivují specificky $CD8^+$ T lymfocyty a ty dokáží selektivně zabít nádorové buňky. Nicméně více rozsáhlejších studií je potřeba k ustanovení účinnosti DC vakcín v NSCLC.

2.6 Randomizovaná, otevřená klinické studie fáze I/II založená na autologní imunoterapii pomocí vakcíny na bázi dendritických buněk (DCVAC/LuCa) v kombinaci s karboplatinou/ paklitaxelem u pacientů v pokročilém stádiu nemalobuněčného karcinomu plic

V roce 2018 byla vyhodnocena multicentrická studie klinické fáze I/II (SLU01) založená na autologní imunoterapii pomocí vakcíny na bázi dendritických buněk (DCVAC/LuCa) v kombinaci s karboplatinou/paklitaxelem u pacientů ve stádiu IV nemalobuněčného karcinomu plic sponzorovaná společností Sotio a.s (NCT02470468). V této studii byla testována bezpečnost a účinnost vakcíny na bázi dendritických buněk spolu se standardní chemoterapeutickou léčbou (SoC). Celkově 45 pacientů bylo randomizováno do skupiny léčené chemoterapií a DCVAC/LuCa (DCVAC/LuCa + SoC) a 38 pacientů do skupiny léčené pouze chemoterapií (SoC). Léčebný přípravek DCVAC/LuCa byl podán pacientům ve skupině DCVAC/LuCa + SoC celkem v 15 dávkách po druhém cyklu chemoterapie. Všichni pacienti obdrželi minimálně 4 cykly chemoterapie. Statistická analýza ukázala signifikantní prodloužení mediánu celkového přežití o 112 dní (3.68 měsíců) u pacientů ve skupině DCVAC/LuCa + SoC ve srovnání s pacienty ve skupině SoC (471 vs 359 dní) (p=0,0179; HR = 0.54 [95 % CI:0,32; 0,91] **(Obr. 6)**. Podobné výsledky byly vyhodnoceny i pro prodloužení mediánu přežití pacientů bez progrese (PFS) (**Obr. 7**). PFS pacientů skupiny DCVAC/LuCa + SoC byl o 34 dní (205 vs 171 dní) delší než u skupiny pacientů SoC (p=0,0334; HR=0.58 [95% CI:0,35; 0,97] (**Obr. 7**)



Obr. 6. Kaplan Meierovy křivky celkového přežívání ve studii SLU01. Modrá křivka ukazuje celkové přežití ve skupině léčené DCVAC+SoC a červená křivka jsou pacienti léčeni SoC.



Obr. 7 Kaplan Meierovy křivky přežití bez progrese (PFS) ve studii SLU01. Modrá křivka ukazuje přežití bez progrese ve skupině léčené DCVAC+SoC a červená křivka jsou pacienti léčeni SoC.

Tyto výsledky potvrzují, že imunoterapie pomocí vakcíny na bázi dendritických buněk je bezpečná a vhodná v kombinaci s chemoterapií pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic. Základem pro výrobu vakcíny na bázi dendritických buněk použitých v této studii byla dále v této disertaci uvedená preklinická práce.

2.7 Imunogenní buněčná smrt a její role v protinádorové terapii

Jak jíž bylo popsáno, k úspěšné aktivaci T lymfocytů pomocí DC je potřeba, aby DC byla maturována. Maturace je závislá na signalizaci skrze PRR receptory po navázání molekuly ze skupiny PAMPs nebo DAMPs. V poměrně nedávné době bylo ukázáno, že DAMP molekuly mohou pocházet i z umírajících nádorových buněk, a tak potencovat prezentaci antigenů a protinádorovou imunitní odpověď. Buněčná smrt, která dokáže aktivovat imunitní systém se nazývá imunogenní buněčná smrt (ICD) (Nagata & Tanaka 2017). Za ICD byla dlouho považována nekróza, u které dochází k prasknutí membrány, vylití buněčných komponent a prozánětlivých mediátorů do okolí umírajících buněk. Naopak programovaná buněčná smrt neboli apoptóza byla považována na neimunogenní nebo dokonce tolerogenní (Green et al 2009, Savill & Fadok 2000). To však bylo postupem času zpochybněno řadou pozorování, která dokazují existenci imunogenní apoptózy. Bylo prokázáno, že DC pohlcují apoptotické nádorové buňky a následně v komplexu s MHC I molekulami prezentují nádorové antigeny $CD8^+$ T lymfocytům a také že apoptotické

nádorové buňky vyvolávají efektivní protinádorovou odpověď v myších nádorových modelech (Albert et al 1998, Nowak et al 2003).

V roce 2005 byla publikována studie, která ukazuje, že apoptóza indukovaná antracyklinem aktivuje imunitní systém a jedná se tedy o ICD (Casares et al 2005). Výzkumná skupina Guida Kroemera a Laurence Zitvogel v této studii prokázala, že myší nádorové buňky, které jsou ošetřené vysokými dávkami antracyklinu doxorubicinu a po té injikované do myši, dokáží signifikantně zpomalit růst nádoru. Tato vakcinace byla neúčinná, pokud byly depletovány $CD8^+$ lymfocyty nebo dendritické buňky. Zároveň bylo ukázáno, že přímé podání doxorubucinu do tumoru dokáže potlačit růst nádoru pouze u imunokompetentní myši, nikoliv u myši imunodeficientní. Tyto účinky nebyly pozorovány u mitomycinu C (Casares et al 2005). V následujících letech bylo popsáno mnoho dalších chemoterapeutik a fyzikálních modalit, které indukují ICD, byly postulovány základní znaky a také popsány různé typy ICD a detailně studovány signalizační dráhy. Nyní se věří, že závisí více na tom, jakým činidlem je smrt indukována než na tom, zda je jedná o nekrózu, apoptózu nebo i jiné typy buněčné smrti jako je nekroptóza nebo pyroptóza (Dudek et al 2013, Inoue & Tani 2014). Nejdůležitějším znakem ICD tedy je, že během zániku buňky dochází k povrchové expozici a uvolnění molekul, které patří mezi DAMP molekuly. Toto molekuly interagují s buňkami imunitního systému a mimo jiné aktivují antigen prezentující buňky, které následně zahájí protinádorovou imunitní reakci. V řadě preklinických a retrospektivně i klinických studií byl prokázán positivní význam DAMP molekul pro prognózu pacientů s nádorovými chorobami, kdy vyšší hladina DAMP molekul v nádorovém mikroprostředí značí lepší prognózu pacienta (Fucikova et al 2016a, Fucikova et al 2015, Fucikova et al 2016b, Kroemer et al 2013, Krysko et al 2012).

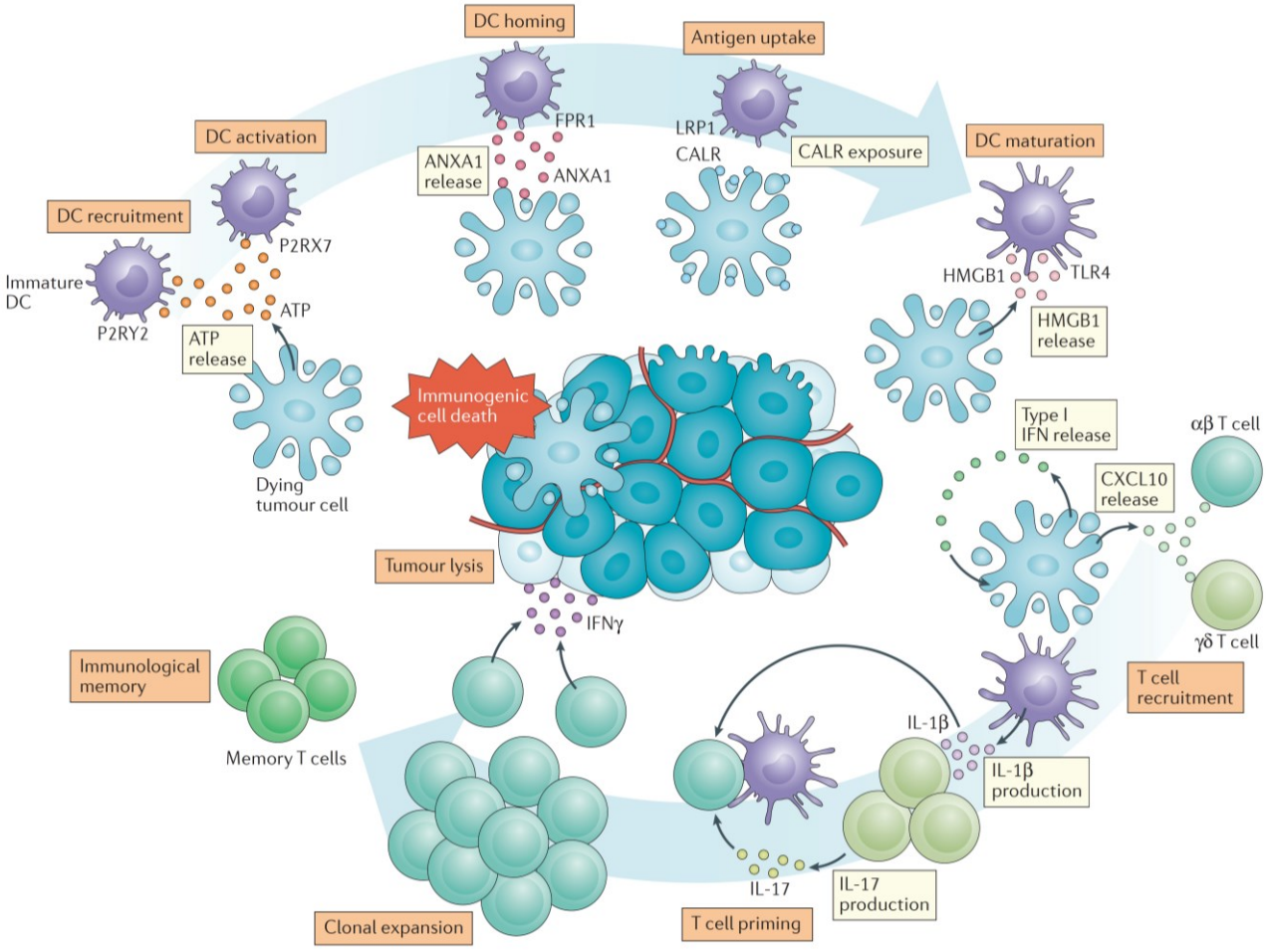
2.7.1 Znaky a mechanismus imunogenní buněčné smrti

Mezi tři základní znaky ICD, které definují všechny induktory imunogenní buněčné smrti patří: 1) translokace chaperonu kalretikulinu (CALR) z lumen endoplasmatického retikula (ER) na povrch buněk, 2) aktivní sekrece ATP a 3) uvolnění HMGB1 proteinu do mezibuněčného prostoru (Kepp et al 2014). Dále bylo popsáno mnoho dalších DAMP molekul, které přispívají k imunogenicitě. Mezi ty patří zejména chaperony z rodiny proteinů teplotního šoku jako jsou HSP70 a HSP90. V komplexu s kalretikulinem se také v některých případech exprimuje na povrch protein Erp57. Dále jsou sekretovány imunostimulační interferony I typu, metabolity sfingomyelinu, mitochondriální produkty (DNA, kardiolipidy, N-formyl peptidy), cytosolické komponenty jako je F-actin.

V některých případech bylo v pozorováno také uvolnění chemokinů a annexinu 1 (Galluzzi et al 2017, Kepp et al 2014). Molekulární mechanismu ICD je znázorněn na **Obr. 8.**

V rané fázi ICD je nejdříve translokován kalretikulin a proteiny HSP70 a HSP90 z lumen ER na povrch nádorové buňky. Tyto molekuly fungují jako 'eat me' signál pro fagocyty a zvyšují taky fagocytickou aktivitu a pohlcení a prezentaci antigenů (Kepp et al 2014, Panaretakis et al 2009). Kalretikulin se naváže na receptor CD91 neboli LRP1 na povrchu APC, čímž spouští produkci inflamatorních cytokinů (IL-6 and TNF-α) (Garg et al 2012c). Dále je v rané fázi uvolňován annexin 1 (ANXA1), který se váže do receptoru FPR1 na povrchu APC a přispívá k migraci APC do nádoru (Vacchelli et al 2016). V následné fázi, kdy se buňka již začne rozpadat dochází k aktivní sekreci ATP, který funguje jako chemoatraktant a dokáže tak přilákat naivní APC. K sekreci ATP je u většiny induktorů zapotřebí, aby buňka spustila proces autofagcytózy, kdy dochází k degradaci cytosolických proteinů a poškozených organel a následné fúzi aufogozomu s lysozomy, které pak splývají s membránou a ATP se takto dostává do extracelulárního prostoru (Michaud et al 2011). ATP a váže se na purinergní receptory P2RX7 a P2RY2 na povrchu APC (Elliott et al 2009). Po vazbě ATP na P2RX7 receptor se spouští formování NLRP3 inflamazómu, což vede k sekreci IL-1β a IL-18 cytokinů. IL-1β cytokin je zásadní při aktivaci IFN-γ produkujících $CD8^+$ T lymfocytů. (Ghiringhelli et al 2009). V závěrečné fázi je z umírajících buněk uvolněn také chromatinový protein HMGB1. K tomu procesu dochází až ve chvíli, kdy je narušena jaderná membrána i plasmatická membrána. Bylo prokázáno, že tento protein je schopen ne navázat ať už v komplexu nebo samostatně na různé receptory jakými jsou např. RAGE, CXCR4, TIM-3 (Chiba et al 2012, Schiraldi et al 2012, Sims et al 2010). Nejdůležitější je však vazba na TLR4 na povrchu APC. Následně dochází ke spuštění signalizační dráhy přes MyD88 adapter vedoucí k produkci prozánětlivých cytokinů a k aktivaci drah zajišťující zpracování antigenů (Apetoh et al 2007, Saenz et al 2014). HMGB1 se v komplexu s DNA dále váže na TLR receptor na povrchu B buněk, kterým indukuje humorální odpověď (Urbonaviciute et al 2008). Další způsobem, jak ICD nádorových buněk potencuje imunitní systém je pomocí stimulace produkce chemokinů CXCL1, CCL2, CXCL10, které fungují jako chemoatraktanty pro neutrofily, které fagocytují umírající buňky a tím dále potencují imunitní odpověď (Garg et al 2017b). Chemokin CXCL10 je sekretován z maligních buněk v závislosti na aktivaci interferonové signalizační dráhy a přitahuje T lymfocyty a do nádoru (Sistigu et al 2014). Interferony I typu jsou produkovány po navázaní RNA pocházející z umírajících nádorových buněk na receptor TLR3 a aktivují makrofágy, DC a NK buňky (McNab et al 2015, Sistigu et al 2014).

Interakce mezi receptory na povrchu APC a DAMP molekulami exprimovanými a uvolňovanými při imunogenní smrti nádorových buněk, a tedy spouští sérii událostí, které vedou ke zvýšení migrace APC i T lymfocytů do nádoru, vytvoření prozánětlivého prostředí, zvýšené expresi MHC I a MHC II molekul, lepší prezentaci nádorových antigenů T lymfocytům a jejich aktivaci. ICD nádorových buněk má tedy schopnost přeměnit umírající nebo odumřelé rakovinné buňky na agens schopné vyvolat protinádorovou imunitu v nepřítomnosti dalších adjuvans (Galluzzi et al., 2014). Z těchto důvodů je indukce ICD nádorových buněk využívána při výrobě a vývoji protinádorových vakcín a terapií.



Obr. 8 Mechanismus imunogenní buněčné smrti. Po indukci imunogenní buněčné smrti (ICD) maligní buňky vystavují na povrch protein kalretikulin (CALR) a další proteiny endoplasmatického retikula, vylučují ATP a později i HMGB1 a annexin 1 (ANXA1). Dále je v maligních buňkách aktivována dráha vedoucí k produkci interferonů typu I a následně chemokinu CXCL10. Vazba těchto DAMP molekul na receptory myeloidních a lymfoidních buněk podporuje lepší pohlcení umírajících buněk, prezentaci antigenu, expresi kostimulačních molekul a produkci imunostimulačních cytokinů. Tyto děje vedou k aktivaci T lymfocytů a eradikaci nádorových buněk (Galluzzi et al 2017).

2.7.2 Indukce imunogenní buněčné smrti

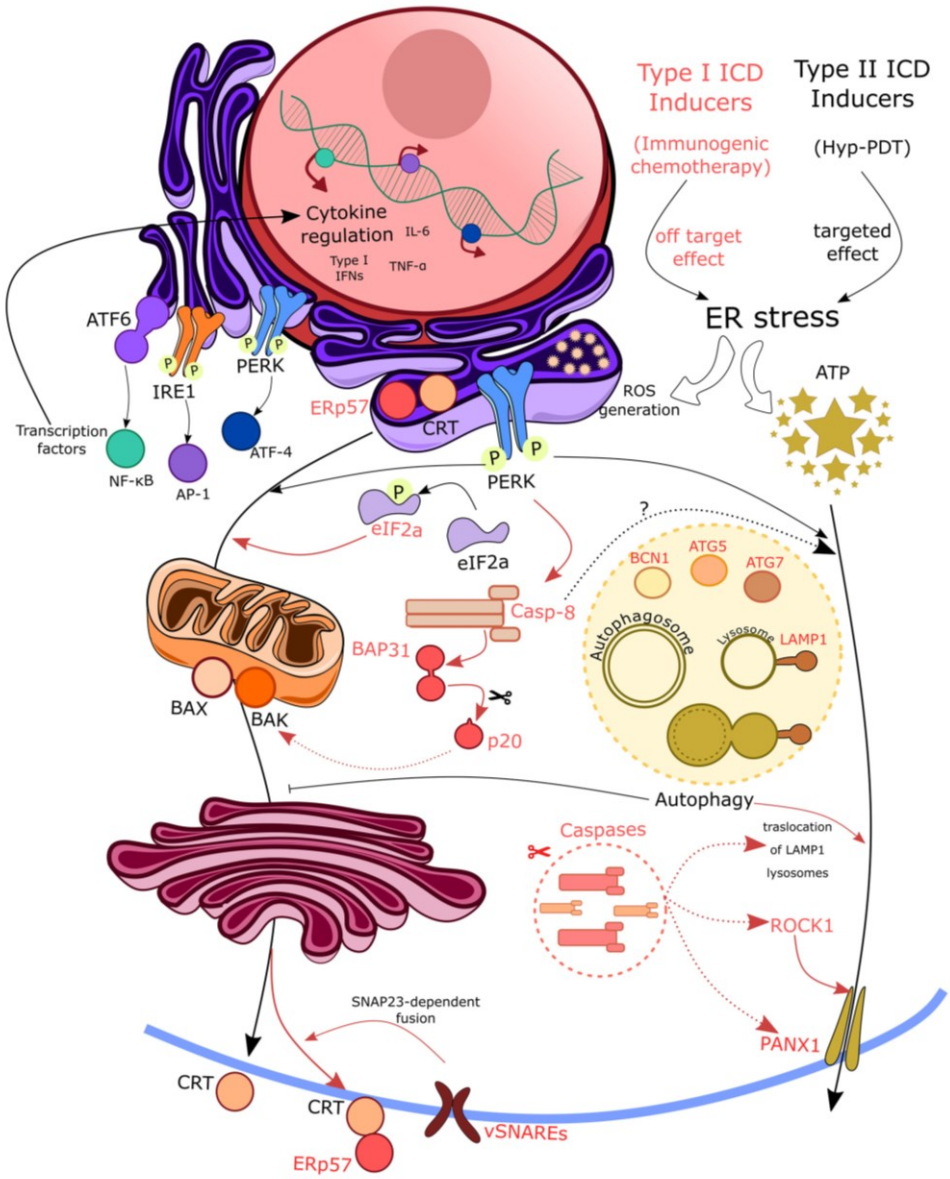
Pro indukci ICD nádorových buněk je zásadní aktivace stresu endoplasmatického retikula (ER) a produkce reaktivních kyslíkových intermediátů (angl. reactive oxygen species – ROS). Bylo prokázáno, že pokud je spuštěn ER stres bez produkce ROS, buněčná smrt není imunogenní (Krysko et al 2012, Martins et al 2011, Panaretakis et al 2009). To, jakým způsobem je ER stres spouštěn a jaké jsou aktivovány následné apoptotické dráhy, dělí induktory na dvě kategorie – na induktory I. a II. třídy **(Obr. 9).** Jako první byly charakterizovány a nejvíce prostudovány jsou induktory I. třídy z řad chemoterapeutik antracyklinů – mitoxantron, doxorubicin a idarubicin (Obeid et al 2007), později byl charakterizován inhibitor 26S proteasomu bortezomib (Spisek et al 2007) a cytostatika cyklofosfamid, oxaliplatina a paklitaxel. Také byla identifkována řada fyzikálních modalit způsobující imunogenní buněčnou smrt – nejdříve radioterapie, později krátkovlnné ionizující UVC záření (nikoliv UVA a UVB) a nejnověji i vysoký hydrostatický tlak. Mezi induktory I. třídy se dále řadí např. srdeční glykosidy (digoxin, digitoxin, ouabain a lanatosid C), rostlinná látka používaná v čínské medicíně shikonin, vorinostat, wogonin, EGFR specifická protilátka 7A7. Mezi induktory II. třídy patří fotodynamická terapie pomocí hypericinu (Hyp-PDT) a některé onkolytické viry (Adkins et al 2014, Garg et al 2015, Krysko et al 2012, Martins et al 2011). Souhrnně lze říci, že induktory I. třídy nevyvolávají přímo stres ER, ale působí na proteiny v jádře a v cytoplazmě. Aktivují nezávislé dráhy pro vystavení kalretikulinu a indukci apoptózy. Kdežto induktory II. třídy vyvolávají přímo ER stres a tím spouští proces apoptózy (Krysko et al 2012).

Zásadním krokem pro indukci imunogenní buněčné smrti je tedy navození ER stresu. Ten vzniká v případě narušení homeostázy způsobené např. produkcí ROS, snížení hladiny vápníku a zvýšenou hladinou nesprávně sbalených proteinů. Na základě těchto signálů jsou aktivované dráhy tzv. unfolded-protein response (UPR), které zahrnující zvýšenou translaci chaperonů, udržení vápníku v ER a zajištění oxidačního prostředí. V případě, že je narušení příliš silné, buňka aktivuje apoptotickou signalizaci, což vede k zániku buňky (Schroder 2008). V případě ICD nádorových buněk indukované antaryckliny, tedy induktory I. třídy, dochází k poklesu vápníku v ER a k aktivaci serin-threoninové kinázy PERK. Tato kináza fosforyluje cytoplasmatický protein eIF2α, následně je aktivována kaspáza-8, která štěpí protein endoplasmatického retikula BAP31 a tím dochází k aktivaci proapoptotických proteinů z rodiny Bcl – BAX a BAK. V této fázi dochází také přesunu kalretikulinu a proteinu Erp57 z ER do Golgiho aparátu a na plasmatickou membránu pomocí aktinu a váčků za přítomnosti SNARE proteinů např. SNAP23/25 a VAMP1. Zablokování

kteréhokoliv proteinu v této dráze inhibuje vystavení kalretikulinu na povrchu buňky. Kalretikulin zásadně podmiňuje imunogenicitu buněk a zajišťuje efektivní pohlcení odumřelých buněk pomocí APC. Pokud nedojde k vystavení kalretikulinu na povrchu umírající buňky, není aktivovaná imunitní odpověď (Panaretakis et al 2009, Zitvogel et al 2010). V případě indukce apoptózy antracykliny, mitoxantrem nebo oxaliplatinou je zásadní pro uvolnění ATP spuštění fagocytózy. Což potvrdila deplece autofagocytických proteinů ATG5, ATG7 and BCN1, která zabránila vylití ATP (Martins et al 2014, Michaud et al 2011).

Fotodynamická terapie pomocí hypericinu (Hyp-PDT) je nejvíce studovaným induktorem II. třídy. Tato metoda je založená na akumulaci fotosenzitivní látky hypericinu v ER a její následné aktivaci pomocí světla. Tato aktivace vede k produkci ROS přímo v ER a spuštění ER stresu. Následně dochází k aktivaci kinázy PERK, avšak na rozdíl od induktorů I. třídy nedochází k fosforylaci eIF2α ani k aktivaci kaspázy-8. Jsou však aktivovány proapototické proteiny BAX a BAK. Kalretikulin je transportován s pomocí PI3K (Fosfatidylinositol-3-kináza) na plasmatickou membránu velkém množství, stejně tak HSP70. Nádorové buňky jsou efektivně fagocytovány a aktivují DC. Také se zdá, že pro sekreci ATP není potřeba v tomto případě zapojení autofagocytické dráhy, ale PI3K (Garg et al 2011, Garg et al 2012a, Garg et al 2012b, Garg et al 2012c).

Je pravděpodobné, že v následujících letech budou objeveny další látky, které navozují ICD nádorových buněk a signalizační dráhy a podrobné mechanismy indukce ICD budou více popsány. Nové informace pomohou k pochopení složitého procesu indukce ICD a k širšímu využití ICD v protinádorové terapii. Nádorové buňky, zabité induktorem ICD, použité jako zdroj antigenů pro DC vakcínu mohou významně přispět k vylepšení účinnosti vakcíny a prolomit tak supresivní nádorové mikroprostředí. Pro výrobu DC vakcín je tedy potřeba vybrat ICD induktor, tak aby účinně zabíjel nádorové buňky a byl pro pacienta bezpečný a použitelný v klinické praxi. Jedním z takových ICD induktorů jsou vysoký hydrostatický tlak (HHP) nebo cytotoxická hypertermie (cHT).



Obr. 9 Mechanismy navození ICD a povrchové vystavení či sekrece DAMP. Mezi induktory ICD I. a II. typu jsou pozorovány rozdíly v signalizačních drahách, definované jejich vedlejším nebo cíleným účinkem na ER. Expozice proteinu kalretikulinu na plazmatické membráně po ošetření induktory ICD typu I je aktivována nepřímým vyvoláním ER stresu přes cytoplasmatické a jaderné proteiny. Dále dochází k produkci ROS, aktivaci PERK a následné fosforylaci eIF2α faktoru. Poté je štěpen protein BAP31 kaspázou-8. Během tohoto procesu jsou aktivovány proapototické proteiny BAX a BAK. Vystavení kalretikulinu na buněčný povrch je závislé na transportu pomocí váčku z ER do Golgiho aparátu a následně na plasmatickou membránu za přítomnosti SNARE proteinů. Kalretikulin je vystavován spolu s proteinem ERp57. Při použití induktorů typu II je přímo v ER indukován stres a spuštěna produkce ROS. Nedochází k fosforylaci eIF2α a aktivaci kaspázy 8, pouze k aktivaci BAX a BAK proteinů. Na rozdíl od induktorů I. třídy není u induktorů II. třídy vyžadováno zapojení autofagie pro sekreci ATP. Kalretikulin je vystavován na povrch buňky bez přítomnosti SNARE váčků a bez proteinu Erp57 (Serrano-Del Valle et al 2019).

2.7.3 Cytotoxická hypertermie

Hypertermie (HT) neboli tepelná terapie může být v onkologické léčbě podána lokálně např. lokální perfuze při léčbě melanomu nebo systemicky tzv. celobuněčná hypertermie (Hildebrandt et al 2002). K opůsobení nádorových buněk *in vitro* a testování jejích vlastností na stimulaci imunitního systému *in vivo* se hypertermie používá již od 70. let 20.století. V mnoha klinických studiích bylo ukázáno, že HT zvyšuje citlivost nádorových buněk k chemoterapii a radioterapii (Hildebrandt et al 2002), což vedlo k tomu, že v roce 2011 FDA schválila HT pro léčbu karcinomu děložního čípku před podáním radioterapie v klinické praxi.

Hypertermie aktivuje vrozenou i adaptivní imunitu, indukuje maturaci DC a jejich migraci, a také potencuje aktivaci a migraci T lymfocytů do sekundárních lymfatických tkání (Baronzio et al 2006, Frey et al 2012). Hypertermie nádorových buněk indukuje buněčnou smrt zprostředkovanou různými molekulárními mechanismy (Hildebrandt et al 2002, Milleron & Bratton 2007, Roti Roti 2008) a tento efekt je závislý na termální dávce (většina studií 41–44 °C), době tepelného působení (30 min. či 1 h), typu nádorových buněk a fázi buněčného cyklu (Hildebrandt et al 2002, Roti Roti 2008). Hypertermie (HT) ≤ 42 °C nádorových buněk zvyšuje jejich imunogenicitu vedoucí k aktivaci nádorově specifických T lymfocytů *in vitro* i *in vivo* v závislosti na zvýšené indukci proteinů teplotního šoku (angl. Heat shock proteins – HSP), typicky HSP70 (Clark & Menoret 2001, Feng et al 2002, Melcher et al 1998). Nicméně standartní HT ≤ 42 °C často vede k přežívání nádorových buněk a tzv. termální toleranci, jelikož aplikované teploty nejsou dostatečné k usmrcení všech buněk (Hildebrandt et al 2002). Velmi málo je známo o působení cytotoxické hypertermie (cHT) > 44 °C, i když terapeutické techniky jakými jsou např. radiofrekvenční ablace (Zerbini et al 2006) nebo ultrazvuková vysokofrekvenční terapie (Zhou 2011), používající vysoké tepelné působení, jsou v klinické onkologii používány na lokální bázi k eliminaci nádorů. Zásadní technický problém s použitím cHT je nepoškodit zdravou tkáň v okolí nádoru. V posledních letech byly vyvinuty další experimentální techniky, které umožňují fokusaci tepelného působení v místě nádoru jakými jsou např. magnetické nanopartikule nebo lipozómy obsahující tyto magnetické nanočástice (Ito et al 2006). HT nádoru založená na magnetických nanočástic o teplotě 50-55 °C dokázala indukovat abskopální efekt v Walker-256 krysím modelu sarkomu (Wang et al 2014).

Působení cHT na nádorové buňky bylo doposud z molekulárního hlediska jen velmi málo prozkoumáno. V naší práci jsme ukázali, ze cHT indukuje imunogenní buněčnou smrt a takto ošetřených nádorových buněk lze využít pro přípravu DC vakcíny. Nicméně

v současnosti není známo, jestli dochází k indukci imunogenní buněčné smrti nádorových buněk přímo v pacientech.

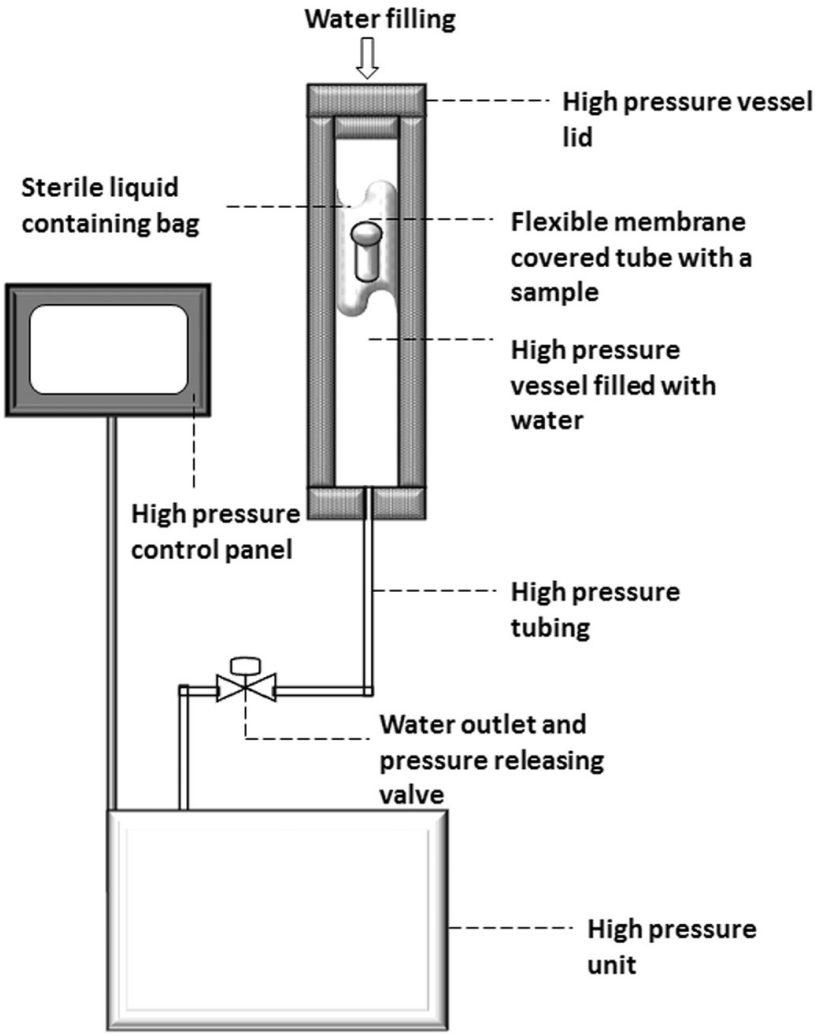
2.7.4 Vysoký hydrostatický tlak

Vysoký hydrostatický tlak (angl. high hydrostatic pressure – HHP) je tlak kapaliny způsobený její tíhou a působí všemi směry. HHP do 100 MPa je považován za fyziologický a změny, které způsobí jsou reverzibilní. Takový tlak je přibližně v hloubce 10 km po mořem. Nejvyšší hydrostatický tlak na zemi je tedy v Mariánském příkopu a to 108,6 MPa, což je 1000 x více než na povrchu země, kde je tlak 0,1 MPa. Laboratorně bylo prokázáno, že HHP v rozmezí 100-150 MPa způsobuje apoptózu myších buněk, tlak mezi 150-250 MPa indukuje apoptózu u lidských buněk, a působení tlaku mezi 300-400 MPa vede k nekróze buněk (Aertsen et al 2009, Frey et al 2008). HHP je využíván ke sterilizaci potravin, kdy dochází ke zničení bakterií a kvasinek, při zachování chuťových vlastností i vitaminů a bez nutnosti použít chemikálie, tepelné ošetření nebo radiaci (Rastogi et al 2007). V biomedicíně je použití HHP vhodná procedura pro sterilizaci kostních transplantátů, chrupavek a vazů (Diehl et al 2008). HHP byl také testován pro výrobu virových a bakteriálních vakcín (Masson et al 2001, Shearer & Kniel 2009). V neposlední řadě je nyní HHP využíván pro usmrcení nádorových buněk a následnou výrobu vakcín pro terapii nádorových onemocnění (Adkins et al 2018, Fucikova et al 2014).

Během působení HHP dochází k rozkladu sil mezi částicemi kapaliny, a tlak působí na ponořená tělesa rovnoměrně všemi směry a nezávisle na tvaru ponořeného objektu. Zároveň je tento tlak přenášen i přes flexibilní membrány a buňky tak mohu být odděleny od tlakované kapaliny (Weiss et al 2012). Technologie používaná pro usmrcení buněk pro výrobu vakcíny musí splňovat přísné GMP podmínky. Celý přístroj musí být umístěn v tzv. čistých prostorech pro výrobu sterilních léčiv a vše musí být omyvatelné. Zařízení je schematicky znázorněno na **Obr. 10**.

Buněčná suspense je ve sterilních podmínkách přenesena to plastové zkumavky. Zkumavka je uzavřena pružnou membránou, aby mohlo dojít k přenosu tlaku bez prasknutí vialky. Tato vialka je umístěna do plastového váčku, který je také naplněn kapalinou, aby při procesu tlakování nemohlo dojít ke kontaminaci. Zkumavka v plastovém sáčku je umístěna to komory, která se napustí vodou a neprodyšně se uzavře. Následně je tato komora natlakována pomocí tlakovací jednotky na požadovaný tlak. Tlak v komoře ustaven během pár sekund a je uniformní v celém prostoru komory. Tlak je možné udržet v požadované výši přesně danou dobu. Pro usmrcení buněk pro výrobu vakcíny je využíváno tlaku 150-300

MPa po dobu několika minut. Většina zařízení však dokáže vyvinout tlak až 800MPa (Adkins et al 2018, Diehl et al 2008, Korn et al 2004). Tlak je pro většinu účelů konstantní po celou dobu působení. Po skončení tlakování je tlak vrácen na původní hladinu během opět během pár sekund. Byli však vyvinuté i přístroje, které dokáží tlak dynamicky měnit a nebo pulsovat (Izydor et al 2017). Celý proces tlakování je obvykle možné sledovat na monitoru a zaznamenávat pro pozdější kontrolu.



Obr. 10 Schématické znázornění zařízení na generování vysokého hydrostatického tlaku. Buňky v suspenzi jsou umístěny do zkumavky s pružným uzávěrem, tato zkumavka je vložena do sáčku, který je naplněn fyziologickým roztokem. Sáček je umístěn do komory, která je před natlakováním naplněna vodou. Tento kontejner je pomocí tlakovací jednotky natlakována na definovaný tlak po danou dobu. Aktuální tlak a celý průběh tlakování je možné sledovat na řídícím panelu (Adkins et al 2018).

Vzhledem k tomu, že takto vysoký tlak není možné použít přímo jako léčebnou modalitu, je využíváno jeho vlastností zabíjet nádorové buňky účinně, asepticky a bez nutnosti použití chemikálií pro výrobu imunoterapeutických vakcín. Nejdříve byly HHP ošetřené nádorové buňky testovány jako imunogenní vakcína samy o sobě a později byly

implementovány do protokolu pro výrobu vakcíny na bázi dendritických buněk jako imunogenní zdroj antigenu (Adkins et al 2018).

Na poli protinádorové terapie se výzkumu vlivu HHP na nádorové buňky věnovala skupina Meira Shinitzkeho, která ukázala, že hydrostatický tlak o síle 120-150 MPa vede k usmrcení a zvýšení imunogenicity u leukemické myší linie EL-4. Tlakem ošetřené a ozářené EL-4 buňky významně oddálily vývoj nádoru a zvýšili přežití v myším nádorovém modelu po inokulaci EL-4 buněk (Richert et al 1986). Tato skupina také ukázala, že myší nádorové buňky zabité HHP 120 MPa a ošetřené chemickými činidlem adenosin dialdehyd, které propojuje membránové proteiny, případně v kombinaci s N-redukčním činidlem acetyl-L-cysteinem indikují imunitní dopověď, zabraňují růstu nádoru i plicních metastáz (Eisenthal et al 1993, Goldman et al 2000). V další studii bylo potvrzeno, že takto ošetřené lidské buňky aktivují imunitní odpověď *in vitro* (Eisenthal et al 1998).

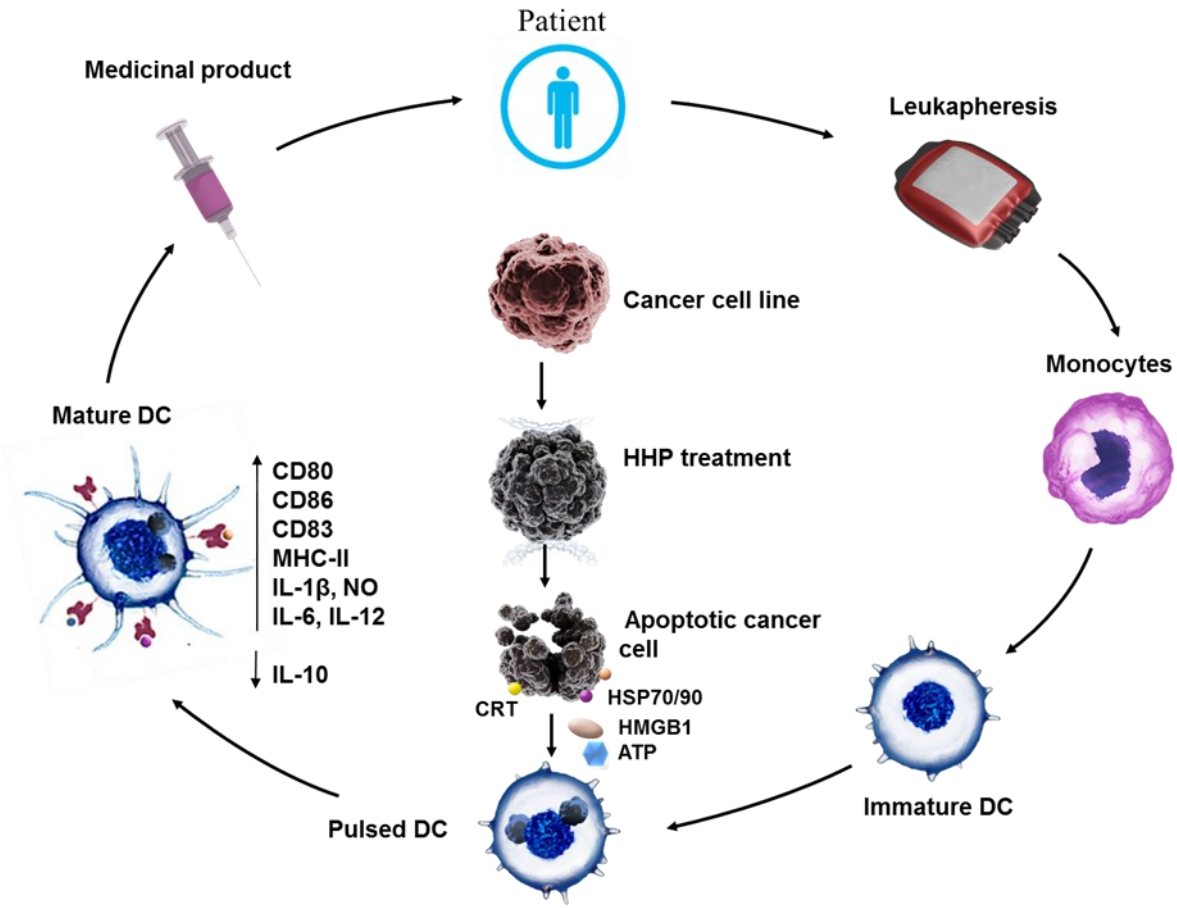
V následujících letech se detailně použití HPP pro terapii pomocí buněčných vakcín věnovaly skupiny Udo S. Gaipla a Brendana Freye, kteří ukázali, že HHP mezi 150 MPa a 300 MPa indukuje jak apoptózu, tak nekrózu u myších i lidských nádorových liniích. Dále bylo prokázáno, že HHP nad 200 MPa buňky inaktivuje a nejsou schopné se replikovat a tvořit kolonie. Zastoupení jednotlivých typů smrti a časový průběh buněčné smrti se mezi liniemi liší. Buňky ošetřené HHP vyšším než 200 MPa indukovaly v myších tvorbu specifických protilátek. Tato data ukázala, že použití HHP na usmrcení nádorových buněk pro výrobu buněčné vakcíny je bezpečné, reprodukcibilní a buňky jsou schopné vyvolat imunitní odpověď (Frey et al 2004, Korn et al 2004, Weiss et al 2010a, Weiss et al 2010b).

Dále se výzkumu HHP a jeho využití v nádorové imunoterapii věnovala s námi spolupracující skupina Jitky Palich Fučíkové. Tato skupina identifikovala, že smrt indukovaná HHP vykazuje všechny základní znaky imunogenní buněčné smrti (Fucíková 2014). Bylo prokázáno, že u lidských nádorových buněk prostaty, ovarií a akutní myeloidní leukemie dochází po ošetření vysokým hydrostatickým tlakem o hodnotě 150-250 MPa k rychlé translokaci chaperonových proteinů kalretikulinu, HSP70 a HSP90 na povrch buněk. V prvních hodinách po indukci smrti byla prokázána i k sekrece ATP a po 48 hodinách uvolněné proteinu HMGB1 z ošetřených buněk.

HHP ošetřené nádorové buňky jsou ve velké míře fagocytovány DC a potencují jejich maturaci. Bylo detekováno zvýšení kostimulačních molekul CD83, CD86 a HLA-DR na povrchu DC a také produkce cytokinů IL-12p70, IL-6, IL-1β a TNF-α. Aktivované DC jsou schopné stimulovat produkci IFN-γ a proliferaci autologních T lymfocytů *in vitro* bez zvýšení počtu T regulačních lymfocytů a produkce cytokinů IL-10 a IFN-α (Fucikova et al

2014). Mechanismus indukce imunogenní buněčné smrti je stejně jako u antracyklinů závislý na produkci ROS, fosforylaci faktoru eIF2α pomocí kinázy PERK a aktivaci kaspázy 8. Zásadní je navíc aktivace kaspázy 2, jejíž inhibice vede k blokaci vystavování kalretikulinu na buněčném povrchu, a tedy i k se snížení imunogenicity (Fucikova et al 2014, Moserova et al 2017). Následně byla schopnost aktivovat imunitní systém a potencovat protinádorovou odpověď potvrzena v *in vivo* myších studiích. DC pulsované HHP ošetřenými myšími nádorovými liniemi byly testovány v TC-1 modelu (HPV pozitivní plicní linie) a TRAM-C2 modelu (prostatická linie). V obou modelech byla prokázána účinnost DC vakcíny v kombinaci s docetaxelem (Mikyskova et al 2016). Profylaktická vakcinace myší pomocí DC vakcíny pulzované HHP ostřenými buňkami vytváří protektivní imunitu a zpomaluje růst nádorů CT26 (kolorektální karcinom) a LL2 (plicní karcinom) (Moserova et al 2017).

V návaznosti na tyto výsledky byl v našich laboratořích vyvinut protokol pro přípravu DC vakcíny a jako zdroj antigenu byly použity nádorové linie ostřené HHP (**Obr. 11**). Bylo prokázáno, že tento protokol je bezpečný a vakcínu lze opakovaně vyrobit v dostatečném množství. DC vakcínu lze navíc také zamrazit bez ztráty účinnosti. Výhoda HHP spočívá právě v jeho bezpečnosti a jednoduchém použití a možnosti standardizace. Pro získáni imunogenního zdroje antigenu nemusí být použita žádná chemoterapeutika ani záření, proto je pro přípravu DC vakcín tato metoda vhodnější než použití jiných induktorů ICD. Po optimalizaci a zavedení protokolu byly spuštěny klinické studie testující DC vakcínu s využitím HHP ošetřených nádorových linií pro léčbu pacientů s karcinomem prostaty a ovarií, a to jak v monoterapii, tak i v kombinaci s chemoterapií. Postup výroby vakcíny je univerzální a přenositelný i na jiné typy maligních onemocnění. Je však potřeba přizpůsobit výběr nádorové linie danému typu onemocnění, tak aby bylo pokryto co nejširšími spektrum nádorových antigenů. Zároveň je nutné upravit sílu HHP, kterým budou buňky usmrcené, aby se dosáhlo kompletní inaktivace buněk při zachování imunogenicity a antigenů v buňce. Použití HHP pro výrobu funkční vakcíny na bázi dendritických buněk pro léčbu NSCLC je jedním z hlavních témat experimentální části této disertační práce.



Obr. 11 Příprava autologní DC vakcíny s využitím HHP ošetřených nádorových buněk. Alogenní nádorové linie jsou usmrceny HHP. Během následujících několika hodin dochází u vystavení molekul kalretikulinu, HSP70 a HSP90 na povrch nádorových buněk a sekreci ATP a HMGB1. Zabité imunogenní nádorové buňky jsou kultivovány s pacientskými DC, které byly vyrobeny z monocytů získaných při leukaferéze. DC pulzované nádorovými buňkami jsou maturovány pomocí poly(I:C). Takto připravené DC exprimují kostimulační molekuly CD80, CD86, CD83 a MHC II molekuly a produkují prozánětlivé cytokiny IL-1β, IL-12, IL-6. Vakcína je rozdělena do několika dávek a zamrazena. Každá jednotlivá dávka je pak následně dopravena k pacientovi v den podání.

3 CÍLE PRÁCE

Teoretická část této disertační práce shrnuje současné poznatky v oblasti léčby NSCLC se zaměřením na imunoterapii pomocí vakcín založených na dendritických buňkách a jejích přípravu. Hlavními cíli této práce byl vývoj a charakterizace DC vakcíny za použití plicních nádorových linií ošetřených modalitami způsobující imunogenní buněčnou smrt jakými jsou HHP a cHT. Cílem byla dále analýza nádorových antigenů primárních plicních nádorových buněk a buněčných linií a detekce buněčných odpovědi u pacientu s NSCLC. Výsledky byly shrnuty ve čtyřech hlavních publikacích:

- **Využití vysokého hydrostatického tlaku pro výrobu vakcíny na bázi dendritických buněk pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic (**Generation of dendritic cell-based vaccine using high hydrostatic pressure for non-small cell lung cancer immunotherapy).

Cílem bylo vývoj a charakterizace DC vakcíny pulsované HHP ošetřenými plicními nádorovými liniemi pro výrobu v GMP režimu. Antigenně specifické T buněčné odpovědi byly analyzovány.

- **Vysoký hydrostatický tlak ovlivňuje množství antigenů v nádorových buňkách: význam pro imunoterapii pomocí dendritických buněk (**Detection of tumor antigens and tumor-antigen specific T cells in NSCLC patients: Correlation with the quality of T cell responses with NSCLC subtype).

Cílem bylo ustanovit podmínky pro HHP ošetření nádorových linií k dosažení maximálního zabíjení nádorových buněk, jejich optimální imunogenicity a minimální antigenní ztráty, která HHP ošetření v závislosti na rozsahu působeného tlaku může doprovázet.

- **Cytotoxická hypertermie indukuje imunogenní smrt nádorových buněk (**Severe, but not mild heat-shock treatment induces immunogenic cell death in cancer cells).

Cílem bylo zjistit, zda cHT indukuje imunogenní smrt nádorových buněk a představuje tak vhodnou modalitu k přípravě imunogenních nádorových buněk pro pulzaci dendritických buněk na výrobu terapeutických vakcín.

- **Detekce nádorových antigenů a specifických T lymfocytů u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic: korelace T buněčné odpovědi se subtypem nemalobuněčného karcinomu plic (**High hydrostatic pressure affects antigenic pool in tumor cells: Implication for dendritic cell-based cancer immunotherapy).

Cílem bylo srovnat antigenní profil plicních nádorových linií využívaných k přípravě DC vakcíny s antigenní profilem primárních plicních nádorů a analyzovat antigenně specifické $CD8^+$ a $CD4^+$ T lymfocyty v krvi pacientů s NSCLC.

4 SEZNAM POUŽITÝCH METOD

V této práci byly použity následující metody:

Buňky a buněčné kultury

Kultivace nádorových linií

Příprava lidských dendritických buněk a pulzace nádorovými buňkami ošetřenými HHP a cHT

Izolace lidských T lymfocytů pro antigenně specifickou stimulaci

Kolonyformní test

Průtoková cytometrie

Detekce apoptózy

Detekce imunogenních molekul

Imunofenotypizace buněk

Detekce chemotaxe buněk

Detekce fagocytózy nádorových buněk

Nádorová tkáň a periferní krev

Mechanické a enzymatické zpracování primární nádorové a nenádorové plicní tkáně

Zpracování periferní krve a isolace monocytů a T lymfocytů

Cytokiny/chemokiny

Detekce cytokinů pomocí ELISA a metodou Luminex (MILLIPLEX cytokinový/chemokinový kit)

Detekce HMGB1 (ELISA) a ATP (bioluminiscence)

Molekulárně biologické metody

Isolace mRNA

Detekce antigenní exprese pomocí RT-PCR

Veškeré metody použité v experimentální části disertační práce jsou detailně popsány v přiložených publikacích.

5 PUBLIKACE

Seznam primárních publikací souvisejících s dizertační prací:

Hradilova N, Sadilkova L, Palata O, Mysikova D, Mrazkova H, Lischke R, Spisek R, Adkins I. (2017) Generation of dendritic cell-based vaccine using high hydrostatic pressure for non-small cell lung cancer immunotherapy. *PLoS One*. 12(2):e0171539 **IF 2017:2,7**

Urbanova L, **Hradilova N**, Moserova I, Vosahlikova S, Sadilkova L, Hensler M, Spisek R, Adkins I. (2017) High hydrostatic pressure affects antigenic pool in tumor cells: Implication for dendritic cell-based cancer immunotherapy. *Immunol Lett.* 187:27-34 **IF 2017:2.4**

Adkins I, Sadilkova L, **Hradilova N**, Tomala J, Kovar M, Spisek R. (2017) Severe, but not mild heat-shock treatment induces immunogenic cell death in cancer cells. *Oncoimmunology* 6(5):e1311433 **IF 2017:4,2**

Palata O, **Podzimkova Hradilova N**, Mysiková D, Kutna B, Mrazkova H, Lischke R, Spisek R, Adkins I. (2020) Detection of tumor antigens and tumor-antigen specific T cells in NSCLC patients: Correlation with the quality of T cell responses with NSCLC subtype. *Immunol Lett.* 219:46-53 **IF 2020: 3,3**

Seznam souhrnných publikací přímo souvisejících s disertační prací:

Adkins I, **Hradilova N**, Palata O, Sadilkova L, Palova-Jelinkova L, Spisek R. (2018) High hydrostatic pressure in cancer immunotherapy and biomedicine. *Biotechnol Adv.* 36(3):577-582 **IF 2018: 12,8**

Seznam dalších publikací:

Myšíková D, Adkins I, **Hradilová N**, Palata O, Šimonek J, Pozniak J, Kolařík J, Skallová-Fialová A, Špíšek R, Lischke R. (2017) Case-Control Study: Smoking History Affects the Production of Tumor Antigen-Specific Antibodies NY-ESO-1 in Patients with Lung Cancer in Comparison with Cancer Disease-Free Group. *J Thorac Oncol*. 12(2):249-257 **IF 2017: 10,3**

Palata O, **Hradilova Podzimkova N,** Nedvedova E, Umprecht A, Sadilkova L, Palova Jelinkova L, Spisek R, Adkins I. (2019) Radiotherapy in Combination With Cytokine Treatment. *Front Oncol.* 9:367. **IF 2018: 4,3**

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledky byly shrnuty ve čtyřech hlavních publikacích, které byly otištěny v recenzovaných zahraničních časopisech. V následujících kapitolách jsou shrnuty hlavní výsledky práce, jejich srovnání s výsledky dosaženými jinými vědeckými týmy, pokud jsou známé, a hodnocen význam v kontextu současného poznání.

6.1 Příloha 1: Využití vysokého hydrostatického tlaku pro výrobu vakcíny na bázi dendritických buněk pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic

Karcinom plic, který je charakterizován špatnou prognózou a vysokou mortalitou, patří mezi jedno z nejčastějších nádorových onemocnění na světě (Mellstedt et al 2011, Oliveres et al 2018). Využití vakcín na bázi dendritických buněk (DC vakcína) pro léčbu NSLC bylo ve velmi omezené míře testováno preklinicky několika vědeckými týmy (Chang et al 2005, Kontani et al 2003), a také v několika klinických studiích fáze I (Babatz et al 2006, Morse et al 2005, Perroud et al 2011, Skachkova et al 2013, Takahashi et al 2013, Ueda et al 2004, Um et al 2010b). Příprava těchto DC vakcín se omezovala většinou pouze na využití směsi rekombinantních proteinů či peptidů z nádorově specifických antigenů. Dalším přístupem bylo využití buněčných lyzátů nádorových buněk po ošetření UVB zářením (Hirschowitz et al 2007, Hirschowitz et al 2004, Hirschowitz et al 2011, Yannelli et al 2005). UVB záření na rozdíl od vysokého hydrostatického tlaku (HHP) neindukuje imunogenní buněčnou smrt, která se ukázala být velmi efektivní v navození protinádorové imunity (Adkins et al 2014).

V této práci jsme testovali vlastnosti DC připravených v bezsérovém mediu X-VIVO, které lze použít pro výrobu DC vakcíny v GMP kvalitě. Takto připravené DC byly pulsovány plicními nádorovými liniemi ošetřenými HHP. Ukázali jsme, že HHP 250 MPa indukuje imunogenní buněčnou smrt plicních nádorových buněk. Pulsované DC zvyšují expresi kostimulačních molekul CD80, CD83, CD86 a HLA-DR molekul, zvyšují schopnost fagocytózy, chemotaktické migrace a indukují expresi CCR7, důležitého receptoru pro chemokiny. Také produkce prozánětlivých cytokinů IL-12p70, TNF-α a IFN-α podstatných pro rozvoj protinádorové imunity byla detekována. Všechny tyto parametry jsou důležité pro funkčnost DC jako zprostředkovatele T buněčné stimulace a navození protinádorové odpovědi. Pulsované DC stimulované poly(I:C) si zachovaly funkční plasticitu a byly schopné další aktivace po vystavení jiným maturačním agens jako např. LPS nebo CD40L, což je důležité pro aktivitu DC vakcíny po podání pacientovi. Takto připravená vakcína byla dále testována na schopnost aktivovat antigenně-specifické T buněčné odpovědi v krvi

zdravých dárců a pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic. Za použití specifického antigenního systému založeného na plicní linii A549 exprimující MP1 protein viru chřipky jsme ukázali, že antigen z HHP ošetřených nádorových linií je po pulzaci prezentován dendritickou buňkou antigen-specifickým $CD8^+$ T buňkám. Tyto specifické $CD8^+$ T lymfocyty byly detekovány průtokovou cytometrií pomocí specifických tetramerů ($MP1_{58-66}$-HLA-A∗201). $CD8^+$ a $CD4^+$ T lymfocyty nádorově specifické pro antigeny pocházející z plicních linií jakými jsou např. hTERT, MAGE-A4, MAGE-A3, MUC1 nebo Survivin byly detekovány v krvi pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic. Klinické studie založené na použití podobných peptidových či proteinových vakcín ukázaly klinický benefit a aktivací nádorově specifických T lymfocytů (Babatz et al 2006, Perroud et al 2011, Ueda et al 2004). V naší práci jsme na závěr ukázali, že HHP vakcína na bázi dendritických buněk připravená z monocytů pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic dokáže stimulovat autologní T buněčné odpovědi bez indukce supresivních T regulačních lymfocytů. Schopnost navození protinádorového terapeutického účinku HHP-DC vakcíny byla ukázána v myším modelu (Mikyskova et al 2016), nicméně antigenně specifické T buněčné odpovědi nebyly dosud analyzovány.

Celkově naše výsledky ukázali, že vakcína na bázi dendritických buněk je funkční a splňuje podmínky pro výrobu v GMP podmínkách. Dále jsme ukázali, že HHP je vhodná modalita pro aseptické zabíjení plicních nádorových buněk, která jim udílí imunogenní vlastnosti, a ty mohou být dále potencované přídavkem poly(I:C). Tato práce vytvořila preklinický základ pro fázi I klinického testování DCVAC/LuCa přípravku (NCT02470468). Výsledky této klinické studie v roce 2018 ukázaly signifikantní zlepšení celkového přežití a přežití bez progrese u pacientů stádia IV nemalobuněčného karcinomu plic léčených DCVAC/LuCa v kombinaci s chemoterapií ve srovnání se skupinou pacientů léčených pouze chemoterapií. Tyto výsledky potvrzují, že imunoterapie pomocí vakcíny na bázi dendritických buněk je bezpečná a vhodná v kombinaci s chemoterapií pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic a potvrzují význam preklinického výzkumu pro design klinického testování.

Vlastní přispění: *návrh většiny experimentů a jejich provedení RT-PCR detekce nádorových antigenů, příprava DC, migrační a stimulační pokusy s DC, fenotypizace DC po pulzaci HHP ošetřenými nádorovými buňkami, analýza fagocytické schopnosti DC, analýza imunogenní buněčné smrti nádorových buněk, návrh a nastavení cytometrických panelů, veškeré cytometrické analýzy a jejich hodnocení včetně statistického zhodnocení, detekce*

antigenně specifických $CD8^+$ a $CD4^+$ T lymfocytů, T regulačních lymfocytů, restimulace T lymfocytů, výroba DC vakcíny z krve pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic, soupis metod a částí manuskriptu.

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Generation of dendritic cell-based vaccine using high hydrostatic pressure for non-small cell lung cancer immunotherapy

Nada Hradilova[1,2], Lenka Sadilkova[1], Ondrej Palata[1,2], Dagmar Mysikova[3], Hana Mrazkova[3], Robert Lischke[3], Radek Spisek[1,2], Irena Adkins[1,2]*

1 SOTIO, Prague, Czech Republic, **2** Department of Immunology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic, **3** Thoracic and Lung Transplantation Division, 3rd Department of Surgery, 1st Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

* adkins@sotio.com

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Hradilova N, Sadilkova L, Palata O, Mysikova D, Mrazkova H, Lischke R, et al. (2017) Generation of dendritic cell-based vaccine using high hydrostatic pressure for non-small cell lung cancer immunotherapy. PLoS ONE 12(2): e0171539. doi:10.1371/journal.pone.0171539

Editor: Hiroshi Shiku, Mie University Graduate School of Medicine, JAPAN

Received: May 22, 2016

Accepted: January 22, 2017

Published: February 10, 2017

Copyright: © 2017 Hradilova et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: The authors declare that this study was supported by Sotio a.s. This study was further supported by the Charles University in Prague, Czech Republic, project GAUK No. 458216 granted to OP. This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials. The specific roles of these authors are articulated in the 'author contributions' section.

Abstract

High hydrostatic pressure (HHP) induces immunogenic death of tumor cells which confer protective anti-tumor immunity *in vivo*. Moreover, DC pulsed with HHP-treated tumor cells induced therapeutic effect in mouse cancer model. In this study, we tested the immunogenicity, stability and T cell stimulatory activity of human monocyte-derived dendritic cell (DC)-based HHP lung cancer vaccine generated in GMP compliant serum free medium using HHP 250 MPa. DC pulsed with HHP-killed lung cancer cells and poly(I:C) enhanced DC maturation, chemotactic migration and production of pro-inflammatory cytokines after 24h. Moreover, DC-based HHP lung cancer vaccine showed functional plasticity after transfer into serum-containing media and stimulation with LPS or CD40L after additional 24h. LPS and CD40L stimulation further differentially enhanced the expression of costimulatory molecules and production of IL-12p70. DC-based HHP lung cancer vaccine decreased the number of $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T regulatory cells and stimulated IFN-γ-producing tumor antigen-specific $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells from non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. Tumor antigen specific $CD8^+$ and $CD4^+$ T cell responses were detected in NSCLC patient's against a selected tumor antigens expressed by lung cancer cell lines used for the vaccine generation. We also showed for the first time that protein antigen from HHP-killed lung cancer cells is processed and presented by DC to $CD8^+$ T cells. Our results represent important preclinical data for ongoing NSCLC Phase I/II clinical trial using DC-based active cellular immunotherapy (DCVAC/LuCa) in combination with chemotherapy and immune enhancers.

Introduction

Lung carcinoma represents the leading cause of cancer mortality worldwide with dismal prognosis as the majority of patients are diagnosed in an advanced stage [1]. This disease can be divided into non-small cell lung carcinoma (NSCLC) (80–85%) and small cell carcinoma (15–20%). NSCLC is represented by three major histological subtypes such as adenocarcinoma

Competing interests: IA, NH, LS, OP and RS are employees of Sotio a.s., Prague, Czech Republic. This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials. The funder provided support in the form of salaries for authors [IA, NH, OP, LS, RS], but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

(50%), squamous cell carcinoma (30%) and large cell carcinoma (5%). Despite advances in surgery, chemotherapy and irradiation the 5-year survival rate has only increased from 5% to 15% over the last 25 years [2]. Therefore the development of new therapeutic strategies in treatment of lung carcinoma is essential. DCs play a key role in inducing and shaping of immune responses and have proven to be crucial in inducing anti-tumor immunity [3, 4]. Since the first DC-based clinical trial in 1995 [5], the technique of *ex vivo* DC manufacturing have developed leading to a large-scale production which conforms to strict regulatory agencies and Good Manufacturing Practices (GMP) requirements. The success of DC-based cancer immunotherapy was documented by FDA approval of Sipuleucel-T (Provenge) for treatment of patients with asymptomatic or minimally symptomatic metastatic castration-resistant prostate cancer in 2010 [6]. Contrary to other malignancies, there are little data on DC-based immunotherapy of lung carcinoma in patients [3]. Several phase I studies for NSCLC treatment were conducted over the past 10 years using DC generated according to various protocols and loaded with TAA-derived peptides [7–10], proteins [11] or tumor cell lysate [12–14, 2]. Surprisingly, only one research group used irradiated and UVB-treated allogeneic whole tumor cells to generate DC-based lung cancer vaccine [15–18]. These studies proved that DC-based lung cancer immunotherapy is safe and well tolerated and in some patients clinical benefit was observed [12, 13, 8, 7, 19]. There are only two studies published so far that have documented prolonged overall survival of NSCLC patients [14, 10].

The success of DC-based cancer immunotherapy depends on the range of TAA presented by DC and the capacity of DC to produce cytokines such as IL-12p70 and provide costimulation to T cells [3]. Several cancer chemotherapeutics and cell death-inducing physical modalities have been described to induce immunogenic cell death (ICD) of tumor cells [20, 21]. Tumor cell ICD is characterized by induction of endoplasmic reticulum stress response, production of reactive oxygen species and surface exposure/emission of danger-associated molecules such as calreticulin, heat shock proteins, HMGB1 or ATP [22, 20, 23]. Tumor cells undergoing ICD activate various immune cells including DC to stimulate anti-tumor immune responses [20, 23]. We have previously shown that the application of high hydrostatic pressure (HHP) on human cancer cell lines and primary tumor cells induces ICD [24]. Human monocyte-derived DC pulsed with HHP-killed tumor cells displayed increased expression of maturation-associated molecules and pro-inflammatory cytokine production which resulted in stimulation of IFN-γ-producing $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells *in vitro* [24]. Moreover, DC loaded with HHP-treated tumor TC-1 or prostate tumor cells TRAMP-C2 combined with docetaxel chemotherapy significantly inhibited growth of tumors in mouse models [25].

In this study, we describe the generation of human DC-based lung cancer vaccine in serum free GMP-compliant media X-VIVO 15 using HHP-killed lung cancer cell lines H520 and H522 as source of TAA and poly(I:C) as a DC maturation signal. DC-based HHP lung cancer vaccine exhibited functional plasticity after additional stimulation in serum containing medium with LPS or CD40L and was fully competent to stimulate $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells. Moreover, DC-based HHP vaccine generated from NSCLC patients induced tumor antigen-specific $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell responses *in vitro*. $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells specific to selected tumor antigens expressed in H520 and H522 were detected in NSCLC cancer patients. Importantly, we showed here for the first time that DC process and present protein antigen from HHP-killed tumor cells to induce antigen-specific $CD8^+$ T cells. These data represent preclinical data for ongoing phase I/II NSCLC clinical trial combining DC-based active cellular immunotherapy with chemotherapy and immune enhancers (NCT02 470468).

Methods

Non-small cancer cell lines

The non-small cell lung cancer cell lines H520 (squamous cell carcinoma), H522 and A549 (adenocarcinoma) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, USA). H520 and H522 were cultivated at 37˚C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 in RPMI-1640 complete medium (Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (PAA), 2 mM GlutaMAX I CTS (Gibco) and 100 U/ml penicillin + 100 mg/ml streptomycin (Gibco). A549 cells were grown in F12 medium (Gibco) supplemented as described above.

Preparation of HHP-killed cancer cells

2×10^6 lung cancer cells were killed with high hydrostatic pressure (HHP) of 250 MPa for 10 minutes using a custom-made device (Resato International BV, Netherlands) located in the GMP manufacturing facility of Sotio, Prague, Czech Republic. After the HHP treatment cells were further incubated at 37˚C for 2 h. Cells were collected by centrifugation (1500 rpm, 5 min), resuspended in 1 ml of CryoStor™ CS-10 (BioLife Solution) and stored at -80˚C for 24h. HHP-killed cells were thawed and washed twice with serum free media X-VIVO 15 (supplemented with recombinant transferrin, Lonza) before addition to DC. The induction of cell death and the exposure of immunogenic molecules (HSP70, HSP90 and calreticulin) by HHP were determined by flow cytometry (S1 Fig).

Generation of DC-based HHP lung cancer vaccine

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from buffy coats of healthy donors by Ficoll-Paque gradient centrifugation (GE Healthcare). 75×10^6 PBMCs/flask in 10 ml of serum free GMP-compliant media X-VIVO 15 (supplemented with transferrin, Lonza) were plated in 75 cm^2 culture flasks (Nunc) at 37˚C and monocytes were allowed to adhere to the flask bottom for 2 h. The non-adherent fraction containing lymphocytes was collected and stored short-term at -80˚C. Monocyte-derived DC were generated in X-VIVO 15 for 4 days [26] in the presence of 500 IU/ml of GM-CSF and 20 ng/ml of IL-4 (both from Gentaur). To generate DC-based HHP lung cancer vaccine, 2×10^5 immature DC/well seeded in 96-well plate (Nunc) were incubated with an equal mixture (1 H520:1 H522) of thawed HHP-killed lung cancer cell lines at a DC/tumor cells ratio of 5:1 for 4 h. After that poly(I:C) (25 μg/ml, VacciGrade™ InvivoGen) was added for additional 20 h.

Phenotype and cytokine production of DC-based HHP lung cancer vaccine

DC maturation after pulsation with HHP-killed cancer cells alone or after pulsation with HHP-killed cancer cells and poly(I:C) (DC-based HHP lung cancer vaccine) was evaluated by flow cytometry. DC phenotype was determined by staining with CD80-FITC, CD86-PE, CD83-PE-Cy5.5 (Beckman Coulter), CCR7 (CD197)-APC-eFluor780 (eBioscience), CD11c-APC (Exbio) and HLA-DR-PE-Cy7 (BD Biosciences) for 20 min. Cells viability was detected with DAPI staining. $CD11c^+$DAPI negative DC were analyzed for mean fluorescence intensity (MFI) of the particular maturation marker. To determine cytokine production, cell supernatants were harvested 24 h after DC's stimulation and stored at -80˚C. IL-12p70, IL-10, IFN-α and TNF-α were determined using Luminex assay (MILLIPLEX™ Human Cytokine/Chemokine Kit, Merck Millipore) by Luminex 2000 (Luminex).

Migration and phagocytic capacity of DC-based HHP lung cancer vaccine

Migratory capacity of DC loaded with HHP-killed cancer cells alone or loaded with HHP-killed cancer cells and stimulated with poly(I:C) (DC-based HHP lung cancer vaccine) toward chemokines CCL19 and CCL21 was assessed 24 h after maturation using transwell assays (5.0 μm pore size; Costar, Corning). Lower chambers of the transwell plate were filled with 200 μl of RPMI 1640 containing 10% AB human serum with or without chemokines CCL19 (50 ng/ml) and CCL21 (50 ng/ml). 3×10^5 DC in 70 μl of RPMI 1640 containing 10% AB human serum was seeded in the upper chamber of the transwell plate in duplicates. Cells were incubated at 37˚C for 5 h. After that transmigrated DC in the lower chambers were harvested, stained with CD11c-APC antibody (Exbio) and counted using flow cytometry. For phagocytic assays, 1×10^6 DC were stained with 2.5 μl/ml VybrantVR DiO cell labeling solution (Invitrogen) for 20 min at 37˚C before pulsation with HHP-killed cancer cells. Similarly, 1×10^6 thawed HHP-killed lung cancer cells were stained with 2.5 μl/ml VybrantVR DiD cell labeling solution (Invitrogen) in serum free media at 37˚C for 20 min. Cells were washed twice, mixed at DC/tumor cell ratio of 1:5 and incubated for 4 h at 37˚C before poly(I:C) was added to some samples for additional 20 h. Cells incubated at 4˚C served as a negative control for phagocytosis. The phagocytic ability of DC was evaluated by flow cytometry as a percentage of double positive (DiO^+DiD^+) cells.

Stimulation of DC-based HHP lung cancer vaccine in human serum containing media

2×10^5/well of immature DC or DC pulsed with HHP-killed lung cancer cells and stimulated with poly(I:C) were left in serum-free medium X-VIVO 15, or placed into RPMI 1640 medium containing 10% human AB serum (Invitrogen), or stimulated with 1 μg/ml of LPS (*E.coli*, Sigma Aldrich) or placed onto a layer of CD40L-expressing A549 cells for additional 24 h. Stable CD40L-transfected A549 cells were generated by a single cell clone dilution from hygromycin resistant cells transfected with pCMV/hygro-CD40L vector (Sino Biological Inc.). Non-transfected A549 cells were used as a negative control of stimulation. DC maturation was assessed as described above by flow cytometry. IL-10 and IL-12p70 production was determined by ELISA (R&D System) according to manufacturer's instructions.

Generation of DC-based HHP lung cancer vaccine from PBMC of NSCLC patients

Two tubes of peripheral blood (VACUETTE® 9 ml K3 EDTA) were obtained from 6 of NSCLC patients undergoing neoadjuvant surgery in University Hospital Motol, Prague after signing an informed consent. Informed consent was obtained after the nature and possible consequences of the studies had been fully explained. The experiments were performed with an agreement of local ethical committee (University Hospital Motol, Prague, Czech Republic). PBMC were isolated by Ficoll-Pague gradient centrifugation. One half of isolated PBMC was stored at -80˚C for T cell restimulation. Monocytes from the remaining PBMC were separated using $CD14^+$ isolation kit (EasySep™, Human CD14 Positive Selection Kit) according to manufacturer's instructions. 2.5×10^6/well $CD14^+$ cells were seeded into the 6-well plate (Nunclon) in 4 ml of X-VIVO 15 medium supplemented with GM-CSF and IL-4 as described above. On day 4, DC were pulsed with an equal mixture (1:1) of thawed HHP-killed H520 and H522 cell lines for 4 h before poly(I:C) was added for additional 20 h.

Induction of tumor-antigen specific T cells and $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T regulatory cells

2×10^5/well of immature DC, poly(I:C)-treated DC, DC pulsed with HHP-killed cancer cells alone or DC pulsed with HHP-killed cancer cells and stimulated with poly(I:C) were mixed with thawed autologous lymphocytes obtained from PBMC of healthy donors and NSCLC patients at a ratio of 1 DC: 5 T cells in 96-round well plate. Cells were cultivated in RPMI-1640 medium containing 10% AB human serum (Invitrogen), 2 mM GlutaMAX I CTS (Gibco), 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin (Gibco), 1% non-essential amino acids (Gibco), 1 mM natrium pyruvate (Gibco) and 50 μM β-mercaptoethanol (Gibco) for 7 days. A 20 U/ml of IL-2 (PeproTech) was added on days 3 and 5 of cultivation. Poly(I:C) stimulated DC loaded with a mixture of MHC class I-restricted overlapping antigenic peptides to CMV, EBV and influenza (CEF; 2 μg/ml JPT Peptide Technologies) was used as a positive control of $CD8^+$ T cell stimulation. On day 7, T lymphocytes were restimulated with freshly prepared sample-corresponding DC at the same ratio for 1 h before addition of Brefeldin A (BioLegend, 1000x). After 3 h the frequency of IFN-γ-producing and proliferating ($Ki\text{-}67^+$) $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells was determined using flow cytometry. Briefly, T cell were stained with CD3-Alexa 700 (Exbio), CD4-PE-Cy7 (eBioscience) and CD8-PE-Dy590 antibodies (Exbio) for 30 min. Cells were then fixed using Fixation Buffer (eBioscience), permeabilized with Permeabilization Buffer (eBioscience) and stained intracellularly with IFN-γ-FITC (BD Biosciences) and Ki67-PE (Biolegend) antibodies for 30 min. In experiments analyzing NSCLC patient's T cell responses cells were stained extracellularly with CD3-PerCP-Cy5.5 (eBioscience), CD4-PE-Cy7 (eBioscience) and CD8-PE-Dy590 antibodies (Exbio), and intracellularly with IFN-γ-FITC (BD Biosciences) and Ki-67-Alexa 700 (BD Biosciences) antibodies. The percentage of $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T regulatory cells was determined without restimulation with fresh DC by flow cytometry at day 7. T cells were stained with CD4-PE-Cy7 (eBioscience), CD8-PE-Dy590 antibodies (Exbio) and CD25-PerCP-Cy5.5 (BioLegend) for 30 min. Cells were then fixed and permeabilized as described above and stained intracellularly with Foxp3-Alexa Fluor 488 (eBiosciences) for 30 min.

Generation of matrix protein 1-expressing A549 cells and detection of $MP1_{58\text{-}66}$–specific $CD8^+$ T cells

Shorter version of M1 gene (M1v1–699 bp) was obtained by PCR from a plasmid pCMV-H7N9-AH-13-M1 (Sino Biologicals Inc.) bearing a coding sequence (756 bp) for full-length matrix protein 1 (MP1) from H7N9 virus. M1v1 sequence was inserted into pcDNA-YFP plasmid (Invitrogen) to obtain pcDNA3-M1v1-YFP. A549 cells grown to 70% confluence in 24-well plate were transfected with 1 μg pcDNA3-M1v1-YFP (linearized by FspI restriction endonuclease) using Lipofectamin RNAiMAX (Thermo Fisher scientific) in 0.5 ml serum free F12 medium and incubated overnight at 37˚C. Then the cell medium was replaced by serum containing F12 medium supplemented with 300 μg/ml of hygromycin B (Sigma-Aldrich). After 7 days the YFP fluorescence of transfected cells was detected by flow cytometry. Positive cells were diluted 1–3 cells/well into 96-well plate and cultivated under hygromycin B selection for 3 weeks. Autologous T cells were stimulated by $HLA\text{-}A^*201^+$ immature DC, poly(I:C)-treated DC or DC-based HHP lung cancer vaccine generated with thawed HHP-killed MP1-expressing A549 and poly(I:C) as described above. DC incubated with poly(I:C) and $MP1_{58\text{-}66}$ (GILGFVFTL) (10 μg/ml; MBL International) were used as a positive control for $CD8^+$ T cell stimulation. After 8 days, $MP1_{58\text{-}66}$ specific $CD8^+$ T cells were stained with $MP1_{58\text{-}66}$-$HLA\text{-}A^*201$ Tetramer-PE (2 μl/sample; MBL International) for 30 min together with CD3-PerCP-Cy5.5 (eBioscience), CD4-PE-Cy7 (eBioscience) and CD8-Alexa Fluor 700 (Exbio) antibodies and analyzed by flow cytometry.

Detection of tumor antigen-specific T cells in NSCLC patients

PBMC were isolated and cryopreserved in liquid nitrogen from 36 NSCLC patients undergoing neoadjuvant surgery in University Hospital Motol, Prague in 2014–2016 after signing an informed consent. The experiments were performed with an agreement of local ethical committee (University Hospital Motol, Prague, Czech Republic). PBMC were thawed and seeded at 2 x 10^5/well in 100 ul medium containing AB serum as described above and incubated overnight at 37˚C. Then tumor antigen specific pepmixes containing 33–128 peptides from MAGE-A3, MAGE-A4, hTERT, Survivin and Mucin-1 proteins (JPT Peptide Technologies) were added according to manufacturer's recommendation at concentration of 10 ug/ml and incubated for 9 days. A mixture of mainly MHC class I-restricted overlapping antigenic peptides to CMV, EBV and influenza [CEF] (PM-CEF-E; 2 μg/ml JPT Peptide Technologies) and mainly MHC class II-restricted peptides to influenza virus Hemagglutinin [HA] (PM-INFA-HA/Cal; 10 μg/ml JPT Peptide Technologies) were used as positive controls of $CD8^+$ T cell and $CD4^+$ T cell stimulation, respectively. 20 U/ml of IL-2 (PeproTech) was added on days 4 and 7 of cultivation. Cells were restimulated with the peptides on day 9 for 2h. Then Brefeldin A (BioLegend, 1000x) was added and cells were incubated overnight. The production of IFN-γ from $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells was detected by flow cytometry as described above using CD3-AlexaFluor700, IFN-γ-PE-Cy7, CD4-PerCP-Cy5.5, CD8a-eFluor450 (BioLegend) antibodies. The viability of IFN-γ-producing T cells was stained with LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Stain kit (405 nm excitation) (Invitrogen). The percentage of negative control (no antigen added to PBMCs) was deducted from the samples stimulated with an antigenic peptide mixture.

qPCR analysis of antigen expression

Total RNA was isolated from cell lysates using RNeasy mini kit (Qiagene) in accordance with the manufacturer's protocol including DNA digestion step. The RNA purity and concentration was determined spectrophotometrically using a Nanodrop 2000c (Fisher Thermo scientific). Reverse transcription was performed from 1 μg of total RNA using an iScript cDNA synthesis kit (BioRad) using probes specific to MAGE-A3, MAGE-A4, hTERT, Survivin and Mucin-1 designed, synthetized and approved by TIB MOLBIOL Syntheselabor GmBh, Germany. Expression of genes was determined by qPCR on CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BioRad) in duplicate. The each 10 μl reaction contained 5 μl of KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (Kapa Biosystems), 0.5 μM of each forward and reverse primers (TIB Molbiol), 0.2 μM of TaqMan probe (TIB Molbiol), 1.5 μl of DNase-free water and 2 μl of 10x diluted cDNA. The reaction thermal protocol was following: 3 minutes at 95˚C followed by 45 cycles of amplification (95˚C for 15 s, 60˚C for 60 s). The formation of PCR products of the expected lengths was confirmed by agarose gel electrophoresis. The Cq values were determined using CFX Manager software (BioRad) and the relative expressions of the studied genes were calculated with GenEx software (MultiD Analyses) with cut off at 36 cycle. The cut off for positive expression was set to relative expression value greater than the mean plus 2 SDs of the control non-tumoral tissue.

Statistical analysis

Two-tailed paired t-test or unpaired, nonparametric Mann-Whitney test were applied for data analysis using GraphPad PRISM 6 (San Diego, California, USA). The results were considered statistically significant if * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$.

Results

DC-based HHP lung cancer vaccine displays mature phenotype, produces pro-inflammatory cytokines and increases chemotactic migration

To generate DC-based HHP lung cancer vaccine, DC were pulsed with a mixture of thawed HHP-killed H520 and H522 lung cancer cells for 4h and subsequently stimulated with poly(I:C). The phenotype of DC-based HHP lung cancer vaccine, its phagocytic capacity and chemotactic migration was assessed by flow cytometry after additional 20 h and was compared to immature DC, DC pulsed with HHP-killed cells alone or DC stimulated with poly(I:C) alone. Similarly, the production of pro-inflammatory cytokines was measured from cell culture supernatants by Luminex assay. As shown in Fig 1A, DC-based HHP lung cancer vaccine [HHP+poly(I:C)] displays significantly higher expression of CD80, CD83, HLA-DR and CD86 than control immature DC [iDC], DC pulsed with HHP-killed cells alone [HHP] or DC stimulated only with poly(I:C) [poly(I:C)]. Fig 1B shows that 80% of DC phagocytosed thawed HHP-killed lung cancer cells at 37˚C after 24 h when compared to control DC incubated with HHP-killed cancer cells at 4˚C. The addition of poly(I:C), however, decreased the phagocytic capacity of DC by 10% (Fig 1B). The slightly decreased phagocytosis of HHP-killed lung cancer cells by DC after addition of poly(I:C) did not affect the capacity of DC to produce pro-inflammatory cytokines such as IL-12p70, IFN-α and TNF-α (Fig 1C) or stimulate chemotactic migration (Fig 1D) and increase in CCR7 expression (Fig 1E). The production of IL-10 by DC-based HHP lung cancer vaccine was low and even significantly decreased when compared to IL-10 levels produced by DC treated with poly(I:C) only (Fig 1C). The immunogenicity of HHP-killed cells towards the DCs was confirmed [24] as DC pulsed with HHP-killed cells alone significantly enhanced DC maturation, CCR7 expression and the production of pro-inflammatory cytokines (Fig 1A, 1C and 1D).

In summary, these results showed that DC-based HHP lung cancer vaccine generated in serum-free media might be fully competent to stimulate T cell responses as shown by the efficient phagocytosis of HHP-killed lung cancer cells, an increased maturation and pro-inflammatory cytokine production and chemotactic migration.

DC-based HHP lung cancer vaccine further increases its maturation and cytokine production in serum containing medium after additional LPS and CD40L stimulation

To assess further the plasticity and activity of DC-based HHP lung cancer vaccine in serum containing conditions and after additional stimulation, iDC and DC pulsed with HHP-killed cells and poly(I:C) for 24 h [24h] were transferred into RPMI 1640 containing 10% human AB serum for next 24 h [48h]. Cells were left untreated or treated with LPS or plated onto a layer of CD40L-transfected A459 cells. The expression of CD80, CD83, HLA-DR and CD86 was determined by flow cytometry. The production of IL-10 and IL-12p70 was assessed by ELISA. As shown in Fig 2A, the transfer of DC-based HHP lung cancer vaccine into serum containing conditions led to an increased expression of CD80 and CD83 within next 24 h compared to DC-based HHP lung cancer vaccine left in serum-free medium. LPS further enhanced the expression of CD80 and CD86 over the serum level. iDC incubated in serum free medium without HHP-killed tumor cell pulsation and poly(I:C) stimulation showed higher functional plasticity as all the maturation markers CD80, CD83, HLA-DR and CD86 increased after the transfer into serum-containing medium and were further significantly up-regulated over this level by LPS. However, the transfer of iDC or DC-based HHP lung cancer vaccine into serum

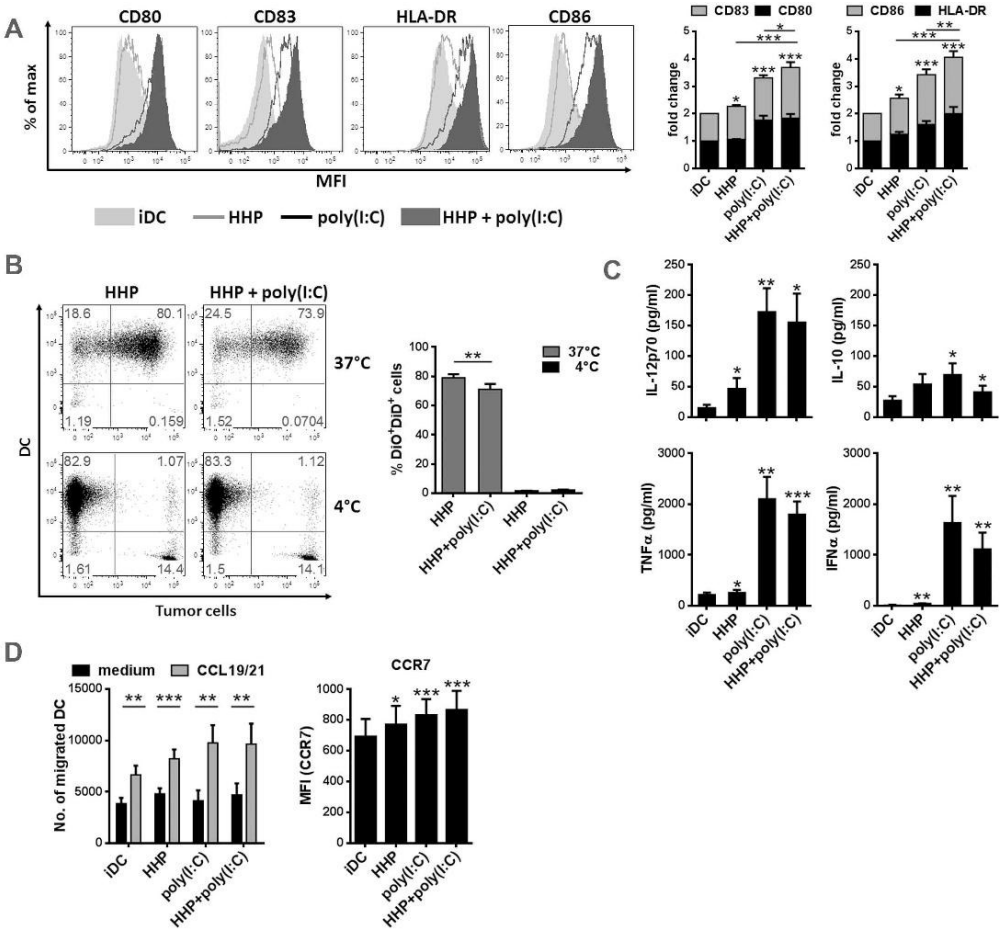


Fig 1. DC-based HHP lung cancer vaccine displays mature phenotype, produces pro-inflammatory cytokines and increases chemotactic migration. 2×10^5 monocyte-derived DC generated in serum-free media X-VIVO 15 were left untreated [iDC] pulsed with thawed 4×10^4 HHP-killed lung cancer cells [HHP], pulsed with HHP-killed cells and poly(I:C) [HHP+poly(I:C)] or stimulated with poly(I:C) only [poly(I:C)] for 24h. (A) The expression of CD80, CD86, CD83, HLA-DR and (E) CCR7 on $CD11c^+DAPI$ negative cells was assessed by flow cytometry. The values represent means ± SEM of 16 donors. Histograms are representative of 16 donors. (B) For phagocytic assays thawed HHP-killed H520 and H522 cells were stained with VybrantVR DiD and DC were stained with VybrantVR DiO at 37˚C for 20 min before vaccine generation. The phagocytic capacity of DC was assessed as a percentage of DiO^+DiD^+ cells by flow cytometry after 24h. Graphs represent means ± SEM of n = 3 in duplicates. (C) Cytokine production was evaluated in cell culture supernatants after 24h by Luminex assay. Graphs represent means ± SEM of n = 5. (D) 3×10^5 DC treated as described above were transferred to serum-containing media in upper chamber of transwell plate and were allowed to migrate to the lower chamber filled with media or media containing a mixture of CCL19 and CCL21 (both 50 ng/ml) at 37˚C for 5h. The number of transmigrated $CD11c^+$ DC was determined by flow cytometry. The graph shows mean ± SEM of 16 donors of n = 4. The results were considered statistically significant if * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$.

doi:10.1371/journal.pone.0171539.g001

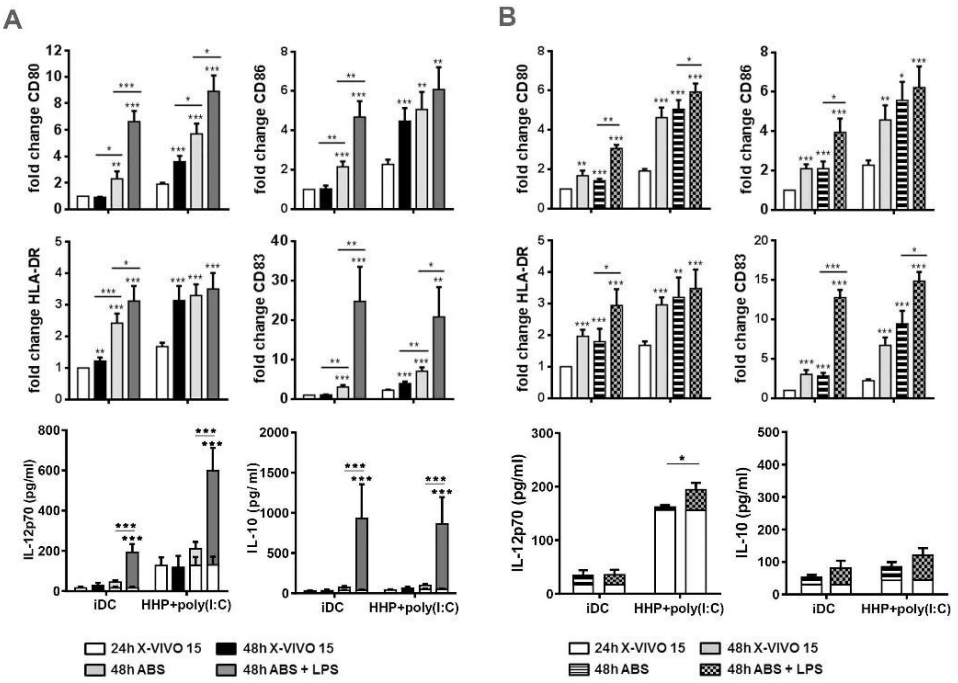


Fig 2. DC-based HHP lung cancer vaccine further increases its maturation and cytokine production in serum containing medium after additional LPS and CD40L stimulation. 2×10^5 monocyte-derived DC generated in serum-free media X-VIVO 15 were left untreated [iDC] pulsed with thawed 4×10^4 HHP-killed lung cancer cells and poly(I:C) [HHP+poly(I:C)] or stimulated with poly(I:C) only [poly(I:C)] for 24h [24h]. Serum-free medium was subsequently replaced with medium containing 10% human AB serum alone or supplemented with LPS (1 μg/ml) (A) or cells were loaded onto a layer of CD40L-expressiong A549 (B) for additional 24h [48h]. Non-transfected A549 cells were used as a negative control of CD40L stimulation (B). The difference in CD80, CD86, CD83 and HLA-DR expression between 24h and 48h samples was determined by flow cytometry. Similarly, the difference in IL-12p70 and IL-10 production was assessed by ELISA. Graphs show mean ± SEM of 8–18 donors of n = 5. The results were considered statistically significant if * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$.

doi:10.1371/journal.pone.0171539.g002

containing medium did not induce IL-12p70 or IL-10 production. LPS, on the other hand, stimulated a significant production of both cytokines in the samples (Fig 2A).

Similar effect to LPS on DC maturation was observed after stimulation with CD40L-expressing A549 cells (Fig 2B). DC-based HHP lung cancer vaccine exhibited higher expression of CD80 and CD83 when stimulated with CD40L-expressing A549 in comparison to DC-based HHP lung cancer vaccine incubated with non-transfected A549. CD40L stimulation induced the expression of all markers CD80, CD83, HLA-DR and CD86 in iDC in contrast to stimulation with non-transfected A549 exhibiting again higher maturational plasticity than DC pulsed with HHP-killed tumor cells and poly(I:C).However, only DC pulsed with HHP-killed tumor cells and poly(I:C) were able to increase IL-12p70 production after CD40L stimulation (Fig 2B). In contrast to LPS, CD40L did not induce any IL-10 production in the samples. In conclusion, DC-based HHP lung cancer vaccine exhibits a capacity to be further stimulated and enhance its stimulatory potential.

DC-based HHP lung cancer vaccine stimulates $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells and decreases the number of $CD4^+CD25^+Foxp3^+$T regulatory cells

We further examine if DC-based HHP lung cancer vaccine induces proliferation and IFN-γ-production in $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells. After 24h iDC, DC pulsed with HHP-killed tumor cells alone, DC pulsed with HHP-killed tumor cells and poly(I:C) or DC stimulated with poly(I:C) only were co-cultured with autologous T lymphocytes at ratio 1:5 for 7 days. T cell proliferation (Ki-67) and IFN-γ production was measured by flow cytometry after restimulation with corresponding freshly prepared DC. As shown in graphs in Fig 3A, DC-based HHP lung cancer vaccine stimulated significantly higher number of IFN-γ-producing $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells in comparison to iDC or DC pulsed with HHP-killed tumor cells alone. However, IFN-γ-producing $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells were also significantly stimulated by DC treated only with poly(I:C) similarly to DC-based HHP lung cancer vaccine. High percentage of IFN-γ producing $CD8^+$ T cells was detected after stimulation with poly(I:C)-stimulated DC loaded with a mixture of antigenic peptides to CMV, EBV and influenza [CEF+poly(I:C)] which was used as a positive control (Fig 3A). Whereas no differences were observed in the induction of IFN-γ-production in T cells between DC-based lung cancer vaccine and DC-treated only with poly(I:C), we observed a significant differences in T cell proliferation. DC pulsed with HHP-killed cells alone induced high $CD8^+$ and $CD4^+$ T cell proliferation (Fig 3B).Which was not further enhanced by addition of poly(I:C). DC treated with poly(I:C) alone stimulated similar proliferation of $CD8^+$ T cells, however failed to induce the proliferation of $CD4^+$ T cells. These results indicate that DC-based HHP lung cancer vaccine stimulates T cells, and might be specifically efficient in inducing $CD4^+$ T cell proliferation. Next we addressed the number of $CD4^+CD25^+$ $Foxp3^+$ T regulatory cells induced by DC-based HHP lung cancer vaccine after 7 days. Fig 3C shows that there was a significantly lower number of $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T regulatory cells induced by DC-based HHP lung cancer vaccine when compared to iDC and DC pulsed with HHP-killed tumor cells alone. Poly(I:C) stimulation alone decreased the number of $CD4^+$ $CD25^+Foxp3^+$ T regulatory cells, however the number of $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T regulatory cell was still slightly higher than the number of T regulatory cells induced by the DC-based lung cancer vaccine (Fig 3C).

DC-based HHP lung cancer vaccine generated from NSCLC patients' monocytes induces tumor-antigen specific $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells

Our results indicate that DC-based HHP lung cancer vaccine stimulates T cells. However, given no differences between DC-based HHP lung cancer vaccine and DC stimulated with poly(I:C) alone, it is not clear if induced T cells recognize antigens which come from the HHP-killed lung cancer cells. To test this, we generated a model antigenic system encompassing A549 cell line expressing a short version of matrix protein 1 (MP1) of influenza virus. Autologous T cells were stimulated with HLA-A^*201^+ iDC, DC stimulated with poly(I:C) alone or DC loaded with thawed HHP-killed A549 expressing MP1 and poly(I:C) for 8 days (Fig 4A). The number of $MP1_{58\text{-}66}$-specific $CD8^+$ T cells was detected with $MP1_{58\text{-}66}$-HLA-A^*201 Tetramer staining by flow cytometry. As shown in Fig 4A DC-based HHP lung cancer vaccine stimulated the expansion of $MP1_{58\text{-}66}$-specific $CD8^+$ T cells over iDC or DC treated with poly(I:C) alone which proves that protein antigens from HHP-killed lung cancer cells are processed and presented by DC to T cells. Next we validated our results on DC-based HHP lung cancer vaccine generated from several NSCLC patients. DCs were generated in serum-free media from $CD14^+$ isolated monocytes. Autologous T lymphocytes were stimulated and restimulated with fresh patient's DC as described above. As shown in Fig 4B, DC-based HHP lung cancer vaccine generated from PBMCs of NSCLC patients stimulated significantly higher amount of IFN-γ-

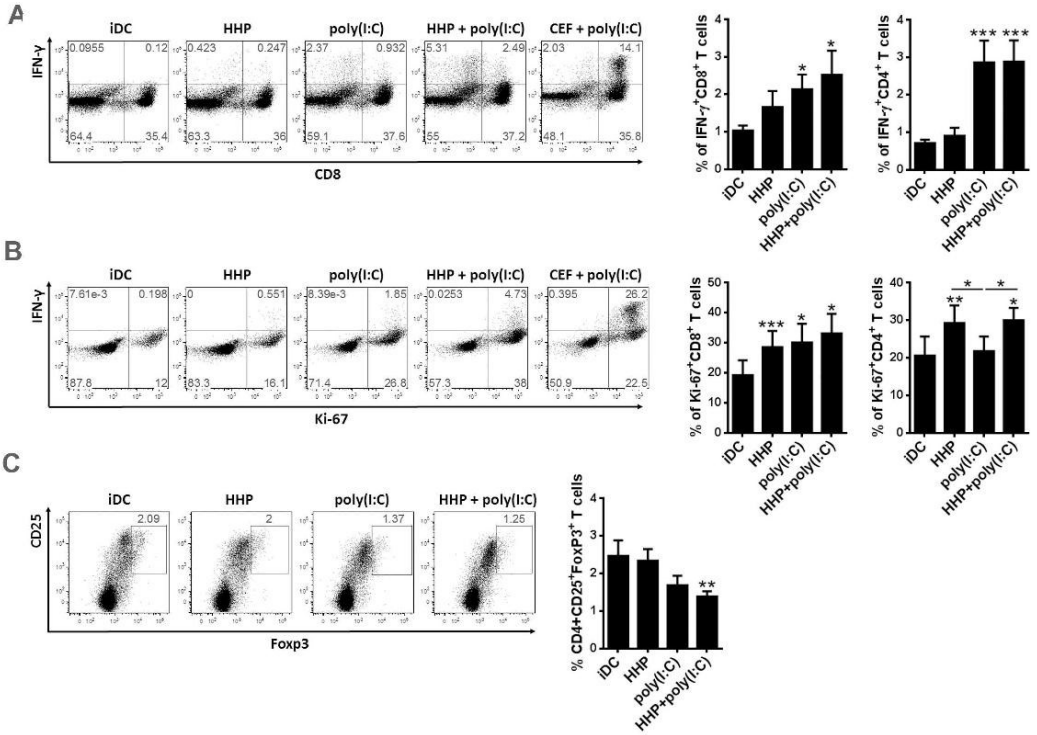


Fig 3. DC-based HHP lung cancer vaccine stimulates $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells and decreases the number of $CD4^+CD25^+Foxp3^+$T regulatory cells. 4×10^4 iDC, DC pulsed with thawed HHP-killed lung cancer cells and poly(I:C) [HHP+poly(I:C)], or stimulated with poly(I:C) alone [poly(I:C)] for 24h were subsequently added to 2×10^5 autologous T cells from healthy donors and subsequently co-cultured for 7 days. (A) IFN-γ-producing $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells were assessed by flow cytometry after one round of restimulation with freshly prepared DC. $CD8^+$ T cells shown in dotplots are gated from $CD3^+$ cells, and predominantly $CD4^+$ T cells are displayed as CD8 negative cells. The percentage in graphs is displayed as a percentage of IFN-γ-producing cells from $CD8^+$ or $CD4^+$ T cells, respectively, therefore it does not correspond to percentages in dotplots. (B) T cell proliferation (Ki-67) and (C) the number of $CD4^+CD25^+FoxP3^+$T regulatory cells was determined without restimulation by flow cytometry. Dotplots are representative of 8 donors. Graphs represent means ± SEM of 8 donors from n = 3. The results were considered statistically significant if * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$.

doi:10.1371/journal.pone.0171539.g003

producing $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells than DC stimulated with poly(I:C) alone or iDC. Similarly, higher proliferation of $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells was detected after DC-based HHP lung cancer vaccine stimulation (Fig 4C). These results showed that DC-based HHP lung cancer vaccine stimulates tumor-antigen specific IFN-γ-producing T cells present in NSCLC patient's blood *in vitro*. To show that tumor-specific $CD8^+$ and $CD4^+$ T cell responses to tumor antigens expressed specifically in H522 and H520 lung cancer cell lines are present in NSCLC patients we analyzed the expression of MAGE-A3, MAGE-A4, hTERT, Survivin and Mucin-1, well-characterized antigens found in lung cancer tumors [27–29] by qPCR. Various degree of expression of all antigens, except of MAGE-A3 in H522, was detected in both cell lines (Fig 4D). The presence of $CD8^+$ and $CD4^+$ T cell responses specific to these antigens was analyzed by stimulation of PBMCs from 36 NSCLC patients with corresponding mixture of antigenic

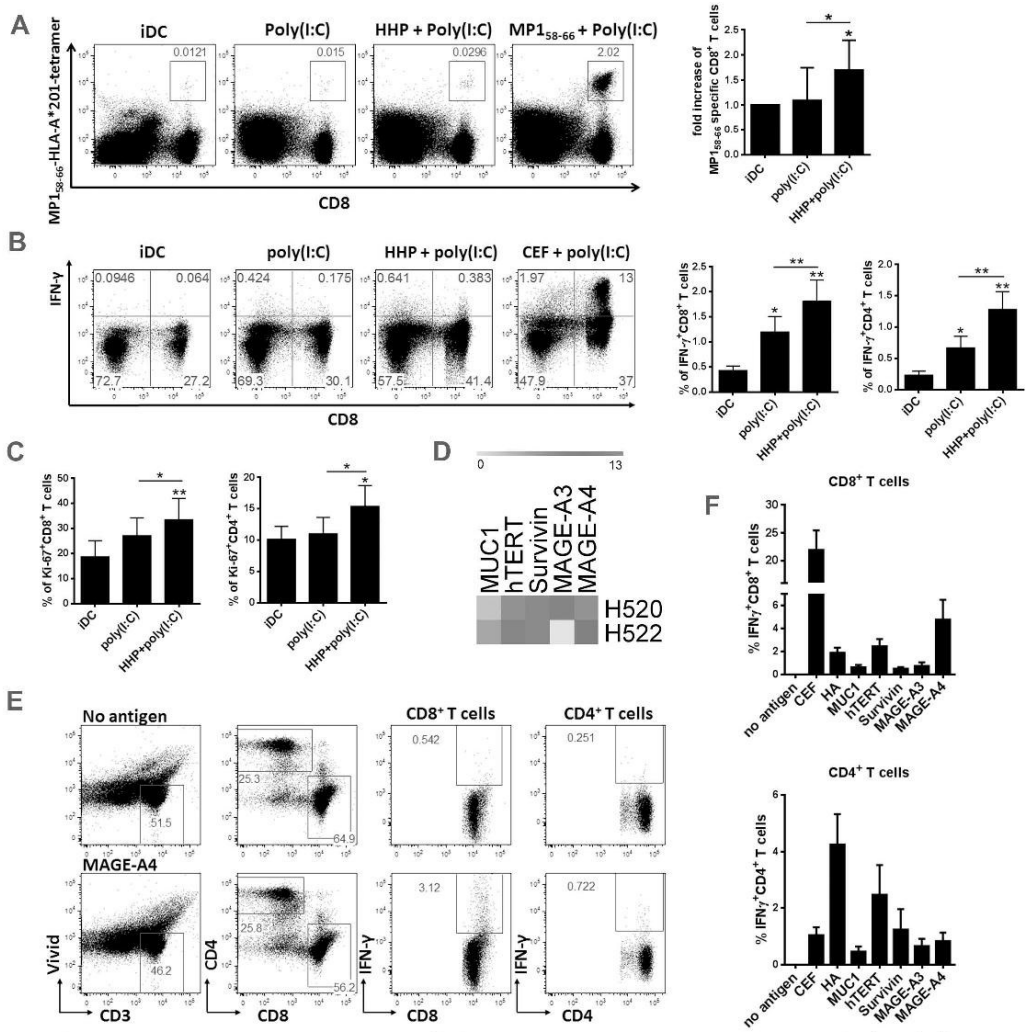


Fig 4. DC-based HHP lung cancer vaccine generated from NSCLC patients' monocytes induces tumor-antigen specific CD8$^+$ and CD4$^+$ T cells. 4×10^4 iDC, DC pulsed with thawed HHP-killed lung cancer cells or MP1-expressing A549 and poly(I:C) [HHP+poly(I:C)] or stimulated with poly(I:C) alone [poly(I:C)] for 24h were subsequently added to 2×10^5 autologous T cells from NSCLC patients and subsequently co-cultured for 7 days. (A) The MP1$_{58-66}$-specific CD8$^+$ T cells were detected without restimulation with MP1$_{58-66}$-HLA-A*201 Tetramer staining by flow cytometry. Dotplots are representative of 4 donors. Graphs represent means ± SEM of 4 donors from n = 2. (B) IFN-γ-producing CD8$^+$ and CD4$^+$ T cells were assessed by flow cytometry after one round of restimulation with freshly prepared NSCLC patient' DC. The percentage in graphs is displayed as a percentage of IFN-γ-producing cells from CD8$^+$ or CD4$^+$ T cells, respectively, therefore it does not correspond to percentages in dotplots. (C) T cell proliferation (Ki-67) was determined without restimulation by flow cytometry. Dotplots are representative of 6 patients. Graphs show means of ± SEM of 6 donors in duplicates. The results were considered statistically significant if * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$. (D) qPCR analyses of Mucin-1, hTERT, Survivin, MAGE-A3 and MAGE-A4 expression in H520 and

H522 cell lines (n = 3, in duplicates) (E) Gating strategy to detect tumor antigen specific IFN-γ producing T cells in NSCLC patients. One representative patient sample for MAGE-A4-specific T cells is shown. (F) Quantitative evaluation of tumor antigen specific IFN-γ producing T cells in 36 NLCLC patients. The percentage of negative control (no antigen) was deducted from the samples stimulated with antigenic pepmixes.

doi:10.1371/journal.pone.0171539.g004

peptides. One representative donor responsive to MAGE-A4 pepmixes stimulation is shown in Fig 4E. In 36 NSCLC patients we detected IFN-γ-producing $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells responsive to the all tested antigens (Fig 4F) which support our findings that our DC-based HHP lung cancer vaccine is fully competent to induce anti-tumor T cell responses in NSCLC patients.

Discussion

DC-based active cellular immunotherapy represents a large field of immunotherapeutic approaches to cancer treatment; however its use is quite limited in immunotherapy of lung carcinoma. In our study we showed that DC-based lung cancer vaccine generated in GMP-complaint serum free media with HHP-killed lung cancer cell lines and poly(I:C) exhibits functional plasticity and activity to stimulate tumor antigen-specific IFN-γ-producing $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells from NSCLC patients.

HHP-killed lung cancer cell lines used for the vaccine generation in this study consisted of allogeneic commercially available adenocarcinoma (H522) and squamous cell carcinoma (H520) cell lines. These cell lines cover 80% of NSCLC histological subtypes and are used as a source of broad range of tumor-associated antigens (TAA) which were shown to be differentially expressed in NSCLC patients [27, 30, 28]. Although DC-based vaccines pulsed with TAA-derived peptides have been shown to induce immune response in NSCLC patients [9, 8, 7, 10], broader TAA availability provided by HHP-killed cell lines might induce immune responses in higher number of patients. The other advantage of allogeneic cell lines is the possibility to cultivate them in high numbers in contrast to autologous tumor material which might be difficult to obtain in sufficient amount due to a frequent inoperability of late stages of the disease in NSCLC patients. Interestingly, only one research group have so far used irradiated and UBV-killed allogeneic adenocarcinoma cell line 1650 for DC-based vaccine generation in phase I clinical trials [16, 15, 18, 17]. The immune responses were observed in 6 out 11 of immunized patients as detected by IFN-γ ELISPOT assay [18]. This shows that killed allogeneic cell lines are safe and suitable for DC-based active lung cancer immunotherapy.

In this study, we showed that HHP treatment generates immunogenic cancer cells, similarly to our previously published data [24]. Phagocytosis of HHP-killed tumor cells by DC stimulated the expression of maturation-associated molecules on DCs and induced production pro-inflammatory cytokines. However, our observed effects on DCs maturation and cytokine production were lower than previously published [24]. This can be explained by DC cultivation in serum free media in our study in contrast to serum-containing media, which represents optimal cultivation conditions for the DC, in the previous study [24]. Poly(I:C)-matured DC exhibit the best T cell stimulatory capacity *in vitro* [31]. In our study, DC pulsed with HHP-killed lung cancer cells and poly(I:C) expressed even higher levels of maturation-associated molecules than DC stimulated with poly(I:C) only which suggests a synergistic stimulatory effect of phagocytosed immunogenic HHP-killed cells and poly(I:C). The slight decrease in phagocytic capacity of DC after addition of poly(I:C) could be explained by the induction of DC maturation which is accompanied by the reduction in antigen uptake as DC concomitantly increase their antigen processing and presentation capacity [4, 32]. The increased chemotactic migration and pro-inflammatory cytokine production was, on the other hand, comparable between poly(I:C)-stimulated DC and DC-based HHP lung cancer vaccine. This suggests that

immunogenicity of HHP-killed cells did not contribute to cytokine production or chemotactic migration induced by poly(I:C). Low IL-10 production and high IL-12p70, TNF-α and IFN-α confirm Th1 polarizing properties of DC induced by poly(I:C).

We also showed that DC-based HHP lung cancer vaccine exhibited functional plasticity after transfer into serum containing conditions which would simulate the transfer of the vaccine into NSCLC patients. DC-based HHP lung cancer vaccine was not functionally exhausted by the first maturation stimuli with poly(I:C) as DC enhanced the expression of maturation associated molecules CD80 and CD83 and IL-12p70 production in response to LPS and CD40L [4, 33, 34]. LPS represent a strong maturation signal which is not likely to occur in NSCLC patients unless there is a bacterial infection. On the other hand, CD40L stimulation represent a physiological signaling which DC-based HHP lung cancer vaccine is likely to encounter on the surface of other immune cells such as B and T cells after administration into NSCLC patients. CD40-CD40L ligation provides necessary costimulatory signals for B and T cells, it is important for induction of cytotoxic $CD8^+$ T lymphocytes and also ensures long-term survival of DC [35, 36, 33]. In keeping with our data, it has been previously reported that human DC matured with poly(I:C) retained their capacity to produce IL-12p70 after additional CD40L stimulation [37]. Moreover CD40L ligation enhances DC cross-presentation [38]. Our data therefore suggest that DC-based HHP lung cancer vaccine might gain further stimulatory activity *in vivo* after administration into NSCLC patients.

Most importantly, we observed that DC-based HHP lung cancer vaccine stimulates proliferation and IFN-γ production in $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells and lowers the numbers of $CD4^+$ $CD25^+Foxp3^+$ T regulatory cells *in vitro*. The T cell stimulatory capacity of DC-based HHP lung cancer vaccine generated from healthy donors was, however, comparable to that of DC stimulated with poly(I:C) alone which indicates that T cells which were not specific to TAA derived from HHP-killed lung cancer cells were induced. As the detection of TAA-specific T cells, specifically by single epitope tetramers, is technically challenging due to their low frequency in blood (10^{-7}) [39, 40], we generated an artificial antigenic system based on an immunodominant $CD8^+$ T cell epitope from influenza MP1 protein. The frequency of influenza-specific $CD8^+$ T cells can range between 10^{-2} to10^{-4} [41]. By using MP1-expressing A549 cells we were able to prove in HLA-A^*201^+ healthy donors that protein antigen derived from HHP-killed lung cancer cells is indeed processed and presented by DC to autologous $CD8^+$ T cells. Moreover, using DC-based HHP lung cancer vaccine generated from NSCLC patients we observed an increase in proliferation and IFN-γ production in $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells over the T cells stimulated with patient's DC-treated with poly(I:C) only. This indicates that TAA-specific T cells were stimulated. We have confirmed here the presence of tumor antigen-specific T cells in the blood of NSCLC patients against selected antigens commonly found in lung cancer [27, 29, 28]. We showed that these antigens are also expressed in lung cancer cell lines H520 and H522 used in this study to generate DC-based HHP lung cancer vaccine. Several clinical trials with peptide or protein vaccine targeted against these antigens have shown the induction of antigen specific T cells and also a clinical benefit in NSCLC patients [42–44]. This is supportive of DC-based HHP lung cancer vaccine effectivity in NSCLC patients. The role of $CD8^+$ T cells in anticancer immunity is well established, however, it is currently not clear if $CD4^+$ T cells induced by DC-based HHP lung cancer vaccine can contribute to or mediate significant anti-tumor effect [45]. As we observed a high proliferation of $CD4^+$ T cells induced by DC-based lung cancer vaccine, it is tempting to speculate that $CD4^+$ T cells might play an important role in shaping anti-cancer responses after DC-based HHP lung cancer immunotherapy in NSCLC patients. DC-based HHP cancer vaccine alone or in combination with chemotherapy was shown to significantly inhibited growth of tumors in mouse models [25], however the differential contribution of $CD8^+$ or $CD4^+$T cells was not analyzed.

In conclusion we showed that DC-based HHP lung cancer vaccine generated in GMP compliant serum free medium is immunologically active and displays functional plasticity towards immunostimulatory Th1 polarizing phenotype *in vitro*. These results represent important preclinical data for the ongoing Phase I/II clinical trial combining DC-based active immunotherapy (DCVAC/LuCa) with chemotherapy and immune enhancers (NCT02470468).

Supporting information

S1 Fig. The induction of cell death and the exposure of immunogenic molecules (HSP70, HSP90 and calreticulin) by HHP in H520 and H522. (A) 1×10^6 cells/ml of H520 a H522 were treated with HHP 250 MPa for 10 min, incubated at 37˚C for 2h and subsequently frozen at -80˚C for 24h. Cell viability of non-treated cells, HHP-killed cells before freezing [2h] and after thawing [2h+24h] was determined with Annexin-PE and DAPI staining using flow cytometry. Dotplots show one representative experiment. Graph shows means ± SEM of n = 5 in duplicates. (B) Exposure of HSP70, HSP90 and calreticulin was determined by flow cytometry. Graphs represent means ± SEM of n = 3 in duplicates.
(TIF)

Author Contributions

Conceptualization: IA RS RL.

Formal analysis: NH OP.

Funding acquisition: RS.

Investigation: NH IA OP HM DM LS.

Methodology: LS IA NH OP DM.

Project administration: IA NH OP LS.

Resources: DM HM.

Supervision: IA RS RL.

Validation: IA NH OP LS DM HM.

Visualization: NH OP LS IA.

Writing – original draft: IA.

Writing – review & editing: IA RS RL.

References

1. Mellstedt H, Vansteenkiste J, Thatcher N. Vaccines for the treatment of non-small cell lung cancer: investigational approaches and clinical experience. Lung cancer. 2011; 73(1):11–7. doi: 10.1016/j.lungcan.2011.02.023 PMID: 21474197
2. Skachkova OV, Khranovska NM, Gorbach OI, Svergun NM, Sydor RI, Nikulina VV. Immunological markers of anti-tumor dendritic cells vaccine efficiency in patients with non-small cell lung cancer. Experimental oncology. 2013; 35(2):109–13. PMID: 23828386
3. Datta J, Terhune JH, Lowenfeld L, Cintolo JA, Xu S, Roses RE et al. Optimizing dendritic cell-based approaches for cancer immunotherapy. The Yale journal of biology and medicine. 2014; 87(4):491–518. PMID: 25506283
4. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ et al. Immunobiology of dendritic cells. Annual review of immunology. 2000; 18:767–811. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.767 PMID: 10837075

5. Mukherji B, Chakraborty NG, Yamasaki S, Okino T, Yamase H, Sporn JR et al. Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1995; 92(17):8078–82. PMID: 7644541
6. Sheikh NA, Petrylak D, Kantoff PW, Dela Rosa C, Stewart FP, Kuan LY et al. Sipuleucel-T immune parameters correlate with survival: an analysis of the randomized phase 3 clinical trials in men with castration-resistant prostate cancer. Cancer immunology, immunotherapy: CII. 2013; 62(1):137–47. doi: 10.1007/s00262-012-1317-2 PMID: 22865266
7. Ueda Y, Itoh T, Nukaya I, Kawashima I, Okugawa K, Yano Y et al. Dendritic cell-based immunotherapy of cancer with carcinoembryonic antigen-derived, HLA-A24-restricted CTL epitope: Clinical outcomes of 18 patients with metastatic gastrointestinal or lung adenocarcinomas. International journal of oncology. 2004; 24(4):909–17. PMID: 15010829
8. Perroud MW Jr., Honma HN, Barbeiro AS, Gilli SC, Almeida MT, Vassallo J et al. Mature autologous dendritic cell vaccines in advanced non-small cell lung cancer: a phase I pilot study. Journal of experimental & clinical cancer research: CR. 2011; 30:65.
9. Babatz J, Rollig C, Lobel B, Folprecht G, Haack M, Gunther H et al. Induction of cellular immune responses against carcinoembryonic antigen in patients with metastatic tumors after vaccination with altered peptide ligand-loaded dendritic cells. Cancer immunology, immunotherapy: CII. 2006; 55 (3):268–76. doi: 10.1007/s00262-005-0021-x PMID: 16034561
10. Takahashi H, Okamoto M, Shimodaira S, Tsujitani S, Nagaya M, Ishidao T et al. Impact of dendritic cell vaccines pulsed with Wilms' tumour-1 peptide antigen on the survival of patients with advanced non-small cell lung cancers. European journal of cancer. 2013; 49(4):852–9. doi: 10.1016/j.ejca.2012.11.005 PMID: 23245331
11. Morse MA, Clay TM, Hobeika AC, Osada T, Khan S, Chui S et al. Phase I study of immunization with dendritic cells modified with fowlpox encoding carcinoembryonic antigen and costimulatory molecules. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research. 2005; 11 (8):3017–24.
12. Kontani K, Taguchi O, Ozaki Y, Hanaoka J, Sawai S, Inoue S et al. Dendritic cell vaccine immunotherapy of cancer targeting MUC1 mucin. International journal of molecular medicine. 2003; 12(4):493–502. PMID: 12964025
13. Chang GC, Lan HC, Juang SH, Wu YC, Lee HC, Hung YM et al. A pilot clinical trial of vaccination with dendritic cells pulsed with autologous tumor cells derived from malignant pleural effusion in patients with late-stage lung carcinoma. Cancer. 2005; 103(4):763–71. doi: 10.1002/cncr.20843 PMID: 15637694
14. Engell-Noerregaard L, Hendel HW, Johannesen HH, Alslev L, Svane IM. FDG PET scans as evaluation of clinical response to dendritic cell vaccination in patients with malignant melanoma. Cancer immunology, immunotherapy: CII. 2013; 62(1):17–25. doi: 10.1007/s00262-012-1306-5 PMID: 22722450
15. Hirschowitz EA, Foody T, Kryscio R, Dickson L, Sturgill J, Yannelli J. Autologous dendritic cell vaccines for non-small-cell lung cancer. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2004; 22(14):2808–15.
16. Hirschowitz EA, Foody T, Hidalgo GE, Yannelli JR. Immunization of NSCLC patients with antigen-pulsed immature autologous dendritic cells. Lung cancer. 2007; 57(3):365–72. doi: 10.1016/j.lungcan.2007.04.002 PMID: 17509725
17. Yannelli JR, Sturgill J, Foody T, Hirschowitz E. The large scale generation of dendritic cells for the immunization of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). Lung cancer. 2005; 47(3):337–50. doi: 10.1016/j.lungcan.2004.08.008 PMID: 15713517
18. Hirschowitz EA, Mullins A, Prajapati D, Baeker T, Kloecker G, Foody T et al. Pilot study of 1650-G: a simplified cellular vaccine for lung cancer. Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer. 2011; 6(1):169–73.
19. Um SJ, Choi YJ, Shin HJ, Son CH, Park YS, Roh MS et al. Phase I study of autologous dendritic cell tumor vaccine in patients with non-small cell lung cancer. Lung cancer. 2010; 70(2):188–94. doi: 10.1016/j.lungcan.2010.02.006 PMID: 20223553
20. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. Annual review of immunology. 2013; 31:51–72. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-100008 PMID: 23157435
21. Adkins I, Fucikova J, Garg AD, Agostinis P, Spisek R. Physical modalities inducing immunogenic tumor cell death for cancer immunotherapy. Oncoimmunology. 2014; 3(12):e968434. doi: 10.4161/21624011.2014.968434 PMID: 25964865
22. Tesniere A, Panaretakis T, Kepp O, Apetoh L, Ghiringhelli F, Zitvogel L et al. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. Cell death and differentiation. 2008; 15(1):3–12. doi: 10.1038/sj.cdd.4402269 PMID: 18007663

23. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. Nature reviews Cancer. 2012; 12(12):860–75. doi: 10.1038/nrc3380 PMID: 23151605

24. Fucikova J, Moserova I, Truxova I, Hermanova I, Vancurova I, Partlova S et al. High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells. International journal of cancer Journal international du cancer. 2014; 135(5):1165–77. doi: 10.1002/ijc.28766 PMID: 24500981

25. Mikyskova R, Stepanek I, Indrova M, Bieblova J, Simova J, Truxova I et al. Dendritic cells pulsed with tumor cells killed by high hydrostatic pressure induce strong immune responses and display therapeutic effects both in murine TC-1 and TRAMP-C2 tumors when combined with docetaxel chemotherapy. International journal of oncology. 2016; 48(3):953–64. doi: 10.3892/ijo.2015.3314 PMID: 26718011

26. Truxova I, Pokorna K, Kloudova K, Partlova S, Spisek R, Fucikova J. Day 3 Poly (I:C)-activated dendritic cells generated in CellGro for use in cancer immunotherapy trials are fully comparable to standard Day 5 DCs. Immunology letters. 2014; 160(1):39–49. doi: 10.1016/j.imlet.2014.03.010 PMID: 24726860

27. Gure AO, Chua R, Williamson B, Gonen M, Ferrera CA, Gnjatic S et al. Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research. 2005; 11(22):8055–62.

28. Karanikas V, Tsochas S, Boukas K, Kerenidi T, Nakou M, Dahabreh J et al. Co-expression patterns of tumor-associated antigen genes by non-small cell lung carcinomas: implications for immunotherapy. Cancer biology & therapy. 2008; 7(3):345–52.

29. Tajima K, Obata Y, Tamaki H, Yoshida M, Chen YT, Scanlan MJ et al. Expression of cancer/testis (CT) antigens in lung cancer. Lung cancer. 2003; 42(1):23–33. PMID: 14512184

30. Grunwald C, Koslowski M, Arsiray T, Dhaene K, Praet M, Victor A et al. Expression of multiple epigenetically regulated cancer/germline genes in nonsmall cell lung cancer. International journal of cancer Journal international du cancer. 2006; 118(10):2522–8. doi: 10.1002/ijc.21669 PMID: 16353146

31. Fucikova J, Rozkova D, Ulcova H, Budinsky V, Sochorova K, Pokorna K et al. Poly I: C-activated dendritic cells that were generated in CellGro for use in cancer immunotherapy trials. Journal of translational medicine. 2011; 9:223. doi: 10.1186/1479-5876-9-223 PMID: 22208910

32. West MA, Wallin RP, Matthews SP, Svensson HG, Zaru R, Ljunggren HG et al. Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. Science. 2004; 305(5687):1153–7. doi: 10.1126/science.1099153 PMID: 15326355

33. Macagno A, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation. Trends in immunology. 2007; 28(5):227–33. doi: 10.1016/j.it.2007.03.008 PMID: 17403614

34. Abdi K, Singh NJ, Matzinger P. Lipopolysaccharide-activated dendritic cells: "exhausted" or alert and waiting? Journal of immunology. 2012; 188(12):5981–9.

35. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. The Journal of experimental medicine. 1996; 184(2):747–52. PMID: 8760829

36. Ma DY, Clark EA. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. Seminars in immunology. 2009; 21(5):265–72. doi: 10.1016/j.smim.2009.05.010 PMID: 19524453

37. Rouas R, Lewalle P, El Ouriaghli F, Nowak B, Duvillier H, Martiat P. Poly(I:C) used for human dendritic cell maturation preserves their ability to secondarily secrete bioactive IL-12. International immunology. 2004; 16(5):767–73. doi: 10.1093/intimm/dxh077 PMID: 15096480

38. Delamarre L, Holcombe H, Mellman I. Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation. The Journal of experimental medicine. 2003; 198(1):111–22. doi: 10.1084/jem.20021542 PMID: 12835477

39. Alanio C, Lemaitre F, Law HK, Hasan M, Albert ML. Enumeration of human antigen-specific naive CD8 + T cells reveals conserved precursor frequencies. Blood. 2010; 115(18):3718–25. doi: 10.1182/blood-2009-10-251124 PMID: 20200354

40. Coulie PG, Connerotte T. Human tumor-specific T lymphocytes: does function matter more than number? Current opinion in immunology. 2005; 17(3):320–5. doi: 10.1016/j.coi.2005.03.002 PMID: 15886124

41. He XS, Mahmood K, Maecker HT, Holmes TH, Kemble GW, Arvin AM et al. Analysis of the frequencies and of the memory T cell phenotypes of human CD8+ T cells specific for influenza A viruses. The Journal of infectious diseases. 2003; 187(7):1075–84. doi: 10.1086/368218 PMID: 12660922

42. Takahashi N, Ohkuri T, Homma S, Ohtake J, Wakita D, Togashi Y et al. First clinical trial of cancer vaccine therapy with artificially synthesized helper/ killer-hybrid epitope long peptide of MAGE-A4 cancer antigen. Cancer science. 2012; 103(1):150–3. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02106.x PMID: 22221328

43. Atanackovic D, Altorki NK, Stockert E, Williamson B, Jungbluth AA, Ritter E et al. Vaccine-induced CD4 + T cell responses to MAGE-3 protein in lung cancer patients. Journal of immunology. 2004; 172 (5):3289–96.

44. Brunsvig PF, Kyte JA, Kersten C, Sundstrom S, Moller M, Nyakas M et al. Telomerase peptide vaccination in NSCLC: a phase II trial in stage III patients vaccinated after chemoradiotherapy and an 8-year update on a phase I/II trial. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research. 2011; 17(21):6847–57.

45. Perez-Diez A, Joncker NT, Choi K, Chan WF, Anderson CC, Lantz O et al. CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. Blood. 2007; 109(12):5346–54. doi: 10.1182/blood-2006-10-051318 PMID: 17327412

6.2 Příloha 2: Vysoký hydrostatický tlak ovlivňuje množství antigenů v nádorových buňkách: význam pro imunoterapii pomocí dendritických buněk.

HHP ošetření nádorových buněk je vhodné pro přípravu DC vakcíny pro léčbu ovariálního, plicního karcinomu a karcinomu prostaty (Fucikova et al 2014). HHP je metoda zabíjení nádorových buněk, která může být standardizována tak, aby splňovala GMP podmínky pro výrobu buněčných vakcín (Fucikova et al 2014). Jako HHP se označuje obecně hydrostatický tlak > 100 MPa (Adkins et al 2018) HHP v závislosti na síle působení vede k denaturaci proteinů v buňce a k jejich následné degradaci (Boonyaratanakornkit et al 2002, Lammi et al 2004), což může mít negativní dopad na množství antigenů potřebných pro stimulaci T lymfocytů při výrobě DC vakcíny.

V této práci jsme testovali rozsah HHP ošetření (150–350 MPa) třech nádorových linií s cílem ustanovit nejlepší podmínky HHP působení, které by vedli k maximální mortalitě buněk, optimální indukci imunogenní smrti, vystavení imunogenních molekul na povrchu umírajících buněk a minimální antigenní degradaci. Množství nádorově-specifických antigenů po HHP ošetření v rozsahu 150–350 MPa bylo sledováno v čase u prostatické linie LNCap, ovariálních linií SK-OV-3 a OV90 a plicních linií H522 a A549-MP1 (linie exprimující MP1 z chřipkového viru). Ukázali jsme, že degradace antigenů je závislá na rozsahu použitého HHP a histologickém původu nádorové linie. Zatímco prostatická a ovariální linie jsou sensitivní k proteinové degradaci až při použitému HHP 300 MPa, plicní linie vykazují degradaci nádorových antigenů při maximální síle HHP 200 MPa. Na základě těchto zjištění vlastnosti DC vakcíny pulzované pouze plicními liniemi H522 a A549 po ošetření HHP 150, 200 a 250 MPa byly dále srovnány. Optimální indukce imunogenní buněčné smrti nádorových buněk byla pozorována při použití HHP 200 MPa. Buňky vykazovaly nejvyšší povrchovou hustotu kalretikulinu, HSP90 a HSP70, nejvyšší sekreci ATP a HMGB1proteinu a byly fagocytovány srovnatelně s buňkami ošetřenými HHP 250 MPa. Analýza MP1-specifických $CD8^+$ T lymfocytů ukázala, že dendritické buňky pulzované plicní linií ošetřenou HHP 150 MPa stimulují vyšší procento T lymfocytů než nádorové buňky ošetřené HHP 200 MPa. Aktivace T regulačních lymfocytů nebyla zjištěna. Mortalita nádorových buněk ošetřených HHP 150 MPa byla malá, což je neslučitelné s jejich využitím při přípravě DC vakcíny, kde negativní kolonyformní testy představují jeden ze vstupních parametrů.

Na základě našich poznatku bylo ošetření plicních linií HHP 200 MPa zvoleno jako nejvhodnější k přípravě nádorových buněk pro pulzaci DC v procesu přípravy DC vakcíny.

Takto ošetřené nádorové buňky vykazují maximální úmrtnost, optimální imunogenicitu a dostatečné množství antigenních proteinů pro stimulaci antigenně specifických T buněčných odpovědí. Tato studie byla podkladem k ustanovení výrobního procesu DC vakcíny pro terapii karcinomu plic.

Vlastní přispění: *návrh experimentů a podílení se na vedení studenta, analýza imunogenní smrti nádorových buněk, sestavení a testování cytometrických panelů, cytometrické analýzy a jejich hodnocení včetně statistického zhodnocení, detekce antigenně specifických* $CD8^+$ *a* $CD4^+$ *T lymfocytů, T regulačních lymfocytů, restimulace T lymfocytů, hodnocení přežívání HHP ošetřených nádorových buněk v kolonyformním testu, soupis metod a částí manuskriptu.*

Immunology Letters 187 (2017) 27–34

Contents lists available at ScienceDirect

Immunology Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/immlet

High hydrostatic pressure affects antigenic pool in tumor cells: Implication for dendritic cell-based cancer immunotherapy

Linda Urbanova[a,b], Nada Hradilova[a,b], Irena Moserova[a,b], Sarka Vosahlikova[a], Lenka Sadilkova[a], Michal Hensler[a], Radek Spisek[a,b], Irena Adkins[a,b,*]

[a] SOTIO, Prague, Czech Republic
[b] Department of Immunology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:
High hydrostatic pressure tumor-associated antigens
Dendritic cells
Lung cancer immunotherapy
$CD8^+$ T cells
Clinical trial

ABSTRACT

High hydrostatic pressure (HHP) can be used to generate dendritic cell (DC)-based active immunotherapy for prostate, lung and ovarian cancer. We showed here that HHP treatment of selected human cancer cell lines leads to a degradation of tumor antigens which depends on the magnitude of HHP applied and on the cancer cell line origin. Whereas prostate or ovarian cell lines displayed little protein antigen degradation with HHP treatment up to 300 MPa after 2 h, tumor antigens are hardly detected in lung cancer cell line after treatment with HHP 250 MPa at the same time. On the other hand, quick reduction of tumor antigen-coding mRNA was observed at HHP 200 MPa immediately after treatment in all cell lines tested. To optimize the DC-based active cellular therapy protocol for HHP-sensitive cell lines the immunogenicity of HHP-treated lung cancer cells at 150, 200 and 250 MPa was compared. Lung cancer cells treated with HHP 150 MPa display characteristics of immunogenic cell death, however cells are not efficiently phagocytosed by DC. Despite induction of the highest number of antigen-specific $CD8^+$ T cells, 150 MPa-treated lung cancer cells survive in high numbers. This excludes their use in DC vaccine manufacturing. HHP of 200 MPa treatment of lung cancer cells ensures the optimal ratio of efficient immunogenic killing and delivery of protein antigens in DC. These results represent an important pre-clinical data for generation of immunogenic killed lung cancer cells in ongoing NSCLC Phase I/II clinical trial using DC-based active cellular immunotherapy (DCVAC/LuCa).

1. Introduction

High hydrostatic pressure (HHP), which refers to non-physiological pressures > 100 MPa, has been known to affect biological systems for more than 100 years [1]. In biotechnology, HHP up to 800 MPa is used to preserve food [2]. Short-term HHP > 300 MPa exposure has been tested experimentally to inactivate viral vaccines, microorganisms or cancer cells in resected tissues in orthopedic surgery [1,3,4]. HHP as a cancer treatment modality was first described in 1972 for treatment of bladder carcinoma [5]. Later, it has been shown that pressurized murine and human tumor cells exhibit an increased immunogenicity *in vivo* [6–8]. HHP-treated cells can be used for cancer vaccine preparation [9]. In our laboratory, we showed that HHP of 250 MPa induces immunogenic cell death (ICD) in human leukemia, prostate and ovarian cancer cell lines and in primary tumor cells [10]. HHP-induced ICD of cancer cells displays similar molecular characteristics described for ICD induced by anthracyclins [11–13] such as the induction of endoplasmic stress response and reactive oxygen species formation, cell surface exposure of heat shock proteins and calreticulin and the release of ATP and HMGB1. Phagocytosis of HHP-treated tumor cells induced maturation of dendritic cells (DC) which led to stimulation of tumor-antigen specific $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells *in vitro* [10]. Immunization with HHP-treated TC-1 cells, which represent a murine model for human papilloma virus-associated tumors, confer prophylactic immunity in mice [14]. Moreover, DC-based vaccine pulsed with HHP-treated tumor TC-1 or prostate tumor cells TRAMP-C2 combined with docetaxel chemotherapy significantly inhibited growth of tumors in mouse models [14]. HHP treatment of tumor cells can be standardized according to GMP requirements and incorporated into manufacturing protocols for DC-based active cellular cancer immunotherapy. According to our standard operating procedure, we use commercially available allogeneic cancer cell lines that are exposed to HHP 250 MPa for 10 min, incubated for 2 h at 37 °C, then frozen in the preservation medium at − 80 °C and stored in liquid nitrogen prepared for loading of patient's DC. Several clinical trials Phase II for ovarian and prostate cancer and one Phase III for prostate using HHP 250 MPa are now in

* Corresponding author at: SOTIO, Jankovcova 1518/2, Prague 7, Czech Republic.
E-mail address: adkins@sotio.com (I. Adkins).

http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2017.05.005
Received 2 March 2017; Received in revised form 28 April 2017; Accepted 5 May 2017
Available online 08 May 2017
0165-2478/ © 2017 European Federation of Immunological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

progress aiming at evaluation the potential of DC-based cancer vaccine loaded with immunogenic HHP-killed tumor cells to modulate the clinical course of the disease [15].

HHP treatment of tumor cells not only affects their viability in dependence on its magnitude but also induces changes in biomolecules [16]. HHP alters phospholipid bilayers from liquid-crystalline to a gel-like phase [17]. HHP inhibits synthesis of cellular proteins and their enzymatic functions [18,19]. While HHP > 400 MPa readily denature proteins, exposure to HHP ~200 MPa often only affects their tertiary and quaternary structures [20]. On the other hand, DNA seems to be resistant to HHP induced damage up to 1000 MPa [21]. As we observed disappearance of some cellular proteins after 24 h during our previous studies we were interested in the stability of protein tumor antigens in HHP-treated tumor cells. This might impact on the capacity of DC-based vaccine pulsed with HHP-treated cells to induce tumor-antigen specific T cell responses. We tested the antigen content in selected prostate, ovarian and lung cancer cell lines after HHP treatments with 150–350 MPa. Importantly, we assessed an optimal HHP value 200 MPa to prepare HHP-sensitive cell lines such as lung cancer cell lines for antigen pulsing of DC-based vaccines to preserve an optimal ratio between immunogenicity, antigen content and viability.

2. Materials and methods

2.1. Human cancer cell lines

Prostate cancer (LNCap), ovarian cancer (OV90 and SK-OV-3) and lung cancer cell lines (H522 and A549) were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, USA). LNCaP, OV90, SK-OV-3 and H522 were cultured in RPMI-1640 complete medium (Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma Aldrich), 2 mM GlutaMAX I CTS (Gibco), 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin (Gibco). A549 cells and A549 stably expressing an influenza matrix protein 1 (A549-MP1) [22] were grown in F12 medium (Gibco) supplemented as other cell lines. Cells were incubated at 37 °C, 5% CO_2.

2.2. HHP treatment of tumor cells

Tumor cell lines in cell culture medium in 1.5 ml tube were treated with HHP of 150, 200, 250 or 300 MPa for 10 min (LNCaP, H522, OV90, A549, A549-MP1) or for 15 min with HHP 150 up to 350 MPa (SK-OV-3) in custom-made device (Resato International BV) located in the GMP manufacturing facility of Sotio, Prague, Czech Republic. After HHP treatment cells were incubated at 37 °C, 5% CO_2 and collected at different time points. For most experiments, cells were collected after 2 h, resuspended in CryoStor™ CS-10 (BioLife Solution) and stored at −80 °C for 24 h before storage in liquid nitrogen for at least 24 h as described in our standard operation procedure for DC vaccine manufacturing.

2.3. Detection of protein tumor antigens by western blot and flow cytometry

Non-treated and HHP-treated tumor cells were collected at the indicated time points, washed with PBS and lysed on ice for 20 min in RIPA buffer (10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA and 1% Triton X-100) with a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics) and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. For separation of plasma membrane and cytosol, Plasma Membrane Protein Extraction Kit (Abcam) was used according to manufacturer's instructions. Lysates were diluted to the same protein concentration using BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Proteins were then separated by 12% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes by Wet/Tank Blotting Sysems (Bio-Rad). Equal protein loading (2 µg – plasma membrane isolation; 8 µg – whole cell lysates) was verified by Ponceau-S staining. Membranes were further blocked with 5% non-fat dry milk in TBST buffer containing 50 mM Tris, 150 mM NaCl and 0.05% Tween 20 for 1 h at room temperature and incubated with primary antibodies to PSA, Her2 (both Cell Signaling Technology, 1:500), PSMA (Abcam, 1:800), CEA (1:500), MAGE-A3 (1:250), PRAME (1:500), Influenza A MP1 (1:500) (all from Thermo Scientific). overnight at 4 °C. After a washing step with TBST, membranes were incubated with secondary anti-mouse (1:10 000) or anti-rabbit (1:10 000) antibody conjugated with horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories) for 1 h at room temperature and washed again with TBST. Membranes were incubated in Restore Stripping Buffer (Thermo Scientific Pierce) and protein loading verified with Na/K ATPase (Cell Signaling Technology, 1:1000), actin (Sigma Aldrich, 1:1000), GAPDH (GeneTex, 1:1000) or actin (Sigma Aldrich, 1:1000) antibodies. Chemiluminescence was detected using G-box (Tecan) after incubating membranes with SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific).

For time-course analyses of the antigen degradation, 3×10^5 cells/well non-treated or HHP-treated were stained extracellularly with primary antibodies EpCAM-PerCP-Cy5.5 and Her2-APC (Biolegend) (2 µl/sample) or their isotype IgG2bκ-PerCP-Cy5.5 (Biolegend) and IgG1-APC (Exbio) at corresponding concentrations. Then cells were fixed for 30 min, 4 °C, permeabilized (Fix/Perm Solution, eBioscience) and stained intracellulalry with the same antibodies for 20 min at 4 °C. Cells were washed with PBS and analysed by LSRFortessa (BD Biosciences). Data were analyzed with FlowJo software (Tree Star). The mean fluorescence intensity (MFI) of each sample was determined and the MFI of the appropriate isotype control was deducted.

2.4. Immunofluorescence

2×10^5 cell/well non-treated cells or HHP-treated were washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min, 4 °C. After the washing with PBS, cells were incubated in 1% BSA in PBS for 30 min and subsequently incubated with Her2 (Cell Signalling, 1:200) primary antibody in PBS overnight at 4 °C. Cells were washed with PBS and incubated with AlexaFluor488 goat anti-mouse IgG1 secondary antibody (Life Technologies, diluted 1:200) for 1 h at 4 °C. After a washing step with PBS cells were incubated with Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor® 594 Conjugate (Invitrogen, 5 µg/ml), for 10 min, washed with PBS, diluted in 4% paraformaldehyde and mounted on slides with ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Molecular Probes) using StatSpin Cytofuge. Cells were analysed under a DMI 6000 inverted Leica TCS AOBS SP5 tandem scanning confocal microscope and a 63x oil immersion objective.

2.5. RNA isolation, reverse transcription and qPCR of cancer cell lines

Total RNA was isolated using an RNeasy Mini Kit (Qiagen). Each sample containing RLT buffer and cell lysate was quickly thawed and processed in accordance with the manufacturer's protocol which included a DNase I digestion step. The RNA concentration and purity were determined using a NanoDrop 2000c (Thermo Scientific), and the RNA integrity was assessed using an Agilent 2000 Bioanalyzer (Agilent). Purified RNA samples were stored at −80 °C until further use. cDNA was synthesized from 100 ng of total RNA using an iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad). Expression of the selected genes was determined by qPCR on CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BioRad). The each 10 µl reaction contained 5 µl of KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (Kapa Biosystems), 0.5 µl of each forward and reverse primers (500 nM each; TIB Molbiol,), 0.5 µl of TaqMan probe (200 nM; TIB Molbiol), 1.5 µl of RNase-free water and 2 µl of 5x diluted cDNA. Each reaction was done in triplicate. The temperature cycling protocol was following: 3 min at 95 °C followed by 45 cycles (95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s). The formation of PCR products of the expected lengths was confirmed by agarose gel electrophoresis. The Cq values were determined using CFX Manager

software (BioRad) and the relative expressions of the studied genes were calculated with GenEx software (MultiD Analyses) with cut off at 36 cycle.

2.6. Analysis of the immunogenicity of HHP-killed tumor cells

For the evaluation of cell viability and cell surface exposure of immunogenic molecules, 3×10^5/well non-treated or HHP-treated cells were incubated with primary antibody HSP70 (R & D Systems), HSP90 and Calreticulin (Enzo Life Sciences) diluted 1:100 in PBS for 25 min at 4 °C. After a washing with PBS, cells were incubated with Dylight 649-conjugated anti-mouse secondary antibody (Jackson ImmunoResearch) diluted 1:600 for 30 min at 4 °C. Subsequently cells were washed with PBS and stained with Annexin V PerCP-eFluor® 710 (1 µl/sample) in 1x Annexin Binding Buffer (eBiosciences) for 20 min in dark at room temperature. Cells were washed with 1x Annexin Binding Buffer and measured in buffer containing DAPI (1 ng/ml, Invitrogen) by flow cytometry as described above.

2.7. Determination of ATP and HMGB1 release

For ATP release analysis 3.5×10^6/ml H522 cells in 1.5 ml were treated left untreated or treated with HHPs and incubated for 1 h at 37 °C. Cell culture supernatant was collected and frozen immediately at −20 °C. Quantitative determination of ATP was assessed using ATP Determination Kit (Molecular Probes) according to manufacturer's protocol. To detect HMGB1 release, non-treated or HHP-treated H522 were plated at 1×10^6 cells/well in 1 ml in 24 well plate and supernatants were collected at 6 h or 24 h and stored at −80 °C. Quantitative determination of HMGB1 in supernatants was assessed using HMGB1 ELISA according to manufacturer's instructions (IBL International).

2.8. Analysis of maturation and phagocytic capacity of dendritic cells

DC were generated by separating $CD14^+$ cells from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy donor buffy coats using EasySep™ Human CD14 Positive Selection Kit (Stemcell Technologies) according to the manufacturer's protocol. Separated monocytes were incubated in complete RPMI 1640 medium containing 20 ng/ml GM-CSF and 2500 U/ml IL-4 (Gentaur) at 37 °C, 5% CO_2. After 5 days, immature DC were incubated with thawed non-treated or HHP-treated H522 cells at DC/tumor cell ratio of 5:1 (2×10^5 DC: 4×10^4 tumor cells/well) in 96-well plate for 24 h. Poly(I:C) (VacciGrade™ InvivoGen) at 25 µg/ml was added to DC as a positive control of DC maturation. DC were then stained with CD80-FITC, CD86-PE, CD83-PE-Cy5.5 (Beckman Coulter), HLA-DR-PE-Cy7 (BD Biosciences) and CD11c-APC (Exbio) (2 µl/sample) monoclonal antibodies in PBS at 4 °C for 25 min. After a washing step with PBS, the expression of molecules was determined by flow cytometry in $CD11c^+$DAPIneg DC and plotted as a fold change of marker MFI with DC maturation induced by non-treated H522 cells set to 1.

To determine the phagocytic capacity of DC, 2×10^6/ml DC were labeled with 2.5 µl/ml Vybrant DiO (Invitrogen) in serum free medium at 37 °C for 20 min. DC were washed and mixed with thawed non-treated or HHP-treated H522 or A549-M1 cells, which had been labeled with 2.5 µl/2 $\times 10^6$ cells/ml Vybrant DiD (Invitrogen) in serum free medium at 37 °C for 20 min prior to HHP treatment. Pulsed DC were analyzed by flow cytometry after 24 h incubation at 37 °C. DC-tumor cells incubated at 4 °C were used as a negative control of phagocytosis. The phagocytic capacity of DC was determined as a percentage of double positive DC (DiO^+DiD^+).

2.9. Detection of MP1-specific $CD8^+$ T cells and $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T regulatory cells

DC loaded with thawed HHP-treated A549-MP1 for 24 h were added to autologous lymphocytes from HLA-A*201 donors at DC/lymphocyte ratio of 1:5 (2×10^5 DC: 1×10^6 lymphocytes/well) in 24-well plate. DC incubated with MP1-specific peptides $MP1_{58\text{-}66}$ (GILGFVFTL) (10 µg/ml; MBL International) were used as a positive controls for $CD8^+$ T cell stimulation. DC-T cell cocultures were cultivated in RPMI-1640 medium containing 10% AB human serum (Invitrogen), 2 mM GlutaMAX I CTS (Gibco), 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin (Gibco), 1% non-essential amino acids (Gibco), 1 mM sodium pyruvate (Gibco) and 50 µM β-mercaptoethanol (Gibco) at 37 °C with 5% CO_2 for 9 days. IL-2 (PeproTech) was added at 20 U/ml after 2 and 5 days of cultivation. T regulatory cells were stained extracellularly with CD3-Alexa700 (Exbio), CD4-PE-Cy7 (eBioscience), CD25-PerCP-Cy5.5 and CD127-Alexa647 (BioLegend) (2 µl/sample) antibodies in PBS for 30 min at 4 °C. After a washing step with PBS cells were fixed and permeabilized with a Fix/Perm Solution (eBioscience) and stained intracellularly with FoxP3-Alexa Fluor 488 (eBioscience) antibody in PBS containing 2% of rat serum (Sigma Aldrich) for 30 min at 4 °C. $MP1_{58\text{-}66}$ specific $CD8^+$ T cells were stained with $MP1_{58\text{-}66}$-HLA-A*201 Tetramer-PE (2 µl/sample; MBL International) for 30 min at room temperature together with CD3-PerCP-Cy5.5 (eBioscience), CD4-PE-Cy7 (eBioscience), CD8-Alexa Fluor 700 and CD45RO-APC (Exbio) antibodies and analyzed by flow cytometry.

3. Colony-forming assays

Thawed H522 and A549-MP1 cells treated with HHPs were diluted to 5.6×10^4 cells/ml, plated in 6-well plates (3 ml/well) and cultured in conditioned RPMI-1640 or F12 complete medium containing 20% heat-inactivated fetal bovine serum, respectively. Cells were incubated at 37 °C with 5% CO_2. After 21 days (H522) or 13 days (A549-MP1), medium was removed and wells were stained with 0.5% crystal violet for 3 min, washed with distilled water and colony-foming units were counted where applicable. As a positive control thawed non-treated cells were plated in concentration of 5.6×10^4 CFU/ml (grown only for 7 days – H522 and for 5 days – A549-MP1) or 30 CFU/ml and conditioned medium itself was used as a negative control.

3.1. Statistical analysis

Two-tailed paired *t*-test was applied to analyze the data using GraphPad PRISM 6 (San Diego, California, USA). Relative tumor antigen gene expression was calculated using the ΔΔCt method. Due to the RNA fragmentation in the samples relative gene expression was normalized to RNA amount. The results were considered statistically significant if $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ or $***p < 0.001$.

4. Results

4.1. The magnitude of HHP and the tissue origin of selected cancer cell line determine the susceptibility of protein tumor antigens to degradation

To prepare immunogenic HHP-killed ovarian and prostate cancer cells for the DC vaccine manufacturing, cells are treated with HHP of 250 MPa for 10 min, incubated for 2 h at 37 °C, and then stored in liquid nitrogen before addition to patient's DC. High hydrostatic pressure affects cellular proteins [18,19] therefore we analyzed the content of protein tumor antigens in allogeneic human cancer cell lines used for the DC-based vaccine generation after treatment with various HHPs. In our in-house custom made device we exposed ovarian (OV90), prostate (LNCaP) and lung cancer (H522) cells to HHP of 150, 200, 250 and 300 MPa for 10 min, or in case of ovarian SK-OV-3 cell line from HHP of 150 up to 350 MPa for 15 min. Cells were subsequently

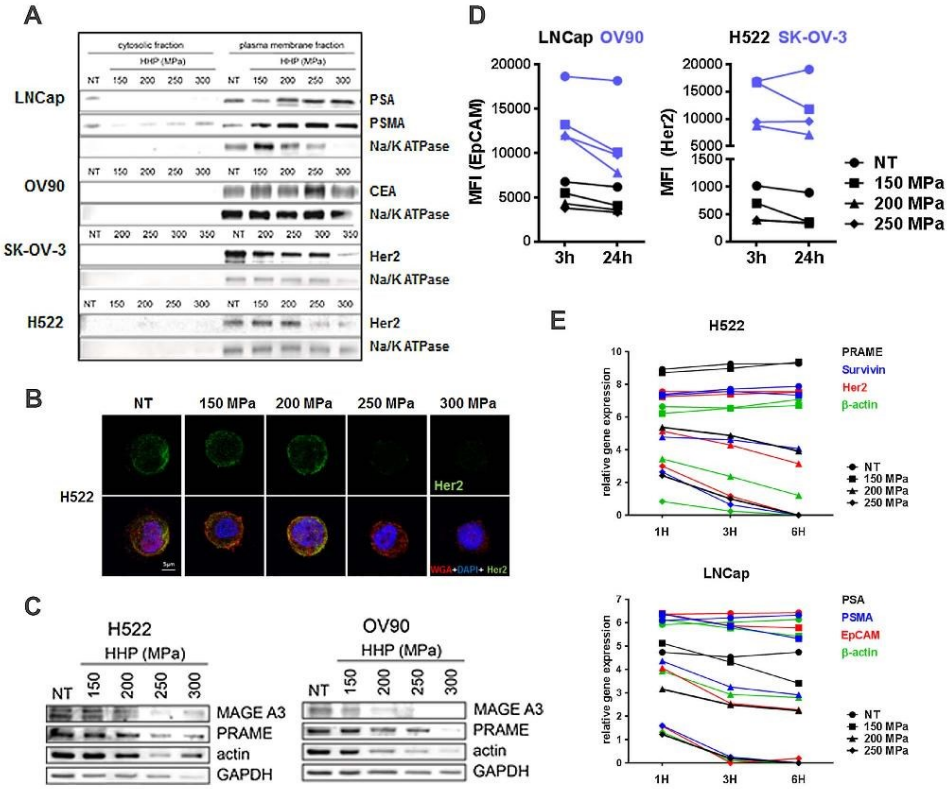


Fig. 1. HHP induces loss of protein tumor antigens in dependence on its magnitude and tissue origin of tumor cell. LNCaP, OV90 and H522 human cancer cell lines were treated with HHP 150–300 MPa for 10 min, or SK-OV-3 was treated with HHP 150–350 MPa for 15 min. Cells were incubated for 2 h at 37 °C and then stored in liquid nitrogen for at least 24 h. The content of the indicated protein tumor antigens in cells directly after thawing was examined by western blot (A, C), confocal microscopy (B) and flow cytometry (D). The blots are representative of three independent experiments. Graphs show mean of triplicates of one representative experiment. (E) Analyses of mRNA content by qPCR. Data from n = 3 were evaluated as a relative expression with GenEx software. Due to the RNA fragmentation in the samples relative gene expression was normalized to RNA amount. The values are given in log2 scale.

incubated for 2 h at 37 °C, and then stored in liquid nitrogen. The content of several membrane-associated tumor antigens in plasma membrane such as PSA, PSMA, CEA and Her2 was analyzed by western blotting directly after thawing of cells (Fig. 1A). As shown in Fig. 1A HHP treatment up to 300 MPa does not significantly affect the amount of tested antigens in ovarian (OV90, SK-OV-3) and prostate (LNCaP) cancer cell lines. However, Her2 antigen is hardly detectable after the HHP treatment of 250 MPa in lung cancer cell line H522. This has also been confirmed by a confocal microscopy (Fig. 1B). We further observed the decrease in cytosolic antigens MAGE-A3 and PRAME after HHP ≥200 MPa not only in H522, but also OV90 (Fig. 1C) which suggests that membrane-associated proteins might be more protected from HHP effects than cytosolic proteins. Fig. 1A and C also show that HHP-induced protein degradation might affect also other cellular proteins as shown in some samples for membrane-bound Na/K ATPase or cytosolic actin and GAPDH proteins.

The observed antigen degradation occurs rapidly and progresses in the course of 24 h even in cells treated with 150 MPa which displays little antigen loss 2 h after HHP treatment (Fig. 1D). The analyses of tumor antigen coding mRNA content showed that mRNA is highly sensitive to HHP in all cell lines tested as its content drops very rapidly within 1 h after HHP treatment of 200 MPa (Fig. 1E). Rapid mRNA degradation was also observed for β-actin-coding mRNA suggesting general affection of mRNA pool. In summary, these results suggest that tumor cells might be differentially sensitive to HHP-induced protein antigen loss in dependence on HHP magnitude and cell tissue origin with lung cancer cell line being the most sensitive.

4.2. Lung cancer cells treated with HHP of 150, 200 and 250 MPa display distinct temporal characteristics of immunogenic cell death

We have previously shown that treatment of lung cancer cell lines H522 and H520 with 250 MPa induces ICD and DC-pulsed with such treated cells induce tumor-antigen specific T cells from non-small cell lung cancer patients [22]. However, as 250 MPa induces the loss of protein tumor antigens in H522 after 2 h, we analyzed if the treatment with lower HHPs such as 150 and 200 MPa, where tumor antigen are preserved, might also induce ICD to replaced 250 MPa treatment. First we analyzed cell viability. H522 cells were treated with 150, 200 or 250 MPa for 10 min and incubated at 37 °C for the indicated time. Cells were stained with Annexin V and DAPI 3 h, 6 h and 24 h after HHP treatment and analyzed by flow cytometry (Fig. 2A and B). As shown in Fig. 2A, 3 h post treatment with 150 MPa 65.8% of cells remain viable in contrast to 38.5% after treatment with 200 MPa and 0.78% after

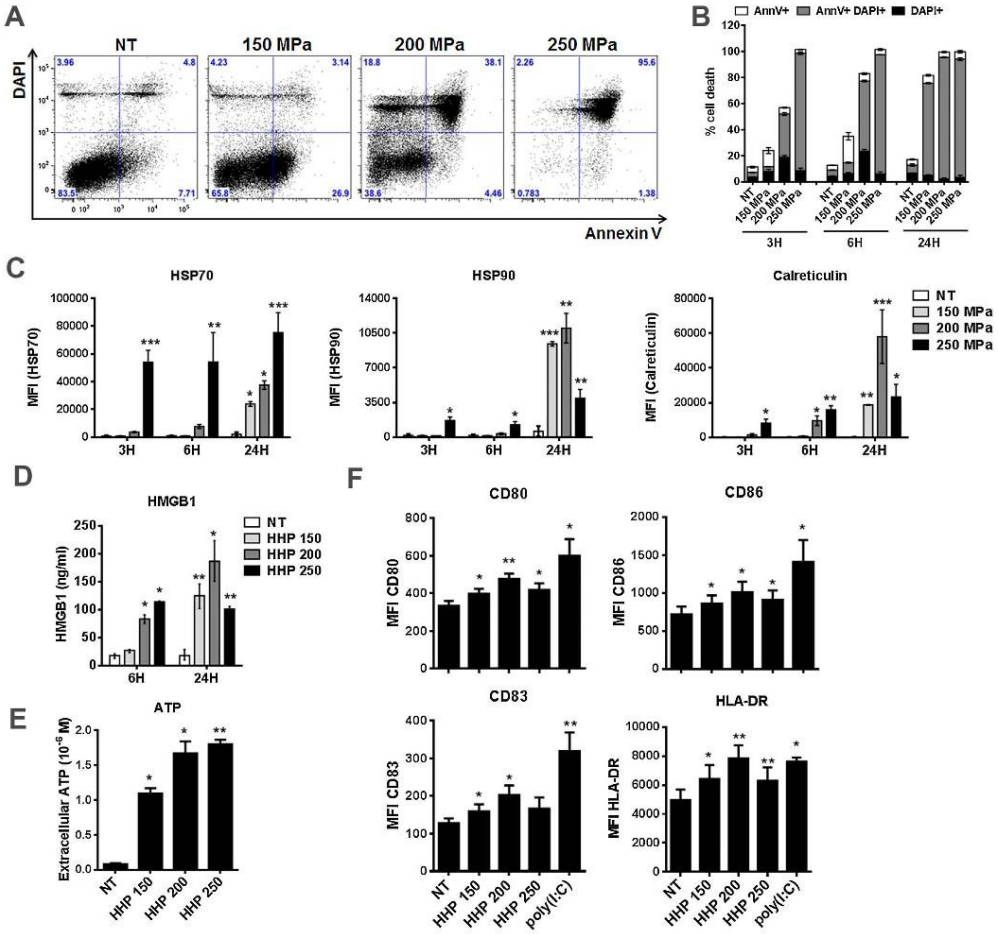


Fig. 2. Lung cancer cells treated with HHP of 150, 200 and 250 MPa display distinct temporal characteristics of immunogenic cell death. H522 cells were left untreated or treated with HHP 150, 200 or 250 MPa for 10 min and incubated for the indicated times at 37 °C. (A) Cell viability was analyzed with Annexin V (AnnV+) and DAPI staining by flow cytometry. Dot plots showing viability at 3 h post HHP treatment are representative of n = 3. (B) Quantitative evaluation of cellular viability in the course of 24 h. Graph represent means ± SEM of n = 3 in duplicates. (C) Flow cytometry analyses of HSP70, HSP90 and calreticulin exposure on H522 cells after HHP treatment. (D) The release of HMGB1 was determined by ELISA and (E) the extracellular ATP content was determined 1 h after HHP treatment by luciferase bioluminescence assay from cell culture supernatants. (F) Human monocyte-derived DC were incubated with non-treated or HHP-treated H522, or with poly(I:C) for 24 h and the expression of CD80, CD86, CD83 and HLA-DR was determined by flow cytometry as MFI. Graphs represent means ± SEM of n = 3 in duplicates. The results were considered statistically significant if *p < 0.05, **p < 0.01 or ***p < 0.001.

250 MPa. However, after 24 h the viability of cells treated with 150 MPa drops to 20% (Fig. 2B) which suggests that HHP as low as 150 MPa induces cell death of lung cancer cells, albeit in a slower rate than treatment with 200 and 250 MPa. To determine the immunogenic character of the HHP-induced cell death, the cell surface exposure of calreticulin, HSP70 and HSP90 and the release of ATP and HMGB1 were analyzed over the course of 24 h. Fig. 1C shows that treatment with all three HHPs eventually leads to the exposure of HSP70, HSP90 and calreticulin as detected by flow cytometry. Whereas H522 cells treated with 250 MPa rapidly expose all molecules within 3 h, cells treated with 150 MPa display a significant exposure of the immunogenic molecules only 24 h post HHP treatment. Similarly, the release of significant amount of HMGB1 from cells treated with 150 MPa was detected only after 24 h (Fig. 2D). On the other hand, the treatment with 150 MPa induced rapid ATP release from H522 cells as detected 1 h post HHP application (Fig. 2E). The concentration of extracellular ATP was, however, lower than that of cells treated with 200 or 250 MPa. To confirm the immunogenicity, HHP-treated cells were incubated with human monocyte-derived DC for 24 h and the expression of maturation-associated molecules has been determined by flow cytometry (Fig. 2F). DC pulsed with H522 treated with all three HHPs displayed a similar increase in CD80, CD86, CD83 and HLA-DR expression on DC in contrast to DC pulsed with non-treated H522. DC stimulated with poly(I:C), which was used as a positive control of DC maturation, displayed even higher expression of all maturation markers. These results showed that all HHP tested induced immunogenic

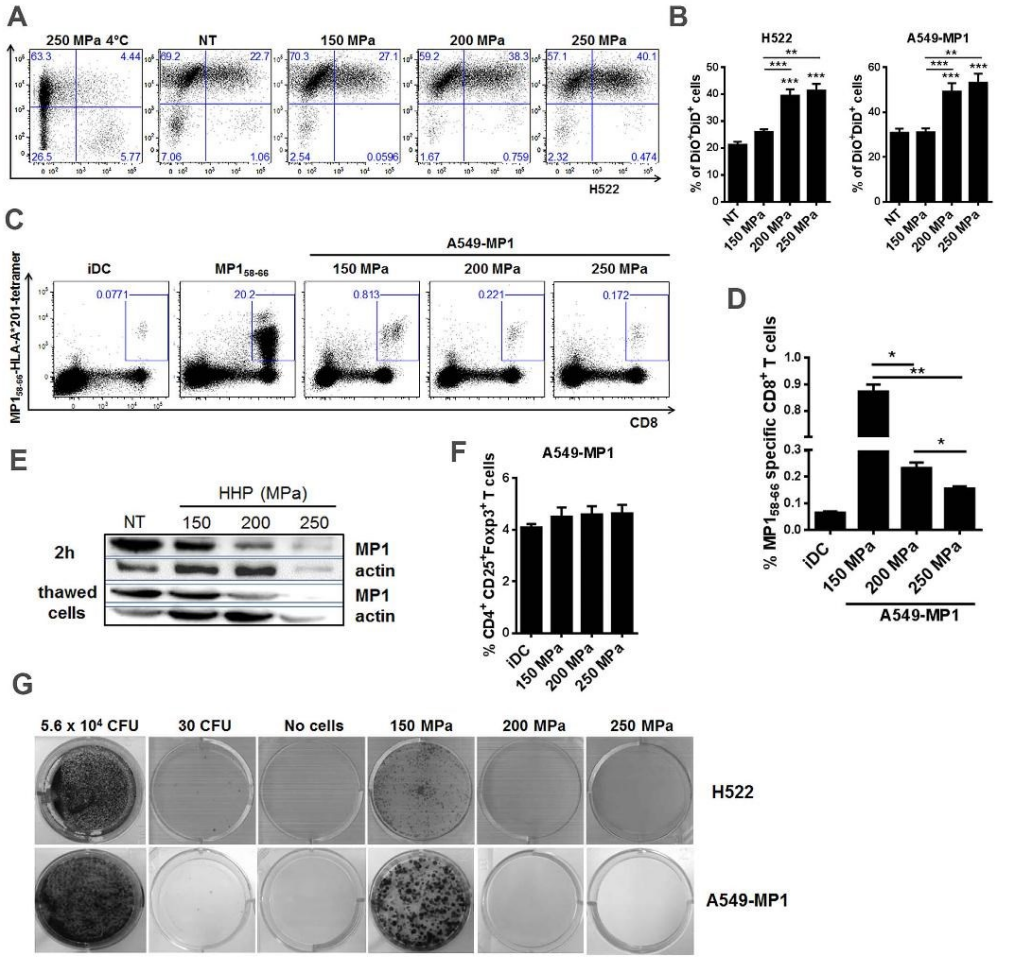


Fig. 3. HHP-induced protein degradation reflects on the induction of antigen-specific CD8$^+$ T cells. (A, B) H522 and A549-expressing influenza matrix protein (A549-MP1) cells were stained with Vybrant DiD before HHP treatment. Similarly, DC were stained with VybrantVR DiO before addition of tumor cells. The phagocytic capacity of DC was assessed as a percentage of DiO$^+$DiD$^+$ DC by flow cytometry after 24 h. Dot plots are representative of n = 3 (A) Graphs represent means ± SEM of n = 3 in duplicates (B). (C,D) 2 × 10^5 HLA-A*201 DC pulsed with thawed HHP-killed A549-MP1 for 24 h were added to 1 × 10^6 autologous T cells and co-cultured for 9 days. MP1-specfic CD8$^+$ T cells were detected with $MP1_{58-66}$-HLA-A*201 tetramer staining. Dot plots are representative of 4–5 donors (C). Graphs represent means ± SEM of n = 4 (D). (E) Western blot analyses of MP1 protein content in A549-MP1 cells 2 h after HHP treatments and directly after thawing the HHP-treated cells. The blot is representative of two independent experiments. (F) The number of CD4$^+$CD25$^+$FoxP3$^+$ T regulatory cells was determined by flow cytometry. Graphs represent means ± SEM of 5 donors from n = 2. (G) H522 and A549-MP1 cell survival was analyzed by clonogenic assays after 21 days (H522) and 10 days (A549-MP1) and compared to non-treated cells. Pictures are representative of n = 3. The results were considered statistically significant if *p < 0.05, **p < 0.01 or ***p < 0.001.

cell death in lung cancer cell line, however, with a distinct temporal pattern.

4.3. HHP-induced protein degradation affects the number of stimulated antigen-specific CD8$^+$ T cells

To determine if the HHP-induced protein antigen degradation influence on the induction of antigen-specific T cells, we used lung cancer cell line A549 expressing matrix influenza protein 1 (A549-MP1) as a model system of antigen-specific T cell stimulation applicable in healthy donors [22]. First we analyze by flow cytometry the capacity of DC to phagocytose thawed H522 and A549-MP1 cells treated with HHP of 150, 200 and 250 MPa after 24 h. As shown in Fig. 3A and B phagocytosis of H522 and A549-MP1 treated with 200 or 250 MPa by DC was significantly higher (by 40%–50%) than phagocytosis of cells treated with 150 MPa and non-treated cells. There was no difference between phagocytosis of 150 MPa treated or non-treated H522 or A549-MP1 (Fig. 3B). A549-MP1 treated with different HHPs displayed similar temporal features of immunogenic cell death and induced DC maturation similarly to H522 in Fig. 2 (data not shown).

Next we analyze the expansion of antigen-specific $CD8^+$ T cells. T cells were incubated with DC loaded with thawed HHP-treated A549-MP1 at ratio 5:1 for 9 days and the expansion of MP1-specific $CD8^+$ T cells was detected by flow cytometry using $MP1_{58-66}$HLA-A*tetramer. DC incubated with MP1-specific $MP1_{58-66}$ (GILGFVFTL) peptides were used as a positive control for $CD8^+$ T cell stimulation. As shown in Fig. 3C and D the highest expansion of $MP1_{58-66}$-specific $CD8^+$ T cells was detected after stimulation with DC loaded with 150 MPa-treated A549-MP1 cells. DC loaded with 200 MPa-treated A549-MP1 induced significantly higher numbers of specific $CD8^+$ T cells than DC loaded with 250 MPa-treated A549-MP1 cells and unpulsed DC (iDC). The $MP1_{58-66}$-specific $CD8^+$ T cells displayed memory $CD45RO^+$ phenotype (data not shown). The antigenic stimulation of $CD8^+$ T cells might reflect the MP1 antigen content in A549 cells, which progressively decreased with an increased HHP as well as with the freezing and thawing procedure (Fig. 3E). We have not detected any increase in $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T regulatory cells in DC-T cells cocultures (Fig. 3F).

Finally, we analyzed the long term survival of H522 and A549-MP1 cells after HHP treatment with 150, 200 and 250 MPa performing clonogenic assays as the requirement of regulatory agencies for killed allogeneic tumor cell lines to be used in DC-based vaccine is a negative growth. Fig. 3G shows that 200 and 250 MPa efficiently kills 100% of tumor cells, whereas there is a significant survival of cells treated with 150 MPa, however far lower than in a positive controls which were grown only for 7 days (H522) or 5 days (A549-MP1), respectively. These data suggest, that despite high $CD8^+$ T cells stimulation, HHP of 150 MPa cannot be used for DC vaccine generation due to the high survival rate of HHP-treated tumor cells.

5. Discussion

HHP targets protein synthesis machinery and impairs the function and structure of proteins in eukaryotic cells [18–20]. In this study, we showed that HHP induces loss of protein tumor antigens in selected human cancer cells in dependence on its magnitude and cell tissue origin which might impact on the generation of HHP-killed tumor cells for antigen pulsing of DC-based immunotherapeutic cancer vaccines.

In our study, human tumor cells treated with HHP of 250 MPa showed differential sensitivity to tumor antigen degradation. Whereas prostate and ovarian cancer cell lines show little antigen degradation, lung cancer cell lines display a significant loss of antigens 2 h after HHP treatment with 250 MPa and cryopreservation. This applies only to membrane-associated antigens as cytosolic protein antigens were diminished also in ovarian cells after treatment with HHPs > 200 MPa. Not only protein tumor antigens were affected, but also other cellular proteins decreased after HHP treatment which confirms general protein inhibition observed under HHP pressure and their general degradation during cell death [18,19]. The rapid mRNA degradation and gradual loss of protein tumor antigens after HHP exposure seems to be specific for the pressure as other physical cell-death inducing modality such as heat shock treatment (HS) shows the opposite effects. Interestingly, mRNA for tumor antigens was shown to increase after HS treatment of 42 °C in several cancer cell lines [23–26]. Also HS treatment leads to the induction of HSPs expression which chaperone cellular proteins and protect them from degradation [27]. It is plausible, that this might also occur in cells treated with HHP 150 MPa where the mRNA does not seem to be affected. The induction of HSP expression, albeit weaker in comparison to HS, was described for HHP treatment under 30 MPa [18]. If this applies also to higher HHP values remains to be determined.

The antigenic loss induced by HHP in sensitive cell lines might hamper the antigen pulsing of DC to generate DC-based vaccine. This was confirmed as DC pulsed with lung cancer cells treated with 150 MPa expanded the highest number of antigen-specific $CD8^+$ T cells in comparison to DC pulsed with 200 or 250 MPa-treated cells. DC loaded with 200 MPa-treated lung cancer cells induced higher $CD8^+$ T cell expansion than DC pulsed with 250 MPa-treated cells which correlated with higher DC stimulatory capacity of 200 MPa-treated cells. In accordance with our previous observation there was twice as high expansion of antigen-specific $CD8^+$ T cells induced by DC pulsed with 250 MPa-treated cells [22]. This shows that despite little antigen detection by western blot, there is still substantial amount of antigen within the cells to be processed by DC and presented in the context of MHC class I molecules to $CD8^+$ T cells. We have shown recently that DC-based HHP lung cancer vaccine induces tumor-specific T cells from NSCLC patients. Moreover, we have confirmed that there are $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells specific to selected antigens Mucin-1, hTERT, Survivin, MAGE-A3 and MAGE-A4 which are expressed by H522 cell line used in our study, present in the blood of 36 NSCLC patients [22].

Tumor cells treated with 250 MPa were efficiently phagocytosed by DC within 24 h which might compensate for the antigen loss. Phagocytosis of 150 MPa-treated cells by DC, however, would not explain the observed high $CD8^+$ T cell expansion as it was almost twice as low as phagocytosis of cells treated with 200 or 250 MPa. One possible mechanism of antigen delivery for cross-presentation to DC might be the one observed under mild heat shock (42 °C) treatment of tumor cells [23,28]. Antigens complexed with HSPs are released from heated tumor cells, taken up by macropinocytosis into DC and then efficiently cross-presented in the context of MHC class I molecules [29]. If this occurs during 150 MPa HHP treatment remains to be elucidated.

Lung cancer cells treated with HHP 150, 200 and 250 MPa showed a distinct temporal pattern of the ICD induction, but they similarly stimulated the expression of maturation-associated and costimulatory molecules when incubated with DC for 24 h. Increased costimulatory capacity of DC during maturation might be important for the stimulation of naïve T cells during the DC-based active cellular immunotherapy. Similarly, there was no induction or difference in number of $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T regulatory cells which is in accordance with our previously reported data [10]. The most significant difference among cells treated with HHP of 150, 200 and 250 MPa was in the long term survival. Although HHP treatment with 150 MPa killed 80% cells after 24 h, they still survived in significantly high numbers when plated in colony-forming assays. This excludes the use of 150 MPa HHP to kill HHP-sensitive cell lung cancer cell lines as the requirement of regulatory agencies for the production of HHP-killed tumor cells for antigen pulsing of DC is a negative growth. Based on data we propose to optimize HHP treatment for HHP-sensitive cell lines such as lung cancer cell lines A549 and H522 to 200 MPa (Fig. 4). HHP treatment with 200 MPa generates immunogenic killed cancer cells 2 h after HHP-treatment, which maintain optimal ratio among immunogenicity,

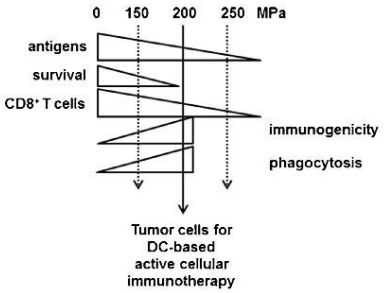


Fig. 4. Optimization of HHP treatment to prepare immunogenic killed HHP-sensitive lung cancer cell lines for DC-based active cellular immunotherapy. The schema represents an optimal HHP value of 200 MPa for HHP-sensitive cancer cell lines such as lung cancer cell lines A549 or H522. HHP treatment with 200 MPa generates immunogenic killed cancer cells 2 h after HHP-treatment, which maintain optimal ratio among immunogenicity, survival and tumor antigen content, for antigen pulsing of DC.

survival and tumor antigen content, for antigen pulsing of DC for DC-based active cellular cancer immunotherapy.

6. Conclusion

In this study, we identified HHP 200 MPa as an optimal pressure value to treat selected human lung cancer cell lines for cancer vaccine preparation to ensure the optimal ratio of efficient immunogenic killing and delivery of protein antigens in DC. These results represent an important pre-clinical data for generation of immunogenic killed lung cancer cells in ongoing NSCLC Phase I/II clinical trial using DC-based active cellular immunotherapy (DCVAC/LuCa) (NCT02470468).

Funding

The work of the Department of Immunology of Charles University is supported by Ministry of Health, Czech Republic–Conceptual Development of Research Organization (University Hospital Motol, Prague, Czech Republic, 00064203).

Competing interest

The authors are employees of Sotio a.s., Prague, Czech Republic. The funder provided support in the form of salaries for authors, but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

[1] A. Aertsen, F. Meersman, M.E. Hendrickx, R.F. Vogel, C.W. Michiels, Biotechnology under high pressure: applications and implications, Trends Biotechnol. 27 (7) (2009) 434–441.
[2] N.K. Rastogi, K.S. Raghavarao, V.M. Balasubramaniam, K. Niranjan, D. Knorr, Opportunities and challenges in high pressure processing of foods, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 47 (1) (2007) 69–112.
[3] P. Diehl, J. Schauwecker, W. Mittelmeier, M. Schmitt, High hydrostatic pressure, a novel approach in orthopedic surgical oncology to disinfect bone, tendons and cartilage, Anticancer Res. 28 (6B) (2008) 3877–3883.
[4] P. Diehl, M. Schmitt, G. Blumelhuber, B. Frey, S. Van Laak, S. Fischer, B. Muehlenweg, R. Meyer-Pittroff, H. Gollwitzer, W. Mittelmeier, Induction of tumor cell death by high hydrostatic pressure as a novel supporting technique in orthopedic surgery, Oncol. Rep. 10 (6) (2003) 1851–1855.
[5] K. Helmstein, Treatment of bladder carcinoma by a hydrostatic pressure technique. Report on 43 cases, Br. J. Urol. 44 (4) (1972) 434–450.
[6] L. Richert, A. Or, M. Shinitzky, Promotion of tumor antigenicity in EL-4 leukemia cells by hydrostatic pressure, Cancer Immunol. Immunother. CII 22 (2) (1986) 119–124.
[7] A. Korn, B. Frey, A. Sheriff, U.S. Gaipl, S. Franz, R. Meyer-Pittroff, G. Bluemelhuberh, M. Herrmann, High hydrostatic pressure inactivated human tumour cells preserve their immunogenicity, Cell. Mol. Biol. 50 (4) (2004) 469–477.
[8] E.M. Weiss, S. Meister, C. Janko, N. Ebel, E. Schlucker, R. Meyer-Pittroff, R. Fietkau, M. Herrmann, U.S. Gaipl, B. Frey, High hydrostatic pressure treatment generates inactivated mammalian tumor cells with immunogeneic features, J. Immunotoxicol. 7 (3) (2010) 194–204.
[9] A. Eisenthal, V. Ramakrishna, Y. Skornick, M. Shinitzky, Induction of cell-mediated immunity against B16-BL6 melanoma in mice vaccinated with cells modified by hydrostatic pressure and chemical crosslinking, Cancer Immunol. Immunother. CII 36 (5) (1993) 300–306.
[10] J. Fucikova, I. Moserova, I. Truxova, I. Hermanova, I. Vancurova, S. Partlova, A. Fialova, L. Sojka, P.F. Cartron, M. Houska, L. Rob, J. Bartunkova, R. Spisek, High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells, J. Int. Cancer 135 (5) (2014) 1165–1177.
[11] D.V. Krysko, A.D. Garg, A. Kaczmarek, O. Krysko, P. Agostinis, P. Vandenabeele, Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy, Nat. Rev. Cancer 12 (12) (2012) 860–875.
[12] G. Kroemer, L. Galluzzi, O. Kepp, L. Zitvogel, Immunogenic cell death in cancer therapy, Annu. Rev. Immunol. 31 (2013) 51–72.
[13] O. Kepp, L. Galluzzi, I. Martins, F. Schlemmer, S. Adjemian, M. Michaud, A.Q. Sukkurwala, L. Menger, L. Zitvogel, G. Kroemer, Molecular determinants of immunogenic cell death elicited by anticancer chemotherapy, Cancer Metastasis Rev. 30 (1) (2011) 61–69.
[14] R. Mikyskova, I. Stepanek, M. Indrova, J. Bieblova, J. Simova, I. Truxova, I. Moserova, J. Fucikova, J. Bartunkova, R. Spisek, M. Reinis, Dendritic cells pulsed with tumor cells killed by high hydrostatic pressure induce strong immune responses and display therapeutic effects both in murine TC-1 and TRAMP-C2 tumors when combined with docetaxel chemotherapy, Int. J. Oncol. 48 (3) (2016) 953–964.
[15] I. Adkins, J. Fucikova, A.D. Garg, P. Agostinis, R. Spisek, Physical modalities inducing immunogenic tumor cell death for cancer immunotherapy, Oncoimmunology 3 (12) (2014) e968434.
[16] B. Frey, C. Janko, N. Ebel, S. Meister, E. Schlucker, R. Meyer-Pittroff, R. Fietkau, M. Herrmann, U.S. Gaipl, Cells under pressure—treatment of eukaryotic cells with high hydrostatic pressure, from physiologic aspects to pressure induced cell death, Curr. Med. Chem. 15 (23) (2008) 2329–2336.
[17] P. Mentre, L. Hamraoui, G. Hui Bon Hoa, P. Debey, Pressure-sensitivity of endoplasmic reticulum membrane and nucleolus as revealed by electron microscopy, Cell. Mol. Biol. 45 (3) (1999) 353–362.
[18] M.J. Lammi, M.A. Elo, R.K. Sironen, H.M. Karjalainen, K. Kaarniranta, H.J. Helminen, Hydrostatic pressure-induced changes in cellular protein synthesis, Biorheology 41 (3–4) (2004) 309–313.
[19] M.A. Elo, H.M. Karjalainen, R.K. Sironen, L. Valmu, N.T. Redpath, G.J. Browne, N. Kalkkinen, H.J. Helminen, M.J. Lammi, High hydrostatic pressure inhibits the biosynthesis of eukaryotic elongation factor-2, J. Cell. Biochem. 94 (3) (2005) 497–507.
[20] B.B. Boonyaratanakornkit, C.B. Park, D.S. Clark, Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins, Biochim. Biophys. Acta 1595 (1–2) (2002) 235–249.
[21] R.B. Macgregor Jr., Effect of hydrostatic pressure on nucleic acids, Biopolymers 48 (4) (1998) 253–263.
[22] N. Hradilova, L. Sadilkova, O. Palata, D. Mysikova, H. Mrazkova, R. Lischke, R. Spisek, I. Adkins, Generation of dendritic cell-based vaccine using high hydrostatic pressure for non-small cell lung cancer immunotherapy, PLoS One 12 (2) (2017) e0171539.
[23] H. Shi, T. Cao, J.E. Connolly, L. Monnet, L. Bennett, S. Chapel, C. Bagnis, P. Mannoni, J. Davoust, A.K. Palucka, J. Banchereau, Hyperthermia enhances CTL cross-priming, J. Immunol. 176 (4) (2006) 2134–2141.
[24] H. Feng, Y. Zeng, M.W. Graner, E. Katsanis, Stressed apoptotic tumor cells stimulate dendritic cells and induce specific cytotoxic T cells, Blood 100 (12) (2002) 4108–4115.
[25] T. Takahashi, N. Mitsuhashi, H. Sakurai, H. Niibe, Modifications of tumor-associated antigen expression on human lung cancer cells by hyperthermia and cytokine, Anticancer Res. 15 (6B) (1995) 2601–2606.
[26] J.Y. Wong, N.F. Mivechi, R.J. Paxton, L.E. Williams, B.G. Beatty, J.D. Beatty, J.E. Shively, The effects of hyperthermia on tumor carcinoembryonic antigen expression, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 17 (4) (1989) 803–808.
[27] R.I. Morimoto, Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes, Science 259 (5100) (1993) 1409–1410.
[28] A. Melcher, S. Todryk, N. Hardwick, M. Ford, M. Jacobson, R.G. Vile, Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression, Nat. Med. 4 (5) (1998) 581–587.
[29] R. Suto, P.K. Srivastava, A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides, Science 269 (5230) (1995) 1585–1588.

6.3 Příloha 3: Cytotoxická hypertermie indukuje imunogenní smrt nádorových buněk

Bylo ukázáno, že tepelné ošetření neboli hypertermie nádorových buněk indukuje buněčnou smrt zprostředkovanou různými molekulárními mechanismy (Hildebrandt et al 2002, Milleron & Bratton 2007, Roti Roti 2008). Dále bylo ukázáno, že tento efekt je závislý na termální dávce (většina studií 41–44 °C), době tepelného působení (30 min či 1 h), typu nádorových buněk a fázi buněčného cyklu (Hildebrandt et al 2002, Roti Roti 2008). Hypertermie (HT) ≤ 42 °C nádorových buněk zvyšuje jejich imunogenicitu vedoucí k aktivaci nádorově specifických T lymfocytů *in vitro* i *in vivo* v závislosti na zvýšené indukci proteinů teplotního šoku (HSP), typicky HSP70 (Clark et al 2019, Clark & Menoret 2001, Feng et al 2002, Melcher et al 1998). Nicméně standartní HT často vede k přežívání nádorových buněk tzv. termální toleranci, jelikož aplikované teploty nejsou dostatečné k usmrcení všech buněk (Hildebrandt et al 2002). Velmi málo je známo o působení cytotoxické hypertermie (cHT) > 44 °C, i když terapeutické techniky používající vysoké tepelné působení jsou v klinické onkologii používány na lokální bázi k eliminaci nádorů (Hildebrandt et al 2002, Zerbini et al 2006, Zhou 2011).

V této práci jsme nejdříve analyzovali molekulární mechanismy buněčné smrti plicní a ovariální nádorových linií po působení HT (42 °C) a cHT (47 °C). Zatímco HT ošetření (42 °C, 1 h) nevedlo k indukci buněčné smrti, cHT (47 °C, 1 h) ošetření vedlo k aktivaci mechanismů imunogenní buněčné smrti během 24 h, které jsou charakterizované indukcí ER stresu, zvýšenou produkcí ROS, vystavením proteinů kalretikulinu, HSP70 a HSP90 na povrchu buňky, uvolněním ATP a hMGB1 proteinu a aktivací mitochondriálních mediátorů a kaspázových enzymů zprostředkujících apoptózu buněk. cHT ošetření nádorových buněk nevedlo k poklesu množství nádorových antigenů MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, CEA a HER2., naopak jejich přechodná zvýšená exprese byla pozorována. To je v souladu s publikovanými daty, kdy bylo ukázáno, že ošetření HT při 42 °C vedlo ke zvýšení mRNA pro nádorově specifické antigeny v několika liniích (Shi et al 2006, Takahashi et al 1995), i když toto pro vyšší teploty pozorováno nebylo. Imunogenní vlastnosti cHT ošetřených nádorových buněk byly dále testovány při přípravě DC vakcíny. Sledována byla fenotypická maturace DC, produkce prozánětlivých cytokinů, schopnost fagocytózy a schopnost stimulovat antigenně specifické T lymfocyty. Pulsované DC zvyšují expresi kostimulačních molekul CD80, CD83, CD86 a HLA-DR molekul, zvyšují schopnost fagocytózy, která je částečné závislá na přítomnosti kalretikulinu na povrchu buněk a produkují prozánětlivých cytokinů IL-12p70, a TNF-α, které jsou podstatné pro rozvoj protinádorové imunity. Takto

připravená vakcína byla dále testována na schopnost aktivovat antigenně-specifické T buněčné odpovědi. Za použití specifického antigenního systému založeného na plicní linii A549 exprimující MP1 protein viru chřipky jsme ukázali, že antigen z cHT ošetřených nádorových linií je po pulzaci prezentován dendritickou buňkou antigen-specifickým $CD8^+$ T buňkám. Tyto specifické $CD8^+$ T lymfocyty byly detekovány průtokovou cytometrií pomocí specifických tetramerů ($MP1_{58-66}$-HLA-A∗201). Aktivace T regulačních lymfocytů nebyla detekována. Schopnost cHT ošetřených nádorových buněk indukovat protinádorovou imunity byla na závěr potvrzena v myším nádorovém modelu. Ukázali jsme, že myší nádorové buňky CT26 umírající imunogenní buněčnou smrtí aktivují DC. Profylaktická imunizace myší pomocí cHT ošetřených CT26 vedla k zabránění růstu nádorů a zvýšení přežívání experimentálních zvířat se stejnou efektivitou jako imunizace buněk ošetřených mitoxantronem, známým induktorem imunogenní buněčné smrti.

Tato práce poprvé ukázala, že tepelné ošetření nádorových buněk využívající cHT (47° C, 1h) indukuje imunogenní buněčnou smrt do té doby popsanou pro některá chemoterapeutika, fyzikální modality jako např. HHP, UV-C či fotodynamickou terapii a oncolytické viry (Adkins et al 2014, Dudek et al 2013, Serrano-Del Valle et al 2019). cHT metoda zabíjení nádorových buněk je vhodná pro přípravu DC vakcín, nicméně by vyžadovala standardizaci pro GMP výrobu. I když je cHT využívána v určitých indikacích v klinické praxi, např. radiofrekvenční ablace nebo ultrazvuková vysokofrekvenční terapie (Zerbini et al 2006, Zhou 2011). V současnosti není známo, jestli dochází k indukci imunogenní buněčné smrti nádorových buněk přímo v pacientech.

Vlastní přispění: *návrh některých experimentů a jejich provedení analýza imunogenní smrti nádorových buněk, sestavení cytometrických panelů, cytometrické analýzy a jejich hodnocení včetně statistického zhodnocení., detekce antigenně specifických $CD8^+$ a $CD4^+$ T lymfocytů, T regulačních lymfocytů, restimulace T lymfocytů, hodnocení přežívání HHP ošetřených nádorových buněk v kolonyformním testu, soupis metod v manuskriptu.*



OncoImmunology

ISSN: (Print) 2162-402X (Online) Journal homepage: https://www.tandfonline.com/loi/koni20

Severe, but not mild heat-shock treatment induces immunogenic cell death in cancer cells

Irena Adkins, Lenka Sadilkova, Nada Hradilova, Jakub Tomala, Marek Kovar & Radek Spisek

To cite this article: Irena Adkins, Lenka Sadilkova, Nada Hradilova, Jakub Tomala, Marek Kovar & Radek Spisek (2017) Severe, but not mild heat-shock treatment induces immunogenic cell death in cancer cells, OncoImmunology, 6:5, e1311433, DOI: 10.1080/2162402X.2017.1311433

To link to this article: https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1311433

Published online: 08 May 2017.

Submit your article to this journal

Article views: 1292

View related articles

View Crossmark data

Citing articles: 13 View citing articles

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=koni20

ONCOIMMUNOLOGY
2017, VOL. 6, NO. 5, e1311433 (13 pages)
https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1311433

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

ORIGINAL RESEARCH

Check for updates

Severe, but not mild heat-shock treatment induces immunogenic cell death in cancer cells

Irena Adkins[a,b], Lenka Sadilkova[a], Nada Hradilova[a,b], Jakub Tomala[c], Marek Kovar[c], and Radek Spisek[a,b]

[a]Sotio a.s, Prague, Czech Republic; [b]Department of Immunology, 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Charles University, Prague, Czech Republic; [c]Laboratory of Tumor Immunology, Institute of Microbiology of the ASCR v.v.i, Prague, Czech Republic

ABSTRACT

The mechanisms of immunogenicity underlying mild heat-shock (mHS) treatment < 42°C of tumor cells are largely attributed to the action of heat-shock proteins; however, little is known about the immunogenicity of tumor cells undergoing severe cytotoxic heat-shock treatment (sHS > 43°C). Here, we found that sHS, but not mHS (42°C), induces immunogenic cell death in human cancer cell lines as defined by the induction of ER stress response and ROS generation, cell surface exposure of calreticulin, HSP70 and HSP90, decrease of cell surface CD47, release of ATP and HMGB1. Only sHS-treated tumor cells were efficiently killed and phagocytosed by dendritic cells (DCs), which was partially dependent on cell surface calreticulin. DCs loaded with mHS or sHS-treated tumor cells displayed similar level of maturation and stimulated IFNγ-producing $CD8^+$ T cells without any additional adjuvants *in vitro*. However, only DCs loaded with sHS-treated tumor cells stimulated antigen-specific $CD4^+$ T cells and induced higher $CD8^+$ T-cell activation and proliferation. sHS-treated murine cells also exposed calreticulin, HSP70 and HSP90 and activated higher DC maturation than mHS treated cells. Vaccination with sHS-treated tumor cells elicited protective immunity in mice. In this study, we defined specific conditions for the sHS treatment of human lung and ovarian tumor cells to arrive at optimal ratio between effective cell death, immunogenicity and content of tumor antigens for immunotherapeutic vaccine generation.

Abbreviations: ATP, adenosine triphosphate; CRT, calreticulin; DAMPs, danger-associated molecular patterns; DC, dendritic cells; ER, endoplasmic reticulum; HHP, high hydrostatic pressure, HMGB1, high-mobility group box 1; HS, heat-shock treatment; HSP, heat-shock protein; ICD, immunogenic cell death; IFNγ, interferon-gamma; ROS, reactive oxygen species

ARTICLE HISTORY
Received 28 September 2016
Revised 18 March 2017
Accepted 22 March 2017

KEYWORDS
Antitumor immunity; calreticulin; cancer immunotherapy; dendritic cells; heat-shock treatment; hyperthermia; immunogenic cell death

Introduction

Hyperthermia (HT) has been studied for the treatment of malignant diseases since 1970s.[1] In 2011, HT treatment prior to radiotherapy was approved by FDA to treat cervical cancer patients. The immune system mediates the major therapeutic effect of HT;[2] therefore, a major unanswered question is whether the combination of HT with various immunotherapeutic approaches would translate into a better clinical outcome in cancer patients. However, there are no clinical data on the use of heat-shock (HS)-killed tumor cells alone or as a source for antigens for active cellular immunotherapy in clinical protocols.

Several cytotoxic drugs, oncolytic viruses and some physical modalities were shown to induce immunogenic cell death (ICD) of tumor cells, subsequently leading to the induction of effective antitumor immune responses *in vitro* and *in vivo*.[3-6] On the molecular level, ICD is characterized by elevated levels of reactive oxygen species (ROS) and endoplasmic reticulum (ER)-stress unfolded protein response (UPR) during which several immunogenic proteins such as an "eat-me" signal calreticulin[7] or danger-associated molecular patterns (DAMPs)[8,9] such as HSP70 and 90,[10] ATP[11] or HMGB1[12] are exposed at the cell surface or released to the cell vicinity.[5,13,14] These molecules facilitate the engulfment of dying tumor cells by immune cells and stimulate antigen presentation. Activated dendritic cells, in particular, prime antitumor adaptive T-cell responses.[4,5] We have recently described ICD induced by high hydrostatic pressure (HHP), which bears the advantage of leaving behind no residual chemical;[15] therefore, being suitable for generation of immunogenic tumor cells for active cancer immunotherapy approaches.[6]

HS-treated tumor cells were documented to die by various modes of cell death depending on the thermal dose.[1,16,17] Thermal dose encompasses the temperature (ranging in most studies from 41°C to 44°C), the duration of heat treatment (30 min or 1 h), tumor cell type and the cell cycle phase.[1,16] Mouse and human tumor cells subjected to mild HS (mHS) ≤ 42°C showed increased immunogenicity as well as the induction of tumor-antigen specific T-cell responses *in vitro* and *in vivo*, which has been attributed mainly to the action of HS proteins such as HSP70.[18-26] Furthermore, HS treatment at 42°C was shown to increase the mRNA for tumor-specific antigens in several cancer cell lines.[21,27,28] However, despite increased immunogenicity, mHS treatment or repeated mHS application

CONTACT Dr. Irena Adkins adkins@sotio.com Sotio a.s, Jankovcova 1518/2, Prague 7 170 00, Czech Republic.
© 2017 Taylor & Francis Group, LLC

on cancer cells often leads to the induction of thermotolerance and cancer cell survival.[1]

Little is known about the mechanisms of immunogenicity of tumor cells that undergo treatment with severe cytotoxic temperatures ($\geq$ 43°C). The induction of tumor-specific T cells in patients with hepatocellular carcinoma after *in situ* radiofrequency ablation of tumors (> 45–50°C) was documented.[29] The recent development of new techniques based on magnetic nanoparticles[30] shows that heat treatment at 46.8°C or 50–55°C can significantly reduce the tumor growth or induce abscopal antitumor immune effects *in vivo*.[31,32] Recently, it has been shown that microwave thermal ablation enhanced immunogenicity of osteosarcoma *in vitro* and *in vivo* accompanied by an increased abundance of calreticulin and release of ATP and HMGB1.[33] Similarly, prostate cancer cells or NHL cell lines treated with cytotoxic HS *in vitro* were shown to expose calreticulin, HSP90, HSP70 and release HMGB1 and ATP and stimulate DC maturation.[34,35] This suggests that severe heat shock (sHS) treatment might be considered as another physical modality inducing ICD.[6]

In this study, we examined the immunogenic features of human cancer cell lines treated with mHS (42°C) and sHS (47°C). We found that only sHS induced ICD as defined by activation of molecular pathways underlaying the immunogenic DAMPs exposure/release in human cancer cells and by the induction of a prophylactic immunity in *in vivo*. Moreover, we defined specific conditions of the sHS treatment to obtain an optimal ratio between cell death, immunogenicity and the presence of tumor antigens to generate an immunotherapeutic vaccine.

Materials and methods

Cell lines

A549, OV90 and CT26 were obtained from ATCC. OV90 and CT26 were cultured in RPMI 1640 (Gibco) containing 10% heat-inactivated FCS, 100 U/mL of penicillin/streptomycin (Gibco) and 2 mmol/L L-glutamine (Gibco). A549 cells were cultured in F12 medium (Gibco) containing 10% heat-inactivated FCS and 100 U/mL of penicillin/streptomycin. Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) *wt* and MEFs Bax/Bak −/− were kindly provided by Prof. Guido Kroemer MD, INSERM U848, Institut Gustave Roussy, France. Wild-type (*wt*) and calreticulin-deficient MEFs ($Calr^{-/-}$) were kindly provided by Prof. Marek Michalak, University of Alberta, Edmonton, Canada. MEFs were cultivated in DMEM (Sigma) containing glucose (1 g/L), 10% heat-inactivated FCS, 100 U/mL of penicillin/streptomycin, 2 mmol/L L-glutamine, non-essential amino acids (1%; Gibco) and β-mercaptoethanol (0.1%; Gibco).

Antibodies

The following antibodies were used for human studies: anti-human Calreticulin, HSP90 (both from Enzo Life Sciences), HSP70 (R&D Systems), CD47 (B6H12; Santa Cruz Biotechnology), anti-CD80-FITC, CD86-PE, CD83-PerCP-Cy5.5 (Beckman Coulter, Inc.), HLA-DR-PE-Cy7, IFNγ-FITC (BD Biosciences), CD11c-APC, CD8-PE-Dylight594, CD3-Alexa 700, CD8-Alexa Fluor 700, CD127-Alexa647, CD45RO-APC (ExBio), CD4-PE-Cy7, Foxp3-Alexa488, CD3-PerCP-Cy5.5, (eBioscience), CD137-PE (4–1BB), CD25-PerCP-Cy5.5, Ki-67-PE (BioLegend). The following antibodies were used for mouse studies: anti-mouse Calreticulin (Abcam), CD80-FITC, CD86-PE, CD40-PerCP-eFluor710, I-A/I-E-PE-Cy7, CD11c-APC (all from eBioscience), Following antibodies were used for immunoblot analyses: anti-human Calreticulin, α-fodrin (both from Enzo Life Sciences), actin (Sigma), BiP, caspase-8, caspase-9, caspase-3, caspase-7, caspase-6, caspase-4, CHOP, lamin, phospho-eIF2α (Ser51), eIF2α, VDAC, cytochrome c, Her2/neu, PERK, IRE1α, XBP1 (all from Cell Signaling Technology), CEA (3G12; Pierce), MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4 (Santa Cruz Biotechnology). Secondary anti-rabbit and anti-mouse antibodies conjugated to horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories) were used.

Cell death inducing treatment of tumor cells

For HS treatment, cells at 1–4 $\times$ 10^6/mL in 1.5-mL tube were placed in heating blocks (Eppendorf) and incubated at 42°C or 47°C for 1 h. Control non-treated cells were incubated at 37°C. Subsequently, cells at 1 $\times$ 10^6/mL were transferred into tissue culture plates and incubated at 37°C for additional 6 h or 24 h. For UV treatment, cells were irradiated by UV-B (312 nm, 7.6 J/cm^2) for 10 min. For treatment with chemotherapeutics, cells were incubated with idarubicin hydrochloride (37 μM; Sigma Aldrich) or cisplatin (A549 1000 μM or OV90 300 μM; Ebewe Pharma).

Flow cytometry analysis of cell death and immunogenic molecules

To detect Calreticulin, HSP70, HSP90 and CD47 cells at 6 h or 24 h were incubated with primary antibodies for 30 min, at 4°C and then stained with APC-conjugated secondary anti-rabbit antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories) for additional 30 min, at 4°C. Cell viability was determined by staining with AnnexinV-PE (BioLegend) or AnnexinV-PerCP-eFluor710 (eBioscience) for 15 min in Annexin V-staining buffer (eBioscience) and DAPI by flow cytometry (LSRFortessa, BD Biosciences). Data were evaluated with FlowJo software (Tree Star). The MFI of markers was determined in $AnnexinV^+$/Dapi negative population. A549 cells were pretreated with caspase-9 inhibitor (Z-LEHD-FMK, 50 μM) (Enzo Life Sciences, Inc.) overnight before HS treatment of 1 h. Cells death was detected by DAPI and AnnexinV-PE (BioLegend) staining by flow cytometry.

Colony-forming assay

Human tumor cells A549 and OV90 were heat-treated as described above and incubated at 37°C for additional 24 h. Mouse CT26 were heat-treated for 1 h and incubated at 37°C for 1h. Cells at concentration of 1.66 $\times$ 10^5/well/3 mL were seeded in six-well plate in fresh medium mixed with a conditioned media at ratio 1:1 and incubated at 37°C for 10 d (human cells) or 14 d (mouse cells), respectively. After that, medium was discarded, cells stained with crystal violet for 5 min, washed with distilled water and colony-forming units

(CFU) were counted where applicable. A low CFU growth (30 CFU/well) was set as a positive control of growth-favoring conditions.

Detection of changes in mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species and the intracellular Ca^{2+} release

To detect changes in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$m), 1×10^6/mL of tumor cells were stained with tetramethylrhodamine, ethyl ester (TMRE, 100 nM, Invitrogen) for 15 min at 37°C directly after HS treatment (0 h = 1 h at 47°C). To detect ROS, 1×10^6/mL of tumor cells were allowed to rest at 37°C for 1 h before staining with cell permeable 2′,7′-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) fluorogenic dye (20 μM) (Abcam) for 30 min at 37°C. Stained cells were treated with HS as indicated above and placed to 37°C for 3 h. For measurement of intracellular Ca^{2+} release 1×10^6/mL tumor cells after HS treatment were stained with Fluo-4-AM (4 μM, Molecular Probes Invitrogen) for 20 min at 37°C. $\Delta\Psi$m, ROS and Ca^{2+} release were detected by flow cytometry. Cells were incubated with L-glutathione (GSH; 5 mM) and N-acetyl-L-cysteine (NAC; 5 mM) (Sigma Aldrich) were used to inhibit ROS induction in HS-treated cells. NAC and GSH were prepared in complete media with adjusted pH to 7.3–7.4.

Confocal microscopy

HS treated tumor cells (1×10^6/mL) were incubated for 6 h at 37°C. Cells were stained with primary antibodies to Calreticulin, CD47, HSP70 and HSP90, and Alexa488-conjugated secondary anti-rabbit antibody (Life Technologies) to detect the immunogenic molecules and CD47 as described above and. After that cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min and mounted on slides using cytocentrifuge (StatSpin). Cells were analyzed Leica TCS A0BS SP5 tandem scanning confocal microscope.

HMGB1 and ATP release

Tumor cells at 1×10^6/mL heated as described above were incubated for additional 1 h at 37°C. For measurement of extracellular ATP release cell culture supernatant was used and for intracellular ATP detection, cells were centrifuged 2,200 rpm, 2 min and pellet resuspended in cell lysis buffer (eBioscience). ATP content was determined according to manufacturer's instructions (ATP assay kit, Sigma-Aldrich). HMGB1 release was determined by HMGB1 ELISA kit (IBL International) from cell culture supernatant according to manufacturer's instructions after 6 h and 24 h.

DC maturation and cytokine production

Immature monocyte-derived dendritic cells (MDDCs) were generated using EasySep human CD14-positive selection kit (StemCell Technologies, Inc.) from human PBMCs isolated from buffy coats (provided by the Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic). Monocytes were cultured for 5 d with human GM-CSF (500 U/mL; Gentaur) and IL-4 (20 ng/mL; PeproTech) in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with L-glutamine (2 mM, Sigma), 100 U penicillin/mL and 10% heat-inactivated FCS at 37°C. DCs were pulsed with HS-treated tumor cells (1 h HS + 23 h at 37°C) at ratio 5:1 for 24 h or incubated separately in transwell system (Corning). Bone marrow cells were flushed from femurs and tibias of BALB/c mice, and cultured at 2×10^6/mL in 100-mm dishes in 10 mL of in the same medium as human DCs, but supplemented with murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (20 ng/mL, PeproTech) and IL-4 (5 ng/mL, Peprotech). Fresh medium was added on day 3 or changed on day 6. Loosely attached cells were used for experiments at day 7. DCs were pulsed with HS-treated CT26 (1 h sHS + 5 h at 37°C) at ratio 5:1 for 24h. DCs incubated with poly(I:C) VacciGrade™ (InvivoGen) 25 μg/mL for 24 h were used as a positive control of DC maturation. The expression of CD80, CD86, CD83 and HLA-DR (human DCs) or CD80, CD86, I-A/I-E and CD40 (in mouse DC) in $CD11c^+$DAPI negative cells were analyzed by flow cytometry. MFI of control unpulsed immature DCs were set to 1. The production of cytokines IL-10, IL-12p70 and TNF-α by human DCs was detected by ELISA (R&D Systems) according to manufacturer's instruction from cell culture supernatants after 24 h.

Phagocytosis of HS-treated cells by DCs

Tumor cells A549, OV90 or *wt* MEFs, $Calr^{-/-}$ MEFs (2×10^6/mL) were stained with VybrantVR DiD (2.5 μL/mL, Invitrogen), in serum free RPMI medium for 20 min, at 37°C prior the HS treatment. Immature monocyte-derived DCs (day 5) or mouse bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs)[36] were stained with VybrantVR DiO (2.5 μL/mL, Invitrogen) for 20 min, at 37°C. Cells were washed twice with serum-containing medium. DCs were pulsed with tumor cells or MEFs at a DC/cell ratio 5:1 for 24 h and the amount of phagocytosed tumor cells was analyzed by flow cytometry and plotted as a percentage of DiO^+DiD^+ DCs. DCs pulsed with tumor cells incubated at 4°C for 24 h were used as a negative control for phagocytosis.

Detection of antigen-specific IFNγ-producing T cells and $CD4^+CD25^+Foxp3^+CD127^{low}$ T regulatory cells

DCs pulsed with HS-treated tumor cells at ratio 5:1 for 24 h were added to autologous lymphocytes at T cell:DC ratio of 10:1 for 7 d. IL-2 (50 U/mL; PeproTech) was added on days 3 and 5. On day 7, lymphocytes were re-stimulated with fresh DCs treated accordingly to original samples. After 1 h, Brefeldin A (eBioscience) was added to block the release of IFNγ for 5 h. After staining with extracellular antibodies for 20 min, 4°C cells were fixed and permeabilized (Fix-PermBuffer Bioscience), and stained to detect intracellular IFNγ or Ki-67 for 30 min at 4°C. To detect $MP1_{58-66}$-specific $CD8^+$ T cells, DCs were pulsed with HS-treated A549 stably expressing influenza matrix protein 1(MP1)[37] and incubated with autologous HLA-$A2^+$ T cells as described above. After 8 d, cells were stained with $MP1_{58-66}$-HLA-A*201 Tetramer-PE (2 μL/sample; MBL International) for 30 min together with CD3-PerCP-Cy5.5, CD4-PE-Cy7, CD8-Alexa Fluor 700 and CD45RO-APC antibodies and analyzed by flow cytometry. DCs incubated with $MP1_{58-66}$

(GILGFVFTL) (10 μg/mL; MBL International) and CEF-E (peptides from CMV, EBV, influenza, JPT Technologies) were used as a positive control for $CD8^+$ T-cell stimulation. To detect T regulatory cells, DC–T cell culture was analyzed without restimulation after 7 d of incubation. T regulatory cells were determined as a percentage of $Foxp3^+CD127^{low}$ from $CD4^+CD25^+$ T cells by flow cytometry.

Immunoblot analysis

HS-treated tumor cells at 4×10^6/mL incubated at 37°C were collected at various time points for cell extract preparation. In some experiments cells treated with thapsigardin (TPG, 5 μM) and staurosporin (1 μM) (all from Sigma-Aldrich) incubated for 24 h were used as positive controls. A549 cells were pretreated with caspase-9 inhibitor (Z-LEHD-FMK, 50 μM) (Enzo Life Sciences, Inc.) overnight before HS treatment. Cells were lysed in ice-cold RIPA buffer (10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA and 1% Triton X-100) containing a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics) and 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF, Roche Diagnostics) 10 min on ice. Proteins were separated on a 10–12% SDS-PAGE, electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad) and blocked with 5% skim milk in TBST buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl and 0.05% Tween 20) for 1 h at room temperature. Membranes were incubated with primary antibodies overnight at 4°C, washed with TBST buffer and immunoreactive bands were visualized with horseradish peroxidase conjugated secondary antibodies using enhanced chemiluminescence reagents (ECL, Amersham Biosciences).

Isolation of cell surface proteins and separation of cellular fractions

Tumor cells grown in flasks were incubated in water bath for 1 h at 37°C, 42°C or 47°C, respectively. Cell were further incubated for additional 2.5 h at 37°C, than washed with PBS and stained with cell non-permeable sulfosuccinimidobiotin (EZ-link™ Sulfo-NHS-Biotin; Thermo Scientific) in PBS on rocking shaker at room temperature for 30 min. Labeled plasma membrane proteins were then affinity-purified using NeutrAvidin Agarose according to the manufacturer's instructions. The presence of calreticulin among plasma membrane proteins was detected by immunoblot analysis. Mitochondria and cytosol were separated using Mitochondria/Cytosol Fractionation Kit (Abcam) according to manufacturer's instructions.

In vivo experiments

BALB/ mice were obtained from a breeding colony at the Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic (ASCR), v.v.i. Mice were used at 9–15 weeks of age and kept in the conventional animal facility of Institute of Microbiology of ASCR, v.v.i. Mice were regularly screened for MHV and other pathogens according to FELASA. All experiments were approved by the Welfare Animal Committee at the Institute of Microbiology, ASCRv.v.i. CT26 cells were treated with mitoxantrone (1 μM, Sigma Aldrich) for 24 h or heated at 47°C for 1 h followed by 1 h incubation at 37°C. 5×10^6 cells in 200 μL PBS were injected s.c. into lower left flank on days 0 and 21. 1×10^5 live CT26 cells in 100 μL PBS were injected s.c. into lower right flank on day 31. Mice were monitored for tumor growth and survival. Mice surviving day 100 without tumor were considered long-term survivors. Tumor size was determined every 2–4 d by a caliper. The experiments were repeated thrice using 10 mice per group.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using software GraphPad (PRISM 6.0). The significance of the differences between groups was determined by using paired Student's *t*-test. Differences were considered statistically significant if $p < 0.05$ (*). Data were expressed as mean ± SEM.

Results

Severe, but not mild heat shock treatment of human cancer cells induces cell death

A549 and OV90 cells were treated with mHS (42°C) or sHS (47°C) for 1 h and subsequently incubated at 37°C for 0 h, 3 h, 6 h and 24 h. Cell viability was determined with Annexin V and DAPI (Fig. 1A). sHS treatment decreased viability of both cell lines by 40–50% within 6 h (Fig. 1B). Contrary to untreated or mHS-treated tumor cells, 80–90% of sHS-treated tumor cells were Annexin V/DAPI double positive by 24 h. High mortality rate of sHS-treated tumor cells was also confirmed in a 10 d colony-forming assay (Fig. 1C). These results show that sHS, but not mHS, induces cell death in human tumor cells.

sHS-treated tumor cells expose calreticulin, HSP70 and HSP90, decrease CD47 on the cell surface and release HMGB1 and ATP

It has been shown that physical modalities such as HHP or hypericin-based photodynamic therapy (Hyp-PDT) induce ICD in cancer cells.[15] Therefore, we analyzed if sHS-treatment of human tumor cells inducer might induce, similarly to HHP or Hyp-PDT, cell surface translocation of calreticulin, HSP70 and HSP90 and release of ATP and HMGB1. Cells were treated with mHS (42°C) or sHS (47°C) for 1 h and subsequently incubated at 37°C for 6 h and 24 h. We found that sHS, but not mHS, induces cell surface exposure of calreticulin (CRT) and HSP90 and decrease of cell surface CD47 in both cancer cell lines after 6 h in AnnexinV+DAPI− cells gated from flow cytometry dotplots (Fig. 2A). HSP70 was detected also on the cell surface of mHS-treated cells, albeit at lower amounts than on cells treated with sHS. To further confirm the exposure of calreticulin, the proteins of plasma membrane of HS-treated cells were analyzed by a western blot. Calreticulin was enriched on the cell surface 3 h after sHS treatment, whereas it was retained in cytosolic/intracellular membranes fraction in control and mHS-treated cells (Fig. 2B). Intracellularly located ER-sessile protein PERK or plasma membrane-located proteins Her2/neu (A549) and CEA (OV90) were used as membrane isolation controls. As shown in Fig. 2C, we observed that both mHS and sHS induce the release of ATP from tumor cells 1 h after HS treatment; however, only sHS displayed significant

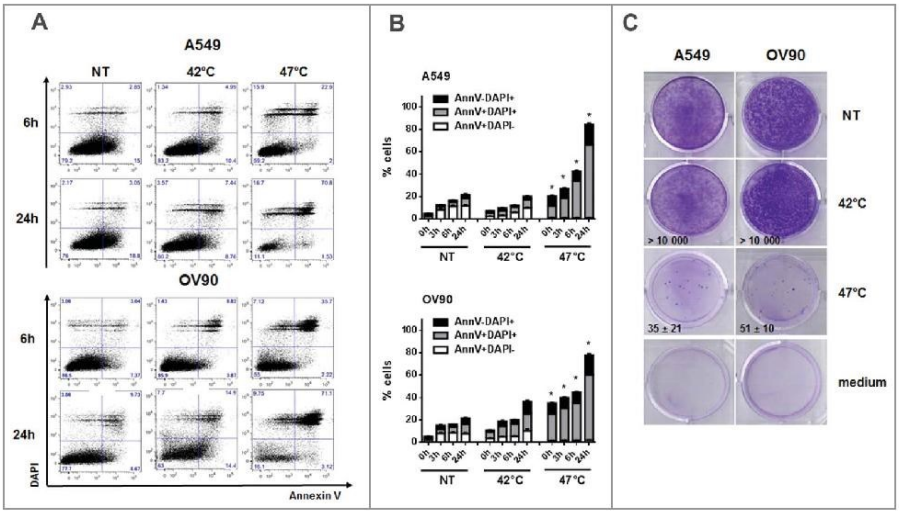


Figure 1. Severe, but not mild heat shock treatment of human cancer cells induces cell death. (A, B) The viability of untreated A549 and OV90 cells and cells treated with mHS (42°C, 1 h) or sHS (47°C, 1 h) followed by an incubation at 37°C for 0 h, 3 h, 6 h and 24 h. (C) Colony-forming assays were assessed after 10 d.

loss of intracellular ATP. Similarly, we detected HMGB1 release in mHS-treated OV90, but profound release of HMGB1 in both A549 and OV90 cancer cell lines 24 h after HS treatment (Fig. 2D). These data suggest that only sHS treatment of cancer cells induces typical molecular characteristics of ICD, described for other ICD inducers.[4,6,38] We compared sHS-mediated exposure of calreticulin to an ICD inducer idarubicin[39] and two non-ICD inducers UV-B and cisplatin in both cell lines (Fig. 2E and F). We show that HS induces faster and higher calreticulin exposure in early apoptotic cells (AnnexinV+DAPI-) over the course of 24 h when compared with idarubicin. The percentage of dead cells was comparable between treatments (Fig. 2E). Cisplatin, on the other hand, while inducing a similar percentage of cell death after 24 h, did not induce calreticulin exposure in cells similarly to UV-B treatment (Fig. 2F).

sHS treatment of human cancer cells induces intracellular Ca^{2+} release, ROS generation and ER stress response leading to a cell death with apoptotic features

Intracellular Ca^{2+} release, ROS generation and ER stress are required for DAMPs release during ICD in tumor cells.[40-43] Therefore, we further analyzed whether sHS treatment of tumor cells induces intracellular Ca^{2+} release, ER stress and ROS production (Fig. 3). sHS but not mHS treatment of both cancer cell lines triggered ROS production 3 h after treatment (Fig. 3A). The sHS-mediated induction of ROS could be only partly inhibited by L-glutathione (GSH) and N-acetyl-L-cysteine (NAC), two well-established ROS scavengers, 3 h post-treatment (Fig. 3B). However, the reduction of oxidative stress was not sufficient to diminish calreticulin exposure or cell death of tumor cells induced by sHS. Both heat treatments induced ER stress in tumor cells as documented by generation of a spliced XBP1, overexpression of BiP and eIF2α phosphorylation (Fig. 3C). sHS induced higher BiP expression than mHS treatment. Both HS treatments also led to a cleavage of caspase-4; however, only sHS treatment induced expression of proapoptotic CHOP protein in A549 cells (Fig. 3C), a protein involved in ER-mediated apoptotis. Only sHS treatment induced an increase in intracellular Ca^{2+} (Fig. 3D) and led to a decrease in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi m$) (Fig. 3E) in both cell lines by the end of the sHS incubation period (1 h HS = 0 h). The loss of mitochondrial functions might be related to the action of Bax and Bak proteins as there was a significant survival benefit in sHS-treated mouse embryonic fibroblast (MEFs) lacking Bax/Bak proteins 3 h after treatment (Fig. 3F). We further observed that sHS treatment did not lead to caspase-8 and caspase-3 activation in A549 cells (Fig. 3G), but to a rapid activation of caspase-9, followed by a cleavage of caspase-6 and −7 and lamins. The initial cleavage of caspase-7, but not caspase-6, was also observed in mHS treated tumor cells. Pre-incubation of A549 cells with caspase-9 inhibitor prevented the activation of executioner caspases-6 and −7 immediately after 1 h of sHS-treatment, which led to a survival benefit of sHS-treated cells by 20% 6 h post-treatment (Fig. 3H). These data point at the activation of intrinsic mitochondrial apoptotic pathway as we also observed a rapid release of cytochrome c from mitochondria 15 min after sHS treatment (Fig. 3G). We also detected cleavage of α-fodrin, which suggests the involvement of Ca^{2+}-activated calpains in sHS-induced cell death (Fig. 3G). In summary, these results show that sHS, but not mHS induces cell death with apoptotic features in human cancer cells.

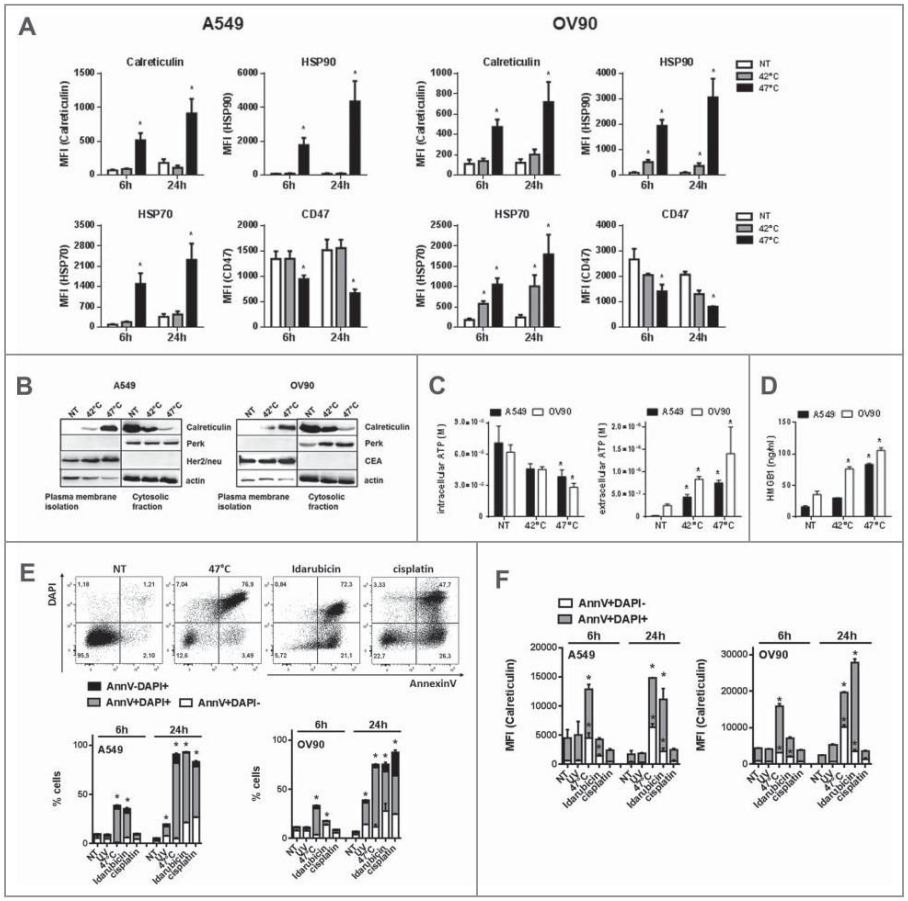


Figure 2. sHS-treated tumor cells expose calreticulin, HSP70 and HSP90, decrease CD47 on the cell surface and release HMGB1 and ATP. A549 or OV90 cells were left untreated or were treated with mHS (42°C, 1 h) or sHS (47°C, 1 h) followed by an incubation at 37°C for 6 h and 24 h. The exposure of HSP70, HSP90, calreticulin and the decrease of CD47 on the cell surface was determined by flow cytometry from AnnV+DAPI− cells (A). (B) Immunoblot of calreticulin cell surface exposure 2.5 h after HT treatment. The expression of PERK, CEA and Her2/neu are shown as controls of cellular and membrane fraction purity. (C) Intra- and extra-cellular levels of ATP 1 h after HS treatment (D) HMGB1 release 24 h after HS treatment. Graphs represent means ± SEM of n = 3–5 ($^*p < 0.05$). Pictures and immunoblots are representative of $n = 3$–4. Comparison of cell death (E) and calreticulin exposure (F) in A549 and OV90 cells induced by treatment with sHS, UV, idarubicin and cisplatin after 6 h and 24 h. Calreticulin exposure was analyzed by flow cytometry from early (AnnV+DAPI−) and late (AnnV+DAPI+) apoptotic cells (F). Graphs represent means ± SEM of $n = 3$ ($^*p < 0.05$).

Phagocytosis of sHS-treated tumor cells partially depends on calreticulin and leads to a phenotypic maturation of DC in vitro

We analyzed whether sHS-induced ICD of tumor cells would impact on phagocytosis and functional characteristics of DCs *in vitro*. mHS or sHS-treated tumor cells (1 h + 24 h, 37°C) were added to human MDDCs at ratio 1:5 and incubated for additional 24 h. Fig. 4A shows that 70% (A549) and 60% (OV90) of DCs phagocytosed sHS-treated tumor cells, whereas only 20% of DCs phagocytosed mHS-treated or control non-treated tumor cells. The phagocytosis of sHS-treated cells was partially dependent on calreticulin as sHS-treated MEFs ($Calr^{-/-}$) were phagocytosed less than sHS-treated MEFs *wt* (Fig. 4B). Interestingly, mHS-and sHS-treated tumor cells induced a similar degree of expression of maturation markers CD80, CD86, CD83 and HLA-DR on DCs as poly(I:C) (Fig. 4C). However, only poly(I:C) stimulated TNF-α and IL-12p70 production from DCs. Neither poly(I:C) nor HS-treated tumor cells induced IL-10 (Fig. 4D). The capacity of HS-treated tumor cells to activate DC maturation was cell contact dependent as separation of HS-treated tumor cells and DC in a transwell system completely prevented DC maturation (Fig. 4C).

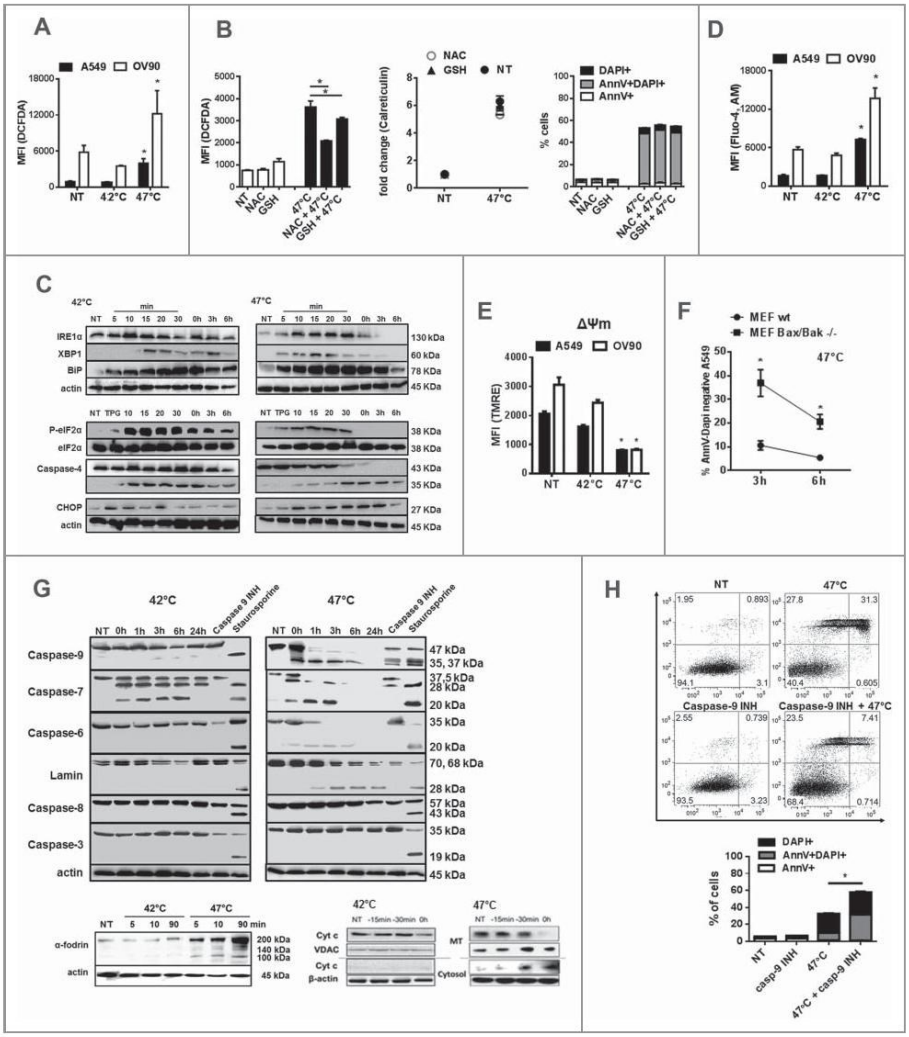


Figure 3. sHS treatment of human cancer cells induces intracellular Ca^{2+} release, ROS generation and ER stress response leading to a cell death with apoptotic features. HS-induced (A, B) ROS generation after 3 h, (C) time course analyses of ER stress response, (D) intracellular Ca^{2+} release and (E) the loss of mitochondrial potential after HS treatment (1 h = 0 h) were analyzed. (F) Survival analyses of sHS-treated MEF *wt* and MEF *Bax/Bak* −/− cells. (G) Time course analyses of cleavage of caspases, lamin, fodrin and cytochrome c release. (H) Flow cytometry analyses of sHS-treated A549 incubated with capase-9 inhibitor. Dotplots and immunoblots are representative of $n = 3–6$. Graphs represent means ± SEM of $n = 3–5$ ($^*p < 0.05$).

DCs pulsed with sHS-treated tumor cells stimulated antigen-specific CD4$^+$ T cells and induced higher CD8$^+$ T cell activation and proliferation in vitro

T cell stimulatory capacity of DC pulsed with mHS or sHS-treated tumor cells was tested in autologous antigen unspecific system and autologous antigen-specific system using HS-treated tumor cells that stably express influenza M1 protein as a model antigen.[37] DCs loaded with mHS or sHS-treated tumor cells induced similarly high number of IFNγ-producing CD8$^+$ T cells (Fig. 5A) and $MP1_{58–66}$-specific CD8$^+$ T cells detected by the tetramer staining (Fig. 5B) than unpulsed iDCs. $MP1_{58–66}$-specific CD8$^+$ T cells displayed a memory phenotype. However, CD8$^+$ T cells induced by DC loaded with sHS-killed tumor cells showed higher proliferation and activation profile (Fig. 5C). Also, only these DCs stimulated IFNγ-

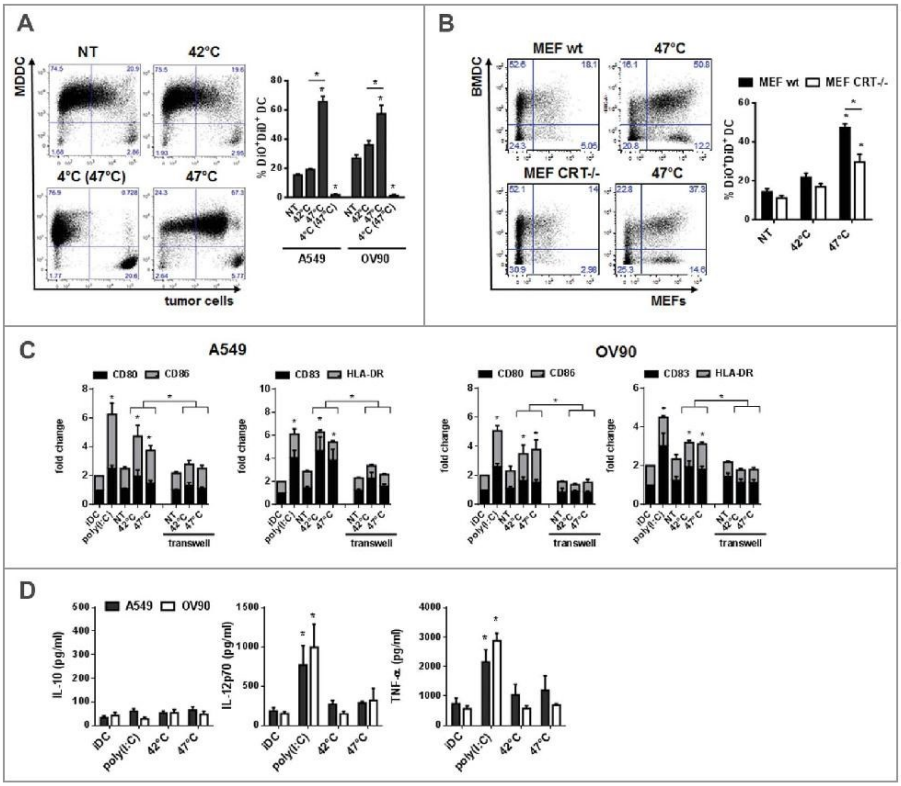


Figure 4. Phagocytosis of sHS-treated tumor cells partially depends on calreticulin and leads to a phenotypic maturation of DC *in vitro*. (A, B) Untreated cells or cells treated with mHS (42°C, 1 h) or sHS (47°C, 1 h) followed by incubation at 37°C for 24 h were incubated with DC for additional 24 h. Graphs show percentage of DAPI negative DiO^+DiD^+ DCs and represent means ± SEM of five donors or four mice ($^*p < 0.05$). (C) The expression of maturation markers on DCs after 24 h in cultures where DC + HS-treated tumor cells were co-incubated or where HS-treated cells were separated from DCs by a transwell. (D) IL-10, IL-12p70 and TNF-α production was determined from cell culture supernatants by ELISA after 24 h. The graphs are means ± SEM of 6–8 donors ($^*p < 0.05$).

producing $CD4^+$ T cells that exhibited a high proliferative activity (Fig. 5D). There was no induction of $CD4^+CD25^+Foxp3^+CD127^{low}$ T regulatory cells by DCs loaded with either mHS- or sHS-killed tumor cells (Fig. 5E). We next analyzed the content of tumor antigens. As shown in Fig. 5E, the content of all tested tumor antigens increased in both cell lines after HS treatment. However, in contrast to mHS-treated cells, tumor antigen levels declined back to basal levels of non-treated cells after sHS treatment.

sHS-treated tumor cells are immunogenic and elicit prophylactic immunity in mice

To confirm our data on sHS-treated human tumor cells, we exposed mouse tumor cells CT26 to mHS or sHS treatment and analyzed the exposure of calreticulin, HSP70 and HSP90 and their capacity to induce maturation of BMDCs *in vitro* (Fig. 6A–C). CT26 seems to be more sensitive to HS-induced cell death than human tumor cells as 80% cells were already dead after 6 h. In line with higher sensitivity of mouse cells to heat treatment, we also observed a significant percentage of dead cells (40%) 24 h after mHS treatment (Fig. 6A). However, the exposure of calreticulin and HSP90 was detected only in AnnV+DAPI− cells treated with sHS (Fig. 6B). HSP70 was not detectable in sHS-treated tumor cells, but was strongly induced by mHS treatment pointing at possible differences in immunogenic molecules exposure/release in mouse tumor cells under various HS conditions. In line with these data, we observed a higher maturation of DC loaded with sHS-treated tumor cells than DC loaded with mHS-treated tumor cells (Fig. 6C). The immunogenicity of sHS-treated CT26 tumor cells was tested *in vivo* in mouse colorectal cancer model in a prophylactic setting and compared with a known ICD inducer mitoxantrone.[7] Mice were vaccinated with sHS- or mitoxantrone-treated CT26 cells at days 0 and 21 and challenged with live CT26 at day 31. A significant tumor size reduction and a survival benefit were observed after vaccination with sHS-treated cells similarly to mice vaccinated with mitoxantrone-

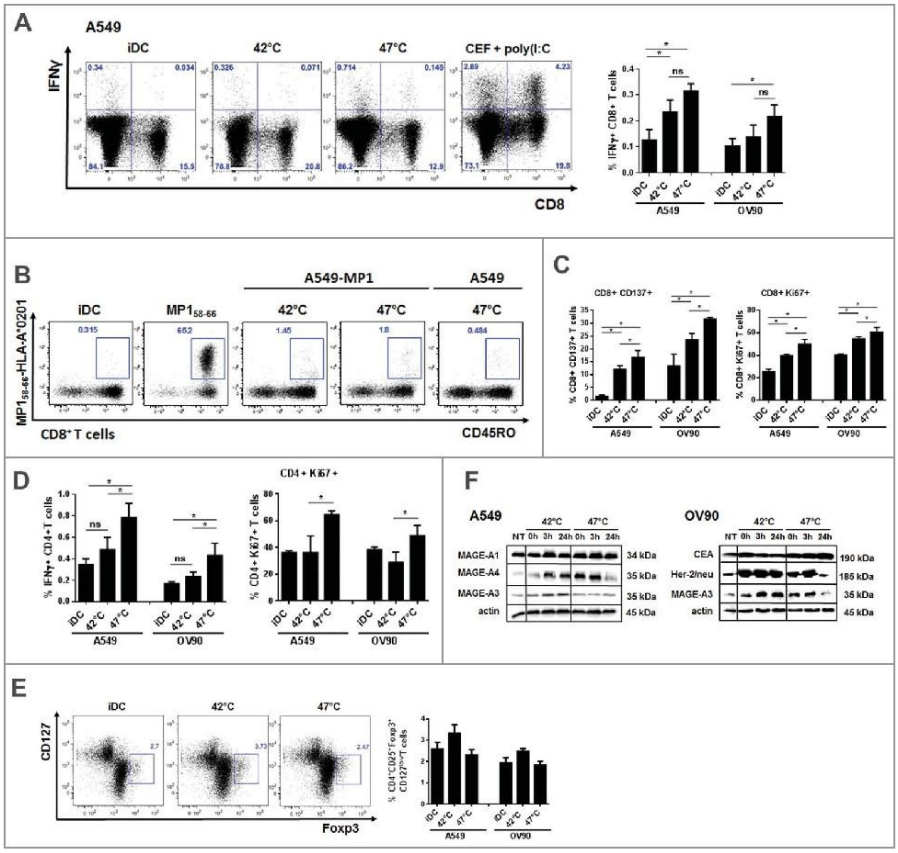


Figure 5. DCs pulsed with sHS-treated tumor cells stimulated antigen-specific $CD4^+$ T cells and induced higher $CD8^+$ T cell activation and proliferation. DCs incubated with sHS or mHS-treated cells for 24 h were added to autologous T lymphocytes at ratio 1:10. The number of IFNγ producing (A) $CD8^+$ and (D) $CD4^+$ T cells, proliferation (Ki67) and activation (CD137) of (C) $CD8^+$ and (D) $CD4^+$ T cells was determined after 7 d after one round of restimulation. (B) The number of $MP1_{58-66}$-specific $CD8^+$ T cells was determined after 9 d. (E) Percentage of $Foxp3^+CD127^{low}$ T regulatory cells from $CD4^+CD25^+$ T cells. Dotplots are representative of 4–8 donors. Graph shows percentage of IFNγ^+CD8^+ T cells or IFNγ^+CD4^+ T cells from $CD8^+$ or $CD4^+$ T cells, respectively and represents means ± SEM of 4–8 donors ($^*p < 0.05$). (F) Immunoblot of tumor antigens after HS treatment. Immunoblots are representative of $n = 3$.

treated cells (Fig. 6D). The long-term survival of sHS-vaccinated mice after tumor cells challenge (more than 100 d) without any signs of tumor growth was recorded in 3 out of 10 mice. The immunogenicity of mHS-treated cells *in vivo* was not tested due to a high probability of cell growth at the site of injection. This conclusion was made based on an *in vitro* colony forming assay prepared from mHS-treated CT26 where a high survival of mHS-treated cells in contrast to sHS-treated cells was observed (Fig. 6E).

Discussion

Our data suggest that the immunogenicity of mHS and sHS-treated tumor cells might not share the same determinants. We showed that sHS (47°C), but not mHS (42°C), induces cell death in human cancer cells that display molecular characteristics of ICD described for other ICD inducing agents[38] such as the generation of ROS, release of intracellular Ca^{2+} and induction of integrated ER stress response, exposure of calreticulin and HSP70 and HSP90, decrease of cell surface CD47 expression and the release of ATP and HMGB1. Severe HS treatment as an ICD inducer might be further supported by the induction of prophylactic immunity by sHS-treated cells in *in vivo* vaccination cancer model.

The immunogenicity of tumor cells treated with mHS (42°C) has been attributed to HS proteins mainly HSP70[20,22]. We showed here that mHS treatment induces HSP70, as well as the release of low amounts of other DAMPs such as ATP or HMGB1. We detected activation of ER stress response proteins and caspase-4, however, without detectable ROS generation and intracellular Ca^{2+} increase. The activation of caspase-4 might also account for

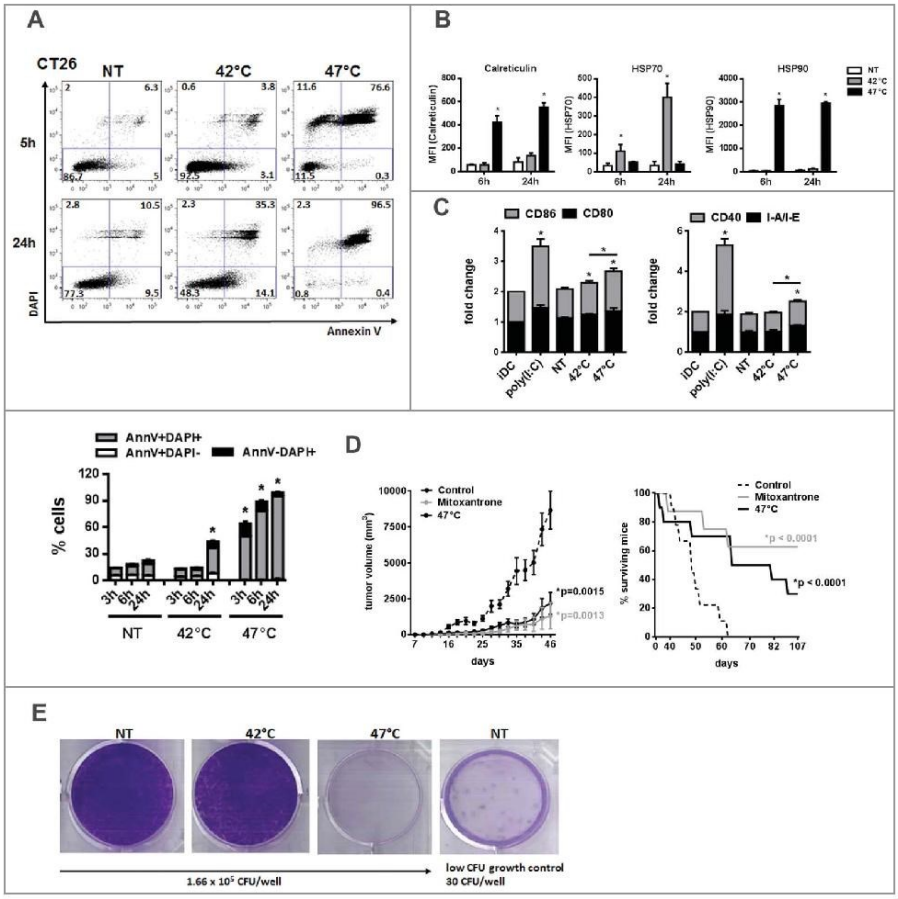


Figure 6. sHS-treated tumor cells are immunogenic and elicit prophylactic immunity in mice. (A, B) The viability of untreated CT26 cells and cells treated with mHS (42°C, 1 h) or sHS (47°C, 1 h) followed by an incubation at 37°C for 5 h and 24 h. (C) The exposure of HSP70, HSP90 and calreticulin was determined by flow cytometry from AnnexinV+DAPI− cells. Graphs represent means ± SEM of $n = 3$ ($^*p < 0.05$). Dotplots are representative of $n = 3$. (D) Mice were vaccinated with sHS or mitoxantrone-treated CT26 cells at days 0 and 21 and challenged with live CT26 at day 31. Tumor growth and survival was monitored in 10 mice per group. Three out of 10 mice were considered long-term survivors after day 100. The results are representative of $n = 3$. (E) Colony-forming assays were assessed after 14 d.

detected transient caspase-7 cleavage observed in mHS-treated tumor cells[44] as any other caspases were not cleaved. The low number of dead cells indicates that several stress-mitigating and anti-apoptotic mechanisms were activated to counteract mHS effects.[1] Furthermore, we observed that mHS-treated cells were not efficiently phagocytosed by DCs, which might explain the lack of $CD4^+$ T cell stimulatory capacity. As CD47 was present on the cell surface of mHS-treated cells, this and also other "don't eat me" molecules are likely to account for the inefficient phagocytosis.[14] On the other hand, mHS-treated cells similarly to sHS-treated cells induced phenotypic DC maturation, which was dependent on the cell–cell contact. However, in these experiments, we cannot exclude the synergy between cell-bound molecules with soluble DAMPs in the DC maturation.[45] DCs pulsed with mHS- or sHS-treated tumor cells similarly stimulated IFNγ-producing $CD8^+$ T cells *in vitro*. This might be explained by a release of sufficient amount of antigenic peptides bound to HSPs from mHS-treated tumor cells, which are then cross-presented by DCs.[46] Indeed, we confirmed that HSP70 is secreted into cell culture supernatant (data not shown). This also corresponds the observation that mHS increases the expression of tumor antigens in tumor cell lines. This has been previously shown on mRNA level for human melanoma cells.[21] However, despite observed general immunogenicity and no induction of $CD4^+CD25^+Foxp3^+CD127^{low}$ T regulatory cells, the lack of cell death excludes the use of mHS for active cellular immunotherapy in cancer patients.

Most importantly, we showed here that the sHS-induced cell death displays molecular features of ICD characterized by the generation of ROS, intracellular Ca^{2+} release and induction of integrated ER stress response, exposure of calreticulin and HSP70 and HSP90, decrease of cell surface CD47 expression and the release of ATP and HMGB1 as described for other agents.[38] This is in line with a few previous studies showing calreticulin and DAMPs release under sHS *in vitro*,[34,47] and *in vivo*.[33] Since the exposure of calreticulin was not prevented by ROS inhibition as described for HHP,[15] it can be speculated that sHS-induced molecular pathways underlying DAMP secretion might exhibit different or possibly unique regulatory features as also documented for various ICD activating treatments.[38] We observed rapid activation of intrinsic apoptotic pathway involving the release of cytochrome c, cleavage of caspase-9, −6 and-7, and activation of ER-mediated apoptotic pathway.[44,45] The sHS-induced cell death could be diminished by caspase-9 inhibition but not by inhibition of ROS generation. This suggests that caspase-9 plays an important, but not exclusive, role in sHS-mediated cell death. The major point-of-no-return determinants of the cell fate upon sHS treatment would be most likely quick irreversible loss of mitochondrial potential depending on Bax/Bak proteins and the rapid decline in ATP levels under such severe stress concomitantly with the activation of multiple cell-death executional pathways as described for various tumor cell types treated with heat at various thermal dose.[17] Interestingly, there was no caspase-8 and −3 cleavage that might be connected to the way how sHS changes membrane fluidics or acts on activity of various membrane proteins, e.g., inactivation of receptor-mediated signaling.[1,16] The cleavage of α-fodrin points at the activation of calpains by intracellular Ca^{2+}.[48-50] We also observed cleavage of LC3 protein at later time points but no activation of RIP3 kinase (data not shown). The involvement of autophagy[51] or necroptosis[52] to cell death was not further analyzed in this study.

Human DCs pulsed with sHS-killed tumor cells displayed enhanced immunogenicity *in vitro* over DC pulsed with mHS-treated tumor cells when analyzed for T-cell stimulation. Despite similar number of IFNγ-producing $CD8^+$ T cells, $CD8^+$ T cells induced by DC pulsed with sHS-killed tumor cells displayed higher activation and proliferation. We showed here that antigen expressed in HS-treated tumor cells is presented to antigen-specific $CD8^+$ T cells using specific $MP1_{58-66}$-HLA-A^*0201 tetramers. DCs pulsed with sHS-killed cells, similar to DC loaded with mHS-treated cells, did not enhanced number of $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T regulatory cells *in vitro*. The difference between sHS and mHS-treated tumor cells was in the efficiency of phagocytosis by DCs. The phagocytosis of sHS-treated cells was partly dependent on cell surface calreticulin (30%), which suggests possible participation of other "eat-me" molecules in this process. Only DCs pulsed with sHS-treated cells stimulated $CD4^+$ T cells *in vitro*, which was most likely connected to a high phagocytosis of sHS-treated cells and to availability of tumor antigens. The importance of $CD4^+$ T cells in severe HT-induced antitumor immunity was shown in the study of Yu et al. using microwave thermal ablation *in vivo* mouse cancer model.[33] Whereas $CD8^+$ T cells were essential for antitumor immunity induced by this treatment,[33] the depletion of $CD4^+$ T cells diminished the survival of immunized mice by 40% in comparison to 100% without $CD4^+$ T-cell depletion.[33] Our data suggest that sHS treatment at 47°C of human cancer cell lines A549 and OV90 might represent the optimal condition to achieve high immunogenicity, high level of tumor antigens and effective cell death, which is required by the regulatory authorities to generate of active cellular cancer immunotherapy. A critical association between the amount of immunogenic signals, specifically calreticulin and HSP90, emitted by dying cells and the clinical efficacy of DC-based vaccine has been documented in indolent B-cell lymphoma patients.[47]

We have further shown that sHS-treated cells exposed immunogenic DAMPs and induced DC maturation similarly to human cell lines. sHS-treated cells induced protective memory antitumor immunity in mouse colorectal cancer model, which was comparable to the vaccination with mitoxantrone-treated tumor cells, a known ICD inducer.[7] Such vaccination assay is considered a gold-standard approach to test the ability of a specific agent to induce ICD.[38] Similar studies using high temperature treatment such as magnetic HT *in vivo* documented the induction of long-lasting antitumor immunity and the advantage of higher therapeutic temperatures (46–55°C) over the mild HT (42–44°C).[31,32] Although our findings support severe HS treatment *in vitro* as an ICD inducer, it remains to be characterized in detail if severe HT-inducing techniques *in vivo* such as radiofrequency ablation, magnetic HT, microwave ablation or high intensity focused ultrasound induce ICD.

Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Funding

This work was supported by Sotio a.s. The work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, within the LQ1604 National Sustainability Program II (Project BIOCEV-FAR), by the project "BIOCEV" (CZ.1.05/1.1.00/02.0109) and the Institutional Research Concept RVO 61388971. The work of the Department of Immunology of Charles University is supported by Ministry of Health, Czech Republic-Conceptual Development of Research Organization (University Hospital Motol, Prague, Czech Republic, 00064203).

ORCID

Jakub Tomala http://orcid.org/0000-0002-6315-2832
Marek Kovar http://orcid.org/0000-0002-6602-1678

References

1. Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, Dieing A, Sreenivasa G, Kerner T, Felix R, Riess H. The cellular and molecular basis of hyperthermia. Crit Rev Oncol Hematol 2002; 43:33-56; PMID:12098606; https://doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00179-2
2. Mentre P, Hamraoui L, Hui Bon Hoa G, Debey P. Pressure-sensitivity of endoplasmic reticulum membrane and nucleolus as revealed by electron microscopy. Cell Mol Biol 1999; 45:353-62; PMID:10386792; https://doi.org/10.1088/1742-6596/121/1/112003
3. Dudek AM, Garg AD, Krysko DV, De Ruysscher D, Agostinis P. Inducers of immunogenic cancer cell death. Cytokine Growth Factor Rev 2013; 24:319-33; PMID:23391812; https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2013.01.005
4. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. Ann Rev Immunol 2013; 31:51-72; PMID:23157435; https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100008

5. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. Nat Rev Cancer 2012; 12:860-75; PMID:23151605; https://doi.org/10.1038/nrc3380
6. Adkins I, Fucikova J, Garg AD, Agostinis P, Spisek R. Physical modalities inducing immunogenic tumor cell death for cancer immunotherapy. Oncoimmunology 2014; 3:e968434; PMID:25964865; https://doi.org/10.4161/21624011.2014.968434
7. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. Nat Med 2007; 13:54-61; PMID:17187072; https://doi.org/10.1038/nm1523
8. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. J Leukocyte biol 2007; 81:1-5; PMID:17032697; http://doi.org/10.1189/jlb.0306164
9. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. Science 2002; 296:301-5; PMID:11951032; https://doi.org/10.1126/science.1071059
10. Spisek R, Charalambous A, Mazumder A, Vesole DH, Jagannath S, Dhodapkar MV. Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications. Blood 2007; 109:4839-45; PMID:17299090; https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-054221
11. Martins I, Tesniere A, Kepp O, Michaud M, Schlemmer F, Senovilla L, Séror C, Métivier D, Perfettini JL, Zitvogel L, et al. Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. Cell Cycle 2009; 8:3723-8; PMID:19855167; https://doi.org/10.4161/cc.8.22.10026
12. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. Nature 2002; 418:191-5; PMID:12110890; https://doi.org/10.1038/nature00858
13. Tesniere A, Panaretakis T, Kepp O, Apetoh L, Ghiringhelli F, Zitvogel L, Kroemer G. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. Cell Death Differ 2008; 15:3-12; PMID:18007663; https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402269
14. Kepp O, Galluzzi L, Martins I, Schlemmer F, Adjemian S, Michaud M, Sukkurwala AQ, Menger L, Zitvogel L, Kroemer G. Molecular determinants of immunogenic cell death elicited by anticancer chemotherapy. Cancer Metastasis Rev 2011; 30:61-9; PMID:21249425; https://doi.org/10.1007/s10555-011-9273-4
15. Fucikova J, Moserova I, Truxova I, Hermanova I, Vancurova I, Partlova S, Fialova A, Sojka L, Cartron PF, Houska M et al. High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells. Int J Cancer 2014; 135:1165-77; PMID:24500981; https://doi.org/10.1002/ijc.28766
16. Roti Roti JL. Cellular responses to hyperthermia (40–46°C): cell killing and molecular events. Int J Hyperthermia 2008; 24:3-15; PMID:18214765; https://doi.org/10.1080/02656730701769841
17. Milleron RS, Bratton SB. 'Heated' debates in apoptosis. Cell Mol Life Sci 2007; 64:2329-33; PMID:17572850; https://doi.org/10.1007/s00018-007-7135-6
18. Suto R, Srivastava PK. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. Science 1995; 269:1585-8; PMID:7545313; https://doi.org/10.1126/science.7545313
19. Melcher A, Todryk S, Hardwick N, Ford M, Jacobson M, Vile RG. Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression. Nat Med 1998; 4:581-7; PMID:9585232; https://doi.org/10.1038/nm0598-581
20. Frey B, Weiss EM, Rubner Y, Wunderlich R, Ott OJ, Sauer R, Fietkau R, Gaipl US. Old and new facts about hyperthermia-induced modulations of the immune system. Int J Hyperthermia 2012; 28:528-42; PMID:22690925; https://doi.org/10.3109/02656736.2012.677933
21. Shi H, Cao T, Connolly JE, Monnet L, Bennett L, Chapel S, Bagnis C, Mannoni P, Davoust J, Palucka AK et al. Hyperthermia enhances CTL cross-priming. J Immunol 2006; 176:2134-41; PMID:18539499; https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.4.2134
22. Zhang HG, Mehta K, Cohen P, Guha C. Hyperthermia on immune regulation: a temperature's story. Cancer Lett 2008; 271:191-204; PMID:18597930; https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.05.026
23. Feng H, Zeng Y, Graner MW, Katsanis E. Stressed apoptotic tumor cells stimulate dendritic cells and induce specific cytotoxic T cells. Blood 2002; 100:4108-15; PMID:12393401; https://doi.org/10.1182/blood-2002-05-1389
24. Feng H, Zeng Y, Graner MW, Likhacheva A, Katsanis E. Exogenous stress proteins enhance the immunogenicity of apoptotic tumor cells and stimulate antitumor immunity. Blood 2003; 101:245-52; PMID:12393411; https://doi.org/10.1182/blood-2002-05-1580
25. Clark PR, Menoret A. The inducible Hsp70 as a marker of tumor immunogenicity. Cell Stress Chaperones 2001; 6:121-5; PMID:11599573; https://doi.org/10.1379/1466-1268(2001)006<0121:TIHAAM>2.0.CO;2
26. Mise K, Kan N, Okino T, Nakanishi M, Satoh K, Teramura Y, Yamasaki S, Ohgaki K, Tobe T. Effect of heat treatment on tumor cells and antitumor effector cells. Cancer Res 1990; 50:6199-202; PMID:2400985; http://doi.org/10.11501/3057478
27. Takahashi T, Mitsuhashi N, Sakurai H, Niibe H. Modifications of tumor-associated antigen expression on human lung cancer cells by hyperthermia and cytokine. Anticancer Res 1995; 15:2601-6; PMID:8669832; https://doi.org/10.1186/1756-9966-27-5
28. Wong JY, Mivechi NF, Paxton RJ, Williams LE, Beatty BG, Beatty JD, Shively JE. The effects of hyperthermia on tumor carcinoembryonic antigen expression. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1989; 17:803-8; PMID:2674083; https://doi.org/10.1016/0360-3016(89)90070-9
29. Zerbini A, Pilli M, Penna A, Pelosi G, Schianchi C, Molinari A, Schivazappa S, Zibera C, Fagnoni FF, Ferrari C et al. Radiofrequency thermal ablation of hepatocellular carcinoma liver nodules can activate and enhance tumor-specific T-cell responses. Cancer Res 2006; 66:1139-46; PMID:16424051; https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2244
30. Ito A, Honda H, Kobayashi T. Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a novel concept of "heat-controlled necrosis" with heat shock protein expression. Cancer Immunol Immunother 2006; 55:320-8; PMID:16133113; https://doi.org/10.1007/s00262-005-0049-y
31. Hu R, Ma S, Li H, Ke X, Wang G, Wei D, Wang W. Effect of magnetic fluid hyperthermia on lung cancer nodules in a murine model. Oncol Lett 2011; 2:1161-4; PMID:22848282; https://doi.org/10.3892/ol.2011.379
32. Wang H, Zhang L, Shi Y, Javidiparsijani S, Wang G, Li X, Ouyang W, Zhou J, Zhao L, Wang X et al. Abscopal antitumor immune effects of magnet-mediated hyperthermia at a high therapeutic temperature on Walker-256 carcinosarcomas in rats. Oncol Lett 2014; 7:764-70; PMID:24527084; https://doi.org/10.3892/ol.2014.1803
33. Yu Z, Geng J, Zhang M, Zhou Y, Fan Q, Chen J. Treatment of osteosarcoma with microwave thermal ablation to induce immunogenic cell death. Oncotarget 2014; 5:6526-39; PMID:25153727; https://doi.org/10.18632/oncotarget.2310
34. Brusa D, Migliore E, Garetto S, Simone M, Matera L. Immunogenicity of 56°C and UVC-treated prostate cancer is associated with release of HSP70 and HMGB1 from necrotic cells. Prostate 2009; 69:1343-52; PMID:19496055; https://doi.org/10.1002/pros.20981
35. Adkins I, Koberle M, Grobner S, Autenrieth SE, Bohn E, Borgmann S, Autenrieth IB. *Y. enterocolitica* inhibits antigen degradation in dendritic cells. Microbes Infect 2008; 10:798-806; PMID:18539499; https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.04.014
36. Adkins I, Kamanova J, Kocourkova A, Svedova M, Tomala J, Janova H, Masin J, Chladkova B, Bumba L, Kovar M et al. Bordetella adenylate cyclase toxin differentially modulates toll-like receptor-stimulated activation, migration and T cell stimulatory capacity of dendritic cells. PloS One 2014; 9:e104064; PMID:25084094; https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104064
37. Hradilova N, Sadilkova L, Palata O, Mysikova D, Mrazkova H, Lischke R, Spisek R, Adkins I. Generation of dendritic cell-based vaccine using high hydrostatic pressure for non-small cell lung cancer immunotherapy. PLoS One 2017; 12:e0171539; PMID:28187172; https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171539
38. Grobner S, Adkins I, Schulz S, Richter K, Borgmann S, Wesselborg S, Ruckdeschel K, Micheau O, Autenrieth IB. Catalytically active Yersinia outer protein P induces cleavage of RIP and caspase-8 at the level of the DISC independently of death receptors in dendritic cells.

Apoptosis 2007; 12:1813-25; PMID:17624595; https://doi.org/10.1007/s10495-007-0100-x

39. Fucikova J, Kralikova P, Fialova A, Brtnicky T, Rob L, Bartunkova J, Spísek R. Human tumor cells killed by anthracydines induce a tumor-specific immune response. Cancer Res 2011; 71:4821-33; PMID:21602432; https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0950
40. Garg AD, Krysko DV, Verfaillie T, Kaczmarek A, Ferreira GB, Marysael T, Rubio N, Firczuk M, Mathieu C, Roebroek AJ et al. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. EMBO J 2012; 31:1062-79; PMID:22252128; https://doi.org/10.1038/emboj.2011.497
41. Garg AD, Krysko DV, Vandenabeele P, Agostinis P. Hypericin-based photodynamic therapy induces surface exposure of damage-associated molecular patterns like HSP70 and calreticulin. Cancer Immunol Immunother 2012; 61:215-21; PMID:22193987; https://doi.org/10.1007/s00262-011-1184-2
42. Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, Tesniere A, Bjorklund AC, Chapman DC, Durchschlag M, Joza N, Pierron G, van Endert P et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. EMBO J 2009; 28:578-90; PMID:19165151; https://doi.org/10.1038/emboj.2009.1
43. Tufi R, Panaretakis T, Bianchi K, Criollo A, Fazi B, Di Sano F, Tesniere A, Kepp O, Paterlini-Brechot P, Zitvogel L et al. Reduction of endoplasmic reticulum Ca^{2+} levels favors plasma membrane surface exposure of calreticulin. Cell Death Differ 2008; 15:274-82; PMID:18034188; https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402275
44. Shellman YG, Howe WR, Miller LA, Goldstein NB, Pacheco TR, Mahajan RL, LaRue SM, Norris DA. Hyperthermia induces endoplasmic reticulum-mediated apoptosis in melanoma and non-melanoma skin cancer cells. J Invest Dermatol 2008; 128:949-56; PMID:17989736; https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701114
45. Chen T, Guo J, Han C, Yang M, Cao X. Heat shock protein 70, released from heat-stressed tumor cells, initiates antitumor immunity by inducing tumor cell chemokine production and activating dendritic cells via TLR4 pathway. J Immunol 2009; 182:1449-59; https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.3.1449
46. Srivastava PK, Udono H, Blachere NE, Li Z. Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. Immunogenetics 1994; 39:93-8; PMID:8276462; https://doi.org/10.1007/BF00188611
47. Zappasodi R, Pupa SM, Ghedini GC, Bongarzone I, Magni M, Cabras AD, Colombo MP, Carlo-Stella C, Gianni AM, Di Nicola M. Improved clinical outcome in indolent B-cell lymphoma patients vaccinated with autologous tumor cells experiencing immunogenic death. Cancer Res 2010; 70:9062-72; PMID:20884630; https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1825
48. Bettaieb A, Averill-Bates DA. Thermotolerance induced at a mild temperature of 40°C alleviates heat shock-induced ER stress and apoptosis in HeLa cells. Biochim Biophys Acta 2015; 1853:52-62; PMID:25260982; https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.09.016
49. Dutta S, Chiu YC, Probert AW, Wang KK. Selective release of calpain produced alphaII-spectrin (alpha-fodrin) breakdown products by acute neuronal cell death. Biol Chem 2002; 383:785-91; PMID:12108543; https://doi.org/10.1515/BC.2002.082
50. Vanags DM, Porn-Ares MI, Coppola S, Burgess DH, Orrenius S. Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. J Biol Chem 1996; 271:31075-85; PMID:8940103; https://doi.org/10.1074/jbc.271.49.31075
51. Martins I, Michaud M, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Ma Y, Shen S, Kepp O, Menger L, Vacchelli E, Galluzzi L et al. Premortem autophagy determines the immunogenicity of chemotherapy-induced cancer cell death. Autophagy 2012; 8:413-5; PMID:22361584; https://doi.org/10.4161/auto.19009
52. Adkins I, Koberle M, Grobner S, Bohn E, Autenrieth IB, Borgmann S. Yersinia outer proteins E, H, P, and T differentially target the cytoskeleton and inhibit phagocytic capacity of dendritic cells. Int J Med Microbiol 2007; 297:235-44; PMID:17462949; https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.02.005

6.4 Příloha 4: Detekce nádorových antigenů a specifických T lymfocytů u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic: korelace T buněčné odpovědi se subtypem nemalobuněčného karcinomu plic

Většina dosud testovaných DC vakcín pro léčbu NSCLC se omezovala většinou pouze na využití směsi rekombinantních proteinů či peptidů z nádorově specifických antigenů či na využití buněčných lyzátů nádorových buněk (kapitola 2.5). V naší předchozí práci jsme ukázali, ze HHP či cHT jsou fyzikální modality, které mohou zabít nádorové buňky a zajistit tak přísun mnoha nádorových antigenů dendritickým buňkám pro antigenní prezentaci T buňkám a stimulaci efektivní protinádorové odpovědi (Adkins et al 2017, Hradilova et al 2017). V této práci jsme pomocí RT-PCR porovnávali expresi 12 vybraných antigenů asociovaných s karcinomy plic (CEA, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, PRAME, hTERT, HER2, MUC1, Survivin, STEAP1, SOX2 and NY-ESO-1) v 6 komerčně dostupných plicních liniích (A549, H596, H522, H520, H226, SK-MES-1) a primárních nádorech z 32 pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic. Cílem bylo vybrat nejvhodnější plicní linie pro přípravu DC vakcíny na základě exprese nejvyššího počtu těchto antigenů, které byly ve více či méně omezené míře v minulosti testovány v peptidových či proteinových vakcínách pro léčbu NSCLC (Oliveres et al 2018) (kapitola 2.5). Ukázali jsme, že testované nádorové antigeny se více či méně překrývají s antigenním profilem primárních nádorů. Zároveň vyšší expresse nádorových antigenů byla detekována u nádorů SCC subtypu nemalobuněčného karcinomu plic než AC, což je v souladu s dříve publikovanými výsledky (Grunwald et al 2006, Gure et al 2005). Na základě našich výsledků jsme vybrali linie H522 (AC) a H520 (SCC) jako nejvhodnější pro výrobu DC vakcíny. V této práci, jsme dále testovali přítomnost antigenně specifických $CD8^+$ a $CD4^+$ T lymfocytů v krvi pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic pomocí stimulace antigenními peptidy *in vitro* a měření INF-γ produkce T lymfocyty pomocí průtokové cytometrie. Procento IFN-γ^+ T lymfocytů specifických pro jednotlivé antigeny bylo různé. Nicméně bylo stejné v rámci antigenu pro AC i SCC subtypy, s výjimkou výrazně nižšího procenta IFN-γ^+ MAGE-A4 a HER2-specifických $CD4^+$ T lymfocytů u SCC pacientů. Pro analýzu kvalitativních odpovědí tzn. kolik pacientů odpovídalo na určité antigeny jsme zvolili pouze antigeny, které byly testovány u většiny pacientů (16 AC a 11 SCC) jakými byly MAGE-A3, Survivin, STEAP-1 a SOX2. Tato analýza odhalila, že pouze 43,1 % SCC pacientů mělo *in vitro* detekovatelné IFN^+CD8^+ T lymfocyty specifické pro všechny 4 antigeny na rozdíl od 71,9 % AC pacientů. Tento rozdíl nebylo možné vysvětlit sníženou životností buněk v testu, jelikož ta byla stejná u obou subtypů. Z výsledků vyplývá zásadní

rozdíl mezi pacienty s AC a SCC subtypy v reaktivitě $CD8^+$ T lymfocytů na antigenní stimulaci, což naznačuje, že $CD8^+$ T lymfocyty jsou funkčně suprimované. To by mohlo vysvětlovat proč SCC subtyp nemalobuněčného karcinomu plic vykazuje dlouhodobě horší klinickou prognózu (Asamura et al 2008, Kawase et al 2012) navzdory vyšší imunogenicitě, tedy širšímu spektru a vyšší kvantitativní expresi nádorových antigenů (Grunwald et al 2006, Gure et al 2005) a vyššímu počtu somatických mutací (Lawrence et al 2013, Martincorena & Campbell 2015, Martincorena et al 2015) Je možné, že větší imunosupresivní prostředí v SCC pacientech indukovaný větší imunogenicitou vede k hlubší imunosupresi T lymfocytů a následně horší prognóze onemocnění. Tuto hypotézu je nutné dále potvrdit pomocí další experimentální práce. Nicméně, rozdílná reaktivita $CD8^+$ T lymfocytů na antigenní stimulaci mezi AC a SCC subtypy by mohla hrát významnou roli při designu imunoterapeutických přístupů k léčbě nemalobuněčného karcinomu plic

Vlastní přispění: *zpracování nádorových a nenádorových tkání, in vitro stimulace T lymfocytů a cytometrické analýzy antigenně specifických $CD8^+$ a $CD4^+$ T lymfocytů, hodnocení cytometrických dat včetně statistického zhodnocení.*

Immunology Letters 219 (2020) 46–53

Contents lists available at ScienceDirect

Immunology Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/immlet

Detection of tumor antigens and tumor-antigen specific T cells in NSCLC patients: Correlation of the quality of T cell responses with NSCLC subtype

Ondrej Palata[a,b], Nada Podzimkova Hradilova[a,b], Dagmar Mysiková[c], Beata Kutna[c], Hana Mrazkova[c], Robert Lischke[c], Radek Spisek[a,b], Irena Adkins[a,b,*]

[a] Sotio, Prague, Czech Republic
[b] Department of Immunology, 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Charles University, Czech Republic
[c] Thoracic and Lung Transplantation Division, 3rd Department of Surgery, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and University Hospital Motol, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:
Tumor antigens
Non-small cell lung cancer
T cells
Immunomonitoring
Cancer cell lines
Dendritic cell-based immunotherapy

ABSTRACT

Allogeneic cancer cell lines serve as universal source of tumor-associated antigens in cancer vaccines. Immunogenic high hydrostatic pressure-killed cancer cells derived from cell lines can be used for the generation of dendritic cell (DC)-based active cellular immunotherapy of non-small cell lung cancer (NSCLC). We investigated the expression of 12 known NSCLC tumor-associated antigens (TAA) (CEA, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, PRAME, hTERT, HER2, MUC1, Survivin, STEAP1, SOX2 and NY-ESO-1) in 6 NSCLC cell lines as candidates for the generation of DC-based lung cancer vaccine. We showed that the selected antigenic profile of these cell lines overlaps to various degrees with that of primary NSCLC tumors (n = 52), indicating that 4 out of 6 NSCLC cell lines would be suitable for DC-based vaccine generation. We further investigated the presence of TAA-specific T cells in blood of NSCLC patients (n = 32) using commercially available peptide mixes in an *in vitro* stimulation assay. IFN-γ^+CD8$^+$ and IFN-γ^+CD4$^+$ T cell responses to all antigens were detected in NSCLC patients. Interestingly, despite higher TAA expression in squamous cell carcinoma (SCC) the responsiveness of patients' T cells to stimulation was significantly lower in SCC patients than in adenocarcinoma (AC) patients. This suggests qualitative differences in T cell functionality between NSCLC subtypes. Based on this study, and in order to maximize the amount of treatable patients, we selected a mix of H520 and H522 NSCLC cell lines for DC-based vaccine preparation. We also established a minimal panel of antigenic peptide mixes (CEA, hTERT, PRAME, HER2) for immunomonitoring of T cell responses during the DC-based lung cancer immunotherapy in Phase I lung cancer clinical trial (NCT02470468).

1. Introduction

Worldwide, lung cancer remains the leading cause of mortality among malignant diseases with a 5-year survival of 5–15 % [1]. Non-small cell lung cancer (NSCLC), which represent with 80–85 % the majority of lung cancer cases, can be divided into three histological subtypes: adenocarcinoma (AC) (50 %), squamous cell carcinoma (SCC) (30 %) and large cell carcinoma (5 %). Small cell carcinoma represents the remaining 15–20 % of lung cancer cases. During the last decade, the growing therapeutic options for advanced NSCLC patients have been mostly restricted to AC [2,3]. SCC have clinically worse prognosis than AC [4,5] despite high immunogenicity, which is suggested by a higher mutational load [6,7] and higher expression and spectrum of tumor-associated antigens (TAA) [8,9]. The repertoire of human TAA ranges from shared antigens that are expressed by a large group of patients (such as cancer-testis antigens e.g. MAGE-A, NY-ESO-1, PRAME or antigens specifically overexpressed in tumor tissues e.g. CEA, HER2, MUC1) to patient-specific antigens such as neoantigens which arise due to random somatic mutations [10]. Over the last decade, shared antigens have been used as therapeutic targets in many immunotherapeutic approaches using recombinant proteins or peptides. Several clinical trials with peptide or protein vaccines targeted against shared antigens have shown an induction of antigen specific CD8$^+$ and CD4$^+$ T cells and also a clinical benefit in NSCLC patients [11–13]. However, the clinical benefit could not be confirmed in a larger NSCLC Phase III studies [14]. The elicited immune responses in patients were not sufficient to control tumor growth most likely due to limited restriction to the peptide or protein used for immunization. Therefore

* Corresponding author at: Jankovcova 1518/2, Prague 7, 17000, Czech Republic.
E-mail address: adkins@sotio.com (I. Adkins).

https://doi.org/10.1016/j.imlet.2020.01.001
Received 22 August 2019; Received in revised form 29 November 2019; Accepted 7 January 2020
Available online 10 January 2020
0165-2478/ © 2020 European Federation of Immunological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

immunotherapeutic strategies that can elicit a broad polyclonal tumor-specific $CD4^+$ T helper and $CD8^+$ cytotoxic T cell response directed against multiple antigenic epitopes represent a more promising therapeutic option [15]. Beside whole tumor cell vaccines tested in NSCLC [16,17], dendritic cell (DC)-based vaccines loaded with killed autologous or allogeneic tumor cells or cell lysate bear the advantage of multiple tumor antigens presentation to antigen-specific $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells simultaneously [15]. DCs represent the most potent population of antigen-presenting cells for activating naïve T cells against target tumors [18]. DC vaccination has proven to be safe in clinical trials [19]. Sipuleucel-T, which was approved in 2010 as a first DC-based vaccine, demonstrated a survival benefit in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer [20]. Surprisingly so far, only one research group used irradiated and UVB-treated allogeneic whole tumor cells to generate DC-based lung cancer vaccine tested in NSCLC patients [21–24]. In our studies we have employed a high hydrostatic pressure (HHP) technology to generate immunogenic killed tumor cells [25]. DC loaded with HHP-killed lung cancer cells TC-1 or prostate tumor cells TRAMP-C2 combined with docetaxel chemotherapy significantly inhibited growth of tumors in mouse models [26]. More importantly, we have shown that a DC-based vaccine loaded with HHP-killed allogeneic tumor cells can induce antigen-specific T cells in NSCLC patients in vitro [27]. This DC-based vaccine is currently being tested on NSCLC patients is a Phase I clinical trial (NCT02470468).

In this study, which represents the basis for our DC-based vaccine generation, we evaluated the antigenic profile (12 known NSCLC TAA) of 6 commercially available allogeneic NSCLC cancer cell lines and compared it to TAA expression in primary NSCLC tumors (n = 52) in order to choose the most suitable cell lines for DC-based immunotherapy. Moreover, we evaluated the presence of TAA-specific $CD8^+$ and $CD4^+$ T cell responses to these antigens in blood of neoadjuvant NSCLC patients (n = 33) in order to select antigens suitable for the immunomonitoring of the $CD8^+$ and $CD4^+$ T cell responses to the DC-based immunotherapy tested in the Phase I lung cancer clinical trial (NCT02470468). Based on higher expression of tested tumor-associated antigens in SCC tumors, we also compared the quality of antigen-specific $CD8^+$ and $CD4^+$ T cell responses between AC and SCC NSCLC patients.

2. Materials and methods

2.1. Study population

Tumor and non-tumoral tissue, and peripheral blood were obtained from 64 neoadjuvant patients undergoing surgery at the University Hospital Motol in Prague between February 2014 and October 2015. All blood and tissue samples were collected with the patient's written consent and the study was approved by the Institutional Review Board of the University Hospital Motol. Informed consent was obtained after the nature and possible consequences of the studies had been fully explained. The characteristics of the patients are summarized in Table 1. The complete set of samples for antigen expression analysis, which included tumoral and non-tumoral tissue and PBMC, was obtained only for 22 patients (12 SCC and 10 AC). qPCR analysis of antigen expression was performed for 52 patient tumor samples and non-tumoral tissue. The evaluation of antigen-specific T cells was performed for 33 patient PBMC (16 SCC and 17 AC).

Table 1
Characteristics of NSCLC patients.

	Adenocarcinoma (AC)	Squamous cell carcinoma (SCC)
NSCLC patients	33	30
Sex (male/female)	12/22	23/7
Age, yr (mean ± SD)	62.3 ± 9.9	68.5 ± 7.4
Ag expression analyzed	26	26
T cell responses analyzed	17	16
Ag + T cells analyzed	10	11
active smokers	15	16
ex-smokers	7	14
Non-smokers	11	0
Tumor + non-tumoral tissue	26	26
TMN stage		
IA	6	3
IB	6	6
IIA	3	5
IIB	4	7
IIIA	6	5
IIIB	1	0
IV	0	0
Blood	17	16
Tissue + blood	10	12

2.2. NSCLC cell lines

Human NSCLC cell lines A549, H596, H522 (adenocarcinoma) and H520, H226, SK-MES-1 (Squamous cell carcinoma) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, USA). A549 cells were grown in F12 medium (Gibco) and H522, H520, H596 and H226 cells were cultured in RPMI-1640 complete medium (Gibco) supplemented with 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma Aldrich), 2 mM GlutaMAX I CTS (Gibco), 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin (Gibco). SK-MES-1 cells were grown in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, Gibco) supplemented with 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma Aldrich). Cells were incubated at 37 °C in 5 % CO_2.

2.3. qPCR analysis of antigen expression

Total RNA was isolated from cell lysates using RNeasy mini kit (Qiagene). The RLT lysis buffer (Qiagene) contained 1 % β-mercaptoethanol and the extraction was performed in accordance with the manufacturer's protocol including the DNA digestion step. The RNA concentration and purity was determined spectrophotometrically using a Nanodrop 2000c (Fisher Thermo scientific). Reverse trancription was performed from 1 µg of total RNA using an iScript cDNA synthesis kit (BioRad). The probes were designed, synthetized and approved by TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Germany. Its sensitivity was tested previously in Ref. [28]. Expression of all tested antigens was determined by qPCR on CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BioRad). Each 10 µl reaction contained 5 µl of KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (Kapa Biosystems), 0.5 µM of each forward and reverse primers (TIB Molbiol), 0.2 µM of TaqMan probe (TIB Molbiol) and 1.5 µl of DNase-free water and 2 µl of 10x diluted cDNA. Each reaction was done in duplicate. The reaction thermal protocol was following: 3 min at 95 °C followed by 45 cycles of amplification (95 °C for 15 s, 60 °C for 60 s). The formation of PCR products of the expected lengths was confirmed by agarose gel electrophoresis. The Cq values were determined using CFX Manager software (BioRad) and the relative expressions of the studied genes were calculated with the GenEx software (MultiD Analyses), with a cut off at 36 cycles. The cut off for positive expression was set to the relative expression value greater than the mean plus 2 SDs of the non-tumoral tissue control.

2.4. Detection of antigen-specific T cell responses

Two tubes of peripheral blood (VACUETTE® 9 ml K3 EDTA) were obtained from NSCLC patients. PBMC were isolated by Ficoll-Pague gradient centrifugation and stored at −80 °C. To analyse antigen-specific T cell responses, T cells were thawed and seeded at 2×10^5 cells/well in 96-U-well plate in 200 µl of RPMI-1640 medium containing 10 % AB human serum (Invitrogen), 2 mM GlutaMAX I CTS (Gibco), 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin (Gibco), 1 % non-essential

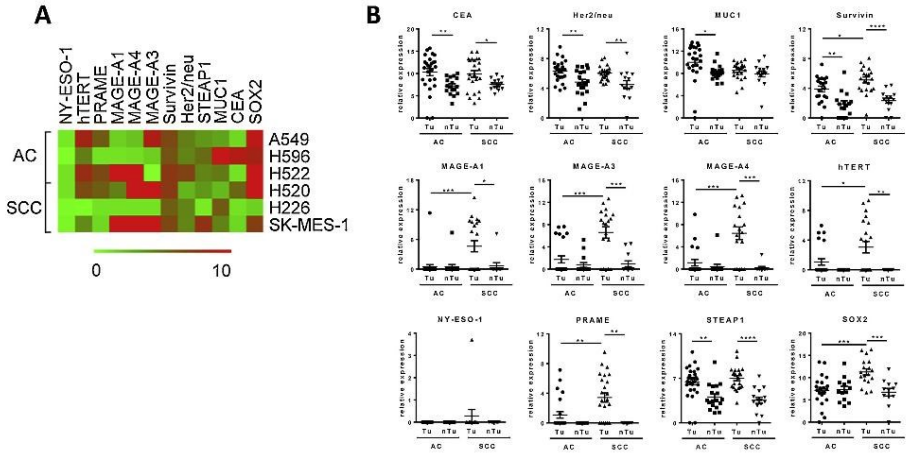


Fig. 1. Spectrum of analysed tumor antigens in allogeneic NSCLC cell lines overlaps with that of the primary NSCLC tumors. **(A)** Expression profile of 12 selected tumor antigens associated with NSCLC in 6 NSCLC cell lines. **(B)** Expression profile of 12 tumor antigens associated with NSCLC in primary tumor (Tu – tumoral tissue) and non-tumoral tissue (nTu) (n = 52). The results were considered statistically significant if * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ or **** $p < 0.0001$. AC refers to adenocarcinoma and SSC refers to squamous cell carcinoma for both primary tumor samples and tumor cell lines.

amino acids (Gibco), 1 mM sodium pyruvate (Gibco) and 50 µM β-mercaptoethanol (Gibco) at 37 °C, 5 % CO_2 overnight. The next day antigenic pepmixes for MAGE-A3 (PM-MAGEA3, 76 peptides), MAGE-A4 (PM-MAGEA4, 77 peptides), MAGE-A1 (PM-MAGEA1, 75 peptides), CEA (PM-CEA, 173 peptides), HER2 (PM-ERB_ECD, 161 peptides), hTERT (PM-TERT, 281 peptides), PRAME (PM-OIP4, 125 peptides), Survivin (PM-MM-Survivin, 33 peptides), MUC1 (PM-MUC1, 115 peptides) STEAP1 (PM-STEAP1, 82 peptides), NY-ESO-1 (PM-NYE, 43 peptides) and SOX2 (PM-SOX2, 77 peptides) (all from JPT Peptide Technologies, PepMix™peptide pools) were added to respective wells at concentration of 2.5 µg/ml. IL-2 (PeproTech) at 40 U/ml was added at day 4 and 7 to the wells. On day 9, pepmixes were added again and cells were incubated for 2 h at 37 °C. Thereafter, Brefeldin A (1000x, BioLegend) was added overnight. PBMCs incubated with CEF (PM-CEF-E, extended, 32 peptides) at a concentration of 1 µg/ml or 5 µl of Influenza A HA(California/Cal H1N1) (PM-INFA-HACal, 139 peptides) were used as positive controls for $CD8^+$ or $CD4^+$ T cell stimulation according to the same protocol. The negative control was PBMCs incubated without peptide. On day 9, cells were fixed and antigen-specific T cells were stained extracellularly with CD3-AlexaFluor 700, CD8-eFluor 450 (BioLegend) and with the LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (405 nm excitation) (Invitrogen) to exclude dead cells for 30 min, 4 °C. After a washing and permeabilization step, cells were stained intracellulary with IFN-γ PE-Cyanine7 and Anti-Human CD4 PerCP-Cyanine5.5 (BioLegend) for 30 min, 4 °C. The production of IFN-γ in $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells was analyzed by flow cytometry using a BD FACSCANTO II (BD Biosciences) and the data were analyzed with the FlowJo software (Tree Star). The percentage of IFN-γ^+ T cells detected in PBMCs without pepmixe addition (negative control – NC) was deducted from the percentage of IFN-γ^+ T cells detected for respective antigens. Two patients were excluded from the evaluation of IFN-γ^+CD4 + T cell due to the lack of responses to the HA antigen.

2.5. Statistical methods

Relative gene expression levels were calculated using the ΔΔCt method and were normalized to the expression levels of β-actin. Values were given in log2 scale. Two-tailed paired or unpaired t-test and nonparametric Mann-Whitney test were applied for data analysis using GraphPad PRISM 6 (San Diego, California, USA). The results were considered statistically significant if $p < 0.05$ (*),$p < 0.01$ (**) or $p < 0.001$ (***).

3. Results

3.1. The spectrum of analysed tumor antigens in allogeneic NSCLC cell lines overlaps with that of the primary NSCLC tumors

To select a suitable AC and SCC cell lines for the generation of DC-based HHP vaccine for NSCLC immunotherapy, [27] the expression of 12 selected known NSCLC tumor antigens (CEA, HER2, MUC1, Survivin, hTERT, STEAP1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A1, PRAME, SOX2 and NY-ESO-1) in commercially available cell lines A549, H596, H522 (AC) and H520, H226 and SK-MES-1 (SCC) was tested by qPCR (Fig. 1A). Survivin and SOX2 were the most expressed antigens in all cell lines except for H226. NY-ESO-1 expression was lacking in all tested cell lines. Various levels of expression of the other antigens were detected in the majority of the tested cell lines [hTERT (5/6), MUC1 (6/6), STEAP1 (5/6), HER2 (6/6), MAGE-A3 (5/6), MAGE-A4 (6/6), PRAME (6/6), MAGE-A1(6/6) and (CEA 6/6)]. The cell lines H226 and H596 exhibited the lowest expression of most of the analysd antigens. Based on the abundance and variability of the expressed antigens, the most suitable cell lines for DC-based HHP vaccine generation seem to be H522 and A549 for AC, and H520 and SK-MES-1 for SCC.

To confirm that the tumor antigens tested were expressed also in NSCLC patients (n = 52), the same panel of antigens was analyzed by qPCR in primary NSCLC tumor samples and compared to paired non-tumoral tissue (Fig. 1B). NSCLC patient characteristics are depicted in Table 1. In accordance with the findings in NSCLC cell lines, the NY-ESO-1 antigen was not detectable in primary tumors except for one SCC patient. All the other antigens tested were significantly overexpressed in tumor tissues when compared to non-tumoral tissue. However, for some antigens, this was dependent on the NSCLC subtype. Whereas MUC1 was significantly overexpressed only in tumors of AC patients, significant SOX2 expression was detected only in SCC patients. CT antigens such as MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, hTERT and PRAME

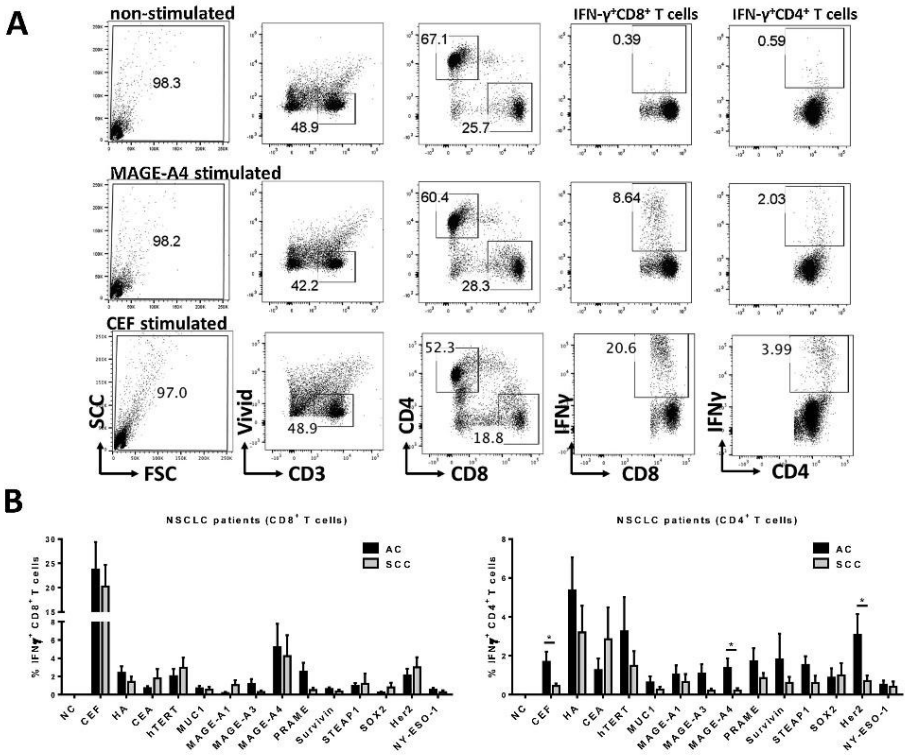


Fig. 2. Tumor antigen-specific CD8+ and CD4+ T cells can be detected in blood of NSCLC patients. **(A)** Flow cytometry gating strategy to detect IFN-γ^+CD8$^+$ and IFN-γ^+CD4$^+$ T cells after *in vitro* stimulation with antigenic pepmixes. Dot plots show one representative patient sample (MAGE-A4 stimulated). **(B)** Quantitative analyses of TAA-specific IFN-γ^+CD8$^+$ and IFN-γ^+CD4$^+$ T cells from PBMCs of 17 AC and 16 SCC patients. NC = negative control, no stimulation with pepmixes. Graph shows means ± SEM. The results were considered statistically significant if $p < 0.05$ (*).

were significantly expressed only in tumors of the majority of SCC patients. Overall, 10 out of 12 antigens were significantly over-expressed in SCC tumors in comparison to 5 out of 12 antigens that were overexpressed in AC tumors. The expression of survivin and SOX2 was significantly higher in SCC tumors than AC tumors. We did not find any correlation between TAA expression and stage of the disease, age, gender or smoking status.

3.2. Tumor antigen-specific CD8$^+$ and CD4$^+$ T cells can be detected in blood of NSCLC patients

To find out if TAA-specific T cells to all 12 antigens tested in our study were present in blood of NSCLC patients, PBMCs of 17 AC and 16 SCC patients were stimulated in an in vitro antigen-specific T cell stimulation assay. PBMC were repeatedly stimulated with a pepmix containing peptides from a particular antigen. The production of IFN-γ from CD8$^+$ and CD4$^+$ T cells was detected after 9 days by flow cytometry (Fig. 2). The gating strategy is shown in Fig. 2A. All patients were tested positive for the presence of IFN-γ^+CD8$^+$ T cell and IFN-γ^+CD4$^+$ T cells to viral CEF pepmixes (containing peptides from CMV, EBV and influenza virus specific for CD8$^+$ T cells) and HA pepmixes (containing peptides from influenza hemagglutinin specific for CD4$^+$ T cells) in comparison to non-stimulated PBMCs incubated without pepmixes. The percentage of non-specific IFN-γ production in non-stimulated T cells was deducted. About 90 % cells were viable in the assay. As shown in Fig. 2B IFN-γ-producing CD8$^+$ and CD4$^+$ T cells specific for all 12 antigens were detected in NSCLC patients. In general, there was no significant quantitative difference between the percentage of IFN-γ-producing T cells reactive to specific antigens between AC and SCC patients, except for MAGE-A4- and HER2-specific IFN-γ^+CD4$^+$ T cells. These were significantly decreased in SCC patients. For MAGE-A4 and HER2, only 11 AC and 9 SCC, and 12 AC and 10 SCC samples, respectively, were analyzed, due to the limited number of PBMCs in some of patient samples. In summary, we have shown that T cells specific to all tested antigens are present in the blood of NSCLC patients, with however a lower amount of MAGE-A4- and HER2-specific IFN-γ^+CD4$^+$ T cells in SCC patients.

3.3. Qualitative T cell responses to tumor antigen stimulation in vitro differ between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma patients

We further evaluated in how many patients IFN-γ^+CD8$^+$ and IFN-γ^+CD4$^+$ T cells specific for a particular antigen were induced, and if there were differences in responsiveness between AC and SCC patients given the higher TAA expression in SCC tumors. We calculated the percentage of patients with positive IFN-γ^+CD8$^+$ (Table 2) and IFN-γ^+CD4$^+$ (Table 3) T cell responses to a particular antigen. More than 80 % of NSCLC patients, including both SCC and AC subtypes,

Table 2
Analysis of IFN-γ^+CD8$^+$ T cell responses in NSCLC patients.

Frequency of patients with positive IFN-γ^+CD8$^+$ T cell responses (positive T cell response /total samples)	CEF	HA	CEA	hTERT	MUC1	MAGE-A1	MAGE-A3
AC patients	100 % (17/17)	88 % (15/17)	69% (9/13)	92 % (12/13)	64 % (9/16)	54 % (7/13)	71 % (12/17)
SCC patients	100 % (16/16)	81 % (13/16)	71 % (5/7)	88 % (7/8)	40 % (4/10)	71 % (5/7)	50 % (7/14)
	MAGE-A4	**PRAME**	**Survivin**	**STEAP1**	**SOX2**	**HER2**	**NY-ESO-1**
AC patients	85 % (11/13)	71 % (10/14)	76 % (13/17)	71 % (12/17)	53 % (9/17)	86 % (12/14)	54 % (7/13)
SCC patients	70 % (7/10)	50 % (6/12)	55 % (6/11)	36 % (4/11)	36 % (4/11)	82 % (9/11)	29 % (2/7)

Table 3
Analysis of IFN-γ^+CD4$^+$ T cell responses in NSCLC patients.

Frequency of patients with positive IFN-γ^+CD4$^+$ T cell responses (positive T cell response/total samples)	CEF	HA	CEA	hTERT	MUC1	MAGE-A1	MAGE-A3
AC patients	80 % (12/15)	100 % (15/15)	82 % (9/11)	82 % (9/11)	58 % (7/12)	91 % (10/11)	73 % (11/15)
SCC patients	85 % (12/14)	100 % (16/16)	83 % (5/6)	86 % (6/7)	50 % (4/8)	43 % (3/7)	33 % (4/12)
	MAGE-A4	**PRAME**	**Survivin**	**STEAP1**	**SOX2**	**HER2**	**NY-ESO-1**
AC patients	82 % (9/11)	85 % (11/13)	71 % (10/14)	93 %(13/14)	50 % (7/14)	83 % (10/12)	54 % (6/11)
SCC patients	33 % (3/9)	80 % (8/10)	60 % (6/10)	55 % (6/11)	73 % (8/11)	70 % (7/10)	38 % (3/8)

Table 4
Qualitative differences in $CD8^+$ T cells responsiveness between NSCLC subtypes.

Adenocarcinoma						
	% IFN-γ^+ $CD8^+$ T cells					
patient No.	NC	CEF	MAGE-A3	Survivin	STEAP1	SOX2
1	0	38.544	0	0	0.784	0
2	0	16.78	0.300	0	0.260	1.200
3	0	5.895	0.250	0.440	1.255	0.105
4	0	0.589	1.218	0.617	0.768	0.497
5	0	7.620	9.810	0.100	1.040	0.030
6	0	43.746	1.796	0.386	3.926	0.716
7	0	27.030	0	0.510	0	0
8	0	25.849	1.129	1.389	0	0
9	0	74.168	0.005	0.144	0.350	0
10	0	11.901	0	0.552	0.181	0
11	0	37.800	0.066	0	0	0
12	0	74.267	1.387	2.377	4.257	0.327
13	0	3.520	2.100	2.610	0.990	0.800
14	0	0.487	0.034	0.230	0.110	0.094
15	0	0.282	1.495	0.253	0	0
16	0	14.849	0	0.670	2.319	0.270
Squamous cell carcinoma						
	% IFN-γ^+ $CD8^+$ T cells					
patient No.	NC	CEF	MAGE-A3	Survivin	STEAP1	SOX2
1	0	13.219	0	0	0.005	1
2	0	5.240	0	0	0	0
3	0	8.982	0	0	0	0
4	0	2.056	0.109	0.476	0	0
5	0	28.940	0	0	0	0
6	0	55.037	0.069	1.477	0.256	1.837
7	0	2.070	1	0	0	0
8	0	23.403	0.008	0.046	0	0
9	0	25.607	0	0.113	0	0
10	0	4.080	0	0.095	0	0
11	0	36.100	2.640	2	14	6

developed IFN-$\gamma^+$$CD8^+$ T cell responses to hTERT and HER2 and IFN-$\gamma^+$$CD4^+$ T cell responses to hTERT, CEA and PRAME. Hence, these antigens might be preferentially suitable to monitor DC-based vaccine-induced T cell responses as the T cell responses might be detectable in the majority of NSCLC patients (≥ 80 %).

Interestingly, the overall percentage of patients with positive both IFN-$\gamma^+$$CD8^+$ and IFN-$\gamma^+$$CD4^+$ T cell responses to a particular antigen was, in fact, lower for SCC patients than for AC patients for all the tested 12 antigens, except for SOX2-specific IFN-$\gamma^+$$CD4^+$ T cells (Table 2 and 3). Similarly, the presence of T cell responses to multiple antigens within one patient was determined (Table 4). Only 4 antigens (MAGE-A3, Survivin, STEAP-1, SOX2) were evaluated as a complete set in the majority of patients (16 AC and 11 SCC patients). Here, the results showed that SCC patients developed IFN-$\gamma^+$$CD8^+$ T cell responses only to 43.1 % of these 4 antigens whereas PBMCs of AC patients displayed IFN-$\gamma^+$$CD8^+$ T cell responses to 71.9 % of these 4 antigens when stimulated *in vitro* (Fig. 3). There were no significant differences between NSCLC subtypes in IFN-$\gamma^+$$CD4^+$ T cell responses to these 4 antigens (Fig. 3). This indicates that despite a higher and more abundant TAA expression in SCC tumors, particularly tumor-antigen specific $CD8^+$ T cells in SCC patients might be impaired in responding to an antigenic stimulation.

4. Discussion

In this study, we compared the expression of known 12 NSCLC tumor-associated antigens in 6 NSCLC cell lines with the expression of these antigens in primary tumor samples from 52 neoadjuvant NSCLC patients. We further analyzed the presence of IFN-$\gamma^+$$CD8^+$ and IFN-$\gamma^+$$CD4^+$ T cell responses to these antigens in the blood of 33 NSCLC patients in order to select suitable antigenic pepmixes for monitoring T cells *ex vivo*. We further correlated the quality of IFN-$\gamma^+$$CD8^+$ and IFN-$\gamma^+$$CD4^+$ T cell responses to NSCLC histological subtype adenocarcinoma (AC) and squamous cell carcinoma (SCC).

The comparison of antigen expression profiles of selected TAA between the NSCLC cell lines and the primary tumors showed a highly overlapping pattern for the A549, H522 (AC) and H520, SK-MES-1 (SCC) cell lines only. All these cell lines are therefore suitable to be used in DC-based vaccine generation, however the combination of H520 and H522 cell lines was finally selected based on additional manufacturing criteria such as feasibility of cultivation, cell growth rate and susceptibility to high hydrostatic pressure treatment [27,29]. The analyses of human NSCLC tumors confirmed previously observed higher abundance of TAA expression in SCC over AC [8,9]. Similarly, MUC1 protein overexpression in AC tumors [30] and SOX2 protein overexpression specifically in SCC tumors [31,32] have also been reported. SOX2, a cancer stem cell transcription factor [33], represents an interesting TAA as it has been recently identified as a positive prognostic marker in NSCLC independently of the NSCLC subtype [32]. Given the high expression of SOX2 in all NSCLC cell lines in our study, it might be worth to determine the possible role of SOX2 in anti-tumor immune responses *in vivo*, specifically, under DC-based immunotherapy.

We further tested the presence of tumor antigen-specific T cells in

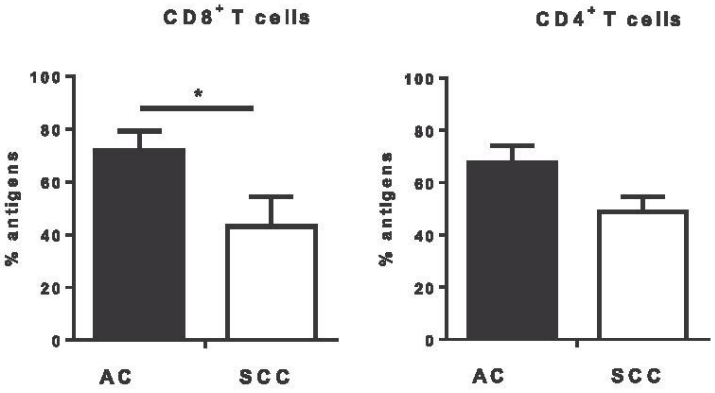


Fig. 3. Overall qualitative T cell responses to 4 tumor antigen stimulation *in vitro* differ between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma patients. Percentage of IFN-$\gamma^+$$CD8^+$ T cells is shown in the table for PBMCs of 16 AC and 11 SCC patients, where all MAGE-A3, Survivin, STEAP1 and SOX2 antigens were analyzed (Table 4). The graph shows that AC patients mount IFN-$\gamma^+$$CD8^+$ T cells to 71.9 % of these 4 antigens whereas SCC patients only to 43.1 %. There were no significant differences between NSCLC subtypes in IFN-$\gamma^+$$CD4^+$ T cell responses to these 4 antigens. Graph shows means ± SEM. The results were considered statistically significant if $p < 0.05$ (*).

NSCLC patients with the primary aim to identify a minimal set of TAA-specific pepmixes suitable for the monitoring of the immune response in patients treated with DC-based immunotherapy. Our data show that IFN-γ^+CD8$^+$ and IFN-γ^+CD4$^+$ T cell responses to all 12 antigens tested are present in the blood of NSCLC patients with limited quantitative differences between the AC and SCC. More than 80 % of NSCLC patients responded to hTERT, CEA, HER2, PRAME antigenic pepmixes. These commercially available pepmixes are suitable for T cell response monitoring of our DC-based vaccine activity to cover the majority of NSCLC patients participating in the Phase I lung cancer clinical trial (NCT02470468), including both NSCLC subtypes. The high percentage of patients with T cell responses to these antigenic pepmixes in our *in vitro* study can be correlated with the number of peptides included in pepmixes CEA (173 peptides), HER2 (161 peptides), hTERT (281 peptides) and PRAME (125 peptides). Not only T cell clonality, but also the frequency of antigen-specific T cells present in a particular patient determines the overall T cell responsiveness. In our study we observed that some other pepmixes with lower peptide content such as Survivin (33 peptides), STEAP1, MAGE-A4 or MAGE-A3 (75–82 peptides) induced T cells responses in a high percentage of AC patients (70–91 %), but not for SCC patients. It also would be possible to monitor T cell responses to these other antigens, but this would depend on the number of PBMC obtained from patients.

Overall, the percentage of patients with positive both IFN-γ^+CD8$^+$ and IFN-γ^+CD4$^+$ T cell responses to a particular antigen was lower for SCC patients than for AC patients for all the 12 antigens tested except for SOX2-specific IFN-γ^+CD4$^+$ T cells. Similarly, the number of CD8$^+$ T cells responsive to 4 selected antigens within one patient was significantly lower for SCC patients than AC patients. As there were no differences in viability or the number of T cells in our in vitro assays this suggests that some functional impairment of T cells might exist in SCC patients. The lower T cell responsiveness might be caused by either lower T cell clonality or tumor-specific T cell frequency in blood of SCC patients or by a higher suppression of T cell function. This might include intrinsic mechanisms such as TCR signaling pathway inhibition or extrinsic mechanism such as the action of other immunosuppressive soluble factors or cell populations. NSCLC cancer is a highly mutated cancer type with further higher mutational load in SCC over AC [7]. There are also more TAA expressed in SCC than in AC [8,9]. Therefore it is plausible that intensive antigenic/immune stimulation might lead to a higher degree of tolerance, T cell clone elimination and/or to higher immunosuppression of T cell functions. It has been shown that elevated TAA expression suppresses variant peptide vaccine responses in mice [34]. We have not detected any correlation between the level of antigens expression and T cell responses in our study. However, this might have been determined by a low number of patients with complete analyses (12 SCC and 10 AC). There are also no data available from SCC patients which would show that some of the aforementioned mechanisms would account for differences in quality of T cells between the NSCLC subtypes. As our finding might be relevant for designing the immunotherapeutic approaches specifically for SCC population of patients, this would merit further investigation which, however, goes beyond the scope of this study.

In general, only a few studies examined the induction of TAA-specific T cell responses after DC-based vaccine immunotherapies in NSCLC patients. In two previous studies with DC-based immunotherapy in NSCLC, the antigen-specific responses induced by DC-based vaccine were detected by INF-γ ELISPOT in 6/16 patients [22] and in 6/11 patients [24] and these could not be correlated with the clinical outcome. The nature of tumor-specific T cell responses that would correlate with the clinical response to immunotherapy is not known and the detected T cell responses reflect in most cases rather the activity of the immunotherapeutic agent than the clinical outcome [35]. In our Phase I clinical study, it might not be expected that the T cell responses to our selected antigens would be correlative with the clinical outcome as it is not possible to determine the tumor rejection T cell epitopes in such multi-antigenic system. Nevertheless, in addition to our selected panel of antigens, monitoring of SOX2-specific T cell responses, specifically in SCC patients, might be of a particular interest during our Phase I clinical trial. It has been shown that T cell responses against SOX2 were associated with NSCLC regression upon immunotherapy with anti-PD-1 [36]. None of the patients lacking SOX2-specific T cells experienced disease regression following anti-PD-1 treatment. Similarly to our study, they showed SOX2-specific CD8$^+$ and CD4$^+$ T cells detected in PBMC of 50 % of NSCLC patients. SOX2 therefore represents an important TAA in NSCLC and it would be very interesting to determine if DC-based vaccine being pulsed with NSCLC cell lines expressing high levels of SOX2 induces SOX2-specific T cells in patients and if this might correlate with the clinical outcome.

Funding

The work was supported by Sotio a.s. The work of the Department of Immunology of Charles University is supported by Ministry of Health, Czech Republic-Conceptual Development of Research Organization (University Hospital Motol, Prague, Czech Republic, No. 00064203).

This study was further supported by the Charles University in Prague, Czech Republic, project GAUK No. 458216 granted to OP

References

[1] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, et al., Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, Int. J. Cancer 136 (2015) E359–386.
[2] C. Genova, E. Rijavec, F. Grossi, Recent advances in squamous non-small cell lung cancer: evidence beyond predictive biomarkers, Expert Rev. Anticancer Ther. 16 (2016) 1–4.
[3] B.A. Derman, K.F. Mileham, P.D. Bonomi, M. Batus, M.J. Fidler, Treatment of advanced squamous cell carcinoma of the lung: a review, Transl. Lung Cancer Res. 4 (2015) 524–532.
[4] H. Asamura, T. Goya, Y. Koshiishi, Y. Sohara, K. Eguchi, et al., A Japanese lung cancer registry study: prognosis of 13,010 resected lung cancers, J. Thorac. Oncol. 3 (2008) 46–52.
[5] A. Kawase, J. Yoshida, G. Ishii, M. Nakao, K. Aokage, et al., Differences between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung: are adenocarcinoma and squamous cell carcinoma prognostically equal? Jpn. J. Clin. Oncol. 42 (2012) 189–195.
[6] I. Martincorena, P.J. Campbell, Somatic mutation in cancer and normal cells, Science 349 (2015) 1483–1489.
[7] M.S. Lawrence, P. Stojanov, P. Polak, G.V. Kryukov, K. Cibulskis, et al., Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes, Nature 499 (2013) 214–218.
[8] A.O. Gure, R. Chua, B. Williamson, M. Gonen, C.A. Ferrera, et al., Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer, Clin. Cancer Res. 11 (2005) 8055–8062.
[9] C. Grunwald, M. Koslowski, T. Arsiray, K. Dhaene, M. Praet, et al., Expression of multiple epigenetically regulated cancer/germline genes in nonsmall cell lung cancer, Int. J. Cancer 118 (2006) 2522–2528.
[10] P. Kvistborg, M.M. van Buuren, T.N. Schumacher, Human cancer regression antigens, Curr. Opin. Immunol. 25 (2013) 284–290.
[11] N. Takahashi, T. Ohkuri, S. Homma, J. Ohtake, D. Wakita, et al., First clinical trial of cancer vaccine therapy with artificially synthesized helper/ killer-hybrid epitope long peptide of MAGE-A4 cancer antigen, Cancer Sci. 103 (2012) 150–153.
[12] D. Atanackovic, N.K. Altorki, E. Stockert, B. Williamson, A.A. Jungbluth, et al., Vaccine-induced CD4 + T cell responses to MAGE-3 protein in lung cancer patients, J. Immunol. 172 (2004) 3289–3296.
[13] P.F. Brunsvig, J.A. Kyte, C. Kersten, S. Sundstrom, M. Moller, et al., Telomerase peptide vaccination in NSCLC: a phase II trial in stage III patients vaccinated after chemoradiotherapy and an 8-year update on a phase I/II trial, Clin. Cancer Res. 17 (2011) 6847–6857.
[14] A. Thomas, G. Giaccone, Why has active immunotherapy not worked in lung cancer? Ann. Oncol. 26 (2015) 2213–2220.
[15] C.L. Chiang, K. Balint, G. Coukos, L.E. Kandalaft, Potential approaches for more successful dendritic cell-based immunotherapy, Expert Opin. Biol. Ther. 15 (2015) 569–582.
[16] E. Rijavec, F. Biello, C. Genova, G. Barletta, C. Maggioni, et al., Belagenpumatucel-L for the treatment of non-small cell lung cancer, Expert Opin. Biol. Ther. 15 (2015) 1371–1379.
[17] J. Nemunaitis, T. Jahan, H. Ross, D. Sterman, D. Richards, et al., Phase 1/2 trial of autologous tumor mixed with an allogeneic GVAX vaccine in advanced-stage non-small-cell lung cancer, Cancer Gene Ther. 13 (2006) 555–562.
[18] J. Banchereau, F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, et al., Immunobiology of dendritic cells, Annu. Rev. Immunol. 18 (2000) 767–811.
[19] E. Vacchelli, I. Vitale, A. Eggermont, W.H. Fridman, J. Fucikova, et al., Trial watch:

dendritic cell-based interventions for cancer therapy, Oncoimmunology 2 (2013) e25771.
[20] K.F. Bol, G. Schreibelt, W.R. Gerritsen, I.J. de Vries, C.G. Figdor, Dendritic cell-based immunotherapy: state of the art and beyond, Clin. Cancer Res. 22 (2016) 1897–1906.
[21] E.A. Hirschowitz, T. Foody, R. Kryscio, L. Dickson, J. Sturgill, et al., Autologous dendritic cell vaccines for non-small-cell lung cancer, J. Clin. Oncol. 22 (2004) 2808–2815.
[22] E.A. Hirschowitz, T. Foody, G.E. Hidalgo, J.R. Yannelli, Immunization of NSCLC patients with antigen-pulsed immature autologous dendritic cells, Lung Cancer 57 (2007) 365–372.
[23] J.R. Yannelli, J. Sturgill, T. Foody, E. Hirschowitz, The large scale generation of dendritic cells for the immunization of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), Lung Cancer 47 (2005) 337–350.
[24] E.A. Hirschowitz, A. Mullins, D. Prajapati, T. Baeker, G. Kloecker, et al., Pilot study of 1650-G: a simplified cellular vaccine for lung cancer, J. Thorac. Oncol. 6 (2011) 169–173.
[25] J. Fucikova, I. Moserova, I. Truxova, I. Hermanova, I. Vancurova, et al., High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells, Int. J. Cancer 135 (2014) 1165–1177.
[26] R. Mikyskova, I. Stepanek, M. Indrova, J. Bieblova, J. Simova, et al., Dendritic cells pulsed with tumor cells killed by high hydrostatic pressure induce strong immune responses and display therapeutic effects both in murine TC-1 and TRAMP-C2 tumors when combined with docetaxel chemotherapy, Int. J. Oncol. 48 (2016) 953–964.
[27] N. Hradilova, L. Sadilkova, O. Palata, D. Mysikova, H. Mrazkova, et al., Generation of dendritic cell-based vaccine using high hydrostatic pressure for non-small cell lung cancer immunotherapy, PLoS One 12 (2017) e0171539.
[28] K. Kloudova, H. Hromadkova, S. Partlova, T. Brtnicky, L. Rob, et al., Expression of tumor antigens on primary ovarian cancer cells compared to established ovarian cancer cell lines, Oncotarget 7 (2016) 46120–46126.
[29] L. Urbanova, N. Hradilova, I. Moserova, S. Vosahlikova, L. Sadilkova, et al., High hydrostatic pressure affects antigenic pool in tumor cells: implication for dendritic cell-based cancer immunotherapy, Immunol. Lett. 187 (2017) 27–34.
[30] S. Nagai, K. Takenaka, M. Sonobe, E. Ogawa, H. Wada, et al., A novel classification of MUC1 expression is correlated with tumor differentiation and postoperative prognosis in non-small cell lung cancer, J. Thorac. Oncol. 1 (2006) 46–51.
[31] N. Karachaliou, R. Rosell, S. Viteri, The role of SOX2 in small cell lung cancer, lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung, Transl. Lung Cancer Res. 2 (2013) 172–179.
[32] V. Velcheti, K. Schalper, X. Yao, H. Cheng, M. Kocoglu, et al., High SOX2 levels predict better outcome in non-small cell lung carcinomas, PLoS One 8 (2013) e61427.
[33] K. Weina, J. Utikal, SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic, Clin. Transl. Med. 3 (2014) 19.
[34] C.B. Kemmler, E.T. Clambey, R.M. Kedl, J.E. Slansky, Elevated tumor-associated antigen expression suppresses variant peptide vaccine responses, J. Immunol. 187 (2011) 4431–4439.
[35] P.G. Coulie, T. Connerotte, Human tumor-specific T lymphocytes: does function matter more than number? Curr. Opin. Immunol. 17 (2005) 320–325.
[36] K.M. Dhodapkar, S.N. Gettinger, R. Das, H. Zebroski, M.V. Dhodapkar, SOX2-specific adaptive immunity and response to immunotherapy in non-small cell lung cancer, Oncoimmunology 2 (2013) e25205.

7 SOUHRN

V této práci jsme ukázali, že jsme schopni vyrobit funkční DC vakcínu pulzovanou nádorovými liniemi ošetřenými HHP nebo cHT, které slouží jako komplexní zdroj antigenů. Tuto DC vakcínu lze vyrobit v kultivačním médiu bez séra v GMP režimu pomocí standardizovaných metod. Dále jsme ukázali, že HHP a cHT indukuje imunogenní buněčnou smrt nádorových buněk, což vede k větší aktivitě DC vakcíny a účinnějšími rozvoji protinádorové imunity. Popsali jsme molekulární mechanismy, které doprovázejí imunogenní buněčnou smrt T lymfocytů po ošetření HHP a cHT. Stanovili jsme optimální hodnotu HHP a cHT ošetření, která zabíjí všechny nádorové buňky, indukuje maximální imunogenicitu a zajišťuje dostatečné množství antigenů v nádorových buňkách pro antigenní prezentaci. Imunogenicita nádorových buněk po ošetření cHT byla testována v myším nádorovém modelu, kde jsme ukázali, že profylaktická vakcinace vede ke snížení růstu nádoru a zvýšení přežívání. V naší práci jsme dále podrobně analyzovali schopnost nádorových buněk ošetřených HHP a cHT stimulovat vlastnosti DC jakými jsou maturovaný fenotyp, produkce protizánětlivých cytokinů, zvýšení fagocytózy, chemotaktická migrace a antigenní prezentace. Takto připravené DC vakcíny jsou schopny prezentovat nádorově specifické antigeny pocházející z nádorových linií $CD8^+$ a $CD4^+$ T lymfocyty a nedochází ke stimulaci T regulačních lymfocytů. Analyzovaný antigenní profil plicních nádorových linií (12 antigenů asociovaných s NSCLC), které byly použité pro výrobu DC vakcíny, se překrývá s antigenní profilem u obou subtypů nemalobuněčného karcinomu, nicméně SCC subtyp vykazuje expresi většího spektra nádorových antigenů. Specifické $CD8^+$ a $CD4^+$ T lymfocyty proti všem nádorovým antigenům byly detekovány v krvi pacientů s AC a SCC, s výrazně nižším množstvím pouze pro IFN-γ^+ MAGE-A4 a HER2-specifické $CD4^+$ T lymfocyty u SCC pacientů. Kvalitativní analýza $CD8^+$ T buněčných odpovědí ukázala, že pouze 43,1 % SCC pacientů mělo *in vitro* detekovatelné antigen specifické IFN^+CD8^+ T lymfocyty na rozdíl od 71,9 % AC pacientů. Tento rozdíl nebyl způsoben nižší životností buněk *in vitro*. Výsledky spíše naznačují, že $CD8^+$ T lymfocyty pocházející z SCC pacientů jsou více funkčně potlačené a další experimentální práce je potřeba k potvrzení této hypotézy. Rozdílná reaktivita $CD8^+$ T lymfocytů na antigenní stimulaci mezi AC a SCC pacienty by nicméně mohla hrát významnou roli pro design nových imunoterapeutických přístupů k léčbě NSCLC.

.

8 SUMMARY

During our experimental work we showed that we were able to produce a functional DC vaccine pulsed with tumor cells treated with HHP or cHT. This DC vaccine can be produced according to standardized procedures in serum free medium to fulfill GMP regulatory requirements. We showed that HHP and cHT induce immunogenic cell death in tumor cells and can activate highly stimulatory DC to elicit effective antitumor responses. The underlying molecular mechanisms of immunogenic cell death induced by HHP and cHT were described in detail throughout our study. The optimal magnitude of HHP and cHT treatment was established to obtain killed tumor cells with high immunogenic potential and content of tumor antigens for T cell presentation. The immunogenicity of cHT-treated tumor cells was shown *in vivo*. Prophylactic vaccination with cHT-treated tumor cells in mice substantially slowed down the tumor growth after the challenge with tumor cells and prolonged survival of the experimental animals. DC pulsed with HHP or cHT-treated tumor cells displayed mature phenotype, increased phagocytic and chemotactic properties and more efficient antigen presentation. DC vaccine stimulated antigen specific $CD8^+$ and $CD4^+$ T lymphocytes without the induction of T regulatory cells. We further showed that the antigenic profile of 12 selected lung cancer-associated antigens in tumor cell lines chosen for the DC vaccine generation overlaps with that of the primary tumors from NSCLC patients. However, the SCC subtype showed a broader spectrum of expressed antigens than AC subtype. Specific $CD8^+$ and $CD4^+$ T lymphocytes against all tumor antigens tested were detected in blood of AC and SCC patients, with markedly lower numbers only for IFN-γ^+ MAGE-A4 a HER2-specific $CD4^+$ T lymphocytes in SCC patients. The quality of $CD8^+$ T cell responses was markedly reduced in SCC patients over the AC patients. Only 43.1% SCC patients have detectable antigen specific IFN^+CD8^+ T cells in comparison to 71.9% of AC patients. The different reactivity of $CD8^+$ T cells was not due to the lower cell viability, but rather due to higher functional suppression in SCC subtype. This finding might be relevant for the design of new immunotherapeutic approaches to NSCLC and merits further examination.

9 ZÁVĚR

Imunoterapie se snaží využít a přimět imunitní systém pacienta k boji proti malignímu onemocnění. Současné imunoterapeutické postupy založené na monoklonálních protilátkách a buněčných terapiích v některých indikacích, mimo jiné u karcinomu plic, vedly k zásadnímu prodloužení života pacientů a zvýšení kvality života. Nové poznatky v experimentální rovině se objevují každý den a pokroky v imunoterapii maligních onemocnění mohou být právem řazeny mezi zásadní milníky v historii medicíny spolu s vakcinací a eradikací některých infekčních onemocnění. Význam těchto objevů byl doceněn udělením Nobelovy ceny za fyziologii nebo medicínu Jamesi P. Allisonovi a Tasuku Honjo za objev PD-1 kontrolního bodu imunity v roce 2018 a Ralphu Steinmanovi za objev dendritických buněk v roce 2011. Naše dosavadní poznatky však stále tvoří jen střípek velké vědecké mozaiky a k úplnému poznání imunoterapeutických principů, které povedou k eradikaci rakoviny, je ještě dlouhá cesta. Důkladné pochopení vztahů mezi nádorovými buňkami a imunitním systémem je naprosto zásadní pro vývoj a zdokonalování imunoterapeutických léčebných přístupů, ke kterým se řadí i vakcíny na bázi dendritických buněk.

.

10 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

Adkins I, Fucikova J, Garg AD, Agostinis P, Spisek R. 2014. Physical modalities inducing immunogenic tumor cell death for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 3: e968434

Adkins I, Hradilova N, Palata O, Sadilkova L, Palova-Jelinkova L, Spisek R. 2018. High hydrostatic pressure in cancer immunotherapy and biomedicine. *Biotechnol Adv* 36: 577-82

Adkins I, Sadilkova L, Hradilova N, Tomala J, Kovar M, Spisek R. 2017. Severe, but not mild heat-shock treatment induces immunogenic cell death in cancer cells. *Oncoimmunology* 6: e1311433

Aertsen A, Meersman F, Hendrickx ME, Vogel RF, Michiels CW. 2009. Biotechnology under high pressure: applications and implications. *Trends Biotechnol* 27: 434-41

Ahn MJ, Sun JM, Lee SH, Ahn JS, Park K. 2017. EGFR TKI combination with immunotherapy in non-small cell lung cancer. *Expert Opin Drug Saf* 16: 465-69

Akhtar N, Bansal JG. 2017. Risk factors of Lung Cancer in nonsmoker. *Current Problems in Cancer* 41: 328-39

Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392: 86-9

Anassi E, Ndefo UA. 2011. Sipuleucel-T (provenge) injection: the first immunotherapy agent (vaccine) for hormone-refractory prostate cancer. *P T* 36: 197-202

Anguille S, Smits EL, Lion E, van Tendeloo VF, Berneman ZN. 2014. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *Lancet Oncol* 15: e257-67

Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Criollo A, Ortiz C, et al. 2007. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol Rev* 220: 47-59

Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon JP, et al. 2004. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 350: 351-60

Arriagada R, Dunant A, Pignon JP, Bergman B, Chabowski M, et al. 2010. Long-term results of the international adjuvant lung cancer trial evaluating adjuvant Cisplatin-based chemotherapy in resected lung cancer. *J Clin Oncol* 28: 35-42

Asamura H, Goya T, Koshiishi Y, Sohara Y, Eguchi K, et al. 2008. A Japanese Lung Cancer Registry study: prognosis of 13,010 resected lung cancers. *J Thorac Oncol* 3: 46-52

Ayoub NM, Al-Shami KM, Yaghan RJ. 2019. Immunotherapy for HER2-positive breast cancer: recent advances and combination therapeutic approaches. *Breast Cancer (Dove Med Press)* 11: 53-69

Babatz J, Rollig C, Lobel B, Folprecht G, Haack M, et al. 2006. Induction of cellular immune responses against carcinoembryonic antigen in patients with metastatic tumors after vaccination with altered peptide ligand-loaded dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 55: 268-76

Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, Burkeholder S, Taquet N, et al. 2001. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 61: 6451-8

Baronzio G, Gramaglia A, Fiorentini G. 2006. Hyperthermia and immunity. A brief overview. *In Vivo* 20: 689-95

Bendzsak A, Nenshi R, Darling G, Schultz SE, Gunraj N, et al. 2011. Overview of lung cancer surgery in Ontario. *Ann Thorac Surg* 91: 361-6

Bijker MS, van den Eeden SJ, Franken KL, Melief CJ, van der Burg SH, Offringa R. 2008. Superior induction of anti-tumor CTL immunity by extended peptide vaccines involves prolonged, DC-focused antigen presentation. *Eur J Immunol* 38: 1033-42

Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. 2013. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol* 31: 443-73

Boffetta P. 2002. Involuntary smoking and lung cancer. *Scand J Work Environ Health* 28 Suppl 2: 30-40

Boonyaratanakornkit BB, Park CB, Clark DS. 2002. Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins. *Biochim Biophys Acta* 1595: 235-49

Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, et al. 2015. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 373: 1627-39

Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crino L, Eberhardt WEE, et al. 2015. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 373: 123-35

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68: 394-424

Brennan P, Crispo A, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P, et al. 2006. High cumulative risk of lung cancer death among smokers and nonsmokers in Central and Eastern Europe. *Am J Epidemiol* 164: 1233-41

Brown ER, Shepherd FA. 2005. Erlotinib in the treatment of non-small cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 5: 767-75

Burnet FM. 1970. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13: 1-27

Burnet M. 1957. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* 1: 779-86

Camidge DR, Pao W, Sequist LV. 2014. Acquired resistance to TKIs in solid tumours: learning from lung cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 11: 473-81

Cancer Genome Atlas Research N. 2012. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 489: 519-25

Cancer Genome Atlas Research N. 2014. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 511: 543-50

Carbone DP, Reck M, Paz-Ares L, Creelan B, Horn L, et al. 2017. First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 376: 2415-26

Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, Ghiringhelli F, Roux S, et al. 2005. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med* 202: 1691-701

Clark GJ, Silveira PA, Hogarth PM, Hart DNJ. 2019. The cell surface phenotype of human dendritic cells. *Semin Cell Dev Biol* 86: 3-14

Clark PR, Menoret A. 2001. The inducible Hsp70 as a marker of tumor immunogenicity. *Cell Stress Chaperones* 6: 121-5

Cohen MH, Gootenberg J, Keegan P, Pazdur R. 2007. FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) plus Carboplatin and Paclitaxel as first-line treatment of advanced/metastatic recurrent nonsquamous non-small cell lung cancer. *Oncologist* 12: 713-8

Collin M, McGovern N, Haniffa M. 2013. Human dendritic cell subsets. *Immunology* 140: 22-30

Constantino J, Gomes C, Falcao A, Cruz MT, Neves BM. 2016. Antitumor dendritic cell-based vaccines: lessons from 20 years of clinical trials and future perspectives. *Transl Res* 168: 74-95

Dauer M, Schad K, Herten J, Junkmann J, Bauer C, et al. 2005. FastDC derived from human monocytes within 48 h effectively prime tumor antigen-specific cytotoxic T cells. *J Immunol Methods* 302: 145-55

Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. 2011. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med* 32: 605-44

Dhodapkar MV, Steinman RM, Sapp M, Desai H, Fossella C, et al. 1999. Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J Clin Invest* 104: 173-80

Diaz-Serrano A, Gella P, Jimenez E, Zugazagoitia J, Rodriguez LPA. 2018. Targeting EGFR in Lung Cancer: Current Standards and Developments. *Drugs* 78: 893-911

Diehl P, Schauwecker J, Mittelmeier W, Schmitt M. 2008. High hydrostatic pressure, a novel approach in orthopedic surgical oncology to disinfect bone, tendons and cartilage. *Anticancer Res* 28: 3877-83

Doroshow DB, Sanmamed MF, Hastings K, Politi K, Rimm DL, et al. 2019. Immunotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer: Facts and Hopes. *Clin Cancer Res*

Douillard JY, Rosell R, De Lena M, Carpagnano F, Ramlau R, et al. 2006. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIA non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 7: 719-27

Dudek AM, Garg AD, Krysko DV, De Ruysscher D, Agostinis P. 2013. Inducers of immunogenic cancer cell death. *Cytokine Growth Factor Rev* 24: 319-33

Dungo RT, Keating GM. 2013. Afatinib: first global approval. *Drugs* 73: 1503-15

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3: 991-8

Eisenthal A, Goldman Y, Skornick Y, Gelfand A, Buyaner D, et al. 1998. Human tumor cells, modified by a novel pressure/crosslinking methodology, promote autologous lymphocyte proliferation and modulate cytokine secretion. *Cancer Immunol Immunother* 46: 304-10

Eisenthal A, Ramakrishna V, Skornick Y, Shinitzky M. 1993. Induction of cell-mediated immunity against B16-BL6 melanoma in mice vaccinated with cells modified by hydrostatic pressure and chemical crosslinking. *Cancer Immunol Immunother* 36: 300-6

Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, et al. 2009. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461: 282-6

EMA. https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/opdivo.

Engel AM, Svane IM, Mouritsen S, Rygaard J, Clausen J, Werdelin O. 1996. Methylcholanthrene-induced sarcomas in nude mice have short induction times and relatively low levels of surface MHC class I expression. *APMIS* 104: 629-39

Engel AM, Svane IM, Rygaard J, Werdelin O. 1997. MCA sarcomas induced in scid mice are more immunogenic than MCA sarcomas induced in congenic, immunocompetent mice. *Scand J Immunol* 45: 463-70

Engell-Noerregaard L, Kvistborg P, Zocca MB, Pedersen AW, Claesson MH, Mellemgaard A. 2013. Clinical and Immunological Effects in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung-Cancer after Vaccination with Dendritic Cells Exposed to an Allogeneic Tumor Cell Lysate. *World Journal of Vaccines* 3: 68-76

Feng H, Zeng Y, Graner MW, Katsanis E. 2002. Stressed apoptotic tumor cells stimulate dendritic cells and induce specific cytotoxic T cells. *Blood* 100: 4108-15

Ferrara N. 2002. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 29: 10-4

Fitzgerald-Bocarsly P, Dai J, Singh S. 2008. Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine Growth Factor Rev* 19: 3-19

Franklin WA. 2000. Pathology of lung cancer. *J. Thorac. Imaging* 15: 3-12

Frey B, Franz S, Sheriff A, Korn A, Bluemelhuber G, et al. 2004. Hydrostatic pressure induced death of mammalian cells engages pathways related to apoptosis or necrosis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 50: 459-67

Frey B, Janko C, Ebel N, Meister S, Schlucker E, et al. 2008. Cells under pressure - treatment of eukaryotic cells with high hydrostatic pressure, from physiologic aspects to pressure induced cell death. *Curr Med Chem* 15: 2329-36

Frey B, Weiss EM, Rubner Y, Wunderlich R, Ott OJ, et al. 2012. Old and new facts about hyperthermia-induced modulations of the immune system. *Int J Hyperthermia* 28: 528-42

Fucikova J, Becht E, Iribarren K, Goc J, Remark R, et al. 2016a. Calreticulin Expression in Human Non-Small Cell Lung Cancers Correlates with Increased Accumulation of Antitumor Immune Cells and Favorable Prognosis. *Cancer Res* 76: 1746-56

Fucikova J, Moserova I, Truxova I, Hermanova I, Vancurova I, et al. 2014. High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells. *Int J Cancer* 135: 1165-77

Fucikova J, Moserova I, Urbanova L, Bezu L, Kepp O, et al. 2015. Prognostic and Predictive Value of DAMPs and DAMP-Associated Processes in Cancer. *Front Immunol* 6: 402

Fucikova J, Rozkova D, Ulcova H, Budinsky V, Sochorova K, et al. 2011. Poly I: C-activated dendritic cells that were generated in CellGro for use in cancer immunotherapy trials. *J Transl Med* 9: 223

Fucikova J, Truxova I, Hensler M, Becht E, Kasikova L, et al. 2016b. Calreticulin exposure by malignant blasts correlates with robust anticancer immunity and improved clinical outcome in AML patients. *Blood* 128: 3113-24

Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, et al. 2003. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J Clin Oncol* 21: 2237-46

Galluzzi L, Buque A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. 2017. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol* 17: 97-111

Gandara DR, Paul SM, Kowanetz M, Schleifman E, Zou W, et al. 2018. Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab. *Nat Med* 24: 1441-48

Garg AD, Coulie PG, Van den Eynde BJ, Agostinis P. 2017a. Integrating Next-Generation Dendritic Cell Vaccines into the Current Cancer Immunotherapy Landscape. *Trends Immunol* 38: 577-93

Garg AD, Dudek-Peric AM, Romano E, Agostinis P. 2015. Immunogenic cell death. *Int J Dev Biol* 59: 131-40

Garg AD, Krysko DV, Vandenabeele P, Agostinis P. 2011. DAMPs and PDT-mediated photo-oxidative stress: exploring the unknown. *Photochem Photobiol Sci* 10: 670-80

Garg AD, Krysko DV, Vandenabeele P, Agostinis P. 2012a. The emergence of phox-ER stress induced immunogenic apoptosis. *Oncoimmunology* 1: 786-88

Garg AD, Krysko DV, Vandenabeele P, Agostinis P. 2012b. Hypericin-based photodynamic therapy induces surface exposure of damage-associated molecular patterns like HSP70 and calreticulin. *Cancer Immunol Immunother* 61: 215-21

Garg AD, Krysko DV, Verfaillie T, Kaczmarek A, Ferreira GB, et al. 2012c. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *EMBO J* 31: 1062-79

Garg AD, Vandenberk L, Fang S, Fasche T, Van Eygen S, et al. 2017b. Pathogen response-like recruitment and activation of neutrophils by sterile immunogenic dying cells drives neutrophil-mediated residual cell killing. *Cell Death Differ* 24: 832-43

Garon EB, Cao D, Alexandris E, John WJ, Yurasov S, Perol M. 2012. A randomized, double-blind, phase III study of Docetaxel and Ramucirumab versus Docetaxel and placebo in the treatment of stage IV non-small-cell lung cancer after disease progression after 1 previous platinum-based therapy (REVEL): treatment rationale and study design. *Clin Lung Cancer* 13: 505-9

Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, et al. 2009. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med* 15: 1170-8

Giaccone G, Bazhenova LA, Nemunaitis J, Tan M, Juhasz E, et al. 2015. A phase III study of belagenpumatucel-L, an allogeneic tumour cell vaccine, as maintenance therapy for non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 51: 2321-9

Goldman Y, Peled A, Shinitzky M. 2000. Effective elimination of lung metastases induced by tumor cells treated with hydrostatic pressure and N-acetyl-L-cysteine. *Cancer Res* 60: 350-8

Goldstraw P, Ball D, Jett JR, Le Chevalier T, Lim E, et al. 2011. Non-small-cell lung cancer. *The Lancet* 378: 1727-40

Green DR, Ferguson T, Zitvogel L, Kroemer G. 2009. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol* 9: 353-63

Greig SL. 2016. Osimertinib: First Global Approval. *Drugs* 76: 263-73

Group N-sCLCC. 1995. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. *BMJ* 311: 899-909

Group NM-aC, Arriagada R, Auperin A, Burdett S, Higgins JP, et al. 2010. Adjuvant chemotherapy, with or without postoperative radiotherapy, in operable non-small-cell lung cancer: two meta-analyses of individual patient data. *Lancet* 375: 1267-77

Grunwald C, Koslowski M, Arsiray T, Dhaene K, Praet M, et al. 2006. Expression of multiple epigenetically regulated cancer/germline genes in nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer* 118: 2522-8

Gure AO, Chua R, Williamson B, Gonen M, Ferreira CA, et al. 2005. Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research* 11: 8055-62

Halliday PR, Blakely CM, Bivona TG. 2019. Emerging Targeted Therapies for the Treatment of Non-small Cell Lung Cancer. *Curr Oncol Rep* 21: 21

Haniffa M, Shin A, Bigley V, McGovern N, Teo P, et al. 2012. Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity* 37: 60-73

Hatfield P, Merrick AE, West E, O'Donnell D, Selby P, et al. 2008. Optimization of dendritic cell loading with tumor cell lysates for cancer immunotherapy. *J Immunother* 31: 620-32

Hellmann MD, Ciuleanu TE, Pluzanski A, Lee JS, Otterson GA, et al. 2018. Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden. *N Engl J Med* 378: 2093-104

Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. 2018. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature* 553: 446-54

Hernandez AM, Vazquez AM. 2015. Racotumomab-alum vaccine for the treatment of non-small-cell lung cancer. *Expert Rev Vaccines* 14: 9-20

Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, Dieing A, Sreenivasa G, et al. 2002. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol* 43: 33-56

Hirschowitz EA, Foody T, Hidalgo GE, Yannelli JR. 2007. Immunization of NSCLC patients with antigen-pulsed immature autologous dendritic cells. *Lung Cancer* 57: 365-72

Hirschowitz EA, Foody T, Kryscio R, Dickson L, Sturgill J, Yannelli J. 2004. Autologous dendritic cell vaccines for non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 22: 2808-15

Hirschowitz EA, Mullins A, Prajapati D, Baeker T, Kloecker G, et al. 2011. Pilot Study of 1650-G A Simplified Cellular Vaccine for Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* 6: 169-73

Hishida T, Yoshida J, Ohe Y, Aokage K, Ishii G, Nagai K. 2014. Surgical outcomes after initial surgery for clinical single-station N2 non-small-cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol* 44: 85-92

Hradilova N, Sadilkova L, Palata O, Mysikova D, Mrazkova H, et al. 2017. Generation of dendritic cell-based vaccine using high hydrostatic pressure for non-small cell lung cancer immunotherapy. *PLoS One* 12: e0171539

Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, Gay L, Ali SM, et al. 2017. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med* 9: 34

Chang GC, Lan HC, Juang SH, Wu YC, Lee HC, et al. 2005. A pilot clinical trial of vaccination with dendritic cells pulsed with autologous tumor cells derived from malignant pleural effusion in patients with late-stage lung carcinoma. *Cancer* 103: 763-71

Cheever MA, Higano CS. 2011. PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. *Clin Cancer Res* 17: 3520-6

Chen Z, Fillmore CM, Hammerman PS, Kim CF, Wong KK. 2014. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat Rev Cancer* 14: 535-46

Cheng TY, Cramb SM, Baade PD, Youlden DR, Nwogu C, Reid ME. 2016. The International Epidemiology of Lung Cancer: Latest Trends, Disparities, and Tumor Characteristics. *J Thorac Oncol* 11: 1653-71

Cheong C, Matos I, Choi JH, Dandamudi DB, Shrestha E, et al. 2010. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* 143: 416-29

Chiba S, Baghdadi M, Akiba H, Yoshiyama H, Kinoshita I, et al. 2012. Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. *Nat Immunol* 13: 832-42

Inamura K. 2018. Update on Immunohistochemistry for the Diagnosis of Lung Cancer. *Cancers (Basel)* 10

Inoue H, Tani K. 2014. Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments. *Cell Death Differ* 21: 39-49

Ito A, Honda H, Kobayashi T. 2006. Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a novel concept of "heat-controlled necrosis" with heat shock protein expression. *Cancer Immunol Immunother* 55: 320-8

Izydor M, Hainthaler M, Gaipl US, Frey B, Schlücker E. 2017. Static and Dynamic, but not Pulsed High-Pressure Treatment Efficiently Inactivates Yeast. *Chemical Engineering & Technology* 40: 130-37

Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, et al. 2010. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 363: 411-22

Kawase A, Yoshida J, Ishii G, Nakao M, Aokage K, et al. 2012. Differences between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung: are adenocarcinoma and squamous cell carcinoma prognostically equal? *Jpn J Clin Oncol* 42: 189-95

Kazandjian D, Blumenthal GM, Chen HY, He K, Patel M, et al. 2014. FDA approval summary: crizotinib for the treatment of metastatic non-small cell lung cancer with anaplastic lymphoma kinase rearrangements. *Oncologist* 19: e5-11

Kazandjian D, Blumenthal GM, Yuan W, He K, Keegan P, Pazdur R. 2016a. FDA Approval of Gefitinib for the Treatment of Patients with Metastatic EGFR Mutation-Positive Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 22: 1307-12

Kazandjian D, Suzman DL, Blumenthal G, Mushti S, He K, et al. 2016b. FDA Approval Summary: Nivolumab for the Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer With Progression On or After Platinum-Based Chemotherapy. *Oncologist* 21: 634-42

Kelly K, Crowley J, Bunn PA, Jr., Presant CA, Grevstad PK, et al. 2001. Randomized phase III trial of paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin in the treatment of patients with advanced non--small-cell lung cancer: a Southwest Oncology Group trial. *J Clin Oncol* 19: 3210-8

Kenter GG, Welters MJ, Valentijn AR, Lowik MJ, Berends-van der Meer DM, et al. 2008. Phase I immunotherapeutic trial with long peptides spanning the E6 and E7 sequences of high-risk human papillomavirus 16 in end-stage cervical cancer patients shows low toxicity and robust immunogenicity. *Clin Cancer Res* 14: 169-77

Kepp O, Senovilla L, Vitale I, Vacchelli E, Adjemian S, et al. 2014. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology* 3: e955691

Khong HT, Restifo NP. 2002. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 3: 999-1005

Khozin S, Blumenthal GM, Jiang X, He K, Boyd K, et al. 2014. U.S. Food and Drug Administration approval summary: Erlotinib for the first-line treatment of metastatic non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor exon 19 deletions or exon 21 (L858R) substitution mutations. *Oncologist* 19: 774-9

Kobayashi KS, van den Elsen PJ. 2012. NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. *Nat Rev Immunol* 12: 813-20

Kokhaei P, Choudhury A, Mahdian R, Lundin J, Moshfegh A, et al. 2004. Apoptotic tumor cells are superior to tumor cell lysate, and tumor cell RNA in induction of autologous T cell response in B-CLL. *Leukemia* 18: 1810-5

Kontani K, Taguchi O, Ozaki Y, Hanaoka J, Sawai S, et al. 2003. Dendritic cell vaccine immunotherapy of cancer targeting MUC1 mucin. *International Journal of Molecular Medicine* 12: 493-502

Korn A, Frey B, Sheriff A, Gaipl US, Franz S, et al. 2004. High hydrostatic pressure inactivated human tumour cells preserve their immunogenicity. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 50: 469-77
Kris MG, Natale RB, Herbst RS, Lynch TJ, Jr., Prager D, et al. 2003. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA* 290: 2149-58
Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. 2013. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol* 31: 51-72
Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. 2012. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 12: 860-75
Kumarakulasinghe NB, van Zanwijk N, Soo RA. 2015. Molecular targeted therapy in the treatment of advanced stage non-small cell lung cancer (NSCLC). *Respirology* 20: 370-8
Lammi MJ, Elo MA, Sironen RK, Karjalainen HM, Kaarniranta K, Helminen HJ. 2004. Hydrostatic pressure-induced changes in cellular protein synthesis. *Biorheology* 41: 309-13
Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, et al. 2013. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 499: 214-18
Lee AW, Truong T, Bickham K, Fonteneau JF, Larsson M, et al. 2002. A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine* 20 Suppl 4: A8-A22
Lee DH. 2017. Treatments for EGFR-mutant non-small cell lung cancer (NSCLC): The road to a success, paved with failures. *Pharmacol Ther* 174: 1-21
Lee JM, Lee MH, Garon E, Goldman JW, Salehi-Rad R, et al. 2017. Phase I Trial of Intratumoral Injection of CCL21 Gene-Modified Dendritic Cells in Lung Cancer Elicits Tumor-Specific Immune Responses and CD8(+) T-cell Infiltration. *Clin Cancer Res* 23: 4556-68
Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OU, Yang YW, Buchanan P. 2015. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta* 1856: 189-210
Limacher JM, Quoix E. 2012. TG4010: A therapeutic vaccine against MUC1 expressing tumors. *Oncoimmunology* 1: 791-92
linkos. https://www.linkos.cz/slovnicek/karcinom-plic-malobunecny-karcinom-plic-sclc-nemalobunecny-karcinom-plic-nsclc/.
Liu K, Nussenzweig MC. 2010. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev* 234: 45-54
Lortet-Tieulent J, Soerjomataram I, Ferlay J, Rutherford M, Weiderpass E, Bray F. 2014. International trends in lung cancer incidence by histological subtype: adenocarcinoma stabilizing in men but still increasing in women. *Lung Cancer* 84: 13-22
Malhotra J, Jabbour SK, Aisner J. 2017. Current state of immunotherapy for non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 6: 196-211
Mantegazza AR, Magalhaes JG, Amigorena S, Marks MS. 2013. Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. *Traffic* 14: 135-52
Martincorena I, Campbell PJ. 2015. Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science* 349: 1483-9
Martincorena I, Roshan A, Gerstung M, Ellis P, Van Loo P, et al. 2015. Tumor evolution. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. *Science* 348: 880-6
Martins I, Kepp O, Schlemmer F, Adjemian S, Tailler M, et al. 2011. Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress. *Oncogene* 30: 1147-58
Martins I, Wang Y, Michaud M, Ma Y, Sukkurwala AQ, et al. 2014. Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death. *Cell Death Differ* 21: 79-91
Masson P, Tonello C, Balny C. 2001. High-Pressure Biotechnology in Medicine and Pharmaceutical Science. *J Biomed Biotechnol* 1: 85-88
Mastelic-Gavillet B, Balint K, Boudousquie C, Gannon PO, Kandalaft LE. 2019. Personalized Dendritic Cell Vaccines-Recent Breakthroughs and Encouraging Clinical Results. *Front Immunol* 10: 766

Matzinger P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296: 301-5
McCarthy EF. 2006. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J* 26: 154-8
McGranahan N, Furness AJ, Rosenthal R, Ramskov S, Lyngaa R, et al. 2016. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science* 351: 1463-9
McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A. 2015. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* 15: 87-103
Melcher A, Todryk S, Hardwick N, Ford M, Jacobson M, Vile RG. 1998. Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression. *Nat Med* 4: 581-7
Mellman I. 2013. Dendritic cells: master regulators of the immune response. *Cancer Immunol Res* 1: 145-9
Mellman I, Steinman RM. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106: 255-8
Mellstedt H, Vansteenkiste J, Thatcher N. 2011. Vaccines for the treatment of non-small cell lung cancer: Investigational approaches and clinical experience. *Lung Cancer* 73: 11-17
Mendoza L. 2014. Dendritic cell vaccines against non-small cell lung cancer - an emerging therapeutic alternative. *Klin Onkol* 27: 294-8
Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Ma Y, et al. 2011. Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* 334: 1573-7
Mikyskova R, Stepanek I, Indrova M, Bieblova J, Simova J, et al. 2016. Dendritic cells pulsed with tumor cells killed by high hydrostatic pressure induce strong immune responses and display therapeutic effects both in murine TC-1 and TRAMP-C2 tumors when combined with docetaxel chemotherapy. *Int J Oncol* 48: 953-64
Milleron RS, Bratton SB. 2007. 'Heated' debates in apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 64: 2329-33
Molina JR, Yang PG, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. 2008. Non-small cell lung cancer: Epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clinic Proceedings* 83: 584-94
Morse MA, Clay TM, Hobeika AC, Osada T, Khan S, et al. 2005. Phase I study of immunization with dendritic cells modified with fowlpox encoding carcinoembryonic antigen and costimulatory molecules. *Clin Cancer Res* 11: 3017-24
Moserova I, Truxova I, Garg AD, Tomala J, Agostinis P, et al. 2017. Caspase-2 and oxidative stress underlie the immunogenic potential of high hydrostatic pressure-induced cancer cell death. *Oncoimmunology* 6: e1258505
Nace G, Evankovich J, Eid R, Tsung A. 2012. Dendritic cells and damage-associated molecular patterns: endogenous danger signals linking innate and adaptive immunity. *J Innate Immun* 4: 6-15
Nagata S, Tanaka M. 2017. Programmed cell death and the immune system. *Nat Rev Immunol* 17: 333-40
Neller MA, Lopez JA, Schmidt CW. 2008. Antigens for cancer immunotherapy. *Semin Immunol* 20: 286-95
Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, et al. 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4: 328-32
Nowak AK, Lake RA, Marzo AL, Scott B, Heath WR, et al. 2003. Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells. *J Immunol* 170: 4905-13
O'Neill DW, Bhardwaj N. 2005. Differentiation of peripheral blood monocytes into dendritic cells. *Curr Protoc Immunol* Chapter 22: Unit 22F 4
Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, et al. 2007. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 13: 54-61

Oliveres H, Caglevic C, Passiglia F, Taverna S, Smits E, Rolfo C. 2018. Vaccine and immune cell therapy in non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis* 10: S1602-S14

Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, Tesniere A, Bjorklund AC, et al. 2009. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J* 28: 578-90

Park K, Tan EH, O'Byrne K, Zhang L, Boyer M, et al. 2016. Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 17: 577-89

Perroud MW, Honma HN, Barbeiro AS, Gilli SCO, Almeida MT, et al. 2011. Mature autologous dendritic cell vaccines in advanced non-small cell lung cancer: a phase I pilot study. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 30

Pesch B, Kendzia B, Gustavsson P, Jockel KH, Johnen G, et al. 2012. Cigarette smoking and lung cancer--relative risk estimates for the major histological types from a pooled analysis of case-control studies. *Int J Cancer* 131: 1210-9

Petersen I, Warth A. 2016. Lung cancer: developments, concepts, and specific aspects of the new WHO classification. *J Cancer Res Clin Oncol* 142: 895-904

Peto J. 2012. That the effects of smoking should be measured in pack-years: misconceptions 4. *Br J Cancer* 107: 406-7

Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV, Douillard JY, Shepherd FA, et al. 2008. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol* 26: 3552-9

Pirker R. 2017. Milestones in the systemic treatment of lung cancer. *Memo* 10: 22-26

Popat S, Mok T, Yang JC, Wu YL, Lungershausen J, et al. 2014. Afatinib in the treatment of EGFR mutation-positive NSCLC--a network meta-analysis. *Lung Cancer* 85: 230-8

Quoix E, Lena H, Losonczy G, Forget F, Chouaid C, et al. 2016. TG4010 immunotherapy and first-line chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer (TIME): results from the phase 2b part of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b/3 trial. *Lancet Oncol* 17: 212-23

Ramalingam SS, Blackhall F, Krzakowski M, Barrios CH, Park K, et al. 2012. Randomized phase II study of dacomitinib (PF-00299804), an irreversible pan-human epidermal growth factor receptor inhibitor, versus erlotinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 30: 3337-44

Rastogi NK, Raghavarao KS, Balasubramaniam VM, Niranjan K, Knorr D. 2007. Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 47: 69-112

Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csoszi T, et al. 2016. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 375: 1823-33

Richert L, Or A, Shinitzky M. 1986. Promotion of tumor antigenicity in EL-4 leukemia cells by hydrostatic pressure. *Cancer Immunol Immunother* 22: 119-24

Rijavec E, Biello F, Genova C, Barletta G, Maggioni C, et al. 2015. Belagenpumatucel-L for the treatment of non-small cell lung cancer. *Expert Opin Biol Ther* 15: 1371-9

Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, et al. 2017. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 389: 255-65

Rivera GA, Wakelee H. 2016. Lung Cancer in Never Smokers. *Adv Exp Med Biol* 893: 43-57

Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, et al. 2015. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 348: 124-8

Rodriguez PC, Rodriguez G, Gonzalez G, Lage A. 2010. Clinical Development and Perspectives of CIMAvax EGF, Cuban Vaccine for Non-small-cell Lung Cancer Therapy. *MEDICC Rev.* 12: 17-23

Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, et al. 2012. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 13: 239-46

Roti Roti JL. 2008. Cellular responses to hyperthermia (40-46 degrees C): cell killing and molecular events. *Int J Hyperthermia* 24: 3-15
Saavedra D, Crombet T. 2017. CIMAvax-EGF: A New Therapeutic Vaccine for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Front Immunol* 8: 269
Sabado RL, Balan S, Bhardwaj N. 2017. Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Res* 27: 74-95
Saenz R, Futalan D, Leutenez L, Eekhout F, Fecteau JF, et al. 2014. TLR4-dependent activation of dendritic cells by an HMGB1-derived peptide adjuvant. *J Transl Med* 12: 211
Sallusto F, Lanzavecchia A. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179: 1109-18
Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, et al. 2006. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 355: 2542-50
Sandler A, Yi J, Dahlberg S, Kolb MM, Wang L, et al. 2010. Treatment outcomes by tumor histology in Eastern Cooperative Group Study E4599 of bevacizumab with paclitaxel/carboplatin for advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 5: 1416-23
Santos PM, Butterfield LH. 2018. Dendritic Cell-Based Cancer Vaccines. *J Immunol* 200: 443-49
Savill J, Fadok V. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407: 784-8
Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, Biesma B, Vansteenkiste J, et al. 2008. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 26: 3543-51
Segura E, Amigorena S. 2013. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol* 34: 440-5
Serrano-Del Valle A, Anel A, Naval J, Marzo I. 2019. Immunogenic Cell Death and Immunotherapy of Multiple Myeloma. *Front Cell Dev Biol* 7: 50
Shearer AE, Kniel KE. 2009. High hydrostatic pressure for development of vaccines. *J Food Prot* 72: 1500-8
Shi H, Cao T, Connolly JE, Monnet L, Bennett L, et al. 2006. Hyperthermia enhances CTL cross-priming. *J Immunol* 176: 2134-41
Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, et al. 2002. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 346: 92-8
Schiraldi M, Raucci A, Munoz LM, Livoti E, Celona B, et al. 2012. HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *J Exp Med* 209: 551-63
Schnurr M, Chen Q, Shin A, Chen W, Toy T, et al. 2005. Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery. *Blood* 105: 2465-72
Schroder M. 2008. Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell Mol Life Sci* 65: 862-94
Schumacher TN, Schreiber RD. 2015. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 348: 69-74
Siegel RL, Miller KD, Jemal A. 2016. Cancer Statistics, 2016. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians* 66: 7-30
Siegel RL, Miller KD, Jemal A. 2017. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 67: 7-30
Siegel RL, Miller KD, Jemal A. 2018. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 68: 7-30
Simon T, Fonteneau JF, Gregoire M. 2009. Dendritic cell preparation for immunotherapeutic interventions. *Immunotherapy* 1: 289-302
Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. 2010. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol* 28: 367-88
Sistigu A, Yamazaki T, Vacchelli E, Chaba K, Enot DP, et al. 2014. Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nat Med* 20: 1301-9
Skachkova OV, Khranovska NM, Gorbach OI, Svergun NM, Sydor RI, Nikulina VV. 2013. Immunological markers of anti-tumor dendritic cells vaccine efficiency in patients with non-small cell lung cancer. *Exp Oncol* 35: 109-13

Skřičková J, Babičková L, Špeldová J. 2009. Postavení chemoterapie v léčbě karcinomu plic. *Onkologie* 3: 285–91
Skřičková J, Babičková L, Tomíšková M, Kadlec B. 2011. Biologická léčba nemalobuněčného karcinomu plic. *Interní medicína pro praxi* 13: 292-95
Skřičková J, Kolek V, Pešek M, Melichar B, Petruželka L, et al. 2016. Mapování epidemiologické situace nemalobuněčného karcinomu plic a obraz léčebné péče v ČR s důrazem na léčbu neresekovatelného a metastatického stadia v letech 2007-2013. *Ekonomie ve zdravotnictví* 2: 24-32
Spisek R, Charalambous A, Mazumder A, Vesole DH, Jagannath S, Dhodapkar MV. 2007. Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications. *Blood* 109: 4839-45
Steinman RM, Cohn ZA. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137: 1142-62
Steinman RM, Witmer MD. 1978. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 5132-6
Sul J, Blumenthal GM, Jiang XP, He K, Keegan P, Pazdur R. 2016. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Patients With Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer Whose Tumors Express Programmed Death-Ligand 1. *Oncologist* 21: 643-50
Sutherland KD, Berns A. 2010. Cell of origin of lung cancer. *Mol Oncol* 4: 397-403
Takahashi H, Okamoto M, Shimodaira S, Tsujitani S, Nagaya M, et al. 2013. Impact of dendritic cell vaccines pulsed with Wilms' tumour-1 peptide antigen on the survival of patients with advanced non-small cell lung cancers. *European Journal of Cancer* 49: 852-59
Takahashi T, Mitsuhashi N, Sakurai H, Niibe H. 1995. Modifications of tumor-associated antigen expression on human lung cancer cells by hyperthermia and cytokine. *Anticancer Res* 15: 2601-6
Takeuchi O, Akira S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140: 805-20
Tandberg DJ, Tong BC, Ackerson BG, Kelsey CR. 2018. Surgery versus stereotactic body radiation therapy for stage I non-small cell lung cancer: A comprehensive review. *Cancer* 124: 667-78
Taylor R, Cumming R, Woodward A, Black M. 2001. Passive smoking and lung cancer: a cumulative meta-analysis. *Aust N Z J Public Health* 25: 203-11
Thatcher N, Chang A, Parikh P, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, et al. 2005. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet* 366: 1527-37
Thomas L. 1959. *In Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States*: 529-32
Thomas L. 1982. On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med* 55: 329-33
Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. 2015. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65: 87-108
Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, et al. 2015. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol* 10: 1243-60
Truxova I, Pokorna K, Kloudova K, Partlova S, Spisek R, Fucikova J. 2014. Day 3 Poly (I:C)-activated dendritic cells generated in CellGro for use in cancer immunotherapy trials are fully comparable to standard Day 5 DCs. *Immunol Lett* 160: 39-49
Tsoukalas N, Aravantinou-Fatorou E, Baxevanos P, Tolia M, Tsapakidis K, et al. 2018. Advanced small cell lung cancer (SCLC): new challenges and new expectations. *Ann. Transl. Med.* 6: 8
Ueda Y, Itoh T, Nukaya I, Kawashima I, Okugawa K, et al. 2004. Dendritic cell-based immunotherapy of cancer with carcinoembryonic antigen-derived, HLA-A24-restricted CTL epitope: Clinical outcomes of 18 patients with metastatic gastrointestinal or lung adenocarcinomas. *Int J Oncol* 24: 909-17

Um SJ, Choi YJ, Shin HJ, Son CH, Park YS, et al. 2010a. Phase I study of autologous dendritic cell tumor vaccine in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 70: 188-94
Um SJ, Choi YJ, Shin HJ, Son CH, Park YS, et al. 2010b. Phase I study of autologous dendritic cell tumor vaccine in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 70: 188-94
Urbonaviciute V, Furnrohr BG, Meister S, Munoz L, Heyder P, et al. 2008. Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J Exp Med* 205: 3007-18
Vacchelli E, Ma Y, Baracco EE, Zitvogel L, Kroemer G. 2016. Yet another pattern recognition receptor involved in the chemotherapy-induced anticancer immune response: Formyl peptide receptor-1. *Oncoimmunology* 5: e1118600
Vansteenkiste JF, Cho BC, Vanakesa T, De Pas T, Zielinski M, et al. 2016. Efficacy of the MAGE-A3 cancer immunotherapeutic as adjuvant therapy in patients with resected MAGE-A3-positive non-small-cell lung cancer (MAGRIT): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 17: 822-35
Vesely MD, Schreiber RD. 2013. Cancer immunoediting: antigens, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci* 1284: 1-5
Vineis P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, et al. 2004. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst* 96: 99-106
Vokes EE, Ready N, Felip E, Horn L, Burgio MA, et al. 2018. Nivolumab versus docetaxel in previously treated advanced non-small-cell lung cancer (CheckMate 017 and CheckMate 057): 3-year update and outcomes in patients with liver metastases. *Ann. Oncol.* 29: 959-65
Waisman A, Lukas D, Clausen BE, Yogev N. 2017. Dendritic cells as gatekeepers of tolerance. *Semin Immunopathol* 39: 153-63
Wakelee H, Kelly K, Edelman MJ. 2014. 50 Years of progress in the systemic therapy of non-small cell lung cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*: 177-89
Wang H, Zhang L, Shi Y, Javidiparsijani S, Wang G, et al. 2014. Abscopal antitumor immune effects of magnet-mediated hyperthermia at a high therapeutic temperature on Walker-256 carcinosarcomas in rats. *Oncol Lett* 7: 764-70
Waxman ES. 2008. Advances in chemotherapy for non-small cell lung cancer. *Semin Oncol Nurs* 24: 49-56
Weaver H, Coonar AS. 2017. Lung cancer: diagnosis, staging and treatment. *Surgery (Oxford)* 35: 247-54
Weinstock C, Khozin S, Suzman D, Zhang L, Tang S, et al. 2017. U.S. Food and Drug Administration Approval Summary: Atezolizumab for Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 23: 4534-39
Weiss EM, Frey B, Rodel F, Herrmann M, Schlucker E, et al. 2010a. Ex vivo- and in vivo-induced dead tumor cells as modulators of antitumor responses. *Ann N Y Acad Sci* 1209: 109-17
Weiss EM, Meister S, Janko C, Ebel N, Schlucker E, et al. 2010b. High hydrostatic pressure treatment generates inactivated mammalian tumor cells with immunogeneic features. *J Immunotoxicol* 7: 194-204
Weiss EM, Wunderlich R, Ebel N, Rubner Y, Schlucker E, et al. 2012. Selected anti-tumor vaccines merit a place in multimodal tumor therapies. *Front Oncol* 2: 132
Wheeler DL, Dunn EF, Harari PM. 2010. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol* 7: 493-507
Williams MA, Bevan MJ. 2007. Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* 25: 171-92
Winton T, Livingston R, Johnson D, Rigas J, Johnston M, et al. 2005. Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 352: 2589-97
Wu YL, Park K, Soo RA, Sun Y, Tyroller K, et al. 2011. INSPIRE: A phase III study of the BLP25 liposome vaccine (L-BLP25) in Asian patients with unresectable stage III non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 11: 430

Wynder EL, Hoffmann D. 1994. Smoking and lung cancer: scientific challenges and opportunities. *Cancer Res* 54: 5284-95

Yannelli JR, Sturgill J, Foody T, Hirschowitz E. 2005. The large scale generation of dendritic cells for the immunization of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 47: 337-50

Zappasodi R, Pupa SM, Ghedini GC, Bongarzone I, Magni M, et al. 2010. Improved clinical outcome in indolent B-cell lymphoma patients vaccinated with autologous tumor cells experiencing immunogenic death. *Cancer Res* 70: 9062-72

Zerbini A, Pilli M, Penna A, Pelosi G, Schianchi C, et al. 2006. Radiofrequency thermal ablation of hepatocellular carcinoma liver nodules can activate and enhance tumor-specific T-cell responses. *Cancer Res* 66: 1139-46

Zhang C, Leighl NB, Wu YL, Zhong WZ. 2019. Emerging therapies for non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol* 12: 45

Zhang Y, Huang S, Gong D, Qin Y, Shen Q. 2010. Programmed death-1 upregulation is correlated with dysfunction of tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes in human non-small cell lung cancer. *Cell Mol Immunol* 7: 389-95

Zhou J, Wang G, Chen Y, Wang H, Hua Y, Cai Z. 2019. Immunogenic cell death in cancer therapy: Present and emerging inducers. *J Cell Mol Med* 23: 4854-65

Zhou Y, Bosch ML, Salgaller ML. 2002. Current methods for loading dendritic cells with tumor antigen for the induction of antitumor immunity. *J Immunother* 25: 289-303

Zhou YF. 2011. High intensity focused ultrasound in clinical tumor ablation. *World J Clin Oncol* 2: 8-27

Zitvogel L, Kepp O, Senovilla L, Menger L, Chaput N, Kroemer G. 2010. Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: the calreticulin exposure pathway. *Clin Cancer Res* 16: 3100-4