

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO



**Respuesta inmune y efectos clínicos inducidos por la terapia
celular TAPCells en pacientes con cáncer de próstata resistente a
la castración**

DIEGO SERGIO A. REYES OSORIO

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS

DIRECTOR BÁSICO DE TESIS PROF. DR. FLAVIO SALAZAR ONFRAY
DIRECTOR CLÍNICO DE TESIS PROF. DR. CHRISTIAN HUIDOBRO A.

2013

ÍNDICE DE MATERIA

ÍNDICE DE MATERIA	1
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	5
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
Mortalidad por cáncer de próstata.....	8
Factores de riesgo.....	9
Diagnóstico y tratamiento del cáncer de próstata.....	10
Terapia de deprivación androgénica (TDA).....	11
Cáncer de Próstata Resistente a la Castración (CPRC).....	12
Quimioterapia en CPRC.....	13
Sistema Inmune y Cáncer.....	14
Células dendríticas (DCs) y su rol en la respuesta inmune.....	15
TAPCells: Células presentadoras de antígenos generadas <i>ex-vivo</i> para uso en inmunoterapia contra el cáncer.....	18
Efecto de TAPCells en pacientes con melanoma maligno avanzado.....	19
Cáncer de Próstata, un tumor inmunogénico.....	19
Inmunoterapia con DCs en Cáncer de Próstata: Estudios Clínicos.....	22
Sipuleucel-T, primera inmunoterapia celular contra el cáncer.....	24
Linfocitos T reguladores y su papel en la inmunoterapia antitumoral.....	25
HIPÓTESIS	27

OBJETIVOS.....	28
Objetivo General.....	28
Objetivos Específicos.....	28
METODOLOGÍA.....	31
Líneas celulares y generación de lisados tumorales.....	31
Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).....	32
Generación de TAPCells cargadas con lisado tumoral de próstata.....	32
Anticuerpos.....	33
Caracterización fenotípica de TAPCells.....	34
Estimulación de PBL utilizando TAPCells autólogas cargadas con lisado tumoral de próstata.....	34
ELISPOT para secreción de IFN- γ	35
Ensayo de citotoxicidad.....	36
Determinación de poblaciones linfocitarias productoras de IFN- γ	37
Pacientes.....	38
Producción de TAPCells autólogas cargadas con lisado tumoral de próstata para tratamiento.....	39
Protocolo de Inmunización y Test de Hipersensibilidad Retardada (DTH) contra lisado tumoral.....	39
Toxicidad y Calidad de Vida.....	40
Evaluación de respuesta clínica.....	41
Análisis de poblaciones de linfocitos reguladores.....	41
Análisis estadístico.....	42

RESULTADOS.....	43
La combinación de lisado tumoral de próstata, TRIMEL y TNF-α es capaz de inducir la maduración de monocitos a células presentadoras de antígenos.....	43
TAPCells cargadas con lisado tumoral de próstata son funcionales y capaces de inducir la proliferación de linfocitos productores de IFN-γ.....	46
Pacientes reclutados en estudio Fase I.....	50
TAPCells es un tratamiento seguro, con baja toxicidad y no afecta la calidad de vida de pacientes con CPRC.....	52
El tratamiento con TAPCells cargadas con lisado tumoral de próstata mantiene la calidad de vida de pacientes con CPRC.....	55
TAPCells es capaz de generar una respuesta inmune específica contra lisado tumoral de próstata.....	57
El tratamiento con TAPCells disminuye el nivel de PSA, aumentado el tiempo de duplicación del PSA.....	60
El tratamiento con TAPCells no provoca un aumento de subpoblaciones de linfocitos con propiedades reguladoras.....	63
DISCUSIÓN.....	69
REFERENCIAS.....	82
ANEXO 1. Acta de aprobación de Comité de Bioética.....	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Lisado tumoral de próstata, en combinación con TRIMEL y TNF-α, tiene la capacidad de inducir la diferenciación rápida de células presentadoras de antígeno (TAPCells) a partir de monocitos.....	45
Figura 2. TAPCells estimula la producción de IFN-γ en linfocitos T autólogos.....	47
Figura 3. Estimulación por TAPCells no aumenta la citotoxicidad mediada por PBL...	48
Figura 4. TAPCells induce la proliferación de LT productores de IFN-γ.....	49
Figura 5. Síntomas náuseas y vómitos aumentan durante el tratamiento, en pacientes usuarios de opioides.....	54
Figura 6. El tratamiento con TAPCells no afecta otros síntomas evaluados por el cuestionario EORTC QLQ-C30.....	55
Figura 7. TAPCells mantiene la calidad de vida global y los parámetros funcionales de pacientes con CPRC.....	56
Figura 8. Inmunoterapia con TAPCells genera una respuesta inmune específica contra lisado tumoral, medida como respuesta DTH.....	58
Figura 9. La mitad de los pacientes tratados muestra un aumento en la producción de IFN-γ en PBMC de sangre periférica.....	59
Figura 10. Inmunoterapia con TAPCells cargadas con lisado tumoral de próstata produce una disminución del PSA sérico en la mayoría de los pacientes.....	62
Figura 11. TAPCells con lisado tumoral de próstata mejora el PSADT en pacientes respondedores inmunológicos.....	62
Figura 12. Estimulación con LPS no aumenta la expresión de Foxp3.....	64
Figura 13. Criopreservación de PBMC no afecta la proporción de células CD4⁺ con fenotipo regulador.....	65
Figura 14. La población de LT reguladores se mantiene estable después del tratamiento con TAPCells.....	67
Figura 15. La población de LT reguladores CD8⁺ Foxp3⁺ se mantiene estable después del tratamiento con TAPCells.....	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los pacientes reclutados.....51

Tabla 2. Eventos adversos durante el tratamiento.....53

RESUMEN

El cáncer de próstata es una patología con una elevada mortalidad y carece de terapias clínicamente efectivas para casos avanzados. La experiencia y resultados clínicos adquiridos por nuestro grupo en el uso de células dendríticas para el tratamiento de melanoma maligno avanzado, nos incentivaron a desarrollar una terapia basada en células dendríticas cargadas con lisados tumorales para el tratamiento del cáncer de próstata resistente a la castración.

En esta tesis demostramos que la combinación de un lisado tumoral de próstata y el lisado tumoral estandarizado de melanoma maligno TRIMEL, es capaz de inducir la maduración y activación de células dendríticas de diferenciación rápida, denominadas TAPCells (*Tumor Antigen Presenting Cells*). De la misma forma, demostramos que TAPCells son capaces de inducir *in vitro* la activación de linfocitos T a un perfil Th1.

A continuación, desarrollamos un estudio clínico Fase I utilizando TAPCells cargadas con lisado tumoral de próstata para el tratamiento de cáncer de próstata resistente a la castración. Veinte pacientes reclutados en este estudio mostraron escasos eventos adversos atribuibles a la terapia, en su mayoría toxicidad grado 2 o menor, demostrando que el tratamiento con TAPCells es una terapia segura. De la misma forma, aunque no se observó un efecto positivo, el tratamiento con TAPCells no afectó la calidad de vida de los pacientes. Así mismo, demostramos que TAPCells es capaz de generar una respuesta inmune específica contra lisado tumoral de próstata en el 64% de los pacientes tratados. Además, observamos una respuesta bioquímica significativa, evaluada como descenso del antígeno prostático específico sérico (PSA), en un 42% de los pacientes tratados, y una mejoría en el tiempo de duplicación del PSA, factor pronóstico asociado a la evolución de la enfermedad. Por último, observamos que la terapia con TAPCells no afecta las poblaciones linfocitarias reguladoras en sangre periférica de los pacientes tratados.

En conjunto, nuestros resultados demuestran que el tratamiento con TAPCells constituye una terapia segura, no asociada a eventos adversos o a disminución de la calidad de vida de los pacientes, capaz de generar una respuesta inmune en la mayoría de ellos, y efectos clínicos positivos en un subgrupo de pacientes, con disminución o estabilización de los niveles de PSA sérico, sugiriendo que su aplicabilidad clínica debe ser evaluada en estudios clínicos prospectivos posteriores.

ABSTRACT

Prostate cancer is a major health problem and it lacks of effective therapies for advanced stages. The experience and clinical results of our group using dendritic cells for advanced melanoma treatment stimulated us to develop a dendritic cell-based therapy, loaded with prostate tumor lysate, for castration-resistant prostate cancer treatment.

In this thesis, we demonstrated that combination of prostate tumor lysate and standardized melanoma lysate TRIMEL is able to induce maturation and activation of fast differentiation dendritic cells, named TAPCells (*Tumor Antigen Presenting Cells*). Similarly, we demonstrated that TAPCells have the ability to induce the activation of peripheral T cell to a Th1 response pattern.

Next, we developed a Phase I clinical study using TAPCells loaded with prostate tumor lysate for the treatment of castration resistant prostate cancer. Twenty patients were recruited. Few adverse events related to treatment were observed, grade 2 or minor, showing that TAPCells is a safe therapy. Although TAPCells treatment did not show a positive effect, it did not affect quality of life of treated patients. Additionally, we demonstrated that TAPCells therapy generated a specific immune response against prostate tumor lysate in 64% of treated patients. Even more, we observed a significantly biochemical response, with a serum prostate specific antigen (PSA) decrease, in 42% of treated patients, together with an increase in PSA doubling time, a prognostic factor of progression. Finally, we observed that TAPCells treatment did not affect the proportions of peripheral subsets from regulatory T cells in treated patients.

Together, our results show that TAPCells treatment is a safe therapy, with few and minor adverse events and it does not decrease patient's quality of life levels. The treatment is able to induce a specific immune response in the majority of patients, and it produces a positive clinical response in a subgroup of patients, with a decrease or stabilization of serum PSA levels, suggesting that definitive clinical application of therapy should be evaluated in subsequent prospective clinical studies.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata es el tumor más frecuentemente diagnosticado en hombres en países industrializados, con una incidencia mundial de 61,7 casos por cada 100.000 habitantes¹. El año 2010, en Estados Unidos, alrededor de 217.000 nuevos casos de cáncer de próstata fueron diagnosticados; en hombres estadounidenses, el riesgo de padecer de cáncer de próstata durante la vida es de alrededor de un 15,9%². En la Comunidad Europea se estiman 338.000 casos anuales, correspondiendo al 24% de los tumores malignos en hombres en dicha comunidad³. China y países del lejano oriente, como Japón e India, cuentan con la menor incidencia a nivel mundial, alcanzando un riesgo 18 veces menor que Estados Unidos¹. En Chile las cifras de incidencia estimadas sugieren la existencia de 55-57 casos por cada 100.000 habitantes^{1,4}, siendo el cáncer más frecuente en nuestro país, tanto en hombres como en la población general¹. Entre 1985 y 2002, la incidencia mundial de cáncer de próstata aumentó un 1,1% anual; sin embargo, desde el año 2008 se estima que el número de casos diagnosticados aumenta anualmente entre un 3,2% y un 7%⁵, alcanzando los 15 millones de casos el año 2015¹.

Mortalidad por cáncer de próstata

La mortalidad por cáncer de próstata se estima en 7,5 muertes por cada 100.000 habitantes por año a nivel mundial¹. En Europa, corresponde a un 8,9% de las muertes por cáncer en hombres⁶. En Estados Unidos, posterior a la introducción del antígeno prostático específico (PSA) como examen para el diagnóstico precoz de cáncer de próstata, la mortalidad

disminuyó desde el año 1991, alcanzando 28.600 casos estimados⁷. Esta disminución en la mortalidad también se observó en países de la Comunidad Europea, principalmente por la disminución en los casos avanzados⁸. Sin embargo, el cáncer de próstata sigue siendo la segunda causa de muerte por cáncer en hombres en Norteamérica y Europa. En Chile, según las estadísticas del año 2009, el cáncer de próstata es también la segunda causa de muerte por cáncer en hombres⁹, y se espera que la mortalidad aumente un 30% en los próximos 10 años¹.

Factores de riesgo

Los principales factores de riesgo conocidos para desarrollar cáncer de próstata son edad, herencia y origen étnico. La edad es el principal factor: la mayor parte de los casos de cáncer de próstata se presentan en adultos mayores, siendo muy poco frecuentes en hombres menores de 50 años¹⁰. De esta misma manera, se ha descrito una mayor frecuencia de cáncer de próstata en mayores de 65 años en autopsias¹⁰. Existe un componente hereditario establecido en el cáncer de próstata, ya que hay un mayor riesgo de padecer cáncer de próstata para familiares de primer grado¹¹, así como también es mayor la probabilidad entre gemelos monocigóticos¹². El cáncer de próstata familiar, definido como la presencia de 3 o más familiares de primer grado con cáncer, o 2 de inicio precoz, se presenta en alrededor de un 10% de los casos. También existe un factor de riesgo ambiental no determinado, expresado en el aumento del riesgo de poblaciones de baja incidencia de cáncer de próstata, como asiáticos, al migrar a países occidentales, donde el riesgo es mayor, aunque nunca se igualan¹³. Se han estudiado otros factores ambientales como obesidad, hábito fumador, actividad sexual y

consumo de alcohol, aunque su efecto en la incidencia de cáncer de próstata no está del todo aclarado¹⁴.

Diagnóstico y tratamiento del cáncer de próstata

La mayoría de los casos de cáncer de próstata no presentan síntomas, y éstos aparecen más frecuentemente cuando el cáncer se encuentra en una etapa avanzada, debido al compromiso local extraprostático o por diseminación a distancia. Por esta razón, el diagnóstico se basa en la detección precoz en pacientes asintomáticos utilizando el antígeno prostático específico (PSA) sérico y el examen digital de la próstata a través del tacto rectal^{15,16}. Una elevación en el PSA o un tacto anormal son hallazgos sospechosos que obligan a descartar la presencia de un cáncer de próstata¹⁵⁻¹⁷. La confirmación se realiza mediante biopsia prostática transrectal ecodirigida¹⁸.

Cuando el cáncer de próstata se encuentra localizado, es decir, confinado a la glándula y sin extensión extracapsular ni diseminación a distancia, los tratamientos existentes, que incluyen la prostatectomía radical^{19,20}, radioterapia externa²¹ y la braquiterapia²², son curativos en un alto porcentaje de los pacientes. Sin embargo, hasta un 30% de los tratados como cáncer órgano-confinado pueden presentar recurrencia de la enfermedad²³, lo que probablemente se explica por una subetapificación previa al tratamiento.

Por otra parte, los pacientes con cáncer de próstata avanzado corresponden a aquellos en los cuales existe, al momento del diagnóstico, extensión tumoral extraprostática local, así como diseminación a distancia a linfonodos u otros tejidos, siendo el principal sitio de

metástasis el tejido óseo. En pacientes con enfermedad avanzada, así como aquellos que presentan recurrencia de la enfermedad después de tratados como cáncer órgano-confinado, la principal medida terapéutica es el uso de la terapia de deprivación androgénica (TDA)^{24,25}.

Terapia de deprivación androgénica (TDA)

En 1941, Huggins y Hodges describieron que la deprivación de andrógenos, mediante la castración o a través de la administración de estrógenos, producía una regresión del crecimiento tumoral en pacientes con cáncer de próstata²⁶. Las células del epitelio prostático son dependientes de la presencia de andrógenos para su función y proliferación²⁷. La testosterona producida en el parénquima testicular es el principal andrógeno circulante y estimula indirectamente al epitelio prostático al ser convertida en dihidrotestosterona (DTH) por la enzima 5- α -reductasa (5AR)²⁸. Al suprimir el estímulo androgénico, las células epiteliales prostáticas sufren apoptosis.

La TDA actualmente se realiza, principalmente, mediante dos estrategias: primero, removiendo el tejido productor de testosterona mediante la orquiectomía bilateral (castración quirúrgica). Ésta ha disminuido su indicación, por tratarse de una cirugía mutilante, y ante la existencia de productos farmacológicos igualmente efectivos²⁹. La segunda alternativa utilizada es el bloqueo de la producción de testosterona testicular inhibiendo, mediante retroalimentación negativa, el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (castración farmacológica). Se utilizan análogos sintéticos de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) que actúan sobre el receptor de LHRH. La estimulación crónica de estos receptores disminuye su

expresión e impide la secreción de hormona luteinizante hipofisiaria (LH), responsable de la producción de testosterona en las células de Leydig del parénquima testicular³⁰. Hoy en día, los agonistas LHRH son la forma de TDA más utilizada, y han mostrado resultados comparables a la orquiectomía en respuestas clínicas y sobrevida³¹.

La TDA, al alcanzar niveles de testosterona sérica inferiores a 50 ng/ml (niveles de castración farmacológica), tiene una efectividad de un 80 a 85% en el control de la enfermedad³². Sin embargo, no es una terapia curativa y su efecto tiene una mediana de duración de 14 a 30 meses³³. Ésto se debe al desarrollo, durante la progresión de la enfermedad, de células neoplásicas cuya proliferación es independiente del estímulo androgénico, por lo que prácticamente todos los pacientes se vuelven resistentes al tratamiento³⁴.

Cáncer de Próstata Resistente a la Castración (CPRC)

El cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC) comprende un grupo heterogéneo de pacientes con cáncer de próstata avanzado, que sometidos a TDA presentan una enfermedad progresiva, tanto progresión bioquímica (ascenso continuo de PSA) como progresión clínica (aumento o aparición de nuevas lesiones metastásicas)³⁵. Múltiples denominaciones se han utilizado para categorizar a estos pacientes, además de CPRC, como andrógeno-independiente, hormono-refractario u hormono-independiente, aunque sutiles diferencias existen entre los diferentes términos³⁶. El pronóstico de los pacientes con CPRC es

poco alentador, ya que presentan un empeoramiento ininterrumpido de la enfermedad, con una mediana de sobrevida general entre 12 y 24 meses³⁶.

Las opciones terapéuticas en el CPRC son limitadas, incluyen diferentes medidas hormonales y actúan como medidas de rescate. La adición de antiandrógenos (bloqueo androgénico combinado), bloqueo de la producción de andrógenos suprarrenales y el uso de dietilestilbestrol (DES) muestran respuestas bioquímicas en hasta un 65% de los pacientes, pero estos resultados no se han reflejado en un impacto en la sobrevida general³⁷. Por el momento, existe consenso en que debe mantenerse la TDA durante estudios clínicos.

Quimioterapia en CPRC

Históricamente, se ha considerado al cáncer de próstata como un tumor quimiorresistente, debido a la mala respuesta mostrada con las primeras drogas citotóxicas estudiadas³⁸. Sin embargo, el uso de quimioterapia utilizando taxanos, específicamente docetaxel, ha mostrado respuesta bioquímica en un 20-50% de los pacientes, con mejoría de la calidad de vida de éstos^{39,40}. Más aún, el tratamiento con docetaxel mostró por primera vez un aumento en 1,9 meses en la mediana de sobrevida general. Recientemente, cabazitaxel, un nuevo agente quimioterápico, mostró aumento de 2,4 meses en la sobrevida general como terapia de segunda línea⁴¹, dando un nuevo impulso al uso de quimioterapia en cáncer de próstata. Sin embargo, la frecuencia de efectos adversos graves, alcanzando toxicidades grado 3 o mayores en un 30% de los pacientes, restringen el uso de estas terapias a pacientes con buena

condición general, y cuestionan el real beneficio clínico. Por lo tanto, se requiere el desarrollo de nuevas terapias oncológicas con menor toxicidad y un mayor impacto clínico.

Sistema Inmune y Cáncer

Aunque los primeros tratamientos inmunológicos descritos contra el cáncer se remontan a los experimentos de William Coley, quien mediante la inoculación de toxinas bacterianas logró la remisión transitoria de sarcomas de partes blandas⁴², el concepto de la participación del sistema inmune en el control del cáncer nació con Elrich, quien sugirió la existencia de un mecanismo de supervisión y eliminación de células transformadas manejado por el sistema inmune⁴³. Posteriormente, en los años 50, basados en los experimentos de trasplante de tumores sólidos en ratones singénicos^{44,45}, Burnet y Thomas plantearon la teoría de la inmunovigilancia, cuyo concepto de eliminación de células transformadas es similar al planteado por Elrich. La mayor incidencia de cáncer en inmunosuprimidos favorece dicha observación. Sin embargo, como la evidencia no era categórica, durante 30 años la participación del sistema inmune en el control antitumoral fue controversial. En los años 80, con el descubrimiento de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs), su capacidad de eliminar células tumorales *in vitro*, la identificación de antígenos asociados a tumores (TAAs) a partir de TILs y la estimulación de linfocitos T de sangre periférica con células tumorales, se demostró la importancia del sistema inmune, y, específicamente, de los linfocitos T en la respuesta antitumoral^{46,47}. Así mismo, se han utilizado linfocitos T citotóxicos autólogos específicos contra antígenos tumorales en el tratamiento del melanoma maligno⁴⁸. Estos

hallazgos han fomentado la investigación en la utilización del sistema inmune como herramienta terapéutica contra el cáncer.

Células dendríticas (DCs) y su rol en la respuesta inmune

Las células dendríticas (DCs) son las principales células presentadoras de antígenos, jugando un rol central en la respuesta inmune adaptativa y en la tolerancia inmune⁴⁹. Se ubican principalmente en tejidos periféricos, donde capturan antígenos, migran a linfonodos regionales y presentan dichos antígenos a linfocitos T (LT) CD4⁺ y CD8⁺, asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)⁵⁰. Además, expresan importantes moléculas coestimuladoras, que en conjunto con la presentación antigénica son capaces de activar de manera específica a LT⁵¹, por lo que las DCs son consideradas el pivote de la respuesta inmune adaptativa.

Las DCs se originan a partir de células progenitoras de la médula ósea, aunque también ha sido descrita su diferenciación en la periferia a partir de monocitos de sangre periférica como consecuencia de señales pro-inflamatorias⁵⁰. Se distinguen dos subpoblaciones de DCs, en base a ubicación, diferencias fenotípicas y funcionales: las DCs plasmocitoides, una subpoblación que participa principalmente en la respuesta inmune innata contra virus y producen grandes cantidades de interferón (IFN)- α ⁵². El segundo grupo, las DCs mieloides o convencionales, se encuentran principalmente en piel y tejidos periféricos; presentan el marcador CD11c y baja expresión de CD123 (CD11c⁺ CD123^{lo})⁵³; además, secretan IL-12 al activarse su receptor CD40 en la sinapsis inmunológica con las moléculas CD40L, ligando

expresado en los linfocitos T activados. Las DCs mieloides, en general, son las más estudiadas en la respuesta inmune, y particularmente en el uso del sistema inmune como terapia oncológica⁵⁴.

En tejidos periféricos las DCs presentan características que las definen como inmaduras (iDCs), que incluyen una gran capacidad fagocítica, lo que les otorga la función principal de capturar antígenos, así como la expresión de receptores de quimioquinas como CCR1, CCR5 y CCR6, que determinan el *homing* de iDCs hacia tejidos periféricos⁵⁵. Al detectar la presencia de un patógeno o una célula anormal, las DCs capturan antígenos e inician un proceso de maduración y activación: desarrollan prolongaciones citoplasmáticas, disminuyen su capacidad fagocítica, pierden marcadores de iDCs y expresan nuevos marcadores, principalmente moléculas que participan en la sinapsis inmunológica, como las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86 y el marcador de activación CD83^{56,57}; aumenta la expresión moléculas de MHC clase I y II⁵⁸ y CCR7, receptor de las CCL19 y CCL21 responsables la migración de las DCs hacia los órganos linfoides secundarios⁵⁹. Al mismo tiempo, durante su maduración, las DCs procesan y presentan los antígenos adquiridos en moléculas MHC clase I y II. Los antígenos fagocitados desde el compartimiento extracelular, son presentados en el contexto de MHC clase II, donde pueden ser reconocidos por LT CD4⁺⁶⁰. Los péptidos antigénicos derivados de proteínas intracelulares son presentados en el contexto de moléculas MHC clase I⁶¹. Estos complejos péptido-MHC clase I son reconocidos por los LT CD8⁺⁴⁹, los cuales se activan convirtiéndose así en células citotóxicas (CTL), con la capacidad de reconocer y eliminar células blanco. Existe, además, una vía de presentación antigénica denominada vía de presentación cruzada, mediante la cual antígenos

exógenos internalizados por las DCs son presentados a LT CD8⁺ asociados a moléculas MHC clase I⁶². Esta vía es fundamental para activar LT CD8⁺ contra antígenos tumorales^{63,64}.

En una respuesta inmune contra patógenos, la maduración de las DCs se inicia cuando las iDCs reconocen, mediante receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PPRs), patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) expresados por los microorganismos⁶⁵. Los PPRs comprenden principalmente receptores tipo Toll (TLR), receptores “NOD-like” y receptores de lectina tipo C. Adicionalmente, se ha descrito que citoquinas proinflamatorias como IFN tipos I y II, TNF- α , GM-CSF e IL-1 β serían capaces de inducir la maduración de iDCs⁶⁶. Recientemente se ha reportado que la presencia de moléculas liberadas por células sometidas a condiciones de estrés o a muerte celular por necrosis, son capaces de ser reconocidas y activar a PPRs de DCs, induciendo su maduración. Estas moléculas son conocidas como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), entre las que se encuentran proteínas de shock térmico (HSP), HMGB1, calreticulina (CRT) y S100⁶⁷⁻⁷⁰.

Debido a su capacidad de generar una respuesta inmune adaptativa, activando LT CD8⁺ y originando CTL específicos, el uso de inmunoterapia antitumoral basada en DCs es una de las estrategias para el tratamiento del cáncer más estudiadas. La capacidad de generar DCs *ex vivo* y cargarlas con antígenos tumorales ha demostrado ser un tratamiento seguro y capaz de generar una respuesta inmune en una variada gama de tumores, como melanoma, cáncer renal y linfoma⁷¹⁻⁷³.

TAPCells: Células presentadoras de antígenos generadas *ex-vivo* para uso en inmunoterapia contra el cáncer

Las DCs corresponden a menos del 1% de las células mononucleares presentes en la circulación sanguínea, por lo que su obtención a partir de sangre periférica es compleja⁷⁴. Sin embargo, ha sido descrita la capacidad de generar, *ex vivo*, grandes cantidades de DCs a partir de monocitos obtenidos de sangre periférica⁷⁵. El protocolo de generación contempla la diferenciación de iDCs al estimular monocitos con GM-CSF e IL-4. Estas iDCs pueden ser cargadas con antígenos tumorales y diferenciarse a mDCs al ser incubadas con estímulos de maduración como TNF- α o LPS. La duración total del proceso es de 7 días.

En nuestro laboratorio se ha desarrollado un protocolo de corta duración para la generación *ex vivo* de DCs, utilizando un lisado celular de melanoma llamado TRIMEL⁷⁶. Estas DCs de diferenciación rápida, denominadas TAPCells, son fenotípica y funcionalmente similares a DCs generadas durante 7 días, pueden ser cargadas con lisados celulares de diferentes tumores y generar respuestas inmunológicas *in vitro* e *in vivo*⁷⁶. En este caso, el lisado tumoral, además del aporte de antígenos, ha mostrado participar en la maduración y activación de estas células, debido a que TRIMEL expresa DAMPs, aumentando la inmunogenicidad de estas DCs⁷⁶. Se ha descrito que células tumorales sometidas a condiciones de estrés son capaces de expresar altos niveles de DAMPs como CRT y HMGB1, a diferencia de células no neoplásicas⁷⁶. En efecto, líneas celulares de melanoma sometidas a un shock térmico presentan la movilización de CRT a la membrana citoplasmática y la secreción de HMGB1 soluble; ambas proteínas son capaces de interactuar con TLRs, especialmente TLR4, y mediar la maduración y activación de DCs^{76,77}. Esta activación de

DCs optimiza la presentación cruzada de antígenos tumorales y aumenta el reconocimiento por linfocitos T CD8⁺ ^{76,77}. De esta forma, el uso de lisados tumorales puede actuar como un factor adicional que disminuye la probabilidad de tolerancia contra antígenos tumorales.

Efecto de TAPCells en pacientes con melanoma maligno avanzado

En dos estudios Fase II realizados en nuestro laboratorio, utilizando DCs cargadas con el lisado tumoral de melanoma TRIMEL, se demostró un 60% de respuesta inmune contra TRIMEL, medida como respuesta de hipersensibilidad retardada contra TRIMEL (DTH⁺), en pacientes portadores de melanoma maligno estadio IV, así como un 85% de reacción de DTH⁺ en un pequeño grupo de pacientes etapa III^{76,78}. La presencia de esta respuesta inmune positiva se correlaciona con un aumento en la sobrevida general, en comparación con los pacientes DTH⁻ y con la sobrevida histórica de los pacientes con melanoma avanzado. Así mismo, se observó que los pacientes con respuesta DTH⁺ presentan una disminución de la proporción de linfocitos reguladores de sangre periférica al completar la inmunoterapia, principalmente la población Tr3 productora de TGF- β , a diferencia de los pacientes no respondedores (DTH⁻), en quienes los linfocitos T reguladores aumentan, sugiriendo un rol de esta población linfocitaria en la respuesta inmune antitumoral generada por la inmunoterapia con DCs⁷⁸.

Cáncer de Próstata, un tumor inmunogénico

La inmunoterapia antitumoral utilizando DCs está basada en la existencia de moléculas blanco tumor-específicas o tejido-específicas, conocidas como antígenos asociados a tumor (TAAs), la cuales pueden ser procesadas por las DCs y ser presentadas a linfocitos T

citotóxicos, generando una respuesta inmune específica⁷⁹. La presencia de estos TAAs califica a un tipo de tumor como inmunogénico. En cáncer de próstata han sido descritos múltiples TAAs, tanto antígenos tejido-específicos y oncoproteínas, lo que indica que el cáncer de próstata es un tumor inmunogénico.

El antígeno prostático específico (PSA) fue identificado como una proteína de secreción prostática^{80,81}. Es un TAA tejido específico, o antígeno de diferenciación, utilizado actualmente como método de diagnóstico precoz y seguimiento⁸². La expresión del PSA se observa en todas las etapas de la enfermedad, y en tumores tanto dependientes como independientes de andrógenos. La fosfatasa ácida prostática (PAP) es también una proteína de secreción tejido específica⁸³ que se encuentra sobre expresada en células neoplásicas prostáticas en todas las etapas de la enfermedad. Utilizando péptidos derivados de PSA y PAP, se ha logrado generar, *in vitro*, CTL específicos para ambos antígenos^{84,85}.

Otros antígenos de diferenciación descritos en cáncer de próstata son el antígeno prostático específico de membrana (PSMA), el antígeno de células progenitoras prostáticas (PSCA), prostetina y Trp-p8. Corresponden proteínas expresadas en la membrana de células epiteliales prostáticas normales y tumorales⁸⁶⁻⁸⁹. También se ha observado que existe un nivel basal de HER-2/neu, tanto en células del epitelio prostático normal como en el tejido tumoral; se ha asociado la sobre-expresión de HER-2/neu a tumores avanzados hormono-resistentes^{90,91}.

Antígenos epiteliales relacionados a cáncer pertenecientes a la familia de antígenos de cáncer testicular MAGE/GAGE han sido identificados en carcinoma de próstata.

Específicamente, genes PAGE-1, PAGE-4 y GAGE-7⁹², pero su aplicación clínica en pacientes con carcinoma de próstata todavía no es clara.

La fuente de antígenos en inmunoterapia utilizando DCs es otro punto crucial. Existen diversas formas de entregar antígenos: se pueden utilizar péptidos sintéticos que corresponden a epítopes de TAAs⁹³. La limitante de esta estrategia es que puede generar fácilmente escape tumoral por pérdida del o los epítopes en las células neoplásicas. Otra alternativa consiste en cargar las DCs con proteínas que correspondan a TAAs⁹⁴. De esta manera, el procesamiento y presentación del antígeno es realizado por las DCs, aumentando el número de epítopes de un mismo antígeno que pueden presentarse en moléculas MHC. Para aumentar la variabilidad antigénica se pueden utilizar lisados tumorales, lo que permitiría generar una respuesta contra múltiples blancos presentes en las células tumorales⁹⁵. También puede utilizarse mRNA que codifica específicamente para un antígeno tumoral o mRNA purificado a partir de células tumorales; los mRNA son traducidos a proteínas en la DC y luego procesado y presentados en éstas⁹⁶.

En un intento de comparar la eficacia de vacunaciones con péptidos antigénicos definidos contra DCs cargadas con células tumorales (mayormente lisados), Neller y colaboradores examinaron las respuestas clínicas en 173 ensayos publicados, en los cuales se trataron pacientes con diversos tipos de cáncer⁹⁷. Se observó que 138 de 1711 pacientes (8,1%) tuvieron respuestas clínicas objetivas cuando se utilizaron como fuente de antígenos células tumorales completas o lisados tumorales, comparado con 63 de 1733 pacientes (3,6%) cuando se utilizaron antígenos molecularmente definidos (péptidos sintéticos o proteínas)⁹⁷. Utilizando el mismo criterio, los autores evaluaron 1601 pacientes portadores de melanoma

etapa IV enrolados en 75 estudios clínicos; encontraron respuestas clínicas objetivas en el 12,6% (107/845) de los pacientes tratados con DCs cargadas con lisados tumorales y sólo en el 6% (41/608) cuando se utilizaron antígenos definidos ($p < 0,001$)⁹⁷. Estos estudios permiten plantear la ventaja de utilizar fuentes de antígenos más complejas.

Inmunoterapia con DCs en Cáncer de Próstata: Estudios Clínicos

DCs cargadas con péptidos

El primer estudio clínico realizado en cáncer de próstata utilizando DCs fue publicado por Murphy en 1996⁹⁸. Se incluyeron en este protocolo 51 pacientes HLA-A2⁺ portadores de CPRC, los que fueron inmunizados por vía endovenosa (*ev*) con DCs cargadas con péptidos derivados de PSMA. Todos los pacientes tuvieron respuesta inmune demostrada *in vitro* y 7 pacientes presentaron un reducción de al menos un 50% en los niveles séricos de PSA al completar el tratamiento. Este estudio se continuó con un ensayo Fase II en 33 pacientes con CPRC. 6 pacientes mostraron un descenso del PSA de un 50% y 2 pacientes tuvieron normalización del PSA. Casi todos los pacientes presentaron una respuesta inmune *in vitro* hasta 200 días después de la inmunización⁹⁹.

Perambakam *et al.*¹⁰⁰ inmunizaron por vía *ev* a 14 pacientes con cáncer de próstata hormono-sensible utilizando DCs cargadas con un péptido derivado de PSA. Cinco pacientes presentaron reacción de hipersensibilidad retardada (DTH⁺) a la inyección subcutánea (*sc*) del péptido, al término del protocolo de inmunización.

Thomas-Kaskel publicó un estudio Fase I utilizando mDCs cargadas con péptidos derivados de PSCA y PSA¹⁰¹. En este estudio, 10 pacientes fueron inmunizados por vía *sc*, 5 pacientes presentaron DTH⁺, y este grupo tuvo una mayor sobrevida que el grupo DTH⁻.

En un ensayo clínico Fase I, 8 pacientes con CPRC fueron inmunizados, por vía *sc*, con mDCs cargadas con péptidos derivados de PSA, PSMA, prostateína, survivina y Trp-p8, mostrando todos los pacientes respuesta inmunológica *in vitro*¹⁰².

DCs transfectadas con mRNA

Esta estrategia busca que el aporte de mRNA que codifica para TAAs sea traducido a proteínas por la maquinaria ribosomal de las DCs, para luego procesar y presentar dichas proteínas en moléculas MHC. Se ha utilizado mRNA que codifica para PSA⁹⁶, mRNA que codifica para telomerasa (hTERT) ligado a mRNA de la proteína de localización lisosomal LAMP-1¹⁰³, y mRNA purificado a partir de 3 líneas tumorales de cáncer de próstata¹⁰⁴. Los estudios mostraron que esta estrategia terapéutica es factible de ser aplicada, y capaz de generar respuesta inmune contra tumor *in vitro*. Sin embargo, en ningún estudio se observaron respuestas clínicas significativas.

DCs cargadas con lisado tumoral

En el uso de lisados tumorales como aporte de antígenos se busca aumentar la diversidad de TAAs. En cáncer de próstata se ha publicado sólo un trabajo utilizando DCs cargadas con lisado tumoral. Pandha *et al.*¹⁰⁵ inmunizaron a 16 pacientes con CPRC por vía *sc*, utilizando iDCs cargadas con un lisado de 2 líneas tumorales de próstata (DU145 y LnCap). Nueve de 16 pacientes presentaron una respuesta DTH⁺ contra lisado tumoral, un paciente

mostró reducción del PSA y ningún paciente refirió eventos adversos asociados a la terapia¹⁰⁵. Sin embargo, el principal problema de este estudio es que se utilizaron iDCs. Como fue mencionado previamente, los lisados tumorales, además de la variabilidad de TAAs, pueden aportar moléculas o señales de peligro (DAMPs) que aumenten la inmunogenicidad de las DCs, con el fin de disminuir la probabilidad de una respuesta inmune tolerogénica. En este sentido, el uso de TRIMEL, lisado tumoral condicionado que expresa DAMPs, en combinación con lisado tumoral de próstata, es una estrategia que busca garantizar tanto el aporte de antígenos a las DCs como una adecuada activación y maduración de éstas.

Sipuleucel-T, primera inmunoterapia celular contra el cáncer

Recientemente, Sipuleucel-T (Provenge), que corresponde a DCs cargadas con la proteína de fusión PA2024, formada por GM-CSF unida a PAP, mostró en un estudio Fase III aleatorizado, controlado con placebo, un aumento de la mediana de sobrevida general de 4,1 meses en pacientes con CPRC, sin mostrar una mayor toxicidad que placebo, siendo un tratamiento bien tolerado¹⁰⁶. Esta mayor sobrevida general no se vio reflejada en respuestas clínicas evaluables ni en una mayor sobrevida libre de progresión. La principal debilidad de Sipuleucel-T es que está dirigido contra un único antígeno, PAP, por lo que aumenta el riesgo de escape tumoral¹⁰⁷. Sin embargo, la menor mortalidad observada, acompañada de escasos eventos adversos graves, convirtieron a Sipuleucel-T en la primera inmunoterapia celular aprobada por la FDA (*Food and Drugs Administration*) en el tratamiento del cáncer¹⁰⁸. Estos

resultados demuestran el potencial impacto clínico del uso del sistema inmune en el tratamiento contra el cáncer.

Linfocitos T reguladores y su papel en la inmunoterapia antitumoral

Los linfocitos T reguladores (Treg) fueron descritos como una subpoblación de linfocitos T CD4⁺ originados en el timo, con propiedades supresoras sobre células efectoras del sistema inmune, y que se caracterizan principalmente por la expresión del factor de transcripción Foxp3^{109,110}. Los Treg son fundamentales en la tolerancia y prevención de la autoinmunidad. Mediante esta capacidad de suprimir la respuesta inmune contra autoantígenos pueden actuar como mecanismo de escape tumoral, impidiendo la respuesta inmune contra TAAs^{111,112}. En modelos murinos, la depleción de Treg aumenta el rechazo de tumores transplantables¹¹². Así mismo, se ha descrito una mayor proporción de Treg infiltrantes en tumores como ovario y pulmón de células no pequeñas¹¹³, mama y páncreas¹¹⁴, en linfonodos metastásicos de melanoma¹¹⁵, y en sangre periférica de pacientes portadores de cáncer pulmonar de células no pequeñas¹¹⁶, hepatocarcinoma¹¹⁷ y cáncer de próstata¹¹⁸. También se ha demostrado, en cáncer de ovario, que la mayor infiltración de Treg en el tejido tumoral es un factor pronóstico negativo de evolución de enfermedad¹¹⁹.

Existen otras poblaciones de linfocitos ubicados en la periferia, con capacidad adquirida de suprimir la respuesta inmune, principalmente a través de la secreción de citoquinas. Los LT reguladores tipo 1 (Tr1) son células capaces de secretar altas cantidades de IL-10 cuando son estimulados *in vitro* con dexametasona y vitamina D3¹²⁰. Otra población de

linfocitos T reguladores lo constituyen las células Th3 que producen grandes cantidades de TGF- β ¹²¹. Además, en los últimos años se han descrito subpoblaciones de LT CD8⁺ con características reguladoras, que en algunos casos expresan Foxp3, así como también producen tanto IL-10 como TGF- β ¹²².

La existencia de estas poblaciones de linfocitos T reguladores puede explicar la inhibición de la respuesta inmune antitumoral, favoreciendo el escape tumoral y disminuyendo la respuesta de las inmunoterapias¹²³.

Los antecedentes expuestos más arriba, en relación a la capacidad de generar células presentadoras de antígenos para uso en inmunoterapia del cáncer, y que el cáncer de próstata es un tumor inmunogénico, sugieren la factibilidad de desarrollar un protocolo de inmunoterapia utilizando DCs autólogas para ser aplicado en pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración, en un estudio clínico Fase I. Estos estudios deben contemplar también el efecto que las inmunizaciones puedan tener en la respuesta inmune, especialmente poblaciones de células reguladoras y en la calidad de vida de los pacientes tratados.

HIPÓTESIS

A pesar del avance en el diagnóstico precoz, el cáncer de próstata sigue siendo una de las principales causas de muerte por cáncer en Chile y en países desarrollados, debido principalmente a la ausencia de terapias efectivas en etapas avanzadas de la enfermedad. Asimismo, producto de la experiencia adquirida en nuestro grupo en el tratamiento de melanoma maligno metastásico con inmunoterapia basada en DCs, se demuestra que esta estrategia terapéutica contra el cáncer puede producir no sólo una respuesta inmunológica, sino que se puede generar resultados clínicos importantes. Basado en estos antecedentes postulamos que:

Hipótesis 1

El uso de TAPCells generadas ex vivo y cargadas con una mezcla de lisado tumoral de cáncer de próstata y TRIMEL, en pacientes portadores de CPRC, constituye una terapia segura y capaz de generar una respuesta inmune específica contra cáncer de próstata, lo que se reflejará en una reacción DTH detectable contra antígenos tumorales prostáticos y una baja en los niveles de antígeno prostático (PSA), asociada a una buena calidad de vida.

Hipótesis 2

Una respuesta inmune efectiva de los pacientes al tratamiento está limitada por un aumento en las subpoblaciones de linfocitos T reguladores, especialmente linfocitos productores de TGF- β .

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la respuesta inmunológica, seguridad y respuesta clínica de un protocolo Fase I de inmunoterapia basado en el uso de DCs autólogas producidas *ex vivo* (TAPCells), cargadas con un lisado de líneas celulares de cáncer de próstata, en el tratamiento de pacientes portadores de cáncer de próstata resistente a la castración, con el fin de mejorar la supervivencia de estos pacientes y contribuir a la comprensión de las bases celulares de la respuesta inmune antitumoral.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Generar TAPCells *ex vivo*, obtenidas a partir de células mononucleares de sangre periférica, cargadas con un compuesto antigénico de lisado tumoral de cáncer de próstata y TRIMEL.

1.a.- Evaluar la activación de las TAPCells utilizando diversas proporciones de lisado tumoral de próstata y TRIMEL, a partir de donantes sanos.

1.b.- Producir TAPCells para tratamiento en pacientes con CPRC.

2.- Caracterizar fenotípica y funcionalmente a las TAPCells.

2.a.- Analizar la expresión de moléculas MHC, moléculas coestimuladoras y marcador de activación.

2.b.- Determinar la producción de IFN- γ en LT estimulados con TAPCells cargadas con lisado tumoral de próstata.

2.c.- Determinar la capacidad citotóxica de LT estimulados con TAPCells cargadas con lisado tumoral de próstata.

3.- Determinar la respuesta inmunológica generada por inmunoterapia con TAPCells en pacientes con CPRC.

3.a.- Medir la respuesta inmunológica *in vivo* mediante test de hipersensibilidad retardada (DTH) contra lisado tumoral.

3.b.- Analizar respuesta inmunológica *in vitro* mediante ELISPOT para producción de IFN- γ .

4.- Evaluar la toxicidad y calidad de vida de los pacientes tratados.

4.a.- Analizar la seguridad y toxicidad del tratamiento utilizando el NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v.3.0.

4.b.- Estimar el impacto en la calidad de vida mediante el cuestionario EORTC QLQ-C30.

5.- Determinar la respuesta clínica generada por la inmunoterapia con TAPCells en pacientes con CPRC.

5.a.- Determinar el PSA sérico mensual y cálculo de tiempo de duplicación del PSA (PSADT).

5.b.- Medir la respuesta clínica utilizando criterios RECIST.

6.- Analizar las subpoblaciones de linfocitos T reguladores en sangre periférica de pacientes sometidos a inmunoterapia.

6.a.- Determinar las subpoblaciones de linfocitos T reguladores naturales (Treg), Tr1 y Th3.

6.b.- Determinar la subpoblación de linfocitos T reguladores CD8⁺ Foxp3⁺.

METODOLOGÍA

Líneas celulares y generación de lisados tumorales

Las líneas celulares de cáncer de próstata DU-145, PC-3 y LnCap fueron obtenidas a partir de lesiones metastásicas (ATCC). La línea SW480 corresponde a una línea de cáncer de colon obtenida a partir de una lesión metastásica (ATCC). Las líneas Mel1, Mel2 y Mel3 fueron establecidas en el Laboratorio de Inmunología Antitumoral de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, a partir de lesiones metastásicas de melanoma maligno. Todas las líneas fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (Gibco), 1% de L-glutamina (Gibco) y 1% de Penicilina-Estreptomicina (Gibco).

Para la generación de lisado tumoral de próstata, las células de cada una de las líneas de cáncer de próstata descritas son recolectadas y resuspendidas en medio AIM-V (Gibco) en igual proporción; luego fueron sometidas a shock térmico, incubándolas por una hora a 42°C y luego dos horas a 37°C. Posteriormente, son lisadas mediante congelación en nitrógeno líquido y descongelación a 37°C por tres veces. Finalmente, el lisado generado es irradiado a 60Gy, para luego ser almacenado a -80°C. El lisado tumoral de melanoma TRIMEL se produce de la misma manera, utilizando las líneas celulares de melanoma. Todas las líneas derivadas de tumores generadas en nuestro laboratorio cuentan con los consentimientos informados correspondientes de los pacientes donantes.

Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Tanto a pacientes como a voluntarios sanos, se extrajeron 40 ml sangre periférica por punción venosa, recolectada en tubos heparinizados (BD vacutainer®, BD Franklin Lakes) para evitar la coagulación. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), fueron separadas por medio de gradiente de densidad utilizando Ficoll- Hypaque ($\delta= 1,077$ g/ml) (Axis-Shield). Brevemente, 10 ml de sangre fue diluida en la razón 1:1 con PBS 10 mM frío (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄). Luego, se agregó 10 ml de Ficoll - Hypaque y centrifugadas 20 minutos a 1200 rpm. Las células mononucleares fueron obtenidas entre la interfase Ficoll - plasma y lavadas dos veces con PBS frío. La viabilidad celular fue comprobada mediante azul de tripán y luego fueron centrifugadas nuevamente a 1200 rpm por cinco minutos, desechando el sobrenadante. En el caso de los voluntarios sanos, las células fueron utilizadas inmediatamente. En el caso de los pacientes, las células del pellet fueron resuspendidas en medio de congelación compuesto de Dimetilsulfóxido (DMSO) 10% y Suero Fetal Bovino (SFB) 90%, y criopreservadas en criotubos de 1,5 ml, en nitrógeno líquido a -195°C. Tanto voluntarios como pacientes firmaron un documento de consentimiento informado previo a la obtención de las muestras sanguíneas.

Generación de TAPCells cargadas con lisado tumoral de próstata

Diez millones de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos (n=3), fueron incubadas durante 2 horas en medio AIM-V (Gibco) a 37°C y en un ambiente con 5%CO₂, descartándose las células no adherentes. Las células adherentes fueron

incubadas por 22 horas en medio AIM-V suplementado con IL-4 recombinante humana (rhIL-4, 500 U/ml, US Biological) y GM-CSF (800 U/ml, Shering Plough). Luego se adicionó al cultivo por 24 horas más TNF- α (20 U/ml), TNF- α (20 U/ml) + TRIMEL (100 mg/ml) (TAPCells), TNF- α (20 U/ml) + lisado de próstata (100 mg/ml), TNF- α (20 U/ml) + lisado de próstata (90 mg/ml) + TRIMEL (10 mg/ml), o TNF- α (20U/ml) + lisado de próstata (80 mg/ml) + TRIMEL (20 mg/ml). Los monocitos activados (AM) correspondieron a células mantenidas en cultivo por 24 horas más, sin adicionar lisado tumoral ni TNF- α .

Anticuerpos

Para la caracterización fenotípica de TAPCells, se utilizaron los anticuerpos monoclonales anti-CD11c-PE, anti-HLA-ABC-FITC, anti-HLA-DRDQDP-FITC, anti-CD80-FITC, anti-CD83-FITC (eBioscience) y anti-CD86-FITC (BD PharMingen).

Para la determinación de linfocitos productores de IFN- γ se utilizaron los anticuerpos monoclonales anti-CD8-FITC, anti-CD4-FITC y anti-IFN- γ -PE (eBioscience).

Para el análisis de poblaciones linfocitarias reguladoras, se utilizaron los anticuerpos anti-CD8-FITC, anti-CD4-FITC, anti-Foxp3-PE, anti-IL-10-Alexa Fluor 647 (eBioscience) y Anti-LAP (TGF- β 1)-PerCP (R&D Systems).

Caracterización fenotípica de TAPCells

Monocitos Activados (AM), TAPCells cargadas con TRIMEL y TAPCells generadas con distintas proporciones de lisado tumoral de próstata y TRIMEL (como fue descrito previamente), fueron incubadas con anticuerpos anti-CD11c, anti-HLA-ABC, anti-HLA-DPDQDR, anti-CD80, anti-CD83, anti-CD86 por 30 minutos a 4°C y en oscuridad, y luego fijadas en paraformaldehído (PFA) 1x. Posteriormente, las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo utilizando un equipo FACSCalibur (BD Biosciences) y el software WinMDI 2.8. Todos los análisis se realizaron sobre la población de células CD11c⁺ para cada condición y muestra.

Estimulación de PBL utilizando TAPCells autólogas cargadas con lisado tumoral de próstata

Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos HLA-A2⁺ (n=3), fueron incubadas durante 2 horas en medio AIM-V (Gibco) a 37°C y en un ambiente con 5%CO₂. Se recolectaron las células no adherentes, que corresponden a linfocitos de sangre periférica (PBL). 25 x 10⁶ PBL fueron incubados con TAPCells autólogas generadas con TNF- α (20 UI/ml) + lisado de próstata (80 mg/ml) + TRIMEL (20 mg/ml) en relación 10:1 en medio RPMI suplementado (como fue descrito en líneas celulares), junto con IL-2 (20 UI/ml). El día 4 se adicionó al cocultivo IL-2 (20 UI/ml). El día 8 se realizó una reestimulación, adicionando al cultivo 2,5 x10⁶ TAPCells autólogas generadas con TNF- α (20 UI/ml) + lisado de próstata (80 mg/ml) + TRIMEL (20 mg/ml) e IL-2 (20 UI/ml). El día 11 se

adicionó al cocultivo IL-2 (20 UI/ml) y el día 14 se recolectó el sobrenadante, desde donde se obtuvieron los PBL, que fueron utilizados inmediatamente en los experimentos siguientes.

ELISPOT para secreción de IFN- γ

El día previo al ensayo, una placa de 96 pocillos de fondo plano (MAIPN1450; Millipore) fue cubierta con 100 μ l/pocillo de anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ humano (Mabtech), ajustado a 15 μ g/ml en PBS 1%, e incubada a 4°C “overnight”. El día del ensayo, la placa fue lavada 5 veces con PBS 1%, se adiciona e incuba por 30 minutos a temperatura ambiental con 200 μ l/placa de PBS-SFB10% para bloquear la unión no específica al anticuerpo. 150 μ l de suspensión, conteniendo 2×10^5 TAPCells como blanco, junto con PBMC como efectores, fueron incubadas por 16 horas en diferentes proporciones (Efector:Blanco 20:1, 10:1 y 5:1) a 37°C y 5% CO₂. El control negativo fueron PBMCs sin TAPCells, y el control positivo PBMC estimuladas con PMA (50 ng/ μ l) e ionomicina (1 ng/ μ l). Los cocultivos fueron incubados a 37°C y bajo 5% CO₂ por 16 horas. Después de la incubación, las placas fueron lavadas con PBS 5 veces e incubadas con el anticuerpo de detección 100 μ l/pocillo (7-B6-1-biotin (Mabtech) diluido en PBS-SFB 0,5%, en una concentración de 1 μ g/ml) durante 2 horas a temperatura ambiente. La placa fue lavada con PBS cinco veces, e incubada con estreptavidina-ALP (Mabtech) 1:1000 en PBS-SFB 0,5%, 100 μ l/pocillo durante 1 hora, en oscuridad y a temperatura ambiente. La placa nuevamente fue lavada 5 veces con PBS y luego incubada con buffer sustrato (100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 0.05% Tween 20, pH 9.5). Al aparecer los spots, la reacción fue detenida

con abundante agua. Los spots fueron contados utilizando un contador ELISPOTscan automatizado (A.EL.VIS, GmbH).

Ensayo de citotoxicidad

El día previo al ensayo de citotoxicidad, 2×10^6 células de las líneas tumorales de cáncer de próstata LnCap y de cancer de colon SW480, que expresan HLA-A2, la línea de cáncer de próstata PC3 HLA-A2-negativa, y de la línea K562, que no expresa MHC, fueron incubadas por 24 horas en medio RPMI 1640 suplementado (descrito en líneas celulares), adicionando al medio IFN- γ 100ug/ml, a 37°C y en ambiente con 5% de CO₂. Posteriormente las células fueron recolectadas e incubadas en 1 ml de RPMI suplementado con 100uCi de Na₂Cr⁵¹ (1 mCi/mL) (Perkin Elmer), por 1 hora a 37°C y CO₂ 5%. Luego, las células fueron lavadas 3 veces en medio RPMI suplementado, y resuspendidas en medio RPMI suplementado en una concentración de 100 mil células/ml de medio.

En placas de 96 pocillos de fondo cóncavo, se cocultivaron 10 mil células LnCap por pocillo en distintas proporciones efector:blanco (30:1, 5:1 y 1:1), por 6 horas a 37°C y CO₂ 5%, donde las células efectoras corresponden a PBL no estimulado y estimulado, y las células blanco a las distintas líneas utilizadas. Finalmente, se recolectaron 50ul de sobrenadante y se agregaron en placas Opti plate 96 wells (Perkin Elmer) con 150 μ l de líquido de centelleo (Microscint 20, Perkin Elmer, USA). La radiación emitida fue medida en el contador de centelleo Top Count NXT (Perkin Elmer, USA), expresada como cuentas por minuto (cpm). Se calculó el porcentaje de lisis específica utilizando la fórmula:

% de lisis = (liberación muestra - liberación espontánea) / (liberación máxima – liberación espontánea)

La liberación espontánea se determinó en incubando 10 mil células blanco en medio de cultivo, y la liberación máxima se midió en células LnCap incubadas con Cr⁵¹ lisadas.

Determinación de poblaciones linfocitarias productoras de IFN- γ

Linfocitos de sangre periférica (PBL) estimulado (descrito previamente) y no estimulado fueron cocultivados en placas de 6 pocillos con TAPCells autólogas cargadas con lisado tumoral de próstata, en una razón de 10:1, durante 24 horas, en medio RPMI suplementado, a 37°C y 5% de CO₂. Luego, las células no adherentes fueron recolectadas y lavadas 3 veces con PBS-SFB 3%. Posteriormente, las células fueron incubadas con anticuerpos anti-CD4-FITC y anti-CD8-FITC por 30 minutos a 4°C y en oscuridad. A continuación, se eliminó por lavado el exceso de anticuerpo y las células fueron incubadas en Buffer Fix/Perm (eBioscience) por 30 minutos a 4°C y oscuridad. Las células fueron lavadas 3 veces con Buffer Perm (eBioscience) e incubadas con el anticuerpo anti-IFN- γ -PE 30 minutos a 4°C y oscuridad. Se eliminó el anticuerpo remanente mediante 3 lavados con Buffer Perm (eBioscience) y las células fueron fijadas en PFA 1x. Luego fueron analizadas mediante citometría de flujo utilizando un equipo FACSCalibur (BD Biosciences) y el software WinMDI 2.8.

Pacientes

Entre enero de 2007 y marzo de 2010 se reclutaron pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración. Los criterios de inclusión contemplaban edad mayor de 18 años, con confirmación histológica de cáncer de próstata; enfermedad progresiva a pesar de bloqueo androgénico combinado, performance estatus ECOG 0 o 1, esperanza de vida mayor a 6 meses, suspensión de tratamientos oncológicos un mes previo al ingreso, hematocrito mayor a 30%, recuento leucocitario normal, perfil hepático dentro de rangos normales y creatininemia menor a 2 g/dl. Los criterios de exclusión fueron presencia y/o sospecha de metástasis cerebrales, enfermedades graves concomitantes, presencia de una segunda neoplasia maligna y uso de corticoides sistémicos o inmunosupresores.

Previo al inicio del protocolo, todos los pacientes firmaron un documento de consentimiento informado. Este estudio contó con la aprobación del Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, en el marco del desarrollo del proyecto FONDEF D05I10366 “Investigación y desarrollo de terapias biológicas optimizadas para tumores urológicos” (Anexo 1).

Durante todo el tratamiento, los pacientes no orquiectomizados mantuvieron terapia de deprivación androgénica con análogos de LHRH o dietilestilbestrol, confirmando niveles de castración farmacológica (testosterona total sérica menor a 50 ng/dl).

Producción de TAPCells autólogas cargadas con lisado tumoral de próstata para tratamiento

Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) fueron obtenidas de cada paciente mediante leucoféresis, en el Banco de Sangre del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, y fueron separadas por medio de gradiente de densidad utilizando Ficoll- Hypaque (Axis-Shield), como fue descrito. PBMC fueron cultivadas en medio AIM-V (Gibco) por 2 horas. Las células no adherentes fueron eliminadas, se agregó medio AIM-V suplementado con rhIL-4 (500 U/ml) (US Biological) y rhGM-CSF (800 U/ml) (Shering Plough) por 22 horas, y luego cultivadas por 24 horas con lisado tumoral de próstata (80ug/ml), TRIMEL (20 ug/ml) y rhTNF- α (20 U/ml) (US Biological). Finalmente, las células fueron cosechadas, criopreservadas en solución de congelación formada por 90% de suero autólogo y 10% de DMSO, y almacenadas en nitrógeno líquido a -196°C.

Protocolo de Inmunización y Test de Hipersensibilidad Retardada (DTH) contra lisado tumoral

Los pacientes ingresados al protocolo fueron inmunizados con 15 millones de TAPCells autólogas los días 1, 7, 30 y 60 del tratamiento, por vía subcutánea, junto con 150 μ g de Immunocyanin (Biosonda), como inmunoayudante, en un volumen total de 600 μ l.

Treinta días después del término del tratamiento, los pacientes fueron sometidos a un test cutáneo de DTH contra lisado tumoral; 150 μ L de lisado tumoral de próstata (4 μ g/ μ L), Immunocyanin 150 μ L (1mg/ml) y 150 μ L de solución fisiológica (como control negativo)

fueron inoculados intradérmicamente en distintos sitios de un antebrazo del paciente. La reacción inflamatoria generada por las distintas inoculaciones fue medida 48 horas más tarde. Se definió como test DTH positivo un aumento de volumen indurado y eritema mayor a 5 mm en el sitio de inoculación.

Previo a la primera inmunización y al test de DTH, se extrajeron 40 ml de sangre venosa periférica a cada paciente, como fue descrito.

Toxicidad y Calidad de Vida

La toxicidad fue evaluada por anamnesis por sistemas y exámenes de laboratorio generales en cada inmunización y al momento del test de DTH, categorizándose según el NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v.3.0. Los exámenes controlados fueron hemograma, perfil bioquímico, perfil hepático, electrolitos plasmáticos y orina completa.

La calidad de vida fue evaluada en cada inmunización y en el test de DTH utilizando el cuestionario autoaplicado European Organization for Research and Treatment of Cancer Quality of Life Core Questionnaire (EORTC QLQ-C30), traducido al español y validado en Chile. Este cuestionario incluye una subescala de calidad de vida global, 5 subescalas funcionales (funciones físicas, de rol, sociales, emocional y cognitivas), y 9 evaluaciones de síntomas (dolor, anorexia, fatiga, constipación, diarrea, náuseas y vómitos, disnea, alteraciones del sueño y efectos financieros). Los puntajes de todas las escalas fueron determinados de acuerdo a las instrucciones de la EORTC¹²⁴.

Evaluación de respuesta clínica

La respuesta clínica fue determinada mediante medición de antígeno prostático específico (PSA), tomografía computada de pelvis y cintigrama óseo. El PSA sérico fue determinado antes del inicio del tratamiento y de manera mensual durante éste. Además, se determinó el tiempo de duplicación del PSA (PSADT) con todos los PSA séricos disponibles durante el año previo al ingreso al estudio, utilizando la calculadora desarrollada por el Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, basada en la fórmula: $PSADT = \log_2 \times dT / (\log B - \log A)$, disponible en el sitio web <http://nomograms.mskcc.org/Prostate/PsaDoublingTime.aspx>

Para evaluar la presencia y evolución de lesiones metastásicas, se realizaron tomografía computada de abdomen y pelvis y cintigrama óseo previo a la primera inmunización y al momento del test de DTH. Se analizó la respuesta en las lesiones metastásica utilizando los criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos versión 1.0 (RECIST).

Análisis de poblaciones de linfocitos reguladores

Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de cada paciente previo a la primera inmunización y al momento del test de DTH, fueron descongeladas en 10 ml de medio RPMI suplementado, gota a gota, a 37°C, lavadas 3 veces en el mismo medio y luego incubadas por 16 horas en medio RPMI suplementado junto con LPS 100 ng/ml, a 37°C. Se adicionó al cultivo Brefeldina A 1000x 1µl/ml por 4 horas. Las células no adherentes fueron recolectadas y lavadas 3 veces con PBS-SFB 3%. Posteriormente, las células fueron incubadas con anticuerpos anti-CD4-FITC y anti-CD8-FITC por 30 minutos a 4°C y en oscuridad. A

continuación, se eliminó por lavado el exceso de anticuerpo y las células fueron incubadas en Buffer Fix/Perm (eBioscience) por 30 minutos a 4°C y oscuridad. Las células fueron lavadas 3 veces con Buffer Perm (eBioscience) e incubadas con los anticuerpos anti-Foxp3, anti-TGF- β y anti-IL-10 por 30 minutos a 4°C y oscuridad. Se eliminó el anticuerpo remanente mediante 3 lavados con Buffer Perm (eBioscience) y las células fueron fijadas en PFA 1x. Luego fueron analizadas mediante citometría de flujo utilizando un equipo FACSCalibur (BD Biosciences) y el software WinMDI 2.8.

Análisis estadístico

Para determinar la normalidad de los resultados, se utilizaron las pruebas de Skewness/Kurtosis, Shapiro-Wilk y Shapiro-Francia. En los resultados con distribución normal, se utilizó la prueba t pareada. En muestras no normales se aplicó el test del signo de Wilcoxon pareado. Para los ensayos de ELISPOT, citotoxicidad, análisis del cuestionario EORTC QLQ-C30 y comparación del tiempo de duplicación del PSA se utilizó la prueba de ANOVA no paramétrico.

En todos los casos se consideró significancia estadística un error alfa menor de 5% (valor de p inferior a 0,05). Se utilizó para estos análisis el programa GraphPad Prism 4.0.

RESULTADOS

La combinación de lisado tumoral de próstata, TRIMEL y TNF- α es capaz de inducir la maduración de monocitos a células presentadoras de antígenos

En resultados previos demostramos que un lisado tumoral alogénico de melanoma maligno, denominado TRIMEL, tiene la capacidad de actuar como estímulo de maduración, además de ser fuente de antígenos tumorales⁷⁶⁻⁷⁸. También se observó que otros lisados tumorales tienen la capacidad de inducir la expresión de marcadores de maduración de DCs a partir de monocitos de sangre periférica⁸¹. Con los antecedentes mencionados, decidimos generar células presentadoras de antígenos de rápida diferenciación, TAPCells, utilizando lisado tumoral de próstata tanto como fuente antigénica y también como estímulo de maduración, junto con TNF- α . Monocitos de sangre periférica de donantes sanos (n=3) fueron incubados por 22 horas con IL-4 y GM-CSF, como fue descrito en la sección de metodología, para luego agregar al cultivo lisado tumoral de próstata, 100 mg/ml por 24 horas y TNF- α . Los resultados indican que el lisado de tumoral de próstata (Pro100) no posee todas las propiedades para, por sí solo, inducir la diferenciación y maduración de monocitos, como si lo hace TRIMEL, especialmente en la inducción de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, el marcador de activación CD83 y la expresión de MHC clase II, las que muestran una expresión significativamente más bajas que las obtenidas en presencia de TRIMEL (Figura 1). Al mismo tiempo, se observó que TNF- α tampoco tiene la capacidad de inducir la expresión de marcadores de maduración (Figura 1). Por lo tanto, decidimos utilizar el lisado tumoral de próstata en combinación con TRIMEL, que ya demostró sus propiedades inductoras de maduración⁷⁶. Para ésto, determinamos la concentración mínima de proteínas de TRIMEL que

en conjunto con lisado tumoral de próstata generara DCs fenotípicamente similares a TAPCells⁷⁶.

Se observó que la combinación de lisado tumoral de próstata en una concentración de proteínas de 80mg/ml, junto con TRIMEL 20mg/ml (Pro80+Trimel20), fueron capaces de inducir la diferenciación fenotípica de DCs con características maduras, similar a la generada por TRIMEL 100mg/ml (Figura 1). En cambio, la combinación de lisado prostático al 90% y TRIMEL al 10% (Pro90+Trimel10) no alcanzó los mismos niveles de expresión de MHC clase II y CD86 (Figura 1). De esta forma, para los experimentos posteriores, así como para el protocolo de tratamiento, utilizamos este esquema de producción de TAPCells cargadas con lisado tumoral de próstata (lisado tumoral de próstata 80 mg/ml, TRIMEL 20 mg/ml y TNF- α (20 UI/ml)).

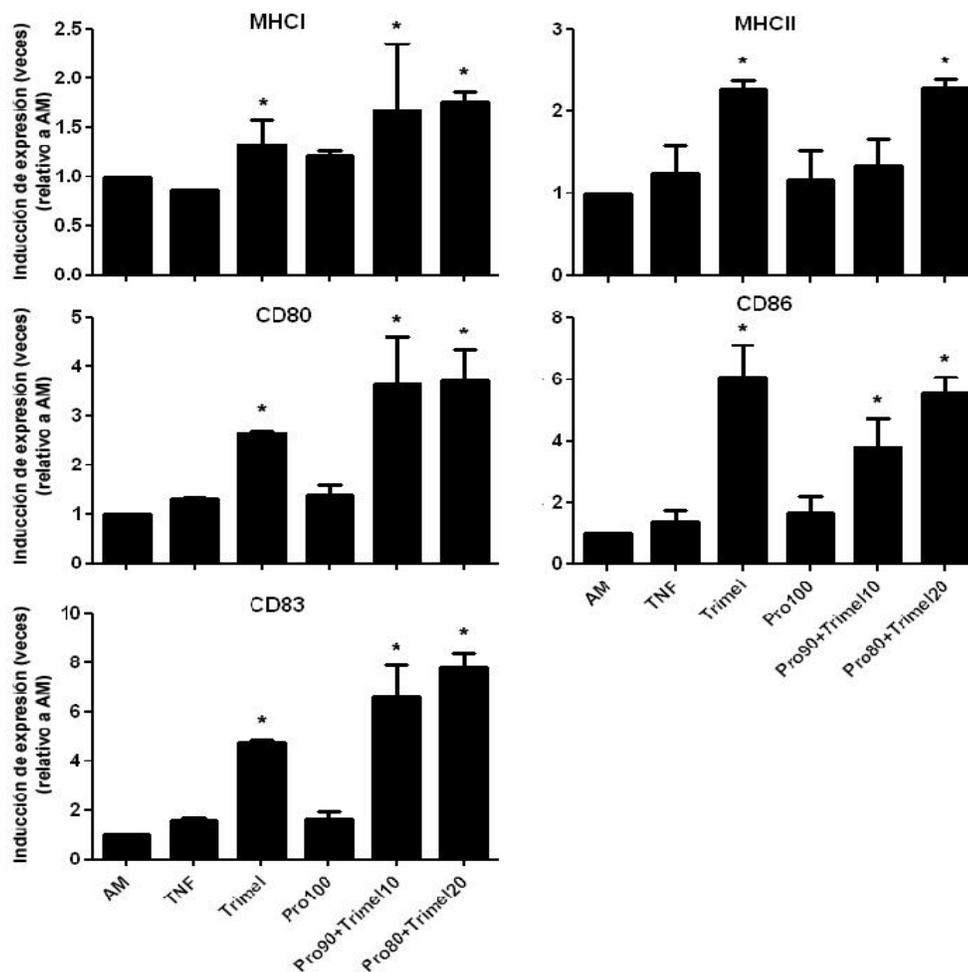


Figura 1. Lisado tumoral de próstata, en combinación con TRIMEL y TNF- α , tiene la capacidad de inducir la diferenciación rápida de células presentadoras de antígeno (TAPCells) a partir de monocitos. PBMC de donantes sanos (n=3) fueron incubadas en medio AIM-V con IL-4 (500 U/ml) y GM-CSF (800 U/ml) por 22 horas, y luego estimuladas por 24 horas más con TNF- α (20U/ml), TNF- α + TRIMEL (100 mg/ml) (Trimel), TNF- α + lisado de próstata (100 mg/ml) (Pro100), TNF- α + lisado de próstata (90 mg/ml) + TRIMEL (10 mg/ml) (Pro90+Trimel10), o TNF- α + lisado de próstata (80 mg/ml) + TRIMEL (20 mg/ml) (Pro80+Trimel20). AM, monocitos sin estimular. Se determinó la expresión de los distintos marcadores de maduración en la población CD11c⁺ mediante citometría de flujo. Los gráficos representan las veces de inducción de la intensidad de fluorescencia promedio para los distintos marcadores (*p < 0,05 prueba t).

TAPCells cargadas con lisado tumoral de próstata son funcionales y capaces de inducir la proliferación de linfocitos productores de IFN- γ

Con el fin de determinar la actividad funcional de TAPCells, evaluamos la capacidad de inducir la activación de LT para la producción de IFN- γ , así como estimular una respuesta citotóxica específica antitumoral. Para esto, analizamos la respuesta de linfocitos de sangre periférica (PBL) de donantes sometidos a dos ciclos de estimulación con TAPCells autólogas (como fue descrito en metodología), comparado con PBL no estimulados.

Primero, evaluamos la capacidad de producción de IFN- γ de PBL después de dos ciclos de estimulación con TAPCells. Para ésto, PBL estimulados y no estimulados fueron cocultivados con TAPCells autólogas y la secreción de IFN- γ fue evaluada en ensayos de ELISPOT. En los tres donantes sanos observamos un aumento significativo de la secreción de IFN- γ por parte de los PBL estimulados, con una secreción de IFN- γ entre 2 y 8 veces mayor después de los 2 ciclos de estimulación (Figura 2).

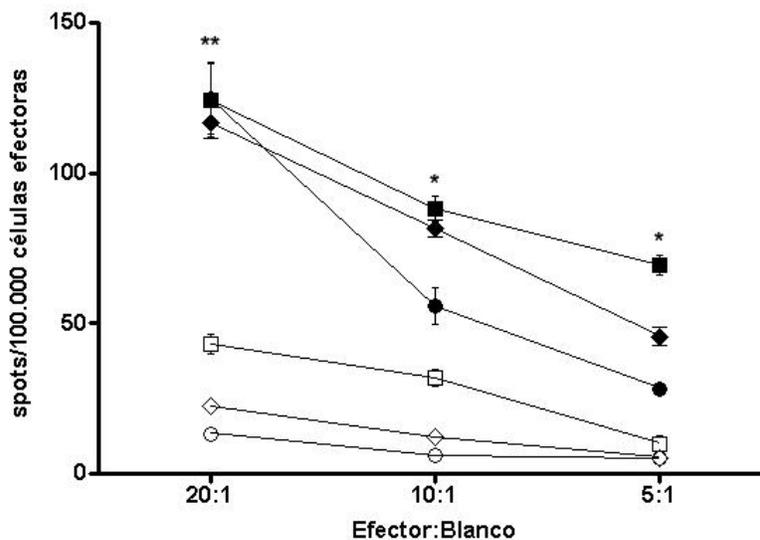


Figura 2. TAPCells estimula la producción de IFN- γ en \square linfocitos T \square autólogos. PBL estimulados (figuras negras) y no estimulados (figuras blancas) de donantes sanos (n=3) fueron cocultivados por 16 horas con TAPCells autólogas cargadas con lisado tumoral de próstata. Se midió la secreción de IFN- γ mediante ensayo de ELISPOT. Cada experimento fue realizado por triplicado (* p<0,05, **p<0,01, ANOVA). Cada figura (círculo, cuadrado y rombo) representa a un donante.

Posteriormente, se evaluó mediante un ensayo de citotoxicidad, si PBL estimulados con TAPCells presentaban una mayor capacidad citotóxica específica contra una línea tumoral de próstata. Se utilizaron PBL estimulados con TAPCells autólogas de donantes HLA-A2⁽⁺⁾ como efectores, y como célula blanco se usó la línea LnCap, que expresa HLA-A2. Para aumentar la expresión de moléculas MHC, las células LnCap fueron preincubadas con IFN- γ , como fue descrito en la sección de metodología. No observamos diferencias en el porcentaje de lisis específica entre PBL estimulados y no estimulados, y tampoco en comparación a la líneas controles: PC3 línea tumoral de próstata HLA-A2⁽⁻⁾, SW480 línea tumoral de colon HLA-A2⁽⁺⁾, y K562, línea de leucemia que no expresa MHC. En este caso, dos ciclos de

estimulación con TAPCells no fueron capaces de inducir un aumento de la lisis específica de células tumorales (Figura 3).

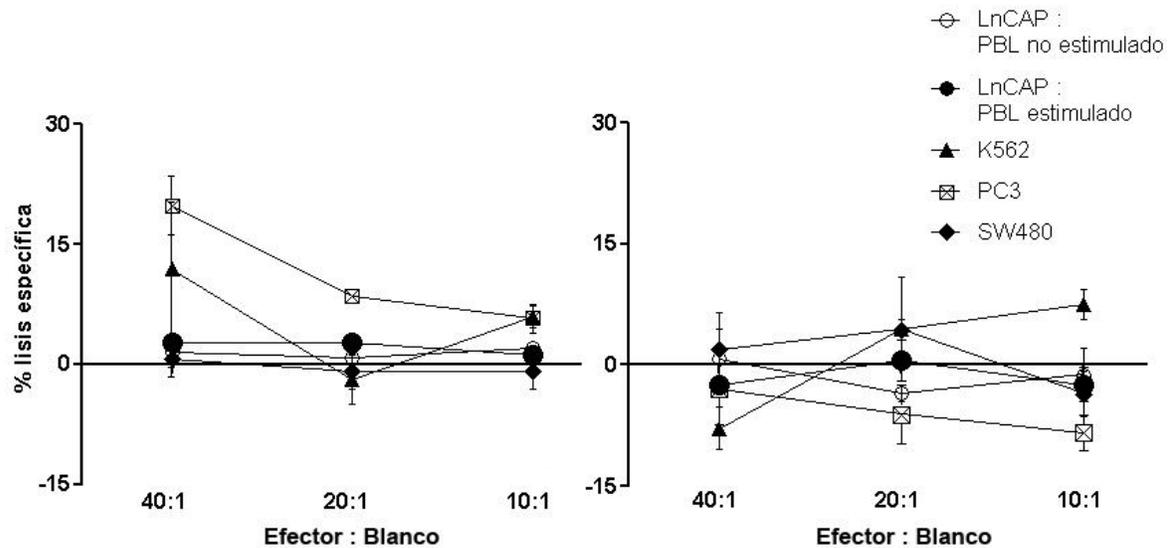


Figura 3. La estimulación por TAPCells no aumenta la citotoxicidad mediada por PBL. En un ensayo de citotoxicidad medido por liberación de Cr₅₁, se enfrentaron células de la línea LnCap HLA-A2⁽⁺⁾ como blanco con PBL estimulados (como fue descrito) y no estimulados de donantes sanos HLA-A2⁽⁺⁾ (n=3). Después de 6 horas de cocultivo, se determinó el porcentaje de lisis específica. Los gráficos mostrados son representativos de 2 experimentos.

Debido a la ausencia de citotoxicidad observada, se evaluó si la estimulación de LT con TAPCells lograba aumentar las poblaciones de LT CD4⁺ y CD8⁺ productoras de IFN- γ , citoquina central en la respuesta inmune antitumoral¹²⁵. Se analizó el efecto de la estimulación de PBL utilizando TAPCells sobre la población de LT productores de IFN- γ , mediante tinción intracelular y citometría de flujo. Se observó que la proporción de linfocitos productores de IFN- γ aumentó significativamente con la estimulación con TAPCells, tanto en LT CD4⁺ como

CD8⁺ (Figura 4) La población de LT CD4⁺IFN- γ ⁺ aumentó desde una media de 23,87% a una media de 75,52% del total de LT CD4⁺ (p<0,001, prueba t). De la misma forma, los LT IFN- γ ⁺ aumentaron desde una media de 44,32% a una media de 70,3% en la población CD8⁺ (p<0,001, prueba t) (Figura 4).

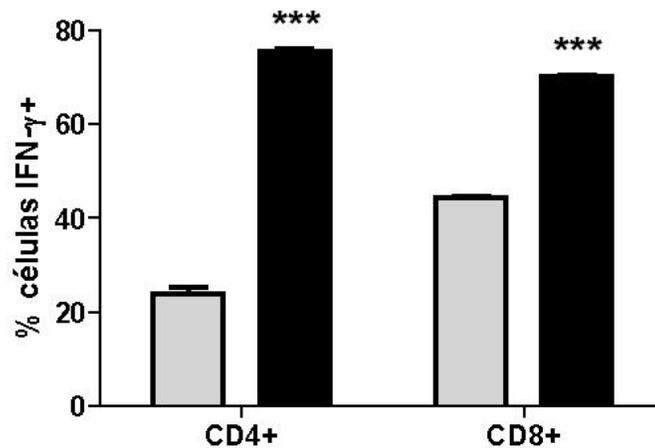


Figura 4. TAPCells induce la proliferación de LT productores de IFN- γ . PBL estimulados (barras negras) y no estimulados (barras grises) de donantes sanos (n=3) fueron cocultivados por 16 horas con TAPCells autólogas cargadas con lisado tumoral de próstata. Se midió la expresión de IFN- γ en las células CD4⁺ y CD8⁺ mediante citometría de flujo. (***)p<0,001, prueba t).

En resumen, se observa que TAPCells son funcionalmente activas, capaces de estimular LT para la producción de IFN- γ , principal citoquina antitumoral, aunque no se observó una mayor capacidad citotóxica de PBL estimulados. Una vez realizada la caracterización fenotípica y funcional de las TAPCells *in vitro* se procedió al diseño de un estudio Fase I en pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración.

Pacientes reclutados en estudio Fase I

Ingresaron al estudio 20 pacientes portadores de CPRC, que cumplían con los criterios de inclusión. Las características de los pacientes se describen en la Tabla 1. Un 55% de los pacientes recibió como terapia inicial TDA, siendo el 45% restante tratado inicialmente como cáncer de próstata órgano-confinado (8 pacientes con prostatectomía radical retropúbica y un paciente con radioterapia externa), y que presentaron progresión de la enfermedad. En relación al tipo de TDA, la mayor parte de los pacientes recibió análogos de LHRH como tratamiento. Todos los pacientes recibieron bloqueo androgénico combinado con algún agonista no esteroide del receptor de andrógenos (flutamida o bicalutamida) previo al ingreso al estudio.

Durante la progresión de la enfermedad, un 75% de los pacientes había recibido terapia hormonal de segunda línea con dietilestilbestrol (DEEB), mientras que un paciente recibió tratamiento de tercera línea con ketoconazol más prednisona. Además, un paciente recibió, antes de ingresar a este estudio, 3 ciclos de quimioterapia con docetaxel más prednisona.

Un 70% de los pacientes presentaba enfermedad metastásica, con compromiso de linfonodos pelvianos y lesiones óseas en todos los casos. Ningún paciente presentaba metástasis viscerales. Un 65% de los pacientes fue considerado como CPRC por progresión bioquímica exclusiva, mientras que el 35% restante presentaba, además de ascenso progresivo del PSA, aumento del número o tamaño de lesiones metastásicas.

Tabla 1. Características de los pacientes (n=20)		
Edad - promedio (rango)	69	(54-84)
Tratamiento Inicial – n (%)		
Intención Curativa	9	(45)
TDA Primaria	11	(55)
Tipo de TDA – n (%)		
Orquiectomía	9	(45)
Análogos LHRH	11	(55)
Terapia de Segunda Línea – n (%)		
DEEB	15	(75)
Ketoconazol	1	(5)
Quimioterapia	1	(5)
Duración de TDA antes de resistencia - meses (rango)		
	24,5	(6-81)
Metástasis – n (%)		
Ósea	14	(70)
Linfonodos	14	(70)
Otros órganos	0	(0)
Progresión – n (%)		
Bioquímica	13	(65)
Clínica	7	(35)
Completaron Estudio – n (%)	14	(70)

En relación a los niveles de PSA sérico al momento de ingresar al estudio, los pacientes presentaban PSA entre 2 ng/ml y 3150 ng/ml, presentando 14 pacientes niveles de PSA al inicio del protocolo menores de 100 ng/ml.

Del total de pacientes que iniciaron el estudio, 14 pacientes completaron el protocolo de tratamiento. Dos pacientes no se realizaron el test DTH por presentar un rápido aumento del PSA durante el tratamiento y decidieron abandonar el estudio. Tres pacientes no

completaron los ciclos de inmunización por falta de adherencia a los controles (inasistencia en fechas establecidas), y un paciente debió ser excluido por requerir uso de corticoides orales después de la segunda inmunización, debido a un cuadro de paraparesia de extremidades inferiores por compresión medular secundario a metástasis en columna lumbar.

TAPCells es un tratamiento seguro, con baja toxicidad y no afecta la calidad de vida de pacientes con CPRC

Los eventos adversos referidos por los pacientes se describen en la Tabla 2, incluyendo a los 20 pacientes reclutados. El total de eventos adversos durante el estudio fue de 10 episodios, de los cuales 8 episodios correspondieron a dolor y eritema en sitio de inmunización después de la cuarta inmunización, con una duración máxima de 48 horas. Ningún paciente requirió tratamiento por dichos eventos, y todos fueron catalogados como toxicidad grado 2. El evento adverso más grave observado durante el estudio (Grado 3) fue un paciente que presentó paraparesia de extremidades inferiores 10 días después de la segunda inmunización. El estudio de diseminación al ingreso de este paciente mostraba múltiples lesiones metastásicas en columna vertebral lumbar. Se practicó una resonancia magnética de columna lumbar, la que fue compatible con un cuadro de compresión medular por metástasis. El paciente inició tratamiento con corticoides orales, por lo que fue excluido del estudio.

Un paciente, con antecedentes de hipertensión arterial en tratamiento, presentó un episodio de crisis hipertensiva después de la tercera inmunización, de 6 horas de duración, autolimitada, calificado como toxicidad grado 2. No existió toxicidad grado 4 o mayor en este

estudio. Tampoco se observaron alteraciones en los estudios de laboratorio practicados a los pacientes.

Tabla 2. Eventos Adversos durante el tratamiento		
Evento	Todos los grados	Grados 3-5
Número (%)		
Cualquiera	10	1
Dolor y eritema en sitio de inoculación	8	0
Paraparesia extremidades inferiores	1	1
Crisis hipertensiva	1	0

Sin embargo, la sección de síntomas del cuestionario EORTC QLQ-C30 detectó un aumento de la presencia de episodios de náuseas y vómitos durante el estudio (Figura 5A), no referido como evento adverso por los pacientes en la anamnesis dirigida. Al evaluar al grupo total de pacientes reclutados, el puntaje para la presencia de estos síntomas fue significativamente mayor después de la tercera y cuarta inmunizaciones (Figura 5A). Para explicar el aumento de la sintomatología emética durante el tratamiento, analizamos si el uso de opioides por dolor secundario a metástasis, medicamentos de uso común en los cuidados paliativos de estos pacientes, podría jugar un rol. Observamos que las náuseas y vómitos empeoraron exclusivamente en el grupo de pacientes usuarios de opioides (Figura 5B). No se observaron cambios en los otros 8 síntomas evaluados por este cuestionario (Figura 6).

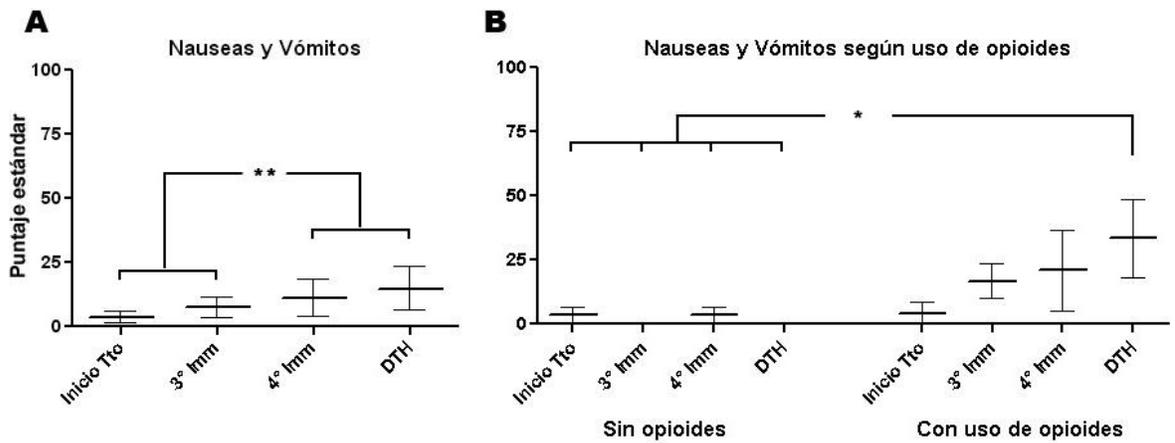


Figura 5. Síntomas nauseas y vómitos aumentan durante el tratamiento, en pacientes usuarios de opioides.

Los pacientes respondieron mensualmente la sección de síntomas del cuestionario EORTC QLQ-C30. (A) Puntaje promedio de nauseas y vómitos para todo el grupo de pacientes (n=14). (B) Puntaje promedio de nauseas y vómitos, según uso de opioides (sin opioides n=8, con opioides n=6) (* p<0,05 ANOVA; ** p<0,01 ANOVA).

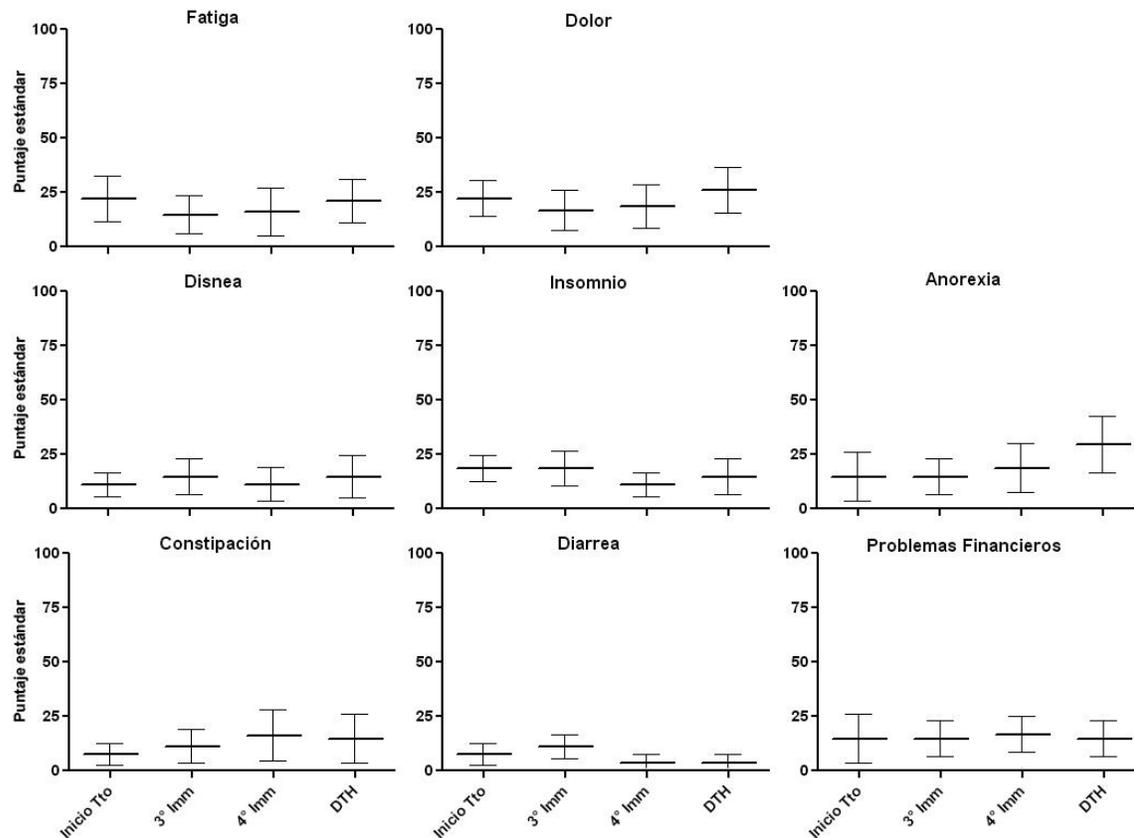


Figura 6. El tratamiento con TAPCells no afecta otros síntomas evaluados por el cuestionario EORTC QLQ-C30. Puntaje promedio para todo el grupo de pacientes tratados (n=14) de cada uno de los síntomas mencionados. El puntaje estándar fue determinado según instrucciones de la EORTC, indicando a mayor puntaje mayor intensidad de sintomatología.

El tratamiento con TAPCells cargadas con lisado tumoral de próstata mantiene la calidad de vida de pacientes con CPRC

Debido al impacto que generan las terapias oncológicas en la calidad de vida de los pacientes con tumores avanzados, evaluamos el efecto del tratamiento con TAPCells sobre la

calidad de vida, utilizando el cuestionario QLQ-C30, el cual fue autoaplicado en la primera, tercera y cuarta inmunizaciones, así como en el test de DTH. Durante el tratamiento, los puntajes para calidad de vida global y los parámetros funcionales, estimados por el cuestionario, se mantuvieron estables (Figura 7), indicando que la calidad de vida no se ve empeorada con esta nueva terapia. Sin embargo, tampoco observamos un incremento en los puntajes en las subescalas evaluadas, no logrando la terapia aumentar la estimación de calidad de vida.

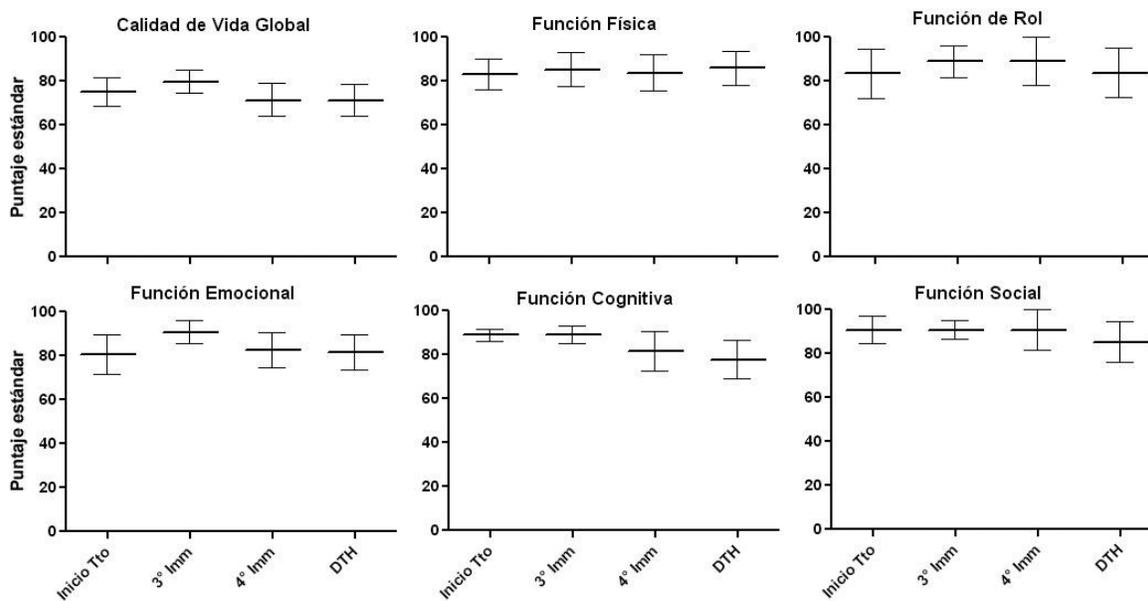


Figura 7. TAPCells mantiene la calidad de vida global y los parámetros funcionales de pacientes con CPRC. El cuestionario EORTC QLQ-C30 fue aplicado mensualmente durante el protocolo de tratamiento (n=14). El puntaje estándar fue determinado según instrucciones de la EORTC, indicando a mayor puntaje mayor calidad de vida o desempeño de las diferentes funciones.

TAPCells es capaz de generar una respuesta inmune específica contra lisado tumoral de próstata

Un objetivo principal en este estudio era determinar si el tratamiento con TAPCells cargadas con lisado tumoral de próstata tiene la capacidad de inducir una respuesta inmune específica. Para ésto, realizamos un test de hipersensibilidad retardada (DTH) contra lisado tumoral de próstata, 30 días después de la última inmunización. El test de DTH es el principal método de monitoreo de respuesta inmune *in vivo* en estudios que utilizan terapias inmunológicas celulares¹²⁶, y en resultados previos de nuestro laboratorio, una respuesta DTH positiva se correlaciona con la sobrevida de pacientes con melanoma⁷⁸.

En este estudio, un 64% de los pacientes (9 de 14 pacientes que completaron el estudio) presentó una respuesta DTH positiva contra lisado tumoral (Figura 8), proporción similar a los estudios realizados con TAPCells en pacientes con melanoma⁷⁶⁻⁷⁸. Al mismo tiempo, todos los pacientes presentaron un test de DTH positivo contra el adyuvante, sugiriendo que un DTH negativo contra lisado tumoral no se explica por un estado de inmunosupresión de los pacientes que no desarrollaron respuesta inmune contra el lisado tumoral.

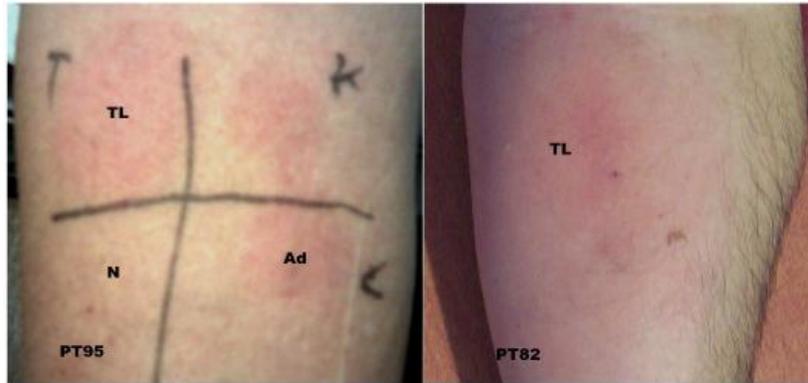


Figura 8. Inmunoterapia con TAPCells genera una respuesta inmune específica contra lisado tumoral, medida como respuesta DTH. Fotografías representativas de dos pacientes que muestran respuestas DTH positivas al lisado tumoral (TL); adyuvante (Ad); solución fisiológica (N).

Al mismo tiempo, evaluamos la respuesta inmune *in vitro* por secreción de IFN- γ antes y al término de la terapia, mediante ensayos de ELISPOT. Este es el método de evaluación de respuesta inmune más utilizado en los estudios clínicos¹²⁷. Se observó que cinco de diez pacientes evaluados con ensayos de ELISPOT mostraron un aumento en la secreción de IFN- γ después del tratamiento (Figura 9). No se observó una correlación entre la respuesta *in vivo* medida por DTH y la respuesta *in vitro*: de los pacientes que mostraron un aumento significativo en la producción de IFN- γ , tres pacientes fueron presentaban una respuesta DTH⁺ y dos eran pacientes DTH⁻ contra lisado tumoral.

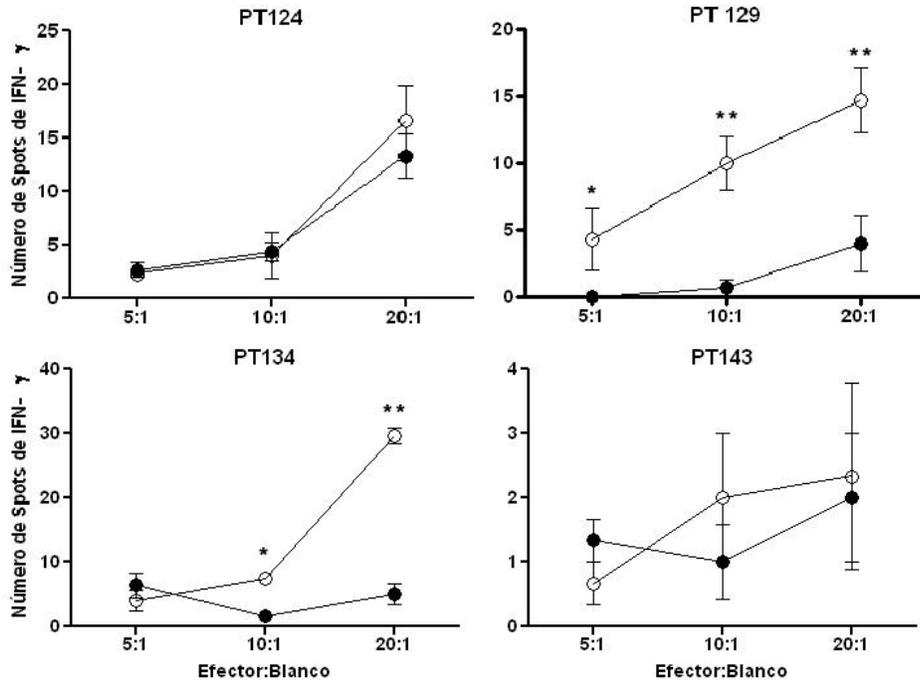


Figura 9. La mitad de los pacientes tratados muestra un aumento en la producción de IFN- γ en PBMC de sangre periférica. PBMC de pacientes obtenidos previo a la primera inmunización (círculos negros) o al momento del test de DTH (círculos blancos) fueron cocultivados durante 18 horas con TAPCells autólogas. Se midió la secreción de IFN- γ mediante ELISPOT (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ ANOVA). Figuras representativas de 4 pacientes. PT124 y PT134 fueron pacientes con respuesta DTH negativa, PT129 y PT143, pacientes con respuesta DTH positiva.

En conclusión, TAPCells son capaces de generar una respuesta inmune específica *in vivo* contra lisado tumoral, evaluado como test de DTH, en la mayoría de los pacientes, y en una proporción similar a otros estudios previos de nuestro grupo^{76,78}. Esta respuesta *in vivo* no se correlaciona con los resultados evaluados *in vitro* mediante ensayos de ELISPOT para secreción de IFN- γ .

El tratamiento con TAPCells disminuye el nivel de PSA, aumentado el tiempo de duplicación del PSA

A pesar de ser un objetivo secundario en este estudio Fase I, resulta importante observar el efecto clínico que puede producir el tratamiento en pacientes portadores de CPRC. Durante el tratamiento, 10 de los 14 pacientes que completaron el estudio mostraron algún descenso del nivel del PSA sérico, mostrando 4 pacientes un descenso mayor a 30% del PSA al momento del ingreso del estudio, y 2 pacientes un descenso mayor a un 50% (Figura 9). Todos los pacientes que presentaron un descenso significativo presentaban un PSA al inicio del estudio menor de 100 ng/dl. Es fundamental recalcar que el PSA sérico aumenta continuamente en pacientes con CPRC y no se describen descensos espontáneos¹²⁸. Ningún paciente presentó negativización del PSA.

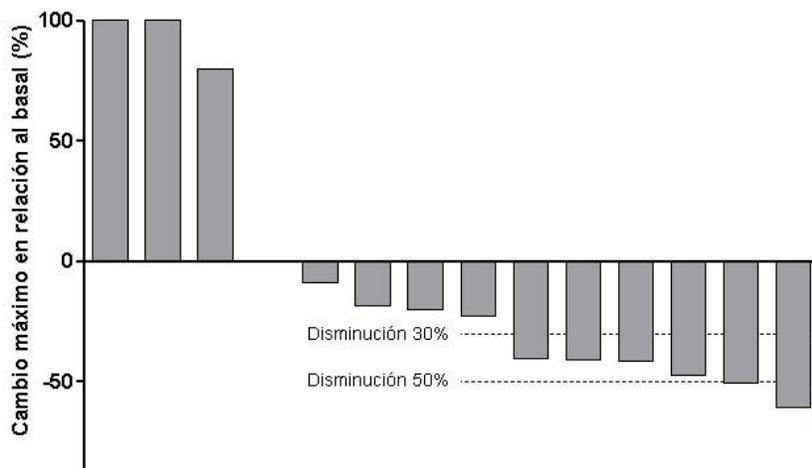


Figura 10. Inmunoterapia con TAPCells cargadas con lisado tumoral de próstata produce una disminución del PSA sérico en la mayoría de los pacientes. El gráfico muestra el máximo cambio en los niveles de PSA durante el tratamiento, en relación al nivel basal de PSA. Cada barra corresponde a un paciente.

De los 10 pacientes que mostraron un descenso del PSA sérico, 8 eran pacientes respondedores inmunológicos, mientras 2 pacientes presentaron un test de DTH⁽⁻⁾ contra lisado tumoral. Sin embargo, los 6 pacientes con un descenso significativo del PSA (mayor a un 30% del basal) eran pacientes que presentaron un test de DTH⁽⁺⁾.

Al mismo tiempo, debido a que es un factor pronóstico de progresión y mortalidad en CPRC, calculamos el tiempo de duplicación del PSA (PSADT) al inicio del tratamiento y al término de éste¹²⁹. El PSADT promedio aumentó de 5,1 meses antes del tratamiento a 6,4 meses al momento del DTH, aunque dicha diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 11A) . En la misma tendencia, el PSADT fue aun mayor en el control 3 meses post DTH, alcanzando un promedio de 10,5 meses. Al analizar el PSADT por subgrupos, identificamos que éste aumenta en el grupo de pacientes respondedores inmunológicos (DTH⁽⁺⁾), en cambio se mantiene estable en los pacientes DTH⁽⁻⁾ (Figura 11B). En los pacientes DTH⁽⁺⁾, el PSADT aumentó de 6,5 meses a 8,2 meses al término del tratamiento, incrementándose aún más a los 3 meses post DTH, alcanzando 12,17 meses. Por el contrario, en el grupo DTH⁽⁻⁾, el PSADT se mantuvo en un valor aproximado de 3 meses durante todo el estudio.

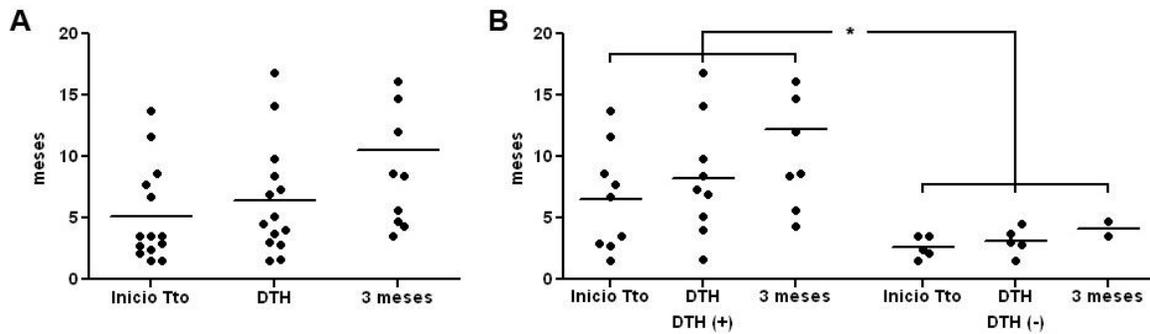


Figura 11. TAPCells con lisado tumoral de próstata mejora el PSADT en pacientes respondedores inmunológicos. El PSADT fue calculado al inicio del estudio, utilizando todos los PSA séricos disponibles el año previo al ingreso al protocolo, y posteriormente con los PSA obtenidos durante el estudio. (A) Evolución del PSADT durante el tratamiento, en el grupo completo de pacientes tratados. (B) Evolución del PSADT durante el tratamiento, según respuesta en el test de DTH. (* $p < 0,05$ ANOVA).

Al contrario de la respuesta bioquímica observada frente al tratamiento, al evaluar cambios en las lesiones metastásicas observadas tanto en cintigrama óseo como en tomografía computada de abdomen y pelvis, no se observó disminución del tamaño de las lesiones metastásicas en ninguno de los pacientes evaluados; 3 pacientes, todos con respuesta DTH⁽⁻⁾, mostraron un aumento significativo de las lesiones en los estudios imagenológicos. En los pacientes no metastásicos que completaron el estudio, no se observó aparición de lesiones metastásicas en los estudios imagenológicos al término del protocolo.

El tratamiento con TAPCells no provoca un aumento de subpoblaciones de linfocitos con propiedades reguladoras

Debido a la relación entre ausencia de respuesta DTH y aumento de linfocitos T reguladores en experiencias previas en melanoma, específicamente la población Th3 (productores de TGF- β)⁷⁸, así como recientes publicaciones que mostraban un aumento de poblaciones reguladoras en diversos protocolos de inmunoterapia con células presentadoras de antígenos en melanoma y cáncer de células renales^{130,131}, se decidió evaluar si el tratamiento utilizado en este estudio clínico influía en la proporción de poblaciones de LT CD4⁺ tanto reguladores naturales (Foxp3⁺), así como linfocitos reguladores periféricos inducibles (productores de TGF- β ⁺ e IL-10⁺). Para ésto, analizamos mediante citometría de flujo la proporción de linfocitos Treg naturales (CD4⁺ Foxp3⁺), linfocitos Tr1 (CD4⁺ IL-10⁺) y linfocitos Th3 (CD4⁺ TGF- β ⁺), comparando sangre periférica obtenida previo a la primera inmunización y sangre periférica del momento del test de DTH. Para optimizar las muestras de sangre, realizamos una tinción de 4 colores. Debido a que se utilizó LPS el día previo a la tinción para inducir la producción de citoquinas intracelulares, se analizó previamente que LPS no afectara la expresión del factor de transcripción Foxp3. Se comparó PBMC incubados con LPS versus PBMC no estimulados de donantes sanos (n=3). Observamos que la expresión de Foxp3 no se ve aumentada en los PBMC tratados con LPS (Figura 12).

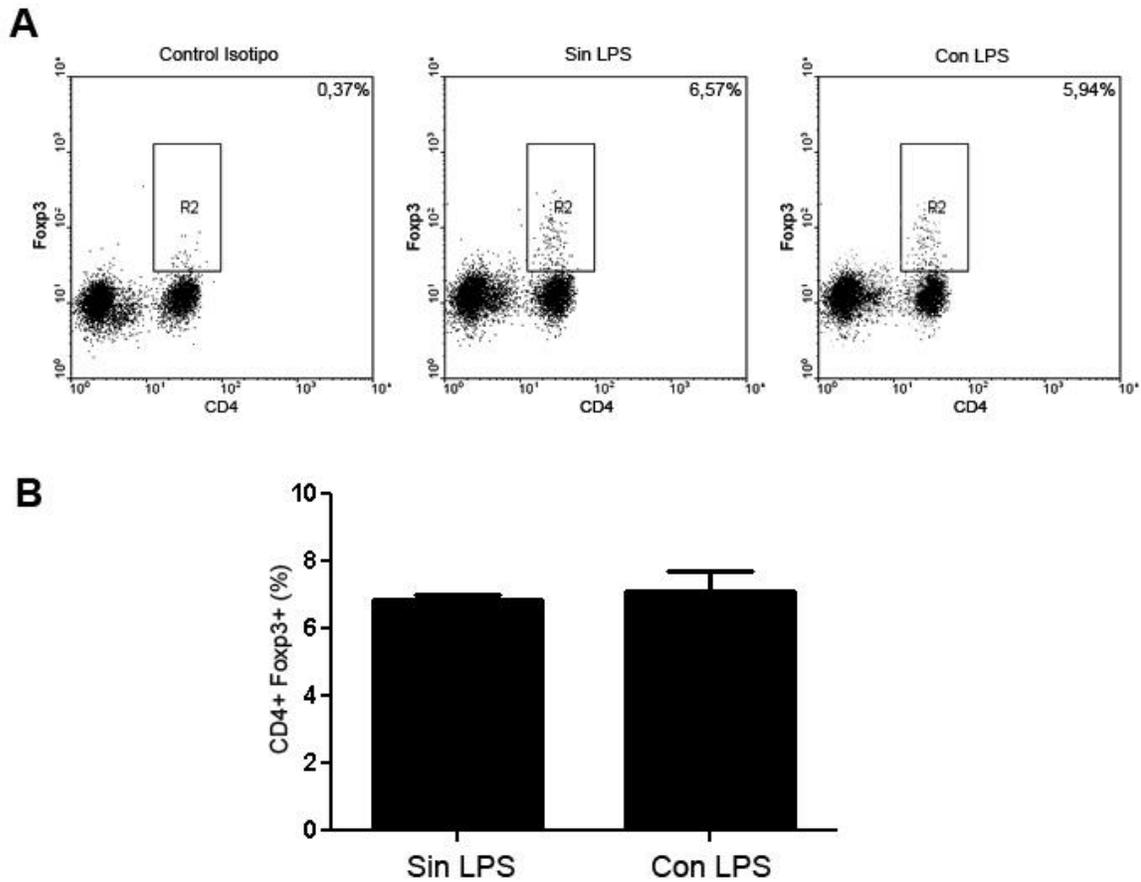


Figura 12. Estimulación con LPS no aumenta la expresión de Foxp3. (A) Dot plots representativos de las diferentes condiciones evaluadas. En la esquina superior izquierda se observa la proporción de células CD4⁺ en la región graficada. (B) Proporción de expresión de Foxp3 en la población de células CD4⁺ de PBMC de donantes sanos con y sin estimulación con LPS (n=3).

Debido a que las muestras de PBMC de los pacientes fueron congeladas después de su obtención, para realizar la determinación de las poblaciones reguladoras de manera simultánea, se analizó si el proceso de congelación alteraba la proporción de las subpoblaciones linfocitarias reguladoras. Se evaluó la proporción de linfocitos Treg naturales

(CD4⁺ Foxp3⁺) (Figura 13B), linfocitos Tr1 (CD4⁺ IL-10⁺) (Figura 13C) y linfocitos Th3 (CD4⁺ TGF-β⁺) (Figura 13D) en PBMC de donantes sanos (n=3), comparando la expresión de los marcadores mencionados en PBMC frescos versus PBMC congelados durante 72 horas. No observamos diferencias en la expresión de los distintos marcadores intracelulares entre PBMC frescos y PBMC congelados.

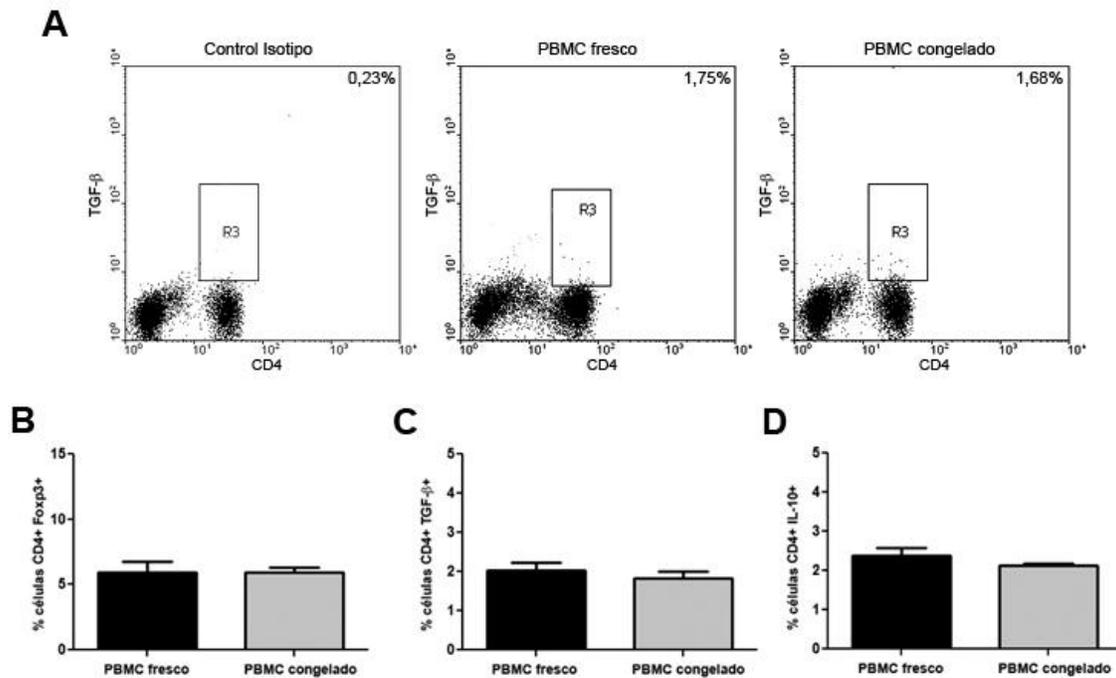


Figura 13. Criopreservación de PBMC no afecta la proporción de células CD4⁺ con fenotipo regulador. (A) Ejemplo de dot plots representativos de las diferentes condiciones evaluadas, para células CD4⁺ TGF-β⁺. En la esquina superior izquierda se observa la proporción de células CD4⁺ en la región graficada. (B) Proporción de células Foxp3⁺ en la población de células CD4⁺ de PBMC frescos y criopreservados de donantes sanos (n=3). (C) Proporción de células TGF-β⁺ en la población de células CD4⁺ de PBMC frescos y congelados de donantes sanos (n=3). (D) Proporción de células IL-10⁺ en la población de células CD4⁺ de PBMC frescos y congelados de donantes sanos (n=3).

En los resultados previos, se observa que la estimulación con LPS para inducir la secreción de citoquinas intracelulares no afecta significativamente la expresión de Foxp3, y que la criopreservación tampoco altera la proporción de las diferentes subpoblaciones de LT CD4⁺ a evaluar. De esta forma, determinamos la proporción de subpoblaciones de LT reguladores en PBMC de pacientes antes de la primera inmunización y al momento del test de DTH. Al analizar la proporción de Treg de sangre periférica, observamos que la proporción de LT CD4⁺ Foxp3⁺ se mantuvo estable durante el tratamiento (promedio 4,6% al inicio del tratamiento versus 4,3% al momento del DTH) (Figura 14A). Tampoco observamos diferencias entre los pacientes respondedores inmunológicos (DTH⁺) versus no respondedores (DTH⁻), así como tampoco diferencias en relación a la presencia o ausencia de lesiones metastásicas (datos no mostrados).

De la misma forma, la población de LT reguladores Th3 tampoco mostró cambios después de la terapia. Los LT CD4⁺ TGF-β⁺ correspondían a un 2,2% de la población CD4⁺ previo al tratamiento, y el promedio post-tratamiento fue de 2,4%. Tampoco observamos diferencias según respuesta DTH ni lesiones metastásicas (Figura 14B). Al analizar la población Tr1, productores de IL-10, tampoco observamos cambios en relación al tratamiento, así como tampoco una correlación con la respuesta inmunológica in vivo ni la presencia de enfermedad diseminada. Los LT CD4⁺ IL-10⁺ permanecieron entre un 1 y 2% del total de LT CD4⁺ durante la terapia (Figura 14C).

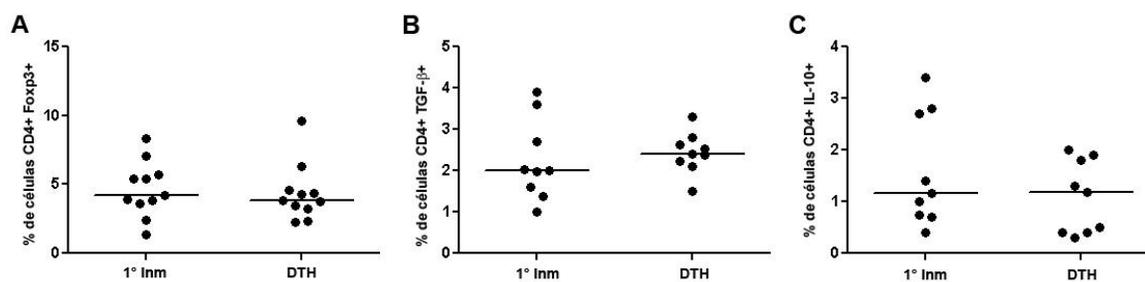


Figura 14. La población de LT reguladores se mantiene estable después del tratamiento con TAPCells. (A) Proporción de células Foxp3⁺ de la población CD4⁺ (Treg) en todo el grupo de pacientes tratados (pacientes evaluables n=11), al inicio del tratamiento (1° Inm) y al momento del test de DTH. (B) Proporción de células TGF-β⁺ de la población CD4⁺ en todo el grupo de pacientes tratados (pacientes evaluables n=11), al inicio del tratamiento (1° Inm) y al momento del test de DTH. (C) Proporción de células IL-10⁺ de la población CD4⁺ en todo el grupo de pacientes tratados (pacientes evaluables n=11), al inicio del tratamiento (1° Inm) y al momento del test de DTH.

Por último, recientemente se describió una población de LT reguladores de la población CD8⁺, que expresan el marcador Foxp3. Esta población se ha asociado a la producción de IL-10 y TGF-β, y ha sido descrita en pacientes con cáncer de colon y cáncer de próstata¹²². En once pacientes evaluados, la proporción de LT Foxp3⁺ en la población CD8⁺ se mantuvo entre un 2,2 y 2,3% durante el estudio, sin observar diferencias relacionadas con la respuesta al test de DTH ni a la presencia de metástasis (Figura 15).

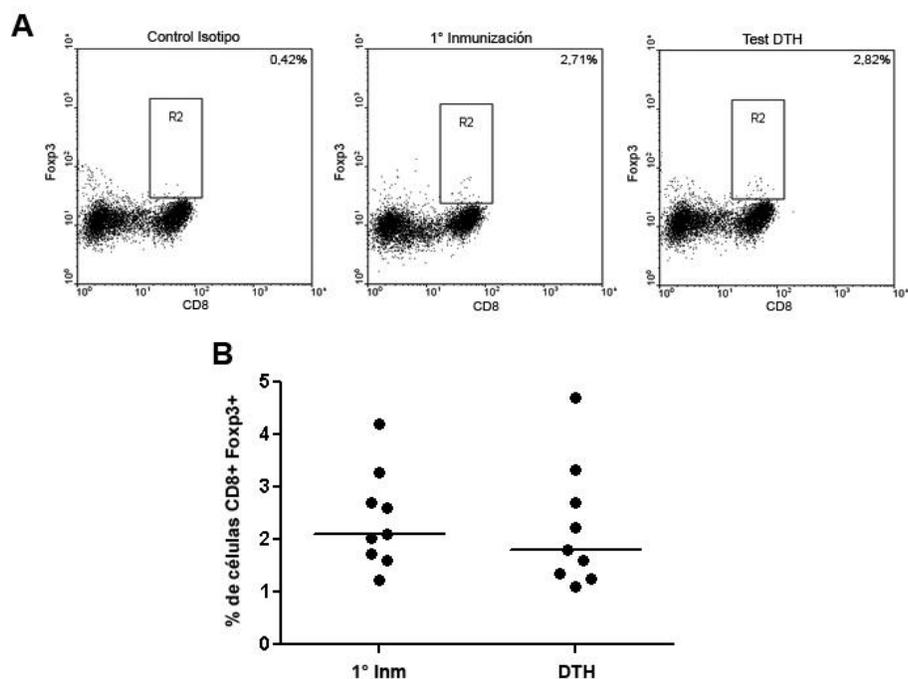


Figura 15. La población de LT reguladores CD8⁺ Foxp3⁺ se mantiene estable después del tratamiento con TAPCells. (A) Dot plots representativos de las diferentes condiciones evaluadas. En la esquina superior izquierda se observa la proporción de células CD8⁺ en la región seleccionada. (B) Proporción de células Foxp3⁺ de la población CD8⁺ en todo el grupo de pacientes tratados (pacientes evaluables n=11), al inicio del tratamiento (1° Inm) y al momento del test de DTH.

En resumen, en este estudio no se observaron cambios significativos en la proporción de las subpoblaciones de LT reguladores de sangre periférica durante el tratamiento, tanto en las poblaciones CD4⁺ como en la población de LT CD8⁺ Foxp3⁺, así como tampoco un relación con la respuesta inmune *in vivo* contra lisado tumoral ni con la presencia o ausencia de enfermedad metastásica.

DISCUSIÓN

Múltiples estrategias en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para el CPRC se han desarrollado en la última década. El uso de docetaxel como terapia de primera línea, y de cabazitaxel en pacientes progresores bajo tratamiento con docetaxel, ha demostrado la utilidad de las nuevas drogas citotóxicas en el tratamiento de estos pacientes³⁹⁻⁴¹. Sin embargo, la importante toxicidad asociada, con eventos adversos grado 3 o mayores en un 30% de los pacientes tratados, disminuyen la adherencia al tratamiento y limitan su aplicabilidad. El uso del sistema inmune como terapia antitumoral trata de replicar y potenciar la función natural que éste realiza, conocida como inmunoedición, que impide el desarrollo y crecimiento de tumores¹³². Hasta ahora, los principales avances en el uso del sistema inmune adaptativo como terapia contra el cáncer muestran la capacidad de generar una respuesta inmune específica contra tumor y efectos secundarios leves, en diversos tumores como melanoma, colon y mama^{78,133,134}. A diferencia de inmunoterapias oncológicas utilizando anticuerpos monoclonales, que han mostrado resultados clínicos prometedores en cáncer de células renales, melanoma y cáncer pulmonar¹³⁵⁻¹³⁷, las respuestas clínicas observadas en estudios utilizando inmunoterapias celulares han sido menores. Sin embargo, con la publicación del estudio IMPACT, donde Sipuleucel-T, células presentadoras de antígenos cargadas con la proteína de fusión PA2024 (PAP – GM-CSF), mostró un aumento de la mediana de supervivencia de 4,1 meses en pacientes con CPRC¹⁰⁶, convirtiéndose en la primera terapia inmune celular aprobada por la Agencia de Alimentos y Drogas de Estados Unidos (FDA) para uso en humanos¹⁰⁸, se ha dado un nuevo impulso al uso del sistema inmune como estrategia antitumoral. Durante este proyecto de tesis, hemos desarrollado el primer estudio clínico

utilizando células presentadoras de antígenos en el tratamiento del cáncer de próstata resistente a la castración en nuestro país. Específicamente, este estudio Fase I utilizando TAPCells cargadas con lisado tumoral de próstata mostró ser una estrategia terapéutica segura, capaz de inducir respuestas inmunes y clínicas en este grupo de pacientes.

Inicialmente, hemos demostrado que la combinación de lisado tumoral de próstata y TRIMEL, en presencia de TNF- α , es capaz de inducir de manera rápida la expresión de marcadores de maduración y activación de DCs en monocitos de sangre periférica. Esta capacidad, observada para otros lisados tumorales y no en células normales⁷⁶, puede ser explicada por la presencia de moléculas con características de señales de peligro (DAMPs) en las células tumorales; estas DAMPs pueden ser reconocidas por PPRs, activando vías de señalización intracelular que generan un aumento en la expresión de marcadores de superficie de células presentadoras de antígenos, así como la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-12 y TNF- α ^{67,76,138}. Aunque el nivel de activación de DCs es menor que el inducido por TRIMEL, el lisado tumoral de próstata logra un aumento de la expresión de marcadores de maduración de DCs. Esta menor capacidad del lisado tumoral de próstata de inducir la diferenciación a DCs puede ser explicada por una mayor expresión de DAMPs en TRIMEL, o porque las líneas tumorales de próstata necesitan un mayor estrés celular para una adecuada expresión de DAMPs. En estudios previos hemos demostrado que condiciones de estrés a las cuales son sometidas las líneas tumorales que componen TRIMEL, inducen un cambio en la expresión de las DAMPs HMGB1 y calreticulina. Estas diferencias en la expresión de las mencionadas proteínas se observa al incubar las líneas de melanoma a 42°C⁷⁶. Sin embargo,

Brusa y colaboradores mostraron que el condicionamiento de la línea LnCap a 56°C, y no 42°C, induce una mayor secreción de HSP70 y HMGB1 por las células tumorales¹³⁹, apoyando la explicación que la inducción de DAMPs en las líneas tumorales de próstata puede requerir otros estímulos diferentes a los utilizados. De todas formas, TAPCells generadas con lisado tumoral de próstata y TRIMEL mostraron ser capaces de activar específicamente LT vírgenes; observamos un aumento de la secreción de IFN- γ en LT sometidos a dos ciclos de estimulación con TAPCells, así como un aumento importante en los LT productores de IFN- γ , tanto poblaciones CD4⁺ como CD8⁺. IFN- γ es la citoquina central en la respuesta inmune antitumoral, activando tanto LT CD8⁺ citotóxicos (CTL)¹²⁵, así como también aumentando la expresión de antígenos asociados a moléculas MHC en las células tumorales¹⁴⁰. La mayor presencia de LT Th1 (CD4⁺ IFN- γ ⁺) ha sido correlacionada con mejor pronóstico en cáncer de colon y cáncer gástrico^{141,142}, así como niveles elevados de IFN- γ se asocian a mejores respuestas clínicas a terapias adyuvantes en cáncer cervicouterino¹⁴³. La ausencia de una mayor respuesta citotóxica en PBL estimulado con TAPCells puede deberse a una baja proporción de CTL antígeno-específico después de dos ciclos de estimulación, y probablemente se requiere un mayor número de reestimulaciones para inducir su proliferación y observar resultados significativos. Otra explicación es que, a pesar del pre-tratamiento con IFN- γ , la línea LnCap expresaba como mecanismo de escape tumoral bajos niveles de moléculas MHC y antígenos, disminuyendo el reconocimiento por parte de LT. Sin embargo, las respuestas inmunológicas y clínicas observadas pueden ser explicadas por la inducción de LT productores de IFN- γ , ya que una mayor producción de esta citoquina puede “reactivar” CTL tumor-específicos que se encuentran suprimidos por los diferentes mecanismos de

evasión presentes en el microambiente tumoral, rompiendo la tolerancia inmune generada por el cáncer.

La capacidad de inducir una respuesta inmune contra lisado tumoral, observada *in vivo* mediante test de DTH, muestra que TAPCells cargadas con lisado tumoral de próstata son funcionalmente activas en pacientes; la proporción de pacientes con respuesta DTH positiva (respondedores inmunológicos) es similar a estudios previos en pacientes con melanoma avanzado^{76,78}. El test de DTH es el principal método de monitoreo inmunológico *in vivo* utilizado en los estudios clínicos¹²⁶. Esta respuesta es mediada por la activación específica de LT CD4⁺ de memoria, que producen citoquinas del perfil de respuesta Th1, como IFN- γ , reclutando células inflamatorias y, principalmente, LT CD8⁺, 24 a 48 horas después de la inoculación del antígeno¹⁴⁴. Algunos estudios han sugerido que el test de DTH no es un buen método de evaluación de la respuesta inmune, por ser difícil de estandarizar y puede representar una respuesta inflamatoria contra compuestos no antigénicos. Sin embargo, es un método reproducible, de bajo costo y ha demostrado en algunos casos ser un factor predictor pronóstico de respuesta en inmunoterapia en cáncer^{78,126}. En publicaciones previas de nuestro grupo, en melanoma maligno, un 60% de los pacientes tratados con células presentadoras de antígenos cargadas con TRIMEL (DCs o TAPCells) mostraron un test de DTH positivo contra lisado tumoral, correlacionándose el test de DTH con un incremento en la mediana de supervivencia general^{76,78}. En el actual estudio, observamos una proporción similar de pacientes con respuesta de DTH positiva contra lisado tumoral de próstata, alrededor de un 60% (pacientes denominados “respondedores inmunológicos”); más aún, se observó que todo los

pacientes que mostraron un descenso significativo del PSA (mayor a un 30% del basal) fueron pacientes respondedores inmunológicos, así como también los pacientes respondedores presentaron un aumento significativo del tiempo de duplicación del PSA (PSADT). Ambos factores, descenso del PSA e incremento del PSADT, se asocian a estabilización de la enfermedad y mayor sobrevida en CPRC^{128,129}. Se puede inferir que una respuesta DTH positiva podría reflejar potente proliferación y activación de LT CD4⁺ de memoria inducida por TAPCells. La función de estos LT CD4⁺ helper es fundamental para la diferenciación y activación de LT CD8⁺ de memoria (Tm), y en una respuesta DTH estos últimos son reclutados al sitio de inoculación antigénica, indicando la participación de estas células de memoria en la respuesta inmune¹⁴⁵. En resultados de nuestro laboratorio, se ha observado que los pacientes tratados con TAPCells muestran un incremento de la proporción de Tm productores de IFN- γ , población relacionada con una respuesta DTH positiva, lo que puede explicar que la mayor parte de los pacientes tratados sean respondedores inmunológicos¹⁴⁶. Más importante aún, a los Tm IFN- γ ⁺ se les atribuye gran parte de la capacidad de respuesta inmune antitumoral, explicando tal vez las respuestas bioquímicas observadas en este estudio¹⁴⁷. Adicionalmente, como utilizamos lisado tumoral como fuente antigénica, el test de DTH es buen método de evaluación de respuesta inmune en este caso. Al contrario de diversos estudios que mencionan a la medición de producción de IFN- γ mediante ELISPOT como un método de evaluación de respuesta inmune¹²⁷, el uso de lisados tumorales como fuente antigénica limitan su utilidad como forma de monitoreo. En nuestro grupo de pacientes, un 50% de los pacientes mostró después del tratamiento una mayor secreción de IFN- γ por parte de LT de sangre periférica. Sin embargo, no encontramos relación entre los resultados de

ensayos de ELISPOT para secreción de IFN- γ con la respuesta inmunológica *in vivo* (DTH) ni con las respuestas bioquímicas observadas. La mayoría de los estudios que sugieren el uso de ELISPOT como técnica de inmunomonitorización utilizan péptidos como antígenos, por lo que no son comparables a nuestros resultados.

En inmunoterapia basada en DCs, las propiedades del adyuvante utilizado son fundamentales, ya que debe generar un ambiente proinflamatorio adecuado para una correcta inducción de una respuesta inmune¹⁴⁸. Principalmente, se requiere una activación de una respuesta Th1 para la generación de memoria inmunológica contra tumor¹⁴⁹. En este estudio se utilizó como adyuvante Immunocyanin, hemocianina aislada del loco chileno (*Concholepas concholepas*). En un modelo murino, Immunocyanin demostró una mejor inducción de citoquinas Th1 comparado con KLH, hemocianina ampliamente utilizada como adyuvante¹⁵⁰. Nuestros resultados muestran que Immunocyanin es capaz de generar una respuesta inmune medida por test de DTH en todos los pacientes, sin presentar eventos adversos relacionados al compuesto.

En relación a la toxicidad, este estudio demuestra que el uso de TAPCells cargadas con lisado tumoral de próstata en el tratamiento de pacientes con CPRC es un tratamiento seguro, ya que los pacientes tratados no presentaron eventos adversos grado 3 o mayor atribuibles a la terapia, y los escasos efectos secundarios fueron leves y autolimitados. El único evento adverso grado 3 observado fue un cuadro de paraparesia de extremidades inferiores, no

atribuible al tratamiento, y explicado por compresión medular secundaria a la presencia de lesiones metastásicas en columna lumbar. Los niveles de toxicidad observados son muy bajos para lo frecuentemente observado en terapias oncológicas: como mencionamos, los agentes quimioterápicos presentan un 30% de episodios de toxicidad grado 3 o mayor³⁹⁻⁴¹. Sipuleucel-T también mostró que un tercio de los pacientes tratados presentó toxicidad grado 3, probablemente por efecto de GM-CSF¹⁰⁶. Incluso los nuevos agentes antiandrogénicos en investigación, abiraterona y MDV3100 muestran hasta un 10% de toxicidad grado 3^{151,152}, por lo que la seguridad mostrada por el tratamiento con TAPCells es un resultado ventajoso. Un hallazgo llamativo en la toxicidad fue el aumento de náuseas y vómitos detectado por el cuestionario de calidad de vida. Los síntomas eméticos son uno de los síntomas más frecuentes en pacientes con cáncer, ya que hasta 60% pacientes con cáncer presenta náuseas y un 30% vómitos. Una de las explicaciones es la disminución del vaciamiento gástrico y enlentecimiento del tránsito intestinal que presentan los pacientes con cáncer¹⁵³. Así mismo, el uso de opiodes es un factor determinante en la presencia de dichos síntomas¹⁵⁴. En este estudio, observamos que el aumento de la sintomatología emética durante el tratamiento se presentaba en los pacientes que estaban usando opiodes en el manejo del dolor oncológico. En general, estudios previos utilizando DCs en el tratamiento de cáncer de próstata no han descrito las náuseas y vómitos como un síntoma frecuente, exceptuando el estudio IMPACT, estudio Fase III de Sipuleucel-T, donde un 28% de los pacientes presentó náuseas y 17,8% vómitos¹⁰⁶. Sin embargo, el uso de GM-CSF, específicamente en cáncer renal, ha mostrado ser causante de náuseas y vómitos como efecto adverso, lo que podría explicar la presencia de los síntomas mencionados en el estudio IMPACT¹⁵⁵.

Con respecto de la calidad de vida de los pacientes tratados, el objetivo principal de este estudio era demostrar que la inmunoterapia con TAPCells no empeora la calidad de vida de los pacientes. Utilizando el cuestionario QLQ-C30 de la EORTC, observamos que, durante el tratamiento, los pacientes no mostraron cambios en las escalas funcionales ni de calidad de vida global. Aunque el objetivo ideal es mejorar la calidad de vida de los pacientes tratados, la terapia no empeora estos indicadores. La ausencia de un efecto positivo en dichos indicadores se puede explicar por los altos niveles en las escalas funcionales que presentaron los pacientes al inicio del tratamiento, debido a la selección de los pacientes a tratar (criterio de inclusión “performance status” ECOG 0 o 1). Este es un detalle fundamental al analizar otros estudios en el tratamiento del CPRC, ya que los resultados positivos observados en quimioterapia y Sipuleucel-T se restringen a este grupo de pacientes con un buen estado general basal^{39-41,106}, que no representa en muchos casos los pacientes que son tratados en la clínica a diario, y probablemente, por la toxicidad de dichos tratamientos, pacientes en peores condiciones generales no presenten los beneficios observados en los estudios clínicos.

Aunque se trata de un objetivo secundario, los resultados observados en la respuesta clínica son promisorios, ya que un descenso significativo de los niveles de PSA no han sido descritos en otros estudios que han investigado el uso de DCs. En nuestro estudio, 6 de 14 pacientes mostraron un descenso de niveles de PSA sérico mayor a un 30% del basal, con 2 pacientes mostrando descensos mayores a un 50%. De la misma forma, el aumento del PSADT presentado por todos los pacientes respondedores inmunológicos, alcanzando una mediana de 12 meses, sugiere que la inmunoterapia TAPCells tendría la capacidad de lograr

una estabilización de la enfermedad. Similar a nuestros estudios previos en melanoma, la respuesta clínica medible, en este caso evaluada por descenso del PSA sérico y aumento del PSADT, es significativamente mayor en los pacientes respondedores DTH positivos, reforzando la utilidad del test de DTH como método de seguimiento en los pacientes tratados con esta terapia^{76,78,126}. A pesar del notable aumento en la sobrevida, en el estudio de Sipuleucel-T no se observaron respuestas bioquímicas ni clínicas, así como tampoco una mejoría en la sobrevida libre de progresión¹⁰⁶. Estos datos nos hacen reflexionar en cuanto a que, a pesar de no generar respuestas clínicas medibles, el tratamiento con Sipuleucel-T logra un significativo aumento de la sobrevida general en paciente portadores de CPRC; en ese sentido, debido al establecido factor pronóstico que tienen el PSA y el PSADT en CPRC, es esperable que la inmunoterapia con TAPCells cargadas con un lisado tumoral de próstata provoque un efecto positivo en la sobrevida general. Sin embargo, para poder demostrar esta afirmación, es fundamental desarrollar un estudio clínico con un mayor número de pacientes y con un seguimiento de al menos 3 años.

El rol de los LT reguladores como mecanismo de escape tumoral se encuentra claramente establecido¹²². Su capacidad de inhibir tanto la respuesta de LT efectores como la acción de células presentadoras de antígeno bloquean una respuesta inmune efectiva contra tumor¹²². La depleción de LT reguladores, tanto selectiva mediante anticuerpos anti-CD25 como por el uso de agentes citotóxicos ayudantes, aumenta el rechazo espontáneo de tumores y mejora la respuesta con distintas estrategias inmunes antitumorales, como transferencia adoptiva, inmunoterapia basada en DCs o uso de anticuerpos monoclonales^{156,157}. Reportes

recientes han sugerido que inmunoterapias usando DCs como estrategia antitumoral inducen la proliferación de LT reguladores periféricos, principalmente en melanoma y cáncer de células renales^{130,131}. Resultados previos de nuestro grupo, en pacientes portadores de melanoma maligno tratados con TAPCells, mostraban una correlación entre ausencia de respuesta inmune contra lisado tumoral, peor sobrevida y mayor proporción de LT reguladores de la población Th3 en sangre periférica⁷⁸. Si este aumento de los LT reguladores productores de TGF- β es consecuencia del tratamiento o es la evolución natural de los pacientes no está aclarado. Sin embargo, la citoquina TGF- β ha sido asociada como un mecanismo de supresión de la función de DCs inducida por LT reguladores¹⁵⁸, lo que podría explicar una ausencia de respuesta DTH por una supresión de las DCs utilizadas como tratamiento por altos niveles de TGF- β en los pacientes. Al mismo tiempo, las características fenotípicas y funcionales similares a DCs maduras que presentan TAPCells hacen poco probable que sean éstas responsables de la inducción y proliferación de LT reguladores Th3. En este estudio buscamos evaluar si los pacientes tratados con TAPCells cargadas con lisado tumoral de próstata presentaban algún cambio en las distintas subpoblaciones de LT reguladores en sangre periférica después de completado el tratamiento. No observamos diferencias en ninguna de las poblaciones de LT reguladores antes y después del tratamiento, tanto LT reguladores naturales (CD4⁺ Foxp3⁺), como Th3 (CD4⁺ TGF- β ⁺), Tr1 (CD4⁺ IL-10⁺) ni LT reguladores CD8⁺ Foxp3⁺, así como tampoco una relación entre respuesta inmune o presencia de metástasis y proporción de las diferentes poblaciones de LT reguladores evaluadas. En un estudio utilizando células tumorales alogénicas como tratamiento en cáncer de próstata, Derhovanessian y colaboradores mostraron que la terapia no induce LT reguladores, así como la respuesta inmune y clínica

tampoco están relacionadas con la proporción de éstos LT en sangre periférica de los pacientes¹⁵⁹. Vergati tampoco observó una diferencia entre LT reguladores e inmunización con células tumorales alogénicas, aunque se observó una tendencia a que los pacientes con mayor sobrevida presentaron menos LT reguladores CD4⁺ Foxp3⁺ en sangre periférica después de la terapia¹⁶⁰. Tal como fue descrito previamente, el protocolo de generación de TAPCells logra producir células presentadoras de antígenos con alta expresión de marcadores de maduración y activación, así como secreción de citoquinas activadoras, lo que disminuye la probabilidad de inducción de respuestas tolerogénicas y proliferación de LT reguladores. Además, es importante mencionar que estos resultados son determinación de LT reguladores en sangre periférica, y en ningún caso representan la situación de estos reguladores en el microambiente tumoral, donde producen su real efecto supresor sobre la respuesta inmune.

Un punto importante, relacionado con las diferencias en las respuestas observadas al tratamiento, tanto inmunológicas como bioquímicas, puede ser explicado por la diferencia en la condición clínica de los pacientes reclutados. Nuestros pacientes mostraban condiciones clínica muy diferentes entre ellos, como un amplio rango de PSA sérico del grupo de pacientes al ingreso, no todos presentaban enfermedad metastásica y algunos recibieron terapias hormonales de segunda línea. Como fue mencionado, el cáncer próstata resistente a la castración (CPRC) incluye a un grupo heterogéneo de pacientes, donde las células tumorales pueden presentar una dependencia hormonal muy diferente paciente a paciente; esto se ve reflejado en respuestas a terapias hormonales de segunda línea variables e impredecibles, condicionando a que esta diferente condición de respuesta hormonal repercute en el estado

oncológico¹⁶¹. Se ha descrito que estado hormonal de los pacientes puede afectar la respuesta inmune: la terapia de deprivación androgénica (TDA) induce un aumento de LT en sangre periférica, así como una mayor infiltración de LT CD8⁺ intratumorales¹⁶². Sin embargo, aparentemente esta mayor respuesta inmune es inicial y transitoria durante la castración, ya que un estado prolongado de deprivación androgénica favorece la proliferación de Treg¹⁶³; en ese sentido, la TDA prolongada favorecería un mecanismo inmune de escape tumoral, actuando como un factor adicional en la progresión de la enfermedad en los pacientes en estado de resistencia a la castración¹⁶³. En nuestro grupo de pacientes tratados, estos distintos estadios hormonales pueden implicar una mayor o menor respuesta inmune inducida por la terapia con TAPCells. Sin embargo, a pesar de las diferencias entre los pacientes incluidos, la presencia de respuesta DTH positiva a lisado tumoral en la mayor parte del grupo tratado refleja la capacidad de TAPCells de inducir una respuesta inmune efectiva.

En conclusión, este estudio demuestra que TAPCells cargadas con lisado tumoral de próstata son células presentadoras de antígenos funcionalmente activas, capaces de generar una respuesta inmune específica tanto *in vivo* como *in vitro*, y con la habilidad de lograr en algunos pacientes respuestas clínicas, manifestadas como un descenso significativo de los niveles séricos de PSA. Al mismo tiempo, la terapia muestra un perfil de seguridad y toxicidad aceptables, sin observar toxicidad grave (Grado 3 o mayor) atribuible a la terapia. Estos resultados sugieren una probable utilidad de TAPCells en el tratamiento del CPRC, aunque es absolutamente necesario continuar la investigación con esta terapia en estudios Fase II y III,

reclutando un mayor número de pacientes y comparándola con las mejores terapias disponibles hoy en día para estos pacientes.

REFERENCIAS

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>, consultado el 21 de agosto de 2012.
2. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60:277-300.
3. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010; 46:765-81.
4. Corti D, Foneron A, Troncoso L, Ebel L, Marchetti P, Muñoz N. Epidemiología del cáncer de próstata. Provincia de Valdivia, 1990-2000. *Rev Chil Urol* 2002; 63:211-4.
5. Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol* 2012; 13:790-801.
6. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe. *Ann Oncol* 2005; 6:481-488.
7. Newcomer LM, Stanford JL, Blumenstein BA, Brawer MK. Temporal trends in rates of prostate cancer: declining incidence of advanced stage disease. *J Urol* 1997; 158:1427-1430.
8. Levi F, Luccini F, Negri E, Boyle P, La Vecchia C. Leveling of prostate cancer mortality in western Europe. *Prostate* 2004; 60:46-52.
9. DEIS, MINSAL Defunciones por Tumores Malignos según Sexo, Chile 2000-2009. Disponible en: [http://http://deis.minsal.cl/vitales/defunciones_serie/Defunciones Mortalidad Tumores Malignos 2000-2009.htm](http://http://deis.minsal.cl/vitales/defunciones_serie/Defunciones_Mortalidad_Tumores_Malignos_2000-2009.htm), consultado el 13 de diciembre de 2012.
10. Pienta KJ, Esper PS. Risk factors for prostate cancer. *Ann Intern Med* 1993; 118:793-803.
11. Gronberg H, Damber L, Damber JE. Familial prostate cancer in Sweden. A nationwide register cohort study. *Cancer* 1996; 77:138-143.
12. Gronberg H, Damber L, Damber JE. Studies of genetic factors in prostate cancer in a twin population. *J Urol* 1994; 52:1484-1487.
13. Zaridze DG, Boyle P, Smans M. International trends in prostatic cancer. *Int J Cancer* 1984; 33:223- 230.

14. Kolonel LN, Altshuler D, Henderson BE. The multiethnic cohort study: exploring genes, lifestyle and cancer risk. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:519-527.
15. Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW. Prostate specific antigen: a decade of discovery – what we have learned and where we are going. *J Urol* 1999; 162:293-306.
16. Carvalhal GF, Smith DS, Mager DE, Catalona WJ. Digital rectal examination for detecting prostate cancer at prostate specific antigen levels of 4 ng/mL or less. *J Urol* 1999; 161:835-839.
17. Thompson IM, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Miller GJ, Ford LG, Lieber MM, Cespedes RD, Atkins JN, Lippman SM, Carlin SM, Ryan A, Szczepanek CM, Crowley JJ, Coltman CA. The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *N Engl J Med* 2003; 349:215–224.
18. Eskew LA, Bare RL, McCullough DL. Systemic 5 region prostate biopsy is superior to sextant method for diagnosing carcinoma of the prostate. *J Urol* 1997; 157:199-202.
19. Han M, Partin AW, Pound CR, Epstein JI, Walsh PC. Long-term biochemical disease-free and cancer specific survival following anatomic radical retropubic prostatectomy. The 15-year Johns Hopkins experience. *Urol Clin North Am* 2001; 28: 555-565.
20. Catalona WJ, Smith DJ. 5-year tumour recurrence rates after anatomical radical retropubic prostatectomy for prostate cancer. *J Urol* 1994; 152:1837-1842.
21. Fowler FJ, Barry MJ, Lu-Yao G, Wasson JH, Bin L. Outcomes of external beam radiation therapy for prostate cancer: a study of Medicare beneficiaries in three surveillance epidemiology and end results areas. *J Clin Oncol* 1996; 14:2258-2265.
22. Potters C, Morgenstern C, Calugaru E, Fearn R, Jassal A, Presser J, Mullen E. 12-year outcomes following permanent prostate brachytherapy in patients with clinically localized prostate cancer. *J Urol* 2005; 173:1562-1566.
23. Bott SRJ. Management of recurrent disease after radical prostatectomy. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2004; 7:211–216.
24. Moul JW, Wu H, Sun L, McLeod DG, Amling CL, Donahue T, Kusuda L, Sexton W, O'Reilly K, Hernandez J, Chung A, Soderdahl D. Early versus delayed hormonal therapy for prostate specific antigen only recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy. *J Urol* 2004; 171:1141–1147.
25. Messing E, Manola J, Sarosdy M, Wilding G, Crawford ED, Trump D. Immediate hormonal therapy compared with observation after radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy in men with node-positive prostate cancer. *New Engl J Med* 1999; 341:1781-1788.

26. Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatase in metastatic carcinoma of the prostate. *J Urol* 2002; 167:948-951.
27. Walsh PC. Physiologic basis for hormonal therapy in carcinoma of the prostate. *Urol Clin North Am* 1975; 2:125-140.
28. Silver RI, Wiley EL, Davis DL, Thigpen AE, Russell DW, McConnell JD. Expression and regulation of steroid 5-a-reductase 2 in prostate disease. *J Urol* 1994; 152:433-437.
29. Melton LJ 3rd, Alothman KI, Achenbach SJ, O'Fallon WM, Zincke H. Decline in bilateral orchiectomy for prostate cancer in Olmsted county, Minnesota, 1956-2000. *Mayo Clinic Proc* 2001; 76:1199-1203.
30. Schally AV. Luteinizing hormone-releasing hormone analogs: their impact on the control of tumourigenesis. *Peptides* 1999; 20:1247-1262.
31. Seidenfeld J, Samson DJ, Hasselblad V, Aronson N, Albertsen PC, Bennett CL, Wilt TJ. Single-therapy androgen suppression in men with advanced prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2000; 132:566-577.
32. McLeod DG. Hormonal therapy: historical perspective to future directions. *Urology* 2003; 61:3-7.
33. Sharifi N, Gulley JL, Dahut WL. Androgen deprivation therapy for prostate cancer. *JAMA* 2005; 294:238-44.
34. Taplin ME, Bubley GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK, Keer HN, Balk SP. Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med* 1995; 332:1393-1398.
35. Bubley GJ, Carducci M, Dahut W, Dawson N, Daliani D, Eisenberger M, Figg WD, Freidlin B, Halabi S, Hudes G, Hussain M, Kaplan R, Myers C, Oh W, Petrylak DP, Reed E, Roth B, Sartor O, Scher H, Simons J, Sinibaldi V, Small EJ, Smith MR, Trump DL, Wilding G et al. Eligibility and response guidelines for phase II clinical trials in androgen-independent prostate cancer: recommendations from the Prostate-Specific Antigen Working Group. *J Clin Oncol* 1999; 17:3461-3467.
36. Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason M, Matveev V, Schmid HP, Van der Kwast T, Wiegel T, Zattoni F, Heidenreich A. EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol* 2011; 59:572-83.
37. Oh WK, Kantoff PW. Management of hormone refractory prostate cancer: current standards and future prospects. *J Urol* 1998; 160:1220-9.
38. Yagoda A, Petrylak D. Cytotoxic chemotherapy for advanced hormoneresistant prostate cancer. *Cancer* 1993; 71:1098-1109.

39. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Théodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA, Eisenberger MA; TAX 327 Investigators. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* 2004; 351:1502-12.
40. Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN Jr, Jones JA, Taplin ME, Burch PA, Berry D, Moinpour C, Kohli M, Benson MC, Small EJ, Raghavan D, Crawford ED. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med* 2004; 351:1513-20.
41. de Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, Hansen S, Machiels JP, Kocak I, Gravis G, Bodrogi I, Mackenzie MJ, Shen L, Roessner M, Gupta S, Sartor AO; TROPIC Investigators. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet* 2010; 376:1147-54.
42. Pain S. Dr Coley's Famous Fever. *New Scientist*. "Spontaneous regression: a hidden treasure buried in time by Hopton Cann". *Medical Hypotheses* 2002; 58:115.
43. Klein G. Immune surveillance—A powerful mechanism with a limited range. *Natl Cancer Inst* 1976; 44:109–113.
44. Prehn RT, Main JM. Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 1957; 18:769-78.
45. Klein G, Sjogren HO, Klein E, Hellstrom KE. Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res* 1960; 20:1561-72.
46. Itoh K, Platsoucas DC, Balch CM. Autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in the infiltrate of human metastatic melanomas: activation by interleukin 2 and autologous tumor cells and involvement of the T cell receptor. *J Exp Med* 1988; 168:1419-41.
47. Topalian SL, Solomon D, Rosenberg SA. Tumor-specific cytolysis by lymphocytes infiltrating human melanomas. *J Immunol* 1989; 142:3714-25.
48. Barth RJ, Jr., Mule JJ, Spiess PJ, Rosenberg SA. Interferon gamma and tumor necrosis factor have a role in tumor regressions mediated by murine CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 1991; 173:647-58.
49. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392:245-52.
50. Steinman RM. Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS* 2003; 111:675-97.
51. Hart, D.N. Dendritic cells: Unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997; 90: 3245-87.

52. Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:275–306.
53. Robinson SP, Patterson S, English N, Davies D, Knight SC, Reid CD. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999; 29:1743-51.
54. Palucka K, Ueno H, Roberts L, Fay J, Banchereau J. Dendritic cells: are they clinically relevant? *Cancer J* 2010; 16:318-24.
55. Bonasio R, von Andrian UH. Generation, migration and function of circulating dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 2006; 18:503-11.
56. Lechmann M, Berchtold S, Hauber J, Steinkasserer A. CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends Immunol* 2002; 23:273–5.
57. Shin T, Kennedy G, Gorski K, Tsuchiya H, Koseki H, Azuma M, Yagita H, Chen L, Powell J, Pardoll D, Housseau F. Cooperative B7–1/2 (CD80/CD86) and B7-DC costimulation of CD4+ T cells independent of the PD-1 receptor. *J Exp Med* 2003; 198:31–8.
58. 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. *J Exp Med* 2003; 198:111–22.
59. Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, Hintzen G, Kiafard Z, Zwirner J, Blankenstein T, Henning G, Förster R. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* 2004; 21:279–88.
60. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:767-811.
61. Zinkernagel RM. On cross-priming of MHC class I-specific CTL: rule or exception? *Eur J Immunol* 2002; 32: 2385-92.
62. Ackerman AL, Kyritsis C, Tampé R, Cresswell P. Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:12889–94.
63. Groh V, Li YQ, Cioca D, Hunder NN, Wang W, Riddell SR, Yee C, Spies T. Efficient cross-priming of tumor antigen-specific T cells by dendritic cells sensitized with diverse anti-MICA opsonized tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:6461-6.

64. Berard F, Blanco P, Davoust J, Neidhart-Berard EM, Nouri-Shirazi M, Taquet N, Rimoldi D, Cerottini JC, Banchereau J, Palucka AK. Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. *J Exp Med* 2000; 192:1535-44.
65. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007; 449:819–826.
66. Jonuleit H, Kühn U, Müller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH. Proinflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 1997; 27:3135-42
67. Bianchi ME. PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007; 81:1–5.
68. Matzinger P. Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nat Immunol* 2007; 8:11-30.
69. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* 2007; 81:28-37.
70. Obeid M, Tesnierel A, Ghiringhelli F, Fimia G, Apetoh L, Jean-Luc Perfettini J, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, Metivier D, Larochette N, Van Endert P, Ciccocanti F, Piacentini M, Zitvogel L, Kroemer G. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nature Medicine* 2007; 13:54–61.
71. Escobar A, López M, Serrano A, Ramirez M, Pérez C, Aguirre A, González R, Alfaro J, Larrondo M, Fodor M, Ferrada C, Salazar-Onfray F. Dendritic cell immunizations combined with low doses interleukin-2 induce specific immune responses in melanoma patients. *Clin Exp Immunol* 2005;142:555-68.
72. Su Z, Dannull J, Heiser A, Yancey D, Pruitt S, Madden J, Coleman D, Niedzwiecki D, Gilboa E, Vieweg J. Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res* 2003; 63:2127–33.
73. Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis TA, Hsu FJ, Benike C, Hao ZM, Taidi B, Rajapaksa R, Caspar CB, Okada CY, van Beckhoven A, Liles TM, Engleman EG, Levy R. Idiotypic-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood* 2002; 99:1517–26.
74. Fearnley DB, Whyte LF, Carnoutsos SA, Cook AH, Hart DN. Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation. *Blood* 1999; 93:728-36.
75. Thurner B, Röder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M, Glaser A, Keikavoussi P, Kämpgen E, Bender A, Schuler G. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods* 1999; 223:1–15.

76. Aguilera R, Saffie C, Tittarelli A, González FE, Ramírez M, Reyes D, Pereda C, Hevia D, García T, Salazar L, Ferreira A, Hermoso M, Mendoza-Naranjo A, Ferrada C, Garrido P, López MN, Salazar-Onfray F. Heat-shock induction of tumor-derived danger signals mediates rapid monocyte differentiation into clinically effective dendritic cells. *Clin Cancer Res* 2011; 17:2474-83.
77. Tittarelli A, González FE, Pereda C, Mora G, Muñoz L, Saffie C, García T, Díaz D, Falcón C, Hermoso M, López MN, Salazar-Onfray F. Toll-like receptor 4 gene polymorphism influences dendritic cell in vitro function and clinical outcomes in vaccinated melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2012 May 3. [Epub ahead of print]
78. López MN, Pereda C, Segal G, Muñoz L, Aguilera R, González FE, Escobar A, Ginesta A, Reyes D, González R, Mendoza-Naranjo A, Larrondo M, Compán A, Ferrada C, Salazar-Onfray F. Prolonged survival of dendritic cell-vaccinated melanoma patients correlates with tumor-specific delayed type IV hypersensitivity response and reduction of tumor growth factor beta-expressing T cells. *J Clin Oncol* 2009; 27: 945-52.
79. Stevanovic S. Identification of tumour-associated T-cell epitopes for vaccine development. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:514-20.
80. Li TS, Beling CG. Isolation and characterization of two specific antigens of human seminal plasma. *Fertil Steril* 1973; 24:134-144.
81. Lundwall A, Lilja H. Molecular cloning of human prostate specific antigen cDNA. *FEBS Lett* 1987; 214:317-22.
82. Oesterling JE. Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. *J Urol* 1991; 145:907-23.
83. Lam KW, Li CY, Yam LT, Sun T, Lee G, Ziesmer S. Improved immunohistochemical detection of prostatic acid phosphatase by a monoclonal antibody. *Prostate* 1989; 15:13-21.
84. Xue BH, Zhang Y, Sosman JA, Peace DJ. Induction of human cytotoxic T lymphocytes specific for prostate specific antigen. *Prostate* 1997; 30:73-8.
85. Peshwa MV, Shi JD, Ruegg C, Laus R, van Schooten WC. Induction of prostate tumor-specific CD8C cytotoxic T-lymphocytes in vitro using antigen-presenting cells pulsed with prostatic acid phosphatase peptide. *Prostate* 1998; 36:129-38.
86. Fair WR, Israeli RS, Heston WD. Prostate-specific membrane antigen. *Prostate* 1997; 32:140-8.

87. Reiter RE, Gu Z, Watabe T, Thomas G, Szigeti K, Davis E, Wahl M, Nisitani S, Yamashiro I, Le Beau MM, Loda M, Witte ON. Prostate stem cell antigen: a cell surface marker overexpressed in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:1735–40.
88. Kalos M, Askaa J, Hylander BL, Repasky EA, Cai F, Vedvick T, Reed SG, Wright GL Jr, Fanger GR. Prostein expression is highly restricted to normal and malignant prostate tissues. *Prostate* 2004; 60:246-56.
89. Kiessling A, Füßel S, Schmitz M, Stevanovic S, Meye A, Weigle B, Klenk U, Wirth MP, Rieber EP. Identification of an HLA-A*0201-restricted T-cell epitope derived from the prostate cancer-associated protein trp-p8. *Prostate* 2003; 56:270-9.
90. Kuhn EJ, Kurnot RA, Sesterhenn TA, Chang EH, Moul JW. Expression of the c-erbB-2 (HER-2/neu) oncoprotein in human prostatic carcinoma. *J Urol* 1993; 150:1427–33.
91. Craft N, Shostak Y, Carey M, Sawyers CL. A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase. *Nat Med* 1999; 5:280–5.
92. Chen ME, Lin SH, Chung LW, Sikes RA. Isolation and characterization of PAGE-1 and GAGE-7. New genes expressed in the LNCaP prostate cancer progression model that share homology with melanoma-associated antigens. *J Biol Chem* 1998; 273:17618–25.
93. Schuler-Thurner, B., et al., Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide- loaded monocyte-derived dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 195:1279–88.
94. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2:52-8.
95. Thumann P, Moc I, Humrich J, Berger TG, Schultz ES, Schuler G, Jenne L. Antigen loading of dendritic cells with whole tumor cell preparations. *J Immunol Methods* 2003; 277:1–16.
96. Heiser A, Coleman D, Dannull J, Yancey D, Maurice MA, Lallas CD, Dahm P, Niedzwiecki D, Gilboa E, Vieweg J. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest* 2002; 109:409-17.
97. Neller MA, López JA, Schmidt CW. Antigens for cancer immunotherapy. *Semin Immunol* 2008; 20:286-95.
98. Murphy GP, Tjoa B, Ragde H, Kenny G, Boynton A. Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. *Prostate* 1996; 29:371-380.

99. Tjoa BA, Simmons SJ, Elgamal A, Rogers M, Ragde H, Kenny GM, Troychak MJ, Boynton AL, Murphy GP. Follow-up evaluation of a phase II prostate cancer vaccine trial. *Prostate* 1999; 40:125-9.
100. Perambakam S, Hallmeyer S, Reddy S, Mahmud N, Bressler L, DeChristopher P, Mahmud D, Nunez R, Sosman JA, Peace DJ. Induction of specific T cell immunity in patients with prostate cancer by vaccination with PSA146-154 peptide. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55:1033-42.
101. Thomas-Kaskel AK, Zeiser R, Jochim R, Robbel C, Schultze-Seemann W, Waller CF, Veelken H. Vaccination of advanced prostate cancer patients with PSCA and PSA peptide-loaded dendritic cells induces DTH responses that correlate with superior overall survival. *Int J Cancer* 2006; 119:2428-34.
102. Fuessel S, Meye A, Schmitz M, Zastrow S, Linné C, Richter K, Löbel B, Hakenberg OW, Hoelig K, Rieber EP, Wirth MP. Vaccination of hormone-refractory prostate cancer patients with peptide cocktail-loaded dendritic cells: results of a phase I clinical trial. *Prostate* 2006; 66:811-21.
103. Su Z, Dannull J, Yang BK, Dahm P, Coleman D, Yancey D, Sichi S, Niedzwiecki D, Boczkowski D, Gilboa E, Vieweg J. Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer. *J Immunol*. 2005; 174:3798-807.
104. Mu LJ, Kyte JA, Kvalheim G, Aamdal S, Dueland S, Hauser M, Hammerstad H, Waehre H, Raabe N, Gaudernack G. Immunotherapy with allotumour mRNA-transfected dendritic cells in androgen-resistant prostate cancer patients. *Br J Cancer* 2005; 93:749-56.
105. Pandha HS, John RJ, Hutchinson J, James N, Whelan M, Corbishley C, Dalgleish AG. Dendritic cell immunotherapy for urological cancers using cryopreserved allogeneic tumour lysate-pulsed cells: a phase I/II study. *BJU Int* 2004; 94:412-8.
106. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, Redfern CH, Ferrari AC, Dreicer R, Sims RB, Xu Y, Frohlich MW, Schellhammer PF; IMPACT Study Investigators. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 2010; 363:411-22.
107. Sonpavde G, Di Lorenzo G, Higano CS, Kantoff PW, Madan R, Shore ND. The role of sipuleucel-T in therapy for castration-resistant prostate cancer: a critical analysis of the literature. *Eur Urol* 2012; 61:639-47.
108. Cheever MA, Higano CS. PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. *Clin Cancer Res* 2011; 17:3520-6.
109. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155:1151-64.

110. Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 2005; 6:331-7 .
111. Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:423–49.
112. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+ CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6:345-52.
113. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, June CH. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2001; 61:4766–72.
114. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 2002; 169:2756–61.
115. Viguier M, Lemaitre F, Verola O, Cho MS, Gorochov G, Dubertret L, Bachelez H, Kourilsky P, Ferradini L. Foxp3 expressing CD4(+) CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 2004; 173:1444–53.
116. Okita R, Saeki T, Takashima S, Yamaguchi Y, Toge T. CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with breast cancer and non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2005; 14:1269-73.
117. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65:2457-64.
118. Miller AM, Lundberg K, Ozenci V, Banham AH, Hellström M, Egevad L, Pisa P. CD4+CD25high T Cells Are Enriched in the Tumor and Peripheral Blood of Prostate Cancer Patients. *J Immunol* 2006; 177: 7398-405.
119. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; 10:942-9.
120. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 2001; 182:68-79.
121. Zheng SG, Gray JD, Ohtsuka K, Yamagiwa S, Horwitz DA. Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. *J Immunol* 2002; 169:4183-9.

122. Mougiakakos D, Choudhury A, Lladser A, Kiessling R, Johansson CC. Regulatory T cells in cancer. *Adv Cancer Res* 2010; 107:57-117.
123. López M, Aguilera R, Pérez C, Mendoza-Naranjo A, Pereda C, Ramirez M, Ferrada C, Aguilón JC, Salazar-Onfray F. The role of regulatory T lymphocytes in the induced immune response mediated by biological vaccines. *Immunobiology* 2006; 211:127-36.
124. Fayers PM, Aaronson NK, Bjordal K, Groenvold M, Curran D, Bottomley A on behalf of the EORTC Quality of Life Group. *EORTC QLQ-C30 Scoring Manual (3rd edition)*. Brussels: EORTC, 2001.
125. Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13, 95–109.
126. de Vries IJ, Bernsen MR, Lesterhuis WJ, Scharenborg NM, Strijk SP, Gerritsen MJ, Ruiter DJ, Figdor CG, Punt CJ, Adema GJ. Immunomonitoring tumor-specific T cells in delayed-type hypersensitivity skin biopsies after dendritic cell vaccination correlates with clinical outcome. *J Clin Oncol* 2005; 23:5779-87.
127. Whiteside TL, Zhao Y, Tsukishiro T, Elder EM, Gooding W, Baar J. Enzyme-linked immunospot, cytokine flow cytometry, and tetramers in the detection of T-cell responses to a dendritic cell-based multipptide vaccine in patients with melanoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9:641-9.
128. Robinson D, Sandblom G, Johansson R, Garmo H, Aus G, Hedlund PO, Varenhorst E; Scandinavian Prostate Cancer Group. PSA kinetics provide improved prediction of survival in metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Urology* 2008; 72:903-7.
129. Semeniuk RC, Venner PM, North S. Prostate-specific antigen doubling time is associated with survival in men with hormone-refractory prostate cancer. *Urology* 2006; 68:565-9
130. Nakai N, Katoh N, Kitagawa T, Ueda E, Takenaka H, Kishimoto S. Immunoregulatory T cells in the peripheral blood of melanoma patients treated with melanoma antigen-pulsed mature monocyte-derived dendritic cell vaccination. *J Dermatol Sci* 2009; 54:31-7.
131. Lemoine FM, Cherai M, Giverne C, Dimitri D, Rosenzweig M, Trebeden-Negre H, Chaput N, Barrou B, Thioun N, Gattegnio B, Selles F, Six A, Azar N, Lotz JP, Buzyn A, Sibony M, Delcourt A, Boyer O, Herson S, Klatzmann D, Lacave R. Massive expansion of regulatory T-cells following interleukin 2 treatment during a phase I-II dendritic cell-based immunotherapy of metastatic renal cancer. *Int J Oncol* 2009; 35:569-81.
132. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 2007; 121: 1-14.

133. Czerniecki BJ, Koski GK, Koldovsky U, Xu S, Cohen PA, Mick R, Nisenbaum H, Pasha T, Xu M, Fox KR, Weinstein S, Orel SG, Vonderheide R, Coukos G, DeMichele A, Araujo L, Spitz FR, Rosen M, Levine BL, June C, Zhang PJ. Targeting HER-2/neu in early breast cancer development using dendritic cells with staged interleukin-12 burst secretion. *Cancer Res* 2007; 67: 1842-52.
134. Morse MA, Nair SK, Mosca PJ, Hobeika AC, Clay TM, Deng Y, Boczkowski D, Proia A, Neidzwiecki D, Clavien PA, Hurwitz HI, Schlom J, Gilboa E, Lysterly HK. Immunotherapy with autologous, human dendritic cells transfected with carcinoembryonic antigen mRNA. *Cancer Invest* 2003; 21: 341-9.
135. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Kim ST, Chen I, Bycott PW, Baum CM, Figlin RA. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356:115-24.
136. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbé C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363:711-23.
137. Cohen MH, Gootenberg J, Keegan P, Pazdur R. 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* 2007; 12:713-8.
138. Srikrishna G, Freeze HH. Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. *Neoplasia* 2009; 11:615-28.
139. Brusa D, Migliore E, Garetto S, Simone M, Matera L. Immunogenicity of 56 degrees C and UVC-treated prostate cancer is associated with release of HSP70 and HMGB1 from necrotic cells. *Prostate* 2009; 69:1343-52.
140. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:7556-7561
141. Ubukata H, Motohashi G, Tabuchi T, Nagata H, Konishi S, Tabuchi T. Evaluations of interferon- γ /interleukin-4 ratio and neutrophil/lymphocyte ratio as prognostic indicators in gastric cancer patients. *J Surg Oncol* 2010; 102:742-7.
142. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, Berger A, Bruneval P, Fridman WH, Pagès F, Galon J. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 2011; 71:1263-71.

143. Sharma A, Rajappa M, Satyam A, Sharma M. Cytokines (TH1 and TH2) in patients with advanced cervical cancer undergoing neoadjuvant chemoradiation: correlation with treatment response. *Int J Gynecol Cancer* 2009; 19:1269-75.
144. Kobayashi K, Kaneda K, Kasama T. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. *Microsc Res Tech* 2001; 53:241-5.
145. Shedlock DJ, Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 2003; 300:337-9.
146. Reyes D, Salazar L, Espinoza E, Pereda C, Castellón E, Valdevenito R, Huidobro C, Becker MI, López MN, Salazar-Onfray F. Tumor Lysate Loaded-Dendritic Cell Vaccine Induces Memory Immune Response And Produces A Biochemical Response In Castration-Resistant Prostate Cancer Patients (Manuscrito en preparación).
147. Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, Lagorce C, Wind P, Marliot F, Bruneval P, Zatloukal K, Trajanoski Z, Berger A, Fridman WH, Galon J. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27:5944-51.
148. Tacken PJ, Figdor CG. Targeted antigen delivery and activation of dendritic cells in vivo: steps towards cost effective vaccines. *Semin Immunol* 2011; 23:12-20.
149. Speiser DE, Romero P. Molecularly defined vaccines for cancer immunotherapy, and protective T cell immunity. *Semin Immunol* 2010; 22:144-54.
150. Moltedo B, Faunes F, Haussmann D, De Ioannes P, De Ioannes AE, Puente J, Becker MI. Immunotherapeutic effect of Concholepas hemocyanin in the murine bladder cancer model: evidence for conserved antitumor properties among hemocyanins. *J Urol* 2006; 176:2690-5.
151. de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K, North S, Chu L, Chi KN, Jones RJ, Goodman OB Jr, Saad F, Staffurth JN, Mainwaring P, Harland S, Flaig TW, Hutson TE, Cheng T, Patterson H, Hainsworth JD, Ryan CJ, Sternberg CN, Ellard SL, Fléchon A, Saleh M, Scholz M, Efstathiou E, Zivi A, Bianchini D, Loriot Y, Chieffo N, Kheoh T, Haqq CM, Scher HI; COU-AA-301 Investigators. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* 2011; 364:1995-2005.
152. Scher HI, Beer TM, Higano CS, Anand A, Taplin ME, Efstathiou E, Rathkopf D, Shelkey J, Yu EY, Alumkal J, Hung D, Hirmand M, Seely L, Morris MJ, Danila DC, Humm J, Larson S, Fleisher M, Sawyers CL; Prostate Cancer Foundation/Department of Defense Prostate Cancer Clinical Trials Consortium. Antitumour activity of MDV3100 in castration-resistant prostate cancer: a phase 1-2 study. *Lancet* 2010; 375:1437-46.

153. Shoemaker LK, Estfan B, Induru R, Walsh TD. Symptom management: an important part of cancer care. *Cleve Clin J Med* 2011; 78:25-34.
154. Watcha MF, White PF. Postoperative nausea and vomiting. Its etiology, treatment, and prevention. *Anesthesiology* 1992; 77:162-84.
155. Rini BI, Stadler WM, Spielberger RT, Ratain MJ, Vogelzang NJ. Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor in metastatic renal cell carcinoma: a phase II trial. *Cancer* 1998; 82:1352-8.
156. Li X, Kostareli E, Suffner J, Garbi N, Hämmerling GJ. Efficient Treg depletion induces T-cell infiltration and rejection of large tumors. *Eur J Immunol* 2010; 40:3325-35.
157. Byrne WL, Mills KH, Lederer JA, O'Sullivan GC. Targeting regulatory T cells in cancer. *Cancer Res* 2011; 71:6915-20.
158. Coe D, Addey C, White M, Simpson E, Dyson J, Chai JG. The roles of antigen-specificity, responsiveness to transforming growth factor- β and antigen-presenting cell subsets in tumour-induced expansion of regulatory T cells. *Immunology* 2010; 131:556-69.
159. Derhovanessian E, Adams V, Hähnel K, Groeger A, Pandha H, Ward S, Pawelec G. Pretreatment frequency of circulating IL-17+ CD4+ T-cells, but not Tregs, correlates with clinical response to whole-cell vaccination in prostate cancer patients. *Int J Cancer* 2009; 125:1372-9.
160. Vergati M, Cereda V, Madan RA, Gulley JL, Huen NY, Rogers CJ, Hance KW, Arlen PM, Schlom J, Tsang KY. Analysis of circulating regulatory T cells in patients with metastatic prostate cancer pre- versus post-vaccination. *Cancer Immunol Immunother* 2011; 60:197-206.
161. Carles J, Castellano D, Climent MÁ, Maroto P, Medina R, Alcaraz A. Castration-resistant metastatic prostate cancer: current status and treatment possibilities. *Clin Transl Oncol* 2012; 14:169-176.
162. Gannon PO, Poisson AO, Delvoye N, Lapointe R, Mes-Masson AM, Saad F. Characterization of the intra-prostatic immune cell infiltration in androgen-deprived prostate cancer patients. *J Immunol Methods* 2009; 348:9-17.
163. Tang S, Dubey P. Opposing effects of androgen ablation on immune function in prostate cancer. *Oncoimmunology* 2012; 1:1220-1221.