

**VACUNACIÓ TERAPÈUTICA AMB CÈL·LULES
TUMORALS COMPLETES I CÈL·LULES
DENDRÍTIQUES EN EL MELANOMA MALIGNNE.**

Tesi presentada per Daniel Benítez Ribas per optar al grau de Doctor en
Ciències Biològiques.

Barcelona, juliol 2003.

**VACUNACIÓ TERAPÈUTICA AMB CÈL·LULES
COMPLETES I CÈL·LULES DENDRÍTiques EN
EL MELANOMA MALIGNNE.**

Memòria presentada per

Daniel Benítez Ribas

per optar al grau de

Doctor en Ciències Biològiques.

Tesi realitzada en el Servei d'Immunologia

Hospital Clínic de Barcelona, sota la direcció del Dr. Ramón Vilella Puig.

Programa de doctorat d'Immunologia (Bienni 1995-1997).

Departament de Fisiologia animal. Facultat de Biologia. Divisió III.

Universitat de Barcelona.

Tutor: Dr. Antonio Celada Cotarelo

Antonio Celada Cotarelo

Ramón Vilella Puig

Daniel Benítez Ribas

Barcelona, juliol 2003.

ABREVIATURES	5
INTRODUCCIÓ	9
EVIDÈNCIES D'IMMUNITAT TUMORAL EN HUMANS	10
IMMUNOTERÀPIA DEL CÀNCER	11
La toxina de Coley	11
IMMUNOVIGILÀNCIA	13
Pot la manipulació del sistema immunitari, causar la regressió de tumors establerts en humans?	15
Quins són els antigens involucrats en el reconeixement immunitari en càncer?	16
VACUNES EN CÀNCER. PRINCIPIS BÀSICS	19
Paper dels limfòcits CD8 ⁺	22
Paper dels limfòcits CD4 ⁺	23
Senyals de perill	26
INFUSIÓ DE CÈL·LULES	27
TILs	28
LAK	29
IVS	29
VACUNES EN CÀNCER. APLICACIONS CLÍNiques. VACUNES AMB LISATS I CÈL·LULES COMPLETES	30
Preparació de la vacuna	30
La resposta al·logènica i la immunitat tumoral	32
Implicacions per la immunoteràpia tumoral	33
Mecanisme d'inducció d'immunitat per una vacuna (lisat o cèl·lula completa)	33
MONITORITZACIÓ DE LA RESPOSTA A LES VACUNES	36
Principis generals	36
Determinació de l'assaig	37
Mesura de la resposta per limfòcits T contra les vacunes	37
VACUNES TUMORALS GENÈTICAMENT MODIFICADES	38

FUTUR DE LES VACUNES	39
CÈL·LULES DENDRÍTIQUES. VACUNES	40
Cèl·lules dendrítiques	40
Origen de les cèl·lules dendrítiques	41
Maduració de les cèl·lules dendrítiques	44
Migració	47
Captura de l'antigen	48
Cèl·lules dendrítiques i tumors.	52
Aplicacions clíniques.	53
US CLÍNIC DE DC GENERADES <i>EX VIVO</i> .	53
Assatjos en humans.	54
Font d'antígens.	54
Aplicacions clíniques.	57
Via d'inoculació.	60
Problemes de la utilització de cèl·lules dendrítiques.	61
EL MELANOMA.	62
Característiques patològiques i tractament.	64
<u>OBJECTIUS.</u>	<u>66</u>
<u>MATERIALS I MÈTODES.</u>	<u>68</u>
1. OBTENCIÓ I CULTIU DE LES CÈL·LULES TUMORALS.	68
2. CARACTERITZACIÓ DE LES MOLÈCULES DE LA MEMBRANA CEL·LULAR.	69
3. MLTR.	70
4. ELISA.	72
5. ELISPOT.	74
6. PREPARACIÓ DE LA VACUNA.	76
7. ADMINISTRACIÓ DE LA VACUNA.	77
8. OBTENCIÓ DE CÈL·LULES DENDRÍTIQUES.	77
9. PREPARACIÓ DEL LISAT.	78
10. ADMINISTRACIÓ DE LES CÈL·LULES DENDRÍTIQUES.	79
11. SEGUIMENT DELS PACIENTS.	79
12. GENERACIÓ DE LÍNIES T ESPECÍFIQUES.	80

Carregat antigènic.	81
Optimització de la maduració.	82
Determinació dels antígens tumorals MAGE-3, MART-1 i tirosinasa.	82
13. CRITERIS D' AVALUACIÓ CLÍNICA.	83
RESULTATS.	84
1. OBTENCIÓ DE LES LÍNIES TUMORALS.	84
2. CARACTERITZACIÓ DE LES LÍNIES TUMORALS DE MELANOMA.	85
2.1 Fenotip.	85
2.2 Anàlisi microbiològic.	86
2.3 Propietats de creixement.	86
2.4 Selecció de les línies de la vacuna.	87
2.5 Antígens tumorals.	88
S-100.	88
Melan A/MART-1, MAGE-3 i tirosinasa.	91
3 VACUNA.	92
3.1 Elaboració de la vacuna.	92
4 GRUP DE PACIENTS VACUNATS.	92
5 RESPOSTA A LES VACUNES.	93
5.1 Seguiment de la resposta immunitària.	93
5.2 Seguiment clínic.	95
6 OBTENCIÓ DE CÈL·LULES DENDRÍTIQUES.	99
7 CARACTERITZACIÓ DE LES CÈL·LULES DENDRÍTIQUES	100
7.1 Fenotip.	100
7.2 Immadures/madures. Estudi amb diferents estímuls maduratius.	104
7.3 Propietats al·loestimuladores.	107
7.4 Secreció de citocines.	111
7.5 Resposta contra tumor <i>in vitro</i> .	116
7.6 Carregat antigènic.	117
7.7 Optimització de la maduració.	121
8 GRUP DE PACIENTS.	128
9 RESPOSTA A LA VACUNA AMB CÈL·LULES DENDRÍTIQUES.	129
9.1 Seguiment de la resposta immunitària.	129
9.2 Seguiment clínic.	132

<u>DISCUSSIÓ.</u>	<u>136</u>
Resposta immunitària-resposta clínica.	144
Cèl·lules dendrítiques.	146
Cèl·lules dendrítiques en la clínica.	151
<u>CONCLUSIONS.</u>	<u>156</u>
<u>ANNEX.</u>	<u>158</u>
<u>BIBLIOGRAFIA.</u>	<u>159</u>

ABREVIATURES

AcMo	Anticossos monoclonals (de l'anglès <i>Monoclonal Antibodies</i>)
AJCC	“American Joint Cancer Committee” (Estadiatge del melanoma)
APC	Cèl·lules presentadores d'antigen. (de l'anglès <i>Antigen Presenting Cell</i>).
BCG	Bàcil atenuat de la tuberculosi (<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>)
CCR	Receptors de quimiocines
CD	Grup de diferenciació (de l'anglès <i>Cluster of differentiation</i>)
CM	Cocktail maduratiu de citocines
cpm	comptes per minut
CTL	Limfòcits T citotòxics.
CTLA-4	Antigen associat als limfòcits citotòxics (<i>de l'anglès Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4</i>)
DC	Cèl·lules dendrítiques
DMSO	Dimetil sulfòxid
DNFB	Dinitrofluorobenzè
DTH	Reacció d'hipersensibilitat retardada
Fc	Receptors d'immunoglobulines
FCS	Sèrum fetal de vedella (de l'anglès <i>Fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceïna
GD	Gangliòsids
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GM-CSF	Factor de creixement de granulòcits i macròfags
GMP	Manipulació en grau clínic (de l'anglès <i>Good Manufacturing Practice</i>)
HLA	Antígens Leucocitaris Humans (de l'anglès <i>Human Leukocyte Antigens</i>)
HSP	Proteïnes d'estrès tèrmic (de l'anglès <i>Heat Shock Proteins</i>)

IE	Index d'estimulació cpm estímuls/cpm basal
IFN	Interferons
IL	Interleucina
IVS	Cèl·lules sensibilitzades <i>in vitro</i> amb antígens tumorals (de l'anglès <i>In vitro sensitized lymphocytes</i>)
LAK	Limfòcits citotòxics activats amb citocines (de l'anglès <i>Lymphokine-activated killer</i>)
LPS	Lipopolisacàrids
MDC	Cèl·lules dendrítiques mieloids
MHC	Complex major d'histocompatibilitat. (de l'anglès <i>Major Histocompatibility Complex</i>).
MM	Melanoma Maligne
NF-κB	Factor de transcripció
NK	Cèl·lules assassines (de l'anglès <i>Natural Killers</i>)
PBLs	Limfòcits de sang perifèrica (de l'anglès <i>Peripheral Blood Lymphocytes</i>)
PBS	Tampó salí fosfat
PDC	Cèl·lules dendrítiques plasmacitoids
PE	Ficoeritrina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PHA	Fitohemaglutinina
rpm	Revolucions per minut
TAC	Tomografia axial computeritzada
TCR	Receptor d'antigen de les cèl·lules T
TGF	Factor de creixement (de l'anglès <i>Transforming Growth factor</i>)
Th	Limfòcits T col·laboradors (de l'anglès <i>T Helpers</i>)
TIL	Limfòcits infiltrants de tumor (de l'anglès <i>Tumo- infiltrating lymphocytes</i>)
TLR	<i>Toll Like Receptors</i>
TNF-α	Factor de necrosi tumoral α (de l'anglès <i>Tumor Necrosis Factor</i>)

INTRODUCCIÓ

El concepte de que el sistema immunitari pot reconèixer i rebutjar tumors no és nou. Històricament, les arrels de la immunologia tumoral es troben en la teràpia del càncer. Diverses estratègies certament arriscades, com les injeccions de materials purulents, documentades en antics textos mèdics occidentals i orientals, es remunten a varis mil·lenis. A partir de que la immunologia es va començar a definir com a disciplina, cap a finals del segle XIX, van emergir els tractaments de tumors amb toxines bacterianes.

William Halsted, un cirujà del segle XIX, va reportar en 1898 que els tumors amb infiltració limfocitària tenien un millor pronòstic que aquells que no ho estaven. Altres investigadors als principis del 1900, van trobar que es produïa el rebuig de tumors trasplantats en animals de laboratori. Aquest rebuig era degut a diferències entre les molècules d'histocompatibilitat, ja que teixits normals no tumorals també eren rebutjats quan es trasplantaven. Amb la utilització de soques de ratolins singènics es va veure que la majoria de tumors no eren rebutjats, excepte en algunes excepcions on el rebuig es produïa sense la resposta d'histocompatibilitat. George Klein, va descriure en 1960 el rebuig d'un tumor en creixement en un mateix animal que li havia sigut prèviament extirpat.

Aquests estudis experimentals de tumors trasplantats van establir el concepte d'immunitat específica del trasplantament de tumors. Malgrat les evidències acumulades en els models experimentals de la presència d'antígens específics d'aquests tumors trasplantats, la immunitat específica contra tumors en humans, és un tema en controvèrsia. Un comentari en una revisió sobre la immunoteràpia del càncer conclou que “ Podria ser tant difícilós rebutjar l'orella dreta i deixar l'esquerra intacte com ho seria immunitzar contra el càncer”.

Evidències d'immunitat tumoral en humans

Existeixen algunes evidències que donarien suport a una reactivitat immunitària pel control i limitació del creixement de tumors en humans. Malgrat tot, aquestes evidències són circumstancials, i són poc clares les proves d'una immunitat antitumoral efectiva; en la **taula 1** es mostra una llista d'algunes d'aquestes evidències i possibles explicacions no relacionades amb el sistema immunitari.

Taula 1

Situació	Comentaris.
Regressió espontània.	Molt poc freqüent
Regressió de metàstasis després de l'extirpació del tumor primari.	Rar, i no necessàriament mediat pel sistema immunitari
Reaparició de metàstasis després de llargs períodes de latència.	No necessàriament mediat pel sistema immunitari, pot ser determinat per la naturalesa del tumor.
La no formació de metàstasis per part de cèl·lules circulants.	Molt probablement no mediat pel sistema immunitari; les cèl·lules circulants poden no trobar l'ambient adequat de creixement.
Infiltració dels tumors per cèl·lules mononuclears.	Pot ser un efecte secundari; no sempre associat a la regressió del tumor.
Alta incidència de càncer en immunosuprimits, gent gran o pacients immunodeficients.	Evidència circumstancial, normalment són limfomes; pot ser degut a la pèrdua del control de les cèl·lules T o infeccions per virus.
Reactivitat immunitària en pacients amb càncer.	Pot estar associat amb un estat general dèbil, un efecte secundari de la malaltia.
Antígens tumorals identificats en assatjos <i>in vitro</i> .	Les proves <i>in vitro</i> no són una indicació fiable del rebuig del tumor <i>in vivo</i> .
Reacció a tests cutanis d'hipersensibilitat amb extractes de càncer.	No està clar el significat del test cutani.
Presència en alguns tumors d'immunocomplexes i glomerulonefritis.	No està documentada la relació dels immunocomplexes amb la resistència al tumor; els antígens poden no ser del tumor; els anticossos contra antígens tumorals poden ajudar al creixement tumoral.

T.C. Emerson va acceptar en 1960, 130 casos com a vàlids d'una llarga llista de remissions espontànies. D'aquests casos, un 10% corresponien a coriocarcinomes, en els quals hi ha expressió d'antígens foranis paterns en el tumor en la mare; també s'han reportat remissions espontànies en un 15% dels limfomes nodulars, una forma de càncer de cèl·lules B subjecte al control del sistema immunitari, i en alguns casos primaris de

melanoma maligne, però aquestes remissions espontànies són fenòmens molt rars i poc freqüents.

Immunoteràpia del Càncer

La immunoteràpia del càncer es pot definir com qualsevol procediment que modifiqui el sistema immunitari i que afecti de manera negativa el creixement d'un tumor establert. Aquests procediments poden ser o no específics pel tumor i actius o passius en funció de la diana que s'utilitzi (**taula 2**).

Taula 2: Tipus d'immunoteràpia del Càncer.

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • ACTIVA: <ul style="list-style-type: none"> – Vacunes terapèutiques. <ul style="list-style-type: none"> • Pèptids. • Lisats cel·lulars. • Cèl·lules atenuades. • Cèl·lules dendrítiques. | <ul style="list-style-type: none"> • PASSIVA: <ul style="list-style-type: none"> • Infusió de: <ul style="list-style-type: none"> – Cèl·lules: <ul style="list-style-type: none"> • TIL • LAK • IVD – Citocines: <ul style="list-style-type: none"> • IL-2 – Cèl·lules + Citocines |
|---|--|

La immunoteràpia específica implica la utilització d'antígens concrets del tumor com a dianes contra els quals dirigir la resposta immunitària; mentre que la teràpia inespecífica, el rebuig del tumor es produeix estimulants de manera global el sistema immunitari inespecíficament i general, sense una diana concreta; com per exemple amb la injecció de dosi molt elevades de citocines.

La toxina de Coley

En 1891, Willian Coley, va començar a investigar els casos de regressions clínicament aparents de càncer incurables, després de tractar una dona jove d'un Sarcoma d'Ewing, que va tenir un desenllaç fatal molt ràpid en dos mesos, i tractar de trobar en aquests casos, com el propi cos es podia defensar contra els tumors. Va identificar en els arxius de l'hospital de Nova York a Fred K. Stein, un pacient sa, que 11 anys abans havia patit un tumor d'uns 6 cm en el pit, que a l'any d'haver sigut

extirpat, s'havia tornat a reproduir, i que després de 4 operacions s'havia fet inoperable donat que havia afectat estructures vitals i creixia envoltant la caròtida. Va ser diagnosticat com un Sarcoma de cèl·lula rodona; una setmana després de la 4^a operació, Stein va desenvolupar una infecció severa per *Streptococcus pyogenes*. Durant els dos episodis de la infecció, es va apreciar una marcada cicatrització de la ferida cancerosa de la cara i la disminució de masses tumorals. Amb la curació de la infecció, les masses tumorals van desaparèixer, i després d'onze anys no presentava evidències de tumor residual. Coley va provocar deliberadament la infecció amb *S. pyogenes* a altres pacients, 12 entre 1891 i 1893. Només en quatre va aconseguir induir una infecció severa; dos d'aquests pacients van morir per la infecció, però els altres dos van experimentar regressions completes de les seves malalties, i els altres 8 van presentar algunes respostes, però no van ser curats (Coley, 1893). En base a aquests resultats mixtes i infeccions fatals, Coley va abandonar la infecció activa en favor de tractaments amb extractes bacterians (Toxina de Coley).

La toxina de Coley consistia en extractes de cultius de *S. pyogenes*, així com, *Bacillus prodigiosus*, una bactèria gram negativa, que de manera fortuïta, produeix endotoxina. Desconegut per Coley en el seu temps, aquesta endotoxina podria actuar com un superantigen provocant la secreció de citocines, entre altres TNF- α i Interferons, amb la conseqüent estimulació del sistema immunitari.

En 1913, Coley havia tractat més de 500 pacients, amb una millora significativa en 150, però el tractament havia generat gran controvèrsia, i en aquell temps s'introduïa la irradiació com a tractament d'elecció. La manca de respostes més consistentes, el fracàs d'altres investigadors per reproduir els mateixos resultats, la predominància de la radioteràpia, el fet de que la toxina de Coley no fos mai acceptada com un tractament del càncer i els efectes secundaris tan tòxics, va portar a la finalització d'aquesta aproximació terapèutica. L'experiència de Coley, amb uns resultats increïbles molt ràpids amb pocs pacients, seguit per una inexplicable incapacitat de duplicar els resultats, va establir els models que obsessionen a aquells que treballen en la immunoteràpia tumoral fins als nostres dies. La immunitat tumoral generada per la toxina de Coley, possiblement es devia a la inducció de senyals de perill, que conferien les endotoxines bacterianes administrades i la secreció d'alts nivells de TNF- α , degut als components LPS.

Immunovigilància

Teoria postulada en el mateix temps de manera independent per Burnet (Burnet, 1967) i Thomas (1970), que es basa en el concepte de que l'acció del sistema immunitari pot prevenir el desenvolupament de càncer. Si els tumors expressen antígens associats específics que són o poden ser reconeguts pel propi sistema immunitari, aquests antígens podrien estimular una reacció inicial de perill que eliminaria tumors petits o cèl·lules canceroses en desenvolupament. La hipòtesi de la immunovigilància es basa en el potencial de les cèl·lules malignes en desenvolupar nous determinants antigènics que reconeguts com a estranys, i presentats d'una manera i en un context adequats, serien eliminades (Smyth, et al. 2001). Burnet va anar més enllà, en suggerir que la reacció al·logènica era un mecanisme que evitava que els tumors fossin contagiosos; si el teixit al·logènic no fos rebutjat, els tumors d'una persona podrien fàcilment créixer en una altre, de la mateixa manera que succeeix en els ratolins “nude”. Aquests ratolins, deficients en cèl·lules T funcionals, són altament susceptibles de desenvolupar tumors provocats per virus, així com totalment incapaços de rebutjar qualsevol tipus de tumor trasplantat (Fenyo, et al. 1968). En una primera ullada, aquest model dona suport a la idea de l'existència de la immunovigilància. No obstant, aquests animals no tenen una incidència més elevada de tumors espontanis, ni una major susceptibilitat a carcinògens químics. Per tant, en aquest punt, no sembla que la manca de cèl·lules T, estigui relacionat amb un increment en el desenvolupament de tumors. Per una altra banda, els ratolins “nude”, tenen les cèl·lules NK (natural killers) actives. És possible que la immunovigilància, al menys en aquests ratolins, pugui dependre del sistema de cèl·lules NK. La situació és més complicada, ja que ratolins sense activitat NK, amb la mutació beige, no tenen una susceptibilitat més elevada a patir tumors químicament induïts. Aquestes evidències, i la manca de correlació *in vivo* entre el desenvolupament tumoral i l'activitat NK deixa en dubte el paper de les cèl·lules NK com a mecanisme general de vigilància immunitària.

Diversos mecanismes, mostrats en la **taula 3**, poden debilitar l'eficàcia de la vigilància immunitària i actuar com a elements de la selecció natural que pot patir el tumor (Chen, et al. 1992).

Taula 3:

Factors implicats en el fracàs de la vigilància immunitària

- Manca d'antigen/s tumorals.
- L'antigen tumoral no és immunogènic.
- Tolerància immunitària contra l'antigen tumoral.
- Immunosupressió.
- Modulació antigènica dels antígens tumorals.
- Immunoselecció de clons no antigènics.
- Desequilibri entre el creixement tumoral i la resposta immunitària.
- Presència de cèl·lules supressores per a la immunitat del tumor.
- Creixement del tumor en un lloc immunologicament privilegiat.
- Manca de molècules HLA.
- Alteració del receptor de la cèl·lula T.
- Producció de molècules immunosupressores per part del tumor.
- Manca de senyals coestimuladors per part del tumor.

Hi ha una clara diferència entre la resposta vigorosa contra tumors induïts per virus, altament antigènics, en comparació amb la poca o nul·la resposta dels tumors que creixen d'una manera espontània en humans. Els tumors induïts per virus són relativament rars en humans, en relació als tumors espontanis, cosa que pot recolzar la hipòtesi de la immunovigilància. Inicialment, aquestes hipòtesis no van tenir gaire suport, però el concepte d'immunovigilància ha estat reconsiderat en cadascun dels avenços associats al sistema immunitari. Durant els últims 15 anys, s'ha incrementat el coneixement sobre les bases moleculars de les interaccions entre el tumor i el seu "hoste". La convergència d'informació que resulta dels estudis bàsics en immunologia cel·lular, l'increment en la sofisticació de la biotecnologia, la qual ha fet que molts productes biològics estiguin disponibles en quantitats i qualitats farmacològiques, ha obert unes possibilitats extraordinàries pel desenvolupament d'immunoteràpies efectives pels pacients amb càncer. A més, la possibilitat de modificar cèl·lules genèticament, implicades en les reaccions immunitàries, i la generació de vectors recombinants que contenen gens, tant per antígens tumorals, com per citocines implicades en la resposta immunitària, esdevenen els resultats inicials de la teràpia gènica del càncer.

Durant les passades dues dècades, algunes preguntes seqüencials han caracteritzat el progrés en el desenvolupament de la immunoteràpia en humans.

1. Pot la manipulació del sistema immunitari, causar la regressió de tumors establerts en humans?.
2. Quins són els antígens involucrats en el reconeixement immunitari en càncer?.
3. Es poden generar limfòcits T anti-tumorals en pacients, amb una immunoteràpia amb antígens del tumor?.
4. Quin o quins mecanismes limiten la regressió del càncer, malgrat hi hagi la generació *in vivo* de cèl·lules T antitumorals?.

Pot la manipulació del sistema immunitari, causar la regressió de tumors establerts en humans?

La primera indicació clara i directe de que la manipulació del sistema immunitari podia causar la regressió de tumors establerts i invasius en humans, provenen dels estudis de l'administració de interleucina-2 (IL-2), en carcinomes metastàtic renals i melanomes (Bindon, et al. 1983, Rosenberg, et al. 1985). La IL-2 va ser identificada en 1976 com un factor de creixement dels limfòcits T i amb un ampli ventall d'efectes immunoreguladors (Morgan, et al. 1976). Produïda pels mateixos limfòcits T activats, no té un efecte directe sobre la cèl·lula tumoral; la resposta *in vivo* en tumors humans deriva de la seva habilitat d'expandir limfòcits específics pel tumor amb activitat antitumoral. A partir de la seva clonació (Taniguchi, et al. 1983), es va poder disposar de la citocina en quantitat i qualitat adequades per la seva aplicació en teràpies en humans, entre elles contra el càncer.

L'administració d'altres dosi de IL-2 recombinant en humans, via endovenosa, va reportar la regressió de tumors grans i invasius en pacients de melanoma metastàtic (Rosenberg, et al. 1985), càncer renal (Atkins, et al. 1993) i en limfomes no-Hodgkins. Els estudis inicials van mostrar que en un 15-20% dels pacients amb càncer metastàtic s'observaven respostes objectives de regressió del tumor (50% de reducció), i respostes completes en la meitat d'aquests pacients. En altres sèries estudiades amb un elevat nombre de pacients inclosos, els resultats obtinguts van ser similars (Atkins, et al. 1999). L'efecte clínic més important observat amb aquesta citocina és que les respostes completes obtingudes es mantenen en el temps, són de llarga durada (Rosenberg, et al. 1998). Els aspectes negatius són que el benefici terapèutic només s'obté en un nombre baix de pacients i que degut a que és necessari aplicar dosi sistèmiques molt elevades

per assolir dosi terapèutiques a nivell local del tumor, la toxicitat associada és molt elevada amb efectes secundaris importants.

Quins són els antígens involucrats en el reconeixement immunitari en càncer?

Molts estudis en animals van mostrar que el rebuig en models de tumors trasplantats, era més una conseqüència de la resposta cel·lular que de la humoral. Amb l'excepció d'anticossos contra factors de creixement importants per la cèl·lula tumoral, l'administració d'anticossos com a teràpia antitumoral ha tingut molt poc efecte en el creixement de tumors sòlids. Per tant els esforços més importants s'han dirigit cap a la identificació d'antígens reconeguts pels limfòcits T humans (Boon, et al. 1994, Rosenberg 1999).

Dins el camp de la immunologia del càncer, ha tingut un gran impacte la caracterització molecular dels antígens reconeguts per anticossos o cèl·lules T autòlogues en el melanoma. Aquests poden ser classificats d'una manera general com:

- Antígens de diferenciació (de melanoma-melanòcit).
- Antígens compartits específics de tumor.
- Antígens mutats.
- Antígens no mutats, sobreexpressats i compartits amb altres tumors.

Antígens de diferenciació de melanoma-melanòcit.

Aquests antígens s'expressen tant en les cèl·lules tumorals com en les seves equivalents sanes. En melanoma, han estat definits en diferents estadis de diferenciació melanòcit/melanoma, i distingeix els melanòcits d'altres llinatges cel·lulars. Hi ha dos prototips dins aquesta família:

- Antígens carbohidrats, particularment gangliòsids. La proporció dels diferents gangliòsids expressats en la membrana cel·lular es modifica amb la transformació maligna. Aquests determinants són reconeguts per autoanticossos en pacients de melanoma metastàtic i la presència d'aquests anticossos es correlaciona amb un millor pronòstic.
- Antígens específics dels melanòcits, particularment proteïnes de la membrana del melanosoma. Aquestes proteïnes són reconegudes tant per anticossos, com per cèl·lules T CD4⁺ i CD8⁺. Els melanosomes són orgànuls especialitzats de la via endocítica, i són els llocs de la síntesi de melanina. El

primer autoantigen identificat va ser la proteïna relacionada amb la tirosinasa 1 (TPR-1), també coneguda com gp75 (Wang, et al. 1995). Altres glicoproteïnes identificades inclouen la tirosinasa (Brichard, et al. 1993), TPR-2 i gp100 (Kawakami, et al. 1994). Un dels antígens més utilitzats en immunoteràpia, la proteïna específica del melanòcit MART-1/Melan-A (Kawakami, et al. 1994), no ha estat encara caracteritzada a nivell cel·lular.

Es possible que la immunitat contra antígens que també s'expressen en cèl·lules normals estigui inhibida, per evitar reaccions autoimmunitàries (Frazer, et al. 2001). La presència de citocines inhibidores en el primer contacte amb aquests antígens en la cèl·lula normal, pot determinar la tolerància contra aquests antígens quan s'expressen en un tumor.

Antígens compartits específics de tumor.

Aquestes proteïnes s'expressen en els espermatozous i placenta, però normalment estan silenciades en les cèl·lules somàtiques. Degut a la manca de molècules clàssiques de MHC en les cèl·lules germinals, aquests antígens van ser descrits funcionalment com a específics de tumor. El prototip d'aquesta família és la proteïna MAGE-1 (Van-der-Bruggen, et al. 1991), i que va ser el primer gen humà identificat en càncer per ser reconegut per cèl·lules CD8. La llista d'antígens, que inclouen la família MAGE, GAGE i BAGE, ha augmentat ràpidament, així com el nombre de epítops potencials restringits per classe I en aquestes famílies.

Un membre interessant d'aquesta família d'antígens és NY-ESO-1 (Jager, et al. 1998). Els pacients amb expressió d'aquesta proteïna en el seu tumor, de manera freqüent, generen anticossos contra l'antigen. De fet a diferència de la resta de proteïnes de la família, NY-ESO-1 es va definir per anticossos utilitzant el mètode de SEREX. La resecció o desaparició de tumors amb expressió de NY-ESO-1, es correlaciona amb una davallada dels anticossos sèrics, per tant la presència d'aquest antigen en el tumor dirigeix la generació d'autoanticossos. També s'ha descrit la presència d'epítops per cèl·lules CD8⁺ i CD4⁺.

A més, la descripció d'epítops per classe II per MAGE-3, fa d'aquesta família part de la petita llista d'antígens tumorals reconeguts per CD4⁺ (Chaux, et al. 1999, Li, et al. 1998, Topalian, et al. 1994), amb tot l'interès que desperta en l'actualitat els antígens tumorals reconeguts pels limfòcits T CD4⁺.

Antígens mutats.

Les bases potencials del reconeixement d'antígens únics per CD8⁺ van ser elucidats pel grup de Thierry Boon fa una dècada (Lurquin, et al. 1989). La mutació puntual d'un nucleòtid podia crear un canvi en un aminoàcid i generar antígens únics. La presència d'aquesta mutació en la cèl·lula tumoral i no en la resta de teixits fa, al menys en alguns casos, que sigui reconeguda pels limfòcits T. A més, estudis recents han mostrat que el sistema immunitari pot reconèixer productes que provenen de transcripts alternatius, incloent aquells amb lloc d'inici críptics, pautes de lectura alternatives, i també part del genoma invisible, com són els pseudogens (Moreau-Aubry, et al. 2000) i les cadenes antisentit de DNA (Van-Den-Eynde, et al. 1999).

L'estudi de limfòcits T CD4⁺ reactius contra el melanoma, ha revelat que les alteracions genètiques en gens àmpliament expressats, poden generar epítops únics amb restricció per classe II (Wang, et al 1999). Mutacions descrites en melanoma, que generen epítops per CD4⁺, afecten per exemple a la isomerasa trifosfat, que per efecte de la mutació es genera un pèptid heteroclític 5log₁₀ més eficient en generar resposta de cèl·lules T que el pèptid original. Els pèptids heteroclítics en tumors augmenten la unió al MHC i poden ser agonistes eficients en l'activació del TCR. Altres mutacions puntuals descrites afecten a proteïnes que controlen el cicle cel·lular, com CDC27 (Wang, et al. 1999). La presència de cèl·lules CD8⁺ específiques per aquesta proteïna, fa que el sistema ataquí al cor de la lesió genètica que potencialment provoca la transformació de la cèl·lula. Molts casos de melanoma familiar presenten aquesta mutació puntual de p16(INK4a) (Wolfel, et al. 1995).

Antígens no mutats, sobreexpressats i compartits amb altres tumors.

Existeixen evidències que determinades proteïnes sobreexpressades en càncer, com l'antigen carcinoembrionari, p53, Her-2/neu, telomerasa, etc..., són antígens tumorals. Hi ha una certa controvèrsia sobre el paper antigènic real, però s'obren moltes possibilitats de poder generar una vacuna "universal" per diferents tipus de càncers. En un estudi inicial, la generació de clons citotòxics CD8⁺ específics per la subunitat catalítica de la telomerasa, té com a resultat la lisi de línies tumorals de diferents histologies (Vonderheide, et al. 1999). Més del 85% dels càncers en humans presenten activitat telomerasa, mentre que aquesta és pràcticament indetectable en teixits sans (Kim, et al. 1994).

Els hipotètics antígens tumorals que farien la resposta immunitària més efectiva haurien de: (1) ser expressats per la majoria de càncers, (2) incloure seqüències peptídiques que s'unissin als MHC, (3) ser processats per les cèl·lules tumorals com a pèptids antigènics, (4) ser reconeguts pel repertori de cèl·lules T de manera restringida pel MHC, i (5) permetre l'expansió dels precursors de cèl·lules CTL i T CD4⁺ específiques.

De manera molt interessant la majoria dels antígens restringits per classe II, reconeguts per cèl·lules reactives CD4⁺ són antígens mutats o proteïnes de fusió. Encara que no s'ha determinat la seva relevància biològica, una possibilitat és que aquestes cèl·lules T CD4⁺ iniciarien la resposta específica, ja que no s'ha generat una tolerància contra aquests antígens en els pacients amb càncer (Wang, 2001). No cal que reconeguin aquests antígens en la membrana de les cèl·lules tumorals, ja que la majoria no expressen classe II, si no que ho fan a través de les cèl·lules presentadores (en especial les cèl·lules dendrítiques) (Larsson, et al. 2001).

Vacunes en càncer. Principis bàsics

Quins són els principis bàsics en el disseny de vacunes en càncer?. La resposta a aquesta pregunta actualment està molt lluny de poder ser contestada, i d'establir uns principis generals, degut a la manca d'eficàcia de la majoria de vacunes tumorals existents. Els conceptes generals provenen de models experimentals, que és on més s'ha avançat, i dels quals comencen a emergir els patrons d'eficàcia. Les vacunes han sigut utilitzades tradicionalment per prevenir malalties infeccioses (vacunes profilàctiques), però poden tenir noves aplicacions en el tractament de malalties (vacunes terapèutiques).

Malgrat que l'aplicació de vacunes profilàctiques en càncer pot ser un concepte estimulants, es generen una gran varietat de problemes pràctics, teòrics i fins i tot ètics per a la seva aplicació (Finn, et al. 2002). Malgrat que, cada vegada hi ha més coneixements sobre els factors genètics i ambientals que contribueixen a la carcinogènesi, un problema en l'actualitat és predir quins pacients desenvoluparan un càncer. Altres aspectes teòrics que fan pràcticament impossible l'èxit de la vacunació profilàctica és conèixer quin o quins antígens del total de gens de la cèl·lula mutaran i

actuaran com a dianes; la vacunació contra antígens també presents en teixits normals podria provocar un estat de tolerància perifèrica degut a la continua persistència del mateix, o bé podria tenir conseqüències autoimmunitàries imprevisibles. Les úniques vacunes preventives que estan sota seriosa consideració són per aquells càncers molt clarament associats a virus; la prevenció de la infecció pel virus del papiloma o les hepatitis, hauria de prevenir el càncer de cèrvix o fetge, respectivament (Zur-Hausen, 2001). La majoria dels esforços, van per tant, encaminats en les vacunes dissenyades per activar el sistema immunitari per destruir tumors ja establerts, que s'anomenen vacunes terapèutiques.

Alguns principis generals a tenir en consideració serien:

- Els tumors humans són molt poc immunogènics.

Quan un càncer es fa clínicament evident, és per que el sistema immunitari no l'ha pogut destruir i ha crescut d'una manera incontrolada. La raó per aquesta manca d'immunogenicitat podria ser que els antígens tumorals no són presentats en un microambient que afavoreixi l'activació de les cèl·lules immunitàries. Les bases moleculars d'aquesta baixa immunogenicitat es poden separar conceptualment en dos grups diferenciats. El primer fa referència als mecanismes d'inhibició del sistema immunitari, per part del tumor, compartit amb la resta de cèl·lules normals de l'organisme, mentre que el segon fa referència a la inestabilitat genètica del tumor, inherent a la cèl·lula transformada (Kageshita, et al. 1997), que proporciona una alta heterogeneïtat al tumor, i que fa que la destrucció de totes les cèl·lules tumorals per part del sistema immunitari sigui una tasca extremadament difícil.

La manca de molècules coestimuladores en la membrana de la cèl·lula tumoral, com per exemple B7-1(CD80), B7-2 (CD86) i CD40L, indueix un estat d'anèrgia en les cèl·lules T que reconeixen antígens en la membrana de la cèl·lula tumoral (Chen, et al. 1994). Aquesta manca de coestimulació és un sistema de protecció, on la presentació d'antígens propis fa que no hi hagi una resposta autoreactiva contra teixits normals. Aquestes molècules coestimuladores s'indueixen en les cèl·lules presentadores d'antigen (APC) quan s'activen per diferents estímuls, entre ells una resposta inflamatòria. La destrucció del teixit normal per part de microbis, així com la presència de components bacterians específics (LPS, seqüències CpG no metilades, dsRNA, etc...)

proporciona senyals de perill (Matzinger, 1994) que estimulen la resposta immunitària, per contra, els tumors no indueixen senyals inflamatòries, ni senyals de perill, per tant passen desapercebuts al sistema immunitari (Matzinger, 1994). En absència d'aquests senyals de perill, el sistema no s'activa completament (Fuchs, et al. 1996).

Un altre sistema que utilitza el tumor per inhibir la resposta immunitària és l'ús ectòpic de mecanismes normals immunosupressors, com és la producció de TGF- β (Halliday, et al. 2001), amb un efecte antiproliferatiu per CTL, NK i cèl·lules LAK. Un altre exemple és la producció de IL-10 per alguns tipus de tumors, que interfereixen directament en la presentació d'antigen mediada pels macròfags i per les cèl·lules dendrítiques (s'inhibeix l'expressió de molècules de coestimulació i també la producció de citocines importants, com la IL-12 en la generació d'una resposta de tipus Th1). Un altre mecanisme immunosupressor que va ser descrit és l'expressió de FasL per part del tumor. Degut a que FasL (CD95L) es troba expressat en llocs "immuno privilegiats" es va hipotetitzar el seu paper en l'escapament del tumor provocant apoptosi a les cèl·lules T específiques. Les dades més recents no suporten el paper d'aquest mecanisme ja que no s'ha trobat FasL quan s'ha mirat en detall en línies cel·lulars de melanoma.

- La vacuna ha d'expressar l'antigen o antígens tumorals dianes.

En el camp de la quimioteràpia s'han produït un nombre d'exemples ben coneguts de l'escapament del tumor al tractament, per mitjà de la inducció en l'expressió de gens de resistència a drogues. Com que l'ús de vacunes recombinants i sintètiques poden ser més efectives, la pressió selectiva per a la pèrdua d'una determinada diana antigènica es pot incrementar. Algunes evidències demostren que les cèl·lules tumorals perden l'antigen gp100, com a resultat del tractament amb el pèptid 209-217 (2M) derivat de la gp100 més IL-2 (Marincola, et al. 2000, Riker, et al. 1999). Aquests resultats fan, que en l'actualitat, el disseny de vacunes compostes d'un sol pèptid, amb o sense adjuvants, siguin molt discutides.

Els tumors tenen uns genomes inestables, cosa que pot proporcionar l'expressió d'antígens associats a tumor en proporcions variables (Cormier, et al. 1998). A més, aquests genomes inestables poden capacitar al tumor a escapar del reconeixement, perquè poden perdre o mutar elements clau en la maquinària de processament antigènic com; els transportadors TAP, la β_2 -microglobulina, o la pèrdua de molècules del complex major d'histocompatibilitat (Rafiq, et al. 2002). Altres mecanismes que

confereixen una baixa immunogenicitat impliquen la inactivació de dos components del proteosoma induïbles pel IFN- γ , anomenats LMP2 i LMP7 (Ayyoub, et al. 2001). La degradació de pèptids i la seva entrada en la via del MHC I es veuria afectada, i per tant la seva presentació i reconeixement pel sistema immunitari.

- Les immunitzacions més efectives en la generació de cèl·lules T reactives, són també més efectives terapèuticament.

El principi de que els limfòcits T eren crítics en la resposta immunitària contra tumors, deriva de la inducció de tumors en models murins amb methyl-cholanthrene. Evidències en la depleció de limfòcits T, revela que tant els CD8⁺ com els CD4⁺ poden jugar un paper en la resposta immunitària antitumoral. Les primeres aproximacions atribuïen tot el protagonisme a els limfòcits T CD8⁺, degut a la seva funció citotòxica, però cada vegada es posa més de manifest la intervenció necessària d'una resposta combinada amb les cèl·lules T CD4⁺, pel desenvolupament d'una activitat antitumoral efectiva i sostinguda.

Paper dels limfòcits CD8⁺

La transferència adoptiva de poblacions pures de limfòcits T CD8⁺ ha mostrat que pot mediar la regressió de tumors induïts en ratolins, mentre que almenys en aquest model, els limfòcits T CD4⁺ no jugaven un paper essencial. La majoria dels epítops immunogènics descrits d'antígens tumorals corresponen a seqüències reconegudes en el contexte del MHC I i per tant reconeguts per les cèl·lules CD8⁺. Degut a que aquestes cèl·lules són les encarregades de la citotoxicitat cel·lular directe, i que la majoria dels tumors expressen MHC I però no expressen MHC II, van ser les primeres cèl·lules identificades en el seu paper antitumoral. Per tant, molts esforços s'han destinat a desenvolupar una immunoteràpia passiva focalitzada en les cèl·lules CD8⁺, i a identificar les dianes moleculars reconegudes per aquestes cèl·lules en models murins i en humans. La majoria dels assatjos clínics en humans que utilitzen pèptids amb o sense adjuvants, corresponen a seqüències restringides per classe I.

Els mecanismes de citotoxicitat descrits són, a través de Fas-FasL, per mitjà de la secreció de TNF- α , IFN- γ , o bé per la secreció de grànuls de perforina/granzima (Winter, et al. 1999).

De manera tradicional molts estudis només s'han centrat en el paper efector de les cèl·lules CD8⁺, però cada vegada hi ha més evidències de que per a una correcta activació i persistència de la resposta immunitària induïda, cal l'activació també de les cèl·lules CD4⁺, ja que són aquestes les que proporcionen els senyals importants i determinants per l'eficient activació (Hu, et al. 2000).

Paper dels limfòcits CD4⁺

El coneixement de com els limfòcits CD4⁺ poden influenciar la resposta antitumoral és molt reduït en comparació amb el dels CD8⁺. Les proves més evidents del poder de les cèl·lules CD4⁺ en la resposta contra proteïnes pròpies, provenen de models murins de malalties autoimmunes, com la encefalomielititis al·lèrgica experimental (EAE), el lupus eritomatós sistèmic i la diabetis. En aquests casos la malaltia es pot transmetre a ratolins “naïve” amb la transferència de limfòcits T CD4⁺ purificats o clons T. Aquests estudis suggereixen que l'activació completa de cèl·lules T autoreactives pot ser un element clau, que no es té en compte en molts protocols clínics de vacunes contra càncer (Zeng, 2001).

Els limfòcits T CD4⁺ poden afectar i modular la funció de les cèl·lules dendrítiques (Chakraborty, et al. 1999). Aquesta activació es porta a terme a través de la interacció entre el CD40 de la cèl·lula presentadora i el CD40L del limfòcit activat (Felzmann, et al. 2001). Aquesta unió fa augmentar la secreció de citocines proinflamatòries que afecten principalment a les cèl·lules T CD8⁺ que puguin estar reconeixent l'antigen en la mateixa cèl·lula dendrítica (Baxevanis, et al. 2000), i també provoca l'atracció d'altres cèl·lules al lloc de la reactivitat immunitària (Mailliard, et al. 2002). En experiments de transferència de clons CD8⁺ específics contra el citomegalovirus, la seva activitat citotòxica es veu dramàticament reduïda en animals deficients en cèl·lules T CD4⁺ específiques. En ratolins deficients en CD4⁺ s'ha pogut observar una progressiva pèrdua de les cèl·lules T CD8⁺, que té com a resultat una resistència disminuïda a les infeccions virals. Aquests resultats podrien tenir implicacions importants en la teràpia antitumoral, ja que per produir-se una regressió tumoral completa, es requereix un immunitat antitumoral prolongada. La inducció simultània d'una resposta Th1 i Th2 és requereix per assolir una resposta màxima antitumoral sistèmica en un model murí de tumor induït per B16 (Hung, et al. 1998).

Les citocines produïdes per aquestes cèl·lules activen els eosinòfils, així com els macròfags, que produeixen superòxid i òxid nítric. Aquests tipus cel·lulars també col·laboren en el lloc tumoral a la seva destrucció (Nishimura, et al. 1999).

Com ja s'ha comentat prèviament, sovint els protocols de vacunació amb pèptids (amb o sense cèl·lules dendrítiques) s'han centrat en epítops reconeguts pels limfòcits T CD8⁺; s'ha demostrat el seu potencial i la seva aplicabilitat en la immunoteràpia del càncer, però les respostes generals són dèbils i transitòries. Una possible raó és la manca de resposta T CD4⁺ en aquests protocols. Cada vegada hi ha més evidències de que aquestes cèl·lules juguen un paper central en la iniciació i manteniment de la resposta immunitària contra el tumor.

Tres possibles vies que medien l'ajut per les cèl·lules CD4⁺ han estat descrites (Ribas, et al. 2001) :

- Activació de la cèl·lula dendrítica dependent de CD40.
- Activació de la cèl·lula dendrítica independent de CD40, a través d'altres receptors de la superfamília del TNF (TRANK, RAF).
- Comunicació directe dependent de limfocines entre les cèl·lules CD4⁺-CD8⁺.

- La funció de la vacuna seria mediada principalment per les cèl·lules dendrítiques.

L'inici de la immunitat de les cèl·lules T és, en gran part, el resultat d'una població especialitzada de APC, anomenades cèl·lules dendrítiques. Aquestes activen la resposta T perquè capturen, processen i presenten antígens en el context de les molècules de MHC en un microambient adequat. També tenen la capacitat de donar els senyals coestimuladors necessaris per aconseguir l'activació completa del limfòcit T. Aquest senyal secundari és la conseqüència d'interaccions diverses entre glicoproteïnes de membrana en la superfície de les cèl·lules T i APC. La interacció entre les molècules B7 i els seus lligands (CD28, CTLA-4) en la superfície de la cèl·lula T és crítica en la generació del senyal secundari. La interacció amb CD28 està associada amb la proliferació i diferenciació, mentre que amb CTLA-4 pot ser responsable d'un estat funcional d'inhibició (Sutmuller, et al. 2001).

Les cèl·lules dendrítiques poden patir la seva maduració o "super-activació" a través de l'activitat de citocines derivades de macròfags, principalment TNF- α , així

com a través de la interacció amb CD40L-CD40 (Felzmann, et al. 2001). Altres components principalment derivats de patògens bacterians proporcionen una maduració forta i eficient de les cèl·lules dendrítiques. Amb aquesta maduració, les cèl·lules dendrítiques poden iniciar d'una manera efectiva la resposta en limfòcits T "naive", i modular el patró de resposta T.

- L'eficàcia de les vacunes pot ser augmentada amb citocines, quimiocines i/o molècules coestimuladores.

Les citocines, i en particular els interferons, poden tenir efectes poderosos en l'activació i proliferació de les cèl·lules T. Es poden utilitzar com adjuvants i millorar la resposta immunitària induïda per la vacuna. Poden ser administrades sistèmicament en forma de proteïna, o bé els seus gens insertats en vacunes recombinants. IL-2, IL-7 o especialment IL-12 han tingut una activitat protectora i terapèutica en models animals de transferència de gens (Zitvogel, et al. 1996). Malgrat tot, no tots aquests resultats en models murins, han sigut confirmats en assatjos clínics en humans; en pacients amb melanoma metastàtic vacunats amb un pèptid immunodominant derivat de la gp100, no va augmentar l'eficàcia de vacunació (mesurat per respostes clíniques objectives) utilitzant GM-CSF o IL-12. Només altes dosis de IL-2 ha demostrat tenir un efecte beneficiós com a adjuvant per immunitzacions amb pèptids (Lee, et al. 1999).

- L'immunògen escollit ha de ser efectiu en el tractament de la malaltia establerta.

Els primers intents en desenvolupar vacunes tumorals es van basar en l'utilització de cèl·lules irradiades, administrades amb adjuvants, per exemple BCG (Lieberman, et al. 1979), o infectades amb virus per tal de generar oncolisats. Degut a que les cèl·lules tumorals són immunògens pobres, s'han destinat molts esforços en l'aïllament d'antígens tumorals a partir del microambient tumoral, per exemple purificant proteïnes d'estrès tèrmic, o bé purificant els pèptids directament del MHC de les cèl·lules tumorals, amb una elució àcida, i utilitzar-los posteriorment per carregar cèl·lules dendrítiques, o bé transfectant les cèl·lules dendrítiques amb RNA tumoral.

Les vacunes recombinants utilitzen vectors vírics atenuats, transfectats amb algun antigen tumoral. A nivell teòric, actuarien com a adjuvants potenciant la resposta immunitària. A part de totes les consideracions de seguretat en l'ús de virus recombinants en teràpies antitumorals, és molt possible que existeixi una immunitat prèvia del pacient contra el virus utilitzat com a vector i que faci, per mitjà d'anticossos

per exemple, que els vectors siguin ràpidament eliminats sense donar lloc a una resposta contra l'antigen tumoral transfectat. La potenciació d'una resposta immunitària per part de components del propi virus, no contribueix a l'especificitat de la immunoreactivitat contra el tumor. Potser l'única excepció a aquesta generalització és l'ús d'immunògens vírics per vacunar en el cas de càncer induïts per virus (p.e. vacunacions amb la forma recombinant humana del papillomavirus per tractar el càncer de cèrvix).

- Els principis bàsics immunològics determinarien la dosi òptima, les reinoculacions, la via d'inoculació.

En addició a tots els components prèviament comentats (tipus d'antigen, immunògen, adjuvant...) un nombre addicional d'incerteses es presenten immediatament. Quina és la dosi apropiada de l'immunogen? Quina via d'inoculació és la més apropiada? Es requereixen posteriors reestimulacions del sistema immunitari? Quantes vegades? Amb quina freqüència?, Com ha de ser subministrada la vacuna; setmanal, mensual, diària, etc.?

La resposta a aquestes preguntes requereix un coneixement profund de la immunofisiologia de la vacunació *in vivo*, ja que els coneixements *in vitro* d'aquests paràmetres, aporten un benefici limitat. Les evidències en models animals suggereixen que amb una dosi incrementada d'immunogen, més enllà de certs límits pot impedir o inclòs eliminar la reactivitat contra aquell antigen. És difícil extrapolar en humans, quines concentracions serien necessàries d'un pèptid, per exemple, per observar el mateix efecte que en ratolins.

Sembla bastant clar que reestimulacions diverses poden incrementar la intensitat de la resposta immunitària. En alguns models, l'eficàcia de les vacunes antitumorals pot ser augmentada, i fer més potent la resposta antigen específica CTL, amb la utilització de dos vectors diferents (reestimulació heteròloga) en front de l'ús d'un únic vector (reestimulació homòloga).

Senyals de perill

Els tumors són generalment cèl·lules sanes, pròpies, que no generen cap tipus de senyal de l'alarma per l'organisme i per tant no activen les APCs (Fuchs, et al. 1996). Mentre les cèl·lules tumorals creixen, no indueixen cap tipus de resposta immunitària, i de fet, lentament poden anar induïnt tolerància pels limfòcits T específics pel tumor. A

pesar de que les zones centrals de tumors sòlids grans, pobrement vascularitzats, el tumor pugui necessitar nutrients, la mort cel·lular per privació de nutrients d'aquestes cèl·lules és per apoptosi, i aquest tipus de mort, no indueix cap tipus de resposta immunitària. Tot i que sembla que hi ha síntesi de proteïnes d'estrès tèrmic (Feng, et al. 2001), aquestes no s'alliberen fora de les cèl·lules; fins que la quantitat de mort sobrepassa a la capacitat local de retirada de cossos apoptòtics. En aquest punt, les cèl·lules mortes, poden esdevenir necròtiques i alertar a les APC locals per diverses senyals d'alarma (possiblement a través de les proteïnes d'estrès tèrmic) i es pot desenvolupar la resposta immunitària. Els pocs limfòcits T específics pel tumor que quedin poden intentar eliminar el tumor, però en aquest punt pot ser un cas de massa pocs i massa tard (Valmori, et al. 2002) encara que tinguin les capacitats efectores intactes.

Infusió de cèl·lules

El braç cel·lular del sistema immunitari juga, com ja hem vist, un paper central en la destrucció de les cèl·lules tumorals, regressió de dipòsits tumorals establerts, i manteniment d'una resposta immunitària antitumoral. L'objectiu de la teràpia de transfèrència adoptiva és promoure aquestes funcions cel·lulars en pacients de càncer per l'administració de cèl·lules que han sigut cultivades *ex vivo*. Aquestes cèl·lules efectores són recollides i cultivades, tractant de minimitzar els efectes reguladors normals del sistema immunitari i la supressió potencial del tumor. Les característiques cel·lulars desitjables d'aquestes cèl·lules poden ser augmentades en cultiu, afegint diversos agents. Finalment, les cèl·lules efectores activades i expandides poden ser utilitzades de manera autòloga per tractar pacients. Les tècniques de transferència de cèl·lules s'han vist molt afavorides per la disponibilitat de citocines recombinants, especialment la IL-2, necessària per l'expansió i supervivència dels cultius de limfòcits.

Podem considerar tres tipus de cèl·lules que es poden escollir per a ser infundides: TILs (de l'anglès "tumor infiltrating lymphocytes"; cèl·lules infiltrants de tumors), cèl·lules LAK (de l'anglès "lymphocyte activated killers"; cèl·lules "killer" activades), i les IVS (de l'anglès "*in vitro* sensitized cells"; cèl·lules sensibilitzades *in vitro*).

TILs

Són limfòcits que infiltren els tumors sòlids i poden créixer en suspensió, a partir de la disgregació dels tumors, amb un medi de cultiu que contingui IL-2 (Holmes, 1985). Tenen la capacitat de reconèixer antígens específics del tumor i poden mantenir la capacitat de lisi específica després de ser expandits *in vitro*. Aproximadament el 50% dels limfòcits obtinguts a partir de pacients de melanoma, exhibeixen lisi específica de tumor o secreció de citocines en l'exposició al tumor autòleg. Reconeixen una ampla varietat d'antígens associats a melanoma i també diversos epítops dins d'una mateixa proteïna. La sèrie més llarga de pacients tractats amb TILs inclouen 86 pacients, als quals a més de les cèl·lules TILs anaven acompanyats amb diferents dosi de IL-2 endovenosa. En aquest estudi, la tasa de respostes clíniques objectives era del 34%, i les respostes eren similars entre rebre o no IL-2. Aquesta resposta clínica del 34% és aproximadament el doble de la tasa de resposta clínica observada en un grup de 134 pacients tractats amb el mateix règim de IL-2 sola, encara que la duració de les respostes van ser curtes. Si bé s'ha demostrat la seva eficàcia i la seva capacitat antitumoral, i estudis esperançadors en models murins, la seva aplicació en humans no ha donat el resultats esperats. Hi ha alguns factors que poden explicar aquesta manca objectiva de resposta. Quan les cèl·lules s'inoculen en el torrent circulatori, poden desplaçar-se amb la sang i col·lisionar amb les parets dels vasos, adherir-se a elles de forma transitòria o estable i finalment extravasar-se. L'eficàcia terapèutica d'aquestes cèl·lules, depèn de que aquestes cèl·lules arribin al lloc del tumor; estudis amb isòtops radioactius mostren que en aproximadament un 30 % dels pacients que rebien aquesta teràpia les cèl·lules no accedien al tumor. També s'ha pogut observar en models murins, que les cèl·lules TILs poden quedar rentigudes en la microcirculació pulmonar degut a la rigidesa que adquireixen les cèl·lules T al ser tractades amb IL-2.

Una nova estratègia per la inoculació de cèl·lules TILs es centra en seleccionar *in vitro* aquells clons que reconeixen el tumor i mostren una activitat citotòxica contra antígens de melanoma, després de l'expansió de les TILs. Es pot millorar en l'especificitat del reconeixement, però pel moment, no hi ha res que ens assegurari que les cèl·lules TILs inoculades de manera endovenosa arriben al teixit tumoral.

LAK

Aquests limfòcits desenvolupen la capacitat de lisar tumor fresc quan són cultivats amb concentracions molt elevades de citocines. Són cèl·lules que s'obtenen de sang perifèrica, normalment posterior a un tractament del pacient amb IL-2 recombinant, factor que provoca una limfocitosi. La seva capacitat citolítica és inespecífica, degut a la manera que són obtingudes. Fins que la IL-2 no va estar disponible en forma recombinant, aquests estudis es van portar a terme amb limfòcits estimulats amb fitohemaglutinina (PHA), i l'activitat antitumoral era similar. Els estudis randomitzats van mostrar que malgrat es podien observar respostes clíniques evidents, no havia un augment de la resposta i de la supervivència respecte al grup de pacients tractats amb cèl·lules LAK+IL-2 respecte al grup tractat només amb IL-2, cosa que desaconsella seguir per aquesta via de teràpia.

IVS

Corresponen a cèl·lules de obtingudes a partir de sang perifèrica que són estimulades en cultiu amb antígens tumorals, per exemple amb tumor autòleg, i s'expandeixen amb dosi de IL-2 molt baixes (10-20 U/ml) per tal de que proliferin només aquelles cèl·lules que siguin específiques i estiguin activades (Chang, et al. 1993). A nivell teòric són la població de limfòcits antitumorals més específics perquè les condicions de cultiu només permeten l'expansió d'aquells limfòcits específics i que probablement no hagin rebut senyals inhibidores per part del tumor com ho poden haver patit els limfòcits aïllats de tumor (TILs). El sistema d'obtenció es pot millorar si en la selecció dels clons de limfòcits T s'utilitzen cèl·lules dendrítiques autòlogues carregades amb els antígens tumorals de manera prèvia a l'expansió. Estudis en la generació i expansió de CTL *in vitro* (Yang, et al. 2002) en controls sans utilitzant cèl·lules dendrítiques autòlogues carregades amb un pèptid de la proteïna gp100 (pèptid G209-2M) han classificat les cèl·lules generades en tres categories: CTL específics pel pèptid amb activitat citotòxica per cèl·lules dianes carregades amb el pèptid; CTL específics que reconeixen els pèptids G209-2M o la forma natural G209, però no melanomes; i CTL reactius contra cèl·lules de melanoma, que reconeixen cèl·lules dianes carregades amb el pèptid, així com melanomes. Aquestes diferents capacitats es troben fortament correlacionades amb l'afinitat del TCR del limfòcit T pel MHC-pèptid, amb més alta

afinitat majors capacitats lítiques presenten les cèl·lules, mentre que les CTL que tenen menor afinitat requereixen altes concentracions de pèptids per ser reconeguts en les cèl·lules dianes. Per tant per a una immunoteràpia efectiva requeriria l'expansió selectiva de CTL amb alta afinitat.

No hi ha dades clíniques respecte aquesta teràpia, malgrat les dades obtingudes *in vitro* apunten a que les cèl·lules generades tenen una alta capacitat citolítica contra el tumor pel qual han sigut seleccionades.

Vacunes en càncer. Aplicacions clíniques. Vacunes amb lisats i cèl·lules completes

L'heterogeneïtat en l'expressió d'antígens associats a tumor ha sigut documentat en diferents tipus de càncer, i clarament juga un paper clau en l'escapament de les cèl·lules tumorals de la immunovigilància (Kageshita, et al. 1997). Per tant el desenvolupament de vacunes compostes per lisats de cèl·lules tumorals o amb cèl·lules completes engloben una aproximació d'ús d'antígens polivalents (Mitchell, et al. 1990). Aquest mètode incorpora dos o més línies cel·lulars del mateix tipus de tumor i per tant tracta de cobrir les pèrdues potencials d'antígens i neutralitzar aquest mecanisme d'escapament tumoral.

Preparació de la vacuna

La selecció del teixit o cèl·lules tumorals és un pas crític en la preparació d'una vacuna tumoral. L'aïllament de tumor de diferents localitzacions en un mateix pacient podria ser el mètode més apropiat per preparar una vacuna autòloga, ja sigui utilitzant lisats o cèl·lules senceres, s'hauria de disposar dels diferents tipus cel·lulars del mateix tumor. La vacunació autòloga evita respostes no desitjades contra teixits normals al·logènics. Malgrat la dificultat que implica la vacunació amb cèl·lules tumorals autòlogues amb un nombre gran de pacients, s'han portat a terme algunes aplicacions terapèutiques (Berd, et al. 1990), on es poden observar respostes clíniques valuables. La modificació del tumor autòleg pot fer que aquest sigui immunogènic i es provoqui una resposta inflamatòria contra ell, que de manera natural no es dona, possiblement pels mecanismes immunoreguladors del tumor (Berd, et al. 1991, Sensi, et al. 1997). Existeixen moltes raons de per què és difícil preparar una vacuna autòloga. No sempre

hi ha disponibilitat del tumor del propi pacient en estadis inicials de la malaltia, no s'assegura l'estandarització dels diferents lots d'una vacuna pels diferents pacients, pot portar molt de temps l'establiment i expansió d'una línia tumoral en cultiu per cada pacient.

Per tal d'evitar aquests problemes, alguns investigadors van decidir utilitzar cèl·lules al·logèniques, i utilitzar-les com a vacunes. En la selecció d'aquestes cèl·lules s'haurien de tenir presents una sèrie de requeriments generals:

1. Buscar línies amb la major expressió d'antígens associats a tumor que puguin induir tant una resposta cel·lular com una humoral.
2. Expressió de HLA classe I i classe II. Millor que els haplotips seleccionats coincideixin amb la major part dels pacients. Selecció dels més freqüents.
3. Rigorós control de qualitat. A part dels requeriments òptims de creixement, la no presència de cap tipus de contaminació vírica, bacteriana o per fongs ha de ser descartada i rutinàriament analitzada.

Fins al moment hi ha reportats diversos assatjos clínics on s'ha tractat primer provar la viabilitat de les vacunes en un petit grup de pacients, generalment amb un estat avançat de la malaltia. De manera col·lectiva, els resultats publicats han mostrat mínimes respostes clíniques, aquestes respostes s'han pogut observar de tota manera, en càncers d'origens molt diferents, carcinoma de colon, càncer colorectal, càncers ginecològics, leucèmies, càncer de pulmó, melanoma, carcinoma renal i sarcomes. Les possibles raons inclouen la manca d'una estandarització en la producció de la vacuna i el fet de que han sigut estudiats múltiples tipus de càncer amb propietats immunogèniques variables.

Un dels treballs pioners de la utilització d'una vacuna al·logènica polivalent en melanoma és el portat a terme pel grup de Morton (Morton, et al. 1996). En l'estudi s'utilitzaven tres línies al·logèniques de melanoma, les quals expressaven alts nivells de sis antígens representatius de melanoma. La inoculació de la vacuna irradiada s'acompanyava les dues primeres vegades amb BCG, com adjuvant. Es va portar a terme un estudi en pacients en estadis III i IV, i com a control utilitzava un grup de pacients històrics del seu hospital, els quals havien rebut els règims de quimioteràpia millor acceptats en cada època. Els resultats d'aquest estudi mostraven una significativa supervivència major del grup de pacients que rebien la vacuna respecte els tractats amb

quimioteràpia (**taula 4**). De manera interessant, aquells pacients amb una supervivència més llarga, dins el grup de vacunats, presentaven una resposta incrementada per anticossos IgM contra determinats antígens de melanoma, així com una hipersensibilitat cutània retardada (DTH). Posteriorment altres grups han demostrat l'activitat antitumoral de vacunes al·logèniques, encara que queda per demostrar l'eficàcia fins que no es portin a terme els estudis randomitzats adequats.

Taula 4: Augment significatiu de la supervivència en pacients de melanoma malignes (estadis III i IV) amb el tractament d'una vacuna polivalent amb cèl·lules senceres.

AJCC	Vacunacions terapèutiques			Controls històrics			Significació
	pac / s. med / s. 5anys (mesos)			pac / s. med / s. 5anys (mesos)			
IV	157	23	25%	1.521	7.5	6%	p=0.0001
III	283	90	52%*	1.474	24.3	33%*	p=0.002 (p*=0.0002)

La resposta al·logènica i la immunitat tumoral

La forta resposta al·logènica contra les molècules de MHC d'un donant en els trasplantaments, i la resposta dèbil contra antígens tumorals, representa dues cares importants de la resposta immunitària, divergents però potencialment interactives. La resposta al·logènica generada podria ser aprofitada d'una manera satisfactòria per promoure l'erradicació d'un càncer metastàtic pel sistema immunitari.

Els limfòcits T immadurs, responen amb una reactivitat inusual contra antígens del MHC no propis, d'altres membres de la mateixa espècie, fenomen anomenat al·loagressió. Mentre que la freqüència d'un precursor T per antígens ambientals està en l'ordre de 1 de cada 10^4 a 1 de cada 10^5 , aproximadament d'un 1-10% del total de limfòcits d'un individu poden respondre contra antígens de MHC d'un altre. Es produeix un reconeixement directe per les cèl·lules T de les molècules de MHC com a estructures intactes en la superfície cel·lular.

Implicacions per la immunoteràpia tumoral

L'objectiu de la teràpia antitumoral és l'estimulació d'una resposta T sistèmica contra pèptids tumorals presentats per antígens leucocitaris propis (HLA). És només a través d'aquests reconeixement restringit per molècules pròpies que els dipòsits metastàsics disseminats poden ser potencialment destruïts.

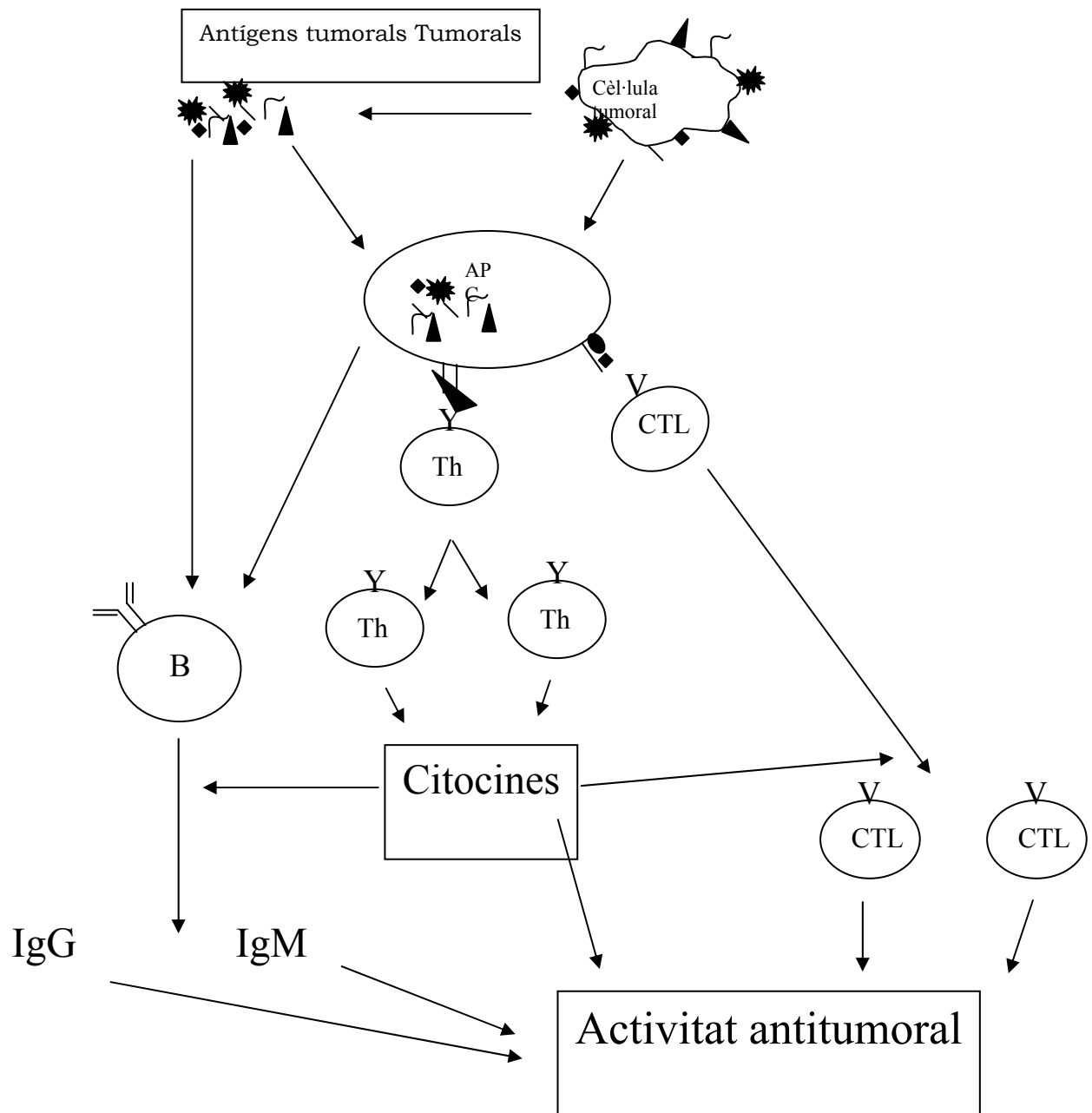
La gran freqüència de precursors que medien l'al·loreconeixement pot tenir amplies implicacions en la generació d'aquestes respostes T restringides pel propi MHC (Fabre, 2001).

- L'elevada proporció de cèl·lules T que responen per reconeixement directe contra les molècules intactes al·logèniques de MHC, pot també representar un nombre de cèl·lules amb una especificitat per pèptids ambientals normals presentats per molècules de HLA pròpies. Aquesta crossreactivitat que ha sigut demostrada per pèptids virals, implica tant a CD4⁺ com a CD8⁺. No hi ha una raó *a priori* de que les cèl·lules T que responen d'una manera al·logènica no tinguin una especificitat per pèptid tumorals presentats per les molècules de HLA pròpies. Malgrat s'ha apuntat aquesta possibilitat en el tractament o prevenció de les infeccions per HIV, no ha sigut considerada per atacar les dianes tumorals aprofitant aquesta crossreactivitat.
- La segona implicació fa referència a l'expansió de cèl·lules T CD4⁺ per reconeixement directe de MHC II i la provisió de resposta T helper pel reconeixement ja de pèptids propis. Aquesta és una consideració crítica ja que la generació de cèl·lules T CD4⁺ antitumorals és dèbil o absent, com ja s'ha comentat prèviament, en la majoria de protocols de vacunació.
- Per últim, la importància de la resposta innata com a sistema per generar un microambient immunoestimulador es comença a conèixer actualment. La captació de pèptids tumorals i la seva presentació per cèl·lules dendrítiques intersticials, en un microambient quiescent, genera un estat d'anèrgia. La resposta al·logènica té el potencial de produir un medi ric en citocines i lligands coestimuladors per a que la resposta generada no sigui anèrgica si no amb potencial antitumoral.

Mecanisme d'inducció d'immunitat per una vacuna (lisat o cèl·lula completa)

El mecanisme d'inducció d'una resposta T helper i la producció d'anticossos no es diferencia als antígens vírics o bacterians. El mecanisme d'inducció de CTL a partir

d'antígens solubles no està clar. Malgrat els antígens solubles són processats i presentats per la via de classe II, existeixen algunes evidències molt discutides, d'una nova via pel processament d'antígens solubles a través de classe I i la generació tant *in vivo* com *in vitro* d'una resposta CTL, procés anomenat de crossreactivitat (Berard, et al. 2000). Diferents estudis presenten que cèl·lules dendrítiques carregades amb lisat de cèl·lules tumorals processen i presenten antigen de manera eficient, induint resposta CTL. La cèl·lula tumoral pot presentar pèptids propis en les seves molècules de HLA, i es podria produir un reconeixement directe de la CTL, però aquest contexte és poc immunogènic degut a la manca de molècules coestimuladores en la membrana de la cèl·lula tumoral (B7.1 i B7.2), l'absència de citocines estimuladores, així com altres factors immunosupressors implicats (Foss, 2002). Huang et al, van mostrar clarament que en un model de tumor murí era necessària la presència de cèl·lules derivades del moll d'ós, possiblement del llinatge de cèl·lules dendrítiques. Aquestes cèl·lules eren riques en molècules de coestimulació, molècules MHC involucrades en el processament de material soluble a partir de cèl·lules necròtiques i estimuladores d'una resposta CTL (Larsson, et al. 2001). En la **figura 1** es representa el mecanisme suggerit per la inducció d'una resposta immunitària antitumoral per vacunes de cèl·lules completes o lisats.

Figura 1: Inducció de la resposta immunitària antitumoral.

Monitorització de la resposta a les vacunes

Principis generals

1. Monitorització del mètode de vacunació, incloent els paràmetres de l'administració de la vacuna, propietats biològiques i efectes locals o sistèmics que porta a una resposta immunitària efectiva i com podem predir dades clíniques.
2. Mesura de la resposta immunitària a la vacuna, basat en el millor coneixement disponible que ens mostri, tipus, qualitat i magnitud de la resposta necessària per tenir un efecte antitumoral.
3. Valoració de factors relacionats amb el tumor, coneguts o sospitosos d'influenciar el desenvolupament i evolució d'una resposta antitumoral efectiva *in vivo*.

És essencial demostrar que la vacuna indueix una resposta immunitària que reconeix els antígens, bé processats de manera natural per la cèl·lula tumoral i presentada per aquesta (dèbil immunogenicitat), o bé per APC, ja que l'eficàcia antitumoral no es pot donar d'altre manera.

També és important determinar la magnitud i la qualitat de la resposta:

- a) Nombre de cèl·lules específiques per l'antigen tumoral.
- b) La seva avidesa (afinitat) per l'antigen.
- c) Producció de citocines.
- d) Capacitat de desplaçament al tumor, aquest punt, pot ser crític en mediar els efectes.

Es creu que un dels factors més importants és que els limfòcits específics pel tumor, no poden accedir al tumor i lisar les cèl·lules.

Malgrat que la millor valoració que es pot fer, és en el mateix lloc on hi ha el tumor i valorar la infiltració cel·lular; normalment només és possible monitoritzar a través de nòduls limfàtics i sang perifèrica. Una consideració important és que no existeixen resultats per optimitzar el temps (timing) de recollida de mostres, i en particular per les respostes mediades per limfòcits T contra vacunes antitumorals.

Un aspecte determinant en la monitorització de la resposta a la vacuna té a veure amb el tipus d'antigen utilitzat. La utilització d'un o diversos pèptids facilita la seva monitorització ja que es disposa l'antigen purificat pel qual s'està intentant generar una

resposta, per contra amb la utilització de lisats o cèl·lules completes, la seva monitorització és més complicada ja que no sabem o és difícil saber contra quin o quins antigens s'està generant la resposta, en el cas de que aquesta s'hagi induït.

Determinació de l'assaig

La determinació de la resposta immunitària prevacunació *versus* postvacunació s'ha de demostrar ser específica pel preparat que forma part de la vacuna, i on és aplicable, que sigui específic per l'antigen tumoral i no per a components adjacents de la vacuna. L'objectiu de monitoritzar els estudis inicials clínics és poder correlacionar la resposta immunitària amb les evidències clíniques. Sovint s'arriba a la conclusió que el tractament que indueix una resposta immunitària produeix uns beneficis clínics. Normalment una bona resposta només representa un millor grup pronòstic de pacients que són capaços de generar una resposta immunitària contra la vacuna (Lee, et al. 1999).

La inducció d'una resposta immunitària en un pacient, depèn de diversos factors associats al propi pacient, que inclouen tractaments amb agents citotòxics abans de la vacunació, tipus de malaltia, estat de la malaltia, estat general del pacient, etc...

Les vacunes derivades de fonts de tumors al·logènics, presumiblement indueixen resposta contra antigens compartits, els quals poden o no ser coneguts. Si és conegut, es pot monitoritzar la resposta i la immunogenicitat de la vacuna, en el cas de que no siguin coneguts calen altres aproximacions i el major objectiu és determinar si la resposta immunitària és induïda per antigens expressats en la vacuna. Respostes serològiques i per limfòcits T poden ser mesurades però a l'igual que amb antigens coneguts, calen línies autòlogues o amb línies al·logèniques amb HLA compartit, preparades per ser utilitzades com a dianes (Herr, et al. 1996).

Mesura de la resposta per limfòcits T contra les vacunes

Malgrat la descripció de diversos assatjos per analitzar la resposta T, paral·lelament a l'avaluació clínica, cap d'ells pot avaluar l'espectre complet de les possibles respostes del limfòcit. A més, no existeixen correlacions clares entre la resposta immunitària i l'activitat antitumoral.

Les respostes cel·lulars a l'activació i reconeixement antigènic porta a l'activació cel·lular, canvi en l'expressió de marcadors de superfície, proliferació, producció de citocines i lisi específica de cèl·lules diana. Per una resposta mediada per CD4⁺ i CD8⁺ la magnitud de la resposta (freqüència de la cèl·lula T específica per l'antigen), així com l'afinitat pel respectiu complex peptid/MHC, poden ser factors importants en determinar si la immunització pot tenir com a resultat la regressió del tumor.

Per últim, no hem d'oblidar que molts protocols de vacunació inclouen molècules immunogèniques per sí mateixes, i el que es mesura és la reactivitat contra aquestes molècules. Les mesures que es realitzen en aquestes situacions, a part d'avaluar les respostes mediades pels limfòcits T, són les reaccions d'hipersensibilitat, mesurada per la reactivitat cutània, i sobre tot la resposta humoral, que en determinades situacions sembla correlacionar amb la resposta clínica que la determinada vacuna produeix (Hsueh, et al. 1998).

Vacunes tumorals genèticament modificades

La clonació dels gens de molècules reguladores del sistema immunitari, ha obert una nova generació de vacunes cel·lulars, amb la transducció a les cèl·lules tumorals de gens de molècules immunològicament actives. L'evaluació de l'activitat antitumoral d'aquest procediment terapèutic s'ha portat a terme en models murins.

En general els tipus de gens utilitzats es poden dividir en tres categories:

1. Gens del complex major d'histocompatibilitat.
2. Gens codificants per molècules coestimuladores, del tipus B7 (Chen, et al. 1992).
3. Gens codificants de citocines.

La utilització d'aquest tipus de vacunes podria ser important en aquells tipus de tumors en els quals no es coneix quins són els antigens associats al tumor, ni els epítops immunodominants. Es tracta que en determinats tumors poc immunogènics, introduir modificacions que generin respostes inflamatores en el mateix lloc de la injecció.

Els primers estudis, portats a terme per Lindernmann i Klein, van mostrar que lisats tumorals eren immunogènics si prèviament havien estat infectats amb el virus de la influença, mentre que el lisat sol, o bé barrejat amb el virus, no conferia aquesta immunogenicitat i no s'induïa una resposta sistèmica. Degut a la necessitat de la infecció per a que la vacuna fos immunogènica, Klein i Lindernmann, van hipotetitzar

que els antígens tumorals dèbils es podrien associar o incorporar al virus, i esdevenir immunògens més potents. A partir d'aquests estudis inicials, es van desenvolupar noves tècniques de transferència de gens, utilitzant vectors retrovirals, adenovirals, etc...

En l'actualitat, el major interès d'aquesta tecnologia es centra en la introducció de gens de citocines en la cèl·lula tumoral. Diversos estudis han fet servir pràcticament la totalitat de citocines reguladores conegudes, però principalment en models experimentals, les citocines amb major potència antitumoral són la IL-2, IL-12 i GM-CSF (Nanni, et al. 1998), ja que generen una potent resposta inflamatòria *in situ*, i a més condicionen la resposta provocada per cèl·lules CD8⁺ i NK (Tanaka, et al. 2000). Un dels problemes actuals i que encara està en vies de solució és que la transducció de gens *in vivo*, són processos poc eficients quan s'utilitzen virus deficients per la replicació.

Els estudis portats a terme en humans són pocs, i es redueixen a un nombre petit de pacients, en estadis molt avançats de la malaltia tumoral. Fins al moment, es tracta de demostrar la seva seguretat d'utilització i la seva capacitat d'induir alguna resposta antitumoral. Els treballs publicats fan referència a la forta estimulació de l'estatus immunològic del pacient, però no es parla de respostes clíniques. Estem encara lluny dins el camp de la utilització de vacunes modificades genèticament, i queden molts aspectes per a ser estudiats, entre ells el més important, de la seva seguretat. La vacunació en models animals de cèl·lules al·logèniques tumorals transfectades amb el gen de GM-CSF (Kayaga, et al. 1999) i una proteïna del virus de papiloma, té com a resultat l'expansió de limfòcits específics per l'antigen tumoral, no només expressat en la cèl·lula de la vacuna, si no en les cèl·lules tumorals injectades, i prevenen l'establiment de les línies tumorals injectades (Chang, et al. 2000).

Futur de les vacunes

Varies àrees d'interès busquen la millora de les vacunes. La primera és la combinació de citocines immunomoduladores amb les vacunes per augmentar la seva eficàcia. La combinació amb drogues quimioterapèutiques, factors antiangiogènics o combinades amb radioteràpia han millorat la seva eficàcia. Adjuvants vírics o bacterians amb gens de citocines també podrien augmentar l'eficàcia, malgrat que la prèvia immunitat antivírica dels pacients suposa un problema. Finalment s'està explorant l'ús de cèl·lules dendrítiques per augmentar la resposta contra les vacunes, com adjuvants

naturals. Les cèl·lules dendrítiques són les cèl·lules presentadores d'antigen més potents que es coneixen, disposen de tots els mecanismes de captura, processament i presentació d'antigen, i en presència de molècules coestimuladores i de citocines proinflamatòries creen un microambient idoni per a la generació d'una resposta adequada mediada per limfòcits T.

Cèl·lules Dendrítiques. Vacunes

Les cèl·lules dendrítiques (DC) van ser identificades per primera vegada en l'epidermis en 1868, i van ser anomenades cèl·lules de Langerhans (Langerhans, 1868). La seva presència en altres teixits van ser descrites al principi dels 70 per Cohn i Steinman (Steinman, et al. 1973), les cèl·lules dendrítiques van ser així anomenades per la seva morfologia característica amb llargues dendrites. Formen part integral del sistema limfohematopoiètic i actuen com a sentinelles del cos, provocant la iniciació de la resposta del sistema immunitari (Banchereau, et al. 1998). Es troben localitzades en l'interstici dels òrgans, inclòs el cervell. El seu estudi i la seva definició va ser difícil fins que al principi dels 90 amb el desenvolupament de les tècniques de cultiu amb l'ús de citocines recombinants, es van poder obtenir cèl·lules dendrítiques en quantitats suficients (Romani, et al. 1994). En l'actualitat es comença a conèixer el paper de les DC, no només com a cèl·lules presentadores d'antigen, si no com a reguladores en la reparació de teixits, en el rebuig a trasplantaments i en la iniciació i manteniment de la resposta inflamatòria. Resultats antitumorals prometedors en ratolins utilitzant cèl·lules dendrítiques com adjuvants naturals van estimular el seu ús en humans (Dallal, et al. 2000). Alguns assatjos clínics han estat publicats, en els quals s'ha destacat la seva seguretat d'ús i respostes clíniques evidents i esperançadores (Banchereau, et al. 2001).

Cèl·lules dendrítiques

Les DCs són les cèl·lules presentadores d'antigen més potents en humans descrites fins al moment; expressen alts nivells de classe I i classe II del MHC, molècules coestimuladores i produeixen una varietat de citocines que inclouen IL-1, IL-12, IL-18, IFN- α i TNF- α , que estimulen una resposta de tipus Th1 i per tant de tipus cel·lular (Banchereau, et al. 2000). Provoquen una potent resposta al·logènica (Sallusto, et al. 1994), (100 vegades superior a altres APC) i expressen de 10 a 100 vegades

nivells més alts de MHC respecte monòcits o limfòcits B. Tenen la propietat de que amb un nombre baix de cèl·lules dendrítiques i baixes concentracions d'antigen generen una forta resposta T, tant de cèl·lules quiescents, memòria i "naive" (Sallio, et al. 2001). L'altra part de la història és que poden induir tolerància (Hackstein, et al. 2001), delecció de cèl·lules T autoreactives, timòcits i anèrgia en cèl·lules T madures (Jonuleit, et al. 2001). Sembla clar que les DC capturen antígens per als quals la immunitat està normalment abolida.

Origen de les cèl·lules dendrítiques

Les DCs constitueixen una rara i heterogènia població fenotípicament diferent dels macròfags (CD14⁻) i representen menys del 1% de la totalitat de les cèl·lules circulants.

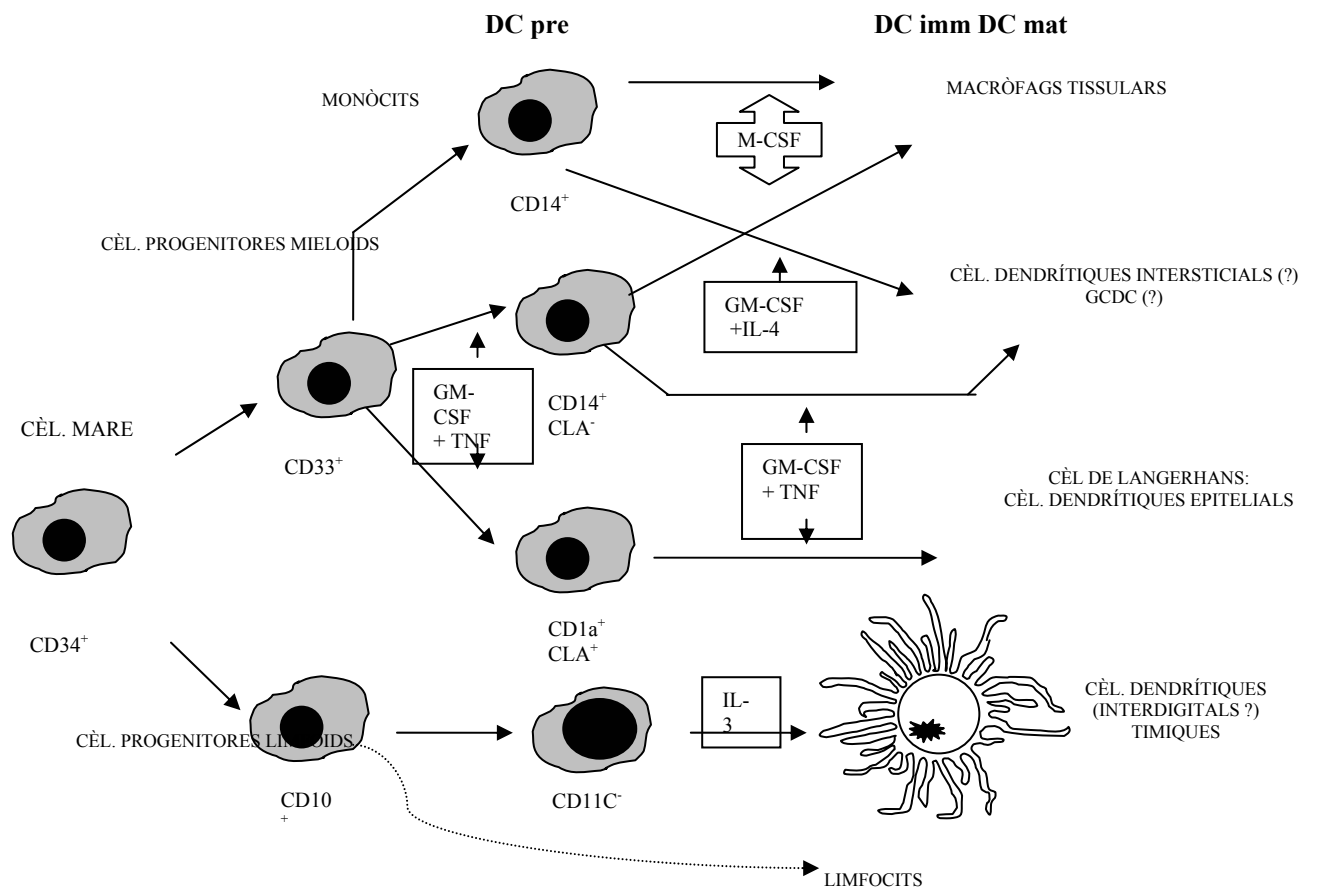


Figura 2. Ontogènia de les cèl·lules dendrítiques .

En humans, els estudis recents indiquen que les DCs provenen de dos llinatges separats (**figura 2**). La relació entre ells és controvertida, principalment per la manca de marcadors específics pels determinats precursors. Les DCs mieloids deriven d'un precursor determinat $CD34^+$ a DCs o d'un precursor de granulòcits/monòcits. Aquestes DC mieloids també poden ser derivades *in vitro* a partir de diferents tipus cel·lulars prèviament considerats com a terminals; així monòcits i precursors de granulòcits, es poden diferenciar a cèl·lules dendrítiques quan s'exposen *in vitro*, a combinacions apropiades de citocines que inclouen GM-CSF, TNF- α , amb o sense IL-4 (Ardavin, et al. 2001).

En el ratolí es va descriure una població de cèl·lules dendrítiques intratímiques derivades a partir de progenitors limfoides $CD4^{low}$. Provenen d'un precursor $CD4^+CD8^+$ i poden ser diferenciats *in vitro* en absència de GM-CSF. Aquestes cèl·lules d'origen limfoide es caracteritzen per l'expressió de l'homodímer $CD8\alpha$. Per contra, no es pot descartar el fet de que existeixi un únic precursor $CD4^{low}$ que doni lloc a les diferents subpoblacions de cèl·lules dendrítiques $CD8\alpha^-$ i les $CD8\alpha^+$ i que existeixi una flexibilitat en la generació de les diferents cèl·lules, al menys en el ratolí (del-Hoyo, et al. 2002). L'origen de les cèl·lules dendrítiques en models murins és en l'actualitat un tema en forta controvèrsia, i queden per establir quins mecanismes fisiològics porten a la generació de cèl·lules dendrítiques *in vivo*. Menys encara es coneix en humans, on no ha sigut encara descrita una població $CD8\alpha^+$. Encara que sí han estat descrites DCs derivades a partir de precursors limfoides $CD10^+$, dels quals no s'ha caracteritzat el seu paper en el sistema immunitari. Són cèl·lules que es caracteritzen per una expressió intensa del CD123 (receptor de la IL-3) així com la manca del CD1a i CD11c (com a marcadors mieloids). Aquestes cèl·lules són productores d'interferons de tipus I (α i β) quan interaccionen amb partícules víriques i requereixen IL-3 com a factor per sobreviure (Banchereau, et al. 2000). No està gaire clar, que les diferents subpoblacions de cèl·lules dendrítiques que es poden obtenir *in vitro* amb combinacions diverses de citocines, estiguin representades *in vivo*. Degut a l'interès en la utilització de cèl·lules dendrítiques en protocols terapèutics, s'estan fent esforços en determinar el paper de cadascuna de les subpoblacions.

Les cèl·lules plasmacitoides (DC2), són cèl·lules d'origen limfoid; que secreten nivells alts d'interferó de tipus I quan són estimulades amb virus i van ser inicialment

implicades en la generació de limfòcits T reguladors i limfòcits T de tipus Th2 (Krug, et al. 2001), donat que la secreció dels interferons de tipus I tenia un efecte immunoregulador en altres cèl·lules dendrítiques, evitant la maduració, provocant la secreció de IL-10 de DCs mieloids, així com afectant la secreció de IFN- γ per part de limfòcits T estimulats. Molt recentment, amb la descripció d'un patró diferencial d'expressió dels receptors TLR (Toll like receptors) (Kadowaki, et al. 2001), entre poblacions limfoides i mieloides de cèl·lules dendrítiques, no sembla tant clara aquesta separació entre DC2 (limfoides) generadores de Th2 i DC1 (mieloides) generadores de Th1; ja que les primeres tenen la capacitat d'induir una resposta de tipus Th1 mediada per una alta producció de IL-12(p70), quan les cèl·lules limfoides s'estimulen amb CpG via TLR-9, o bé amb la interacció amb CD40L i estímuls vírics les cèl·lules plasmacitoides generen una resposta de tipus Th1 molt potent (Cella, et al. 2000).

Un aspecte de la interacció amb aquests receptors, provenen de l'estudi de l'efecte sobre TLR-7, que s'expressa tant en la subpoblació de cèl·lules dendrítiques plasmacitoides com en la de mieloides. A més d'augmentar la supervivència i provocar la maduració de les cèl·lules, la senyalització a través del TLR-7 selectivament facilita la producció de IFN- α de les PDC, i IL-12 a partir de les MDCs (Ito, et al. 2002). Confereixen a la secreció de citocines per les cèl·lules dendrítiques (i per tant el tipus de resposta T que es genera) a més de la limitació de la subpoblació que s'estimula ("lineage model"), una plasticitat de producció en funció dels receptors expressats i de l'estímul rebut per la cèl·lula dendrítica ("instruction model").

Els TLRs, són proteïnes de transmembrana de tipus I, i funcionen com a receptors que reconeixen estructures conservades en microbis (PRRs pattern-recognition receptors). Els dominis citoplasmàtics dels TLRs són similars als del receptor de la IL-1 cosa que li permet utilitzar les mateixes vies de senyalització (Akira, et al. 2001).

Dins la població de cèl·lules dendrítiques mieloides, derivades de monòcits, també s'ha identificat una subpoblació que estaria implicada en la generació d'una resposta de tipus Th2. Correspon a les cèl·lules CD1a⁻, produeixen nivells alts de IL-10, i no produeixen IL-12 quan es maduren amb LPS + IFN- γ i CD40L (que és la maduració adequada per la producció de IL-12 p70). Per contra aquestes cèl·lules dendrítiques no tenen compromesa la seva capacitat al·loestimuladora (Chang, et al. 2000).

És intrigant conèixer si les diferents subpoblacions de cèl·lules dendrítiques ténen predeterminada la capacitat de dirigir la resposta immunitària cap a Th1 o Th2, cosa que podria implicar una manca de flexibilitat que es requereix per reaccionar adequadament pels diferents patògens en els diferents teixits. Al menys en el ratolí això no sembla ser així, ja que la injecció de cèl·lules dendrítiques $CD8\alpha^+$ (implicades en la generació de Th1) que provenen de ratolins $IL-12^{-/-}$ o $IFN-\gamma^{-/-}$, estimulen la producció de IL-4, IL-5 i IL-10 i no de $IFN-\gamma$ per part de les cèl·lules T. Mentre que la injecció de cèl·lules dendrítiques $CD8\alpha^-$ (Th2) que provenen de ratolins $IL-10^{-/-}$, ràpidament incrementen la producció de $IFN-\gamma$ dels limfòcits T. Per tant la funció de les diferents subpoblacions de cèl·lules dendrítiques sembla ser flexible i modulada per factors ambientals, com en aquest cas $IFN-\gamma$ i IL-10. Per tant la capacitat de generació de la resposta Th, de les cèl·lules dendrítiques que migren al gangli limfàtic és clarament transmetre la informació adequada del teixit infectat cap als limfòcits T i induir la resposta immunitària més adequada (Huang, et al. 2001).

S'han descrit 3 models per explicar com les DCs podrien controlar la polarització dels limfòcits T:

1. Existència de diferents subpoblacions de DCs.
2. La naturalesa de l'estímul que activa a la cèl·lula dendrítica.
3. La cinètica d'activació de la cèl·lula dendrítica

Maduració de les cèl·lules dendrítiques

La maduració de les DCs és un procés continu que s'inicia en els teixits perifèrics quan la cèl·lula dendrítica entra en contacte amb l'antigen i/o amb citocines inflammatòries, i que es completa durant la interacció DC-T. Constitueix una sèrie de canvis coordinats, que inclouen la disminució de la macropinocitosi i els receptors Fc, la transició dels compartiments rics en MHC II a la superfície cel·lular en forma de complexos peptídics, l'augment de molècules accessòries coestimuladores, secreció de citocines, canvis en el patró de receptors per quimiocines, etc. La maduració representa un punt de control per l'inici de la immunitat (Banchereau, et al. 2000).

Molts factors estan implicats en la inducció de la maduració:

- Productes derivats de patògens virals o microbians, del tipus LPS, CpG DNA, o dsRNA. Per molts d'aquests els receptors TLR juguen de manera directe o indirecte

un paper crític. La presència de receptors TLRs en la maduració proporciona un mecanisme atractiu pel qual les cèl·lules dendrítiques actuarien de nexa entre la immunitat natural i l'adquirida.

- Citocines proinflamatòries tals com TNF- α , IL-1 β , IL-6, i prostaglandines com per exemple PGE₂ (Steinbrink, et al. 2000). La interacció a través dels receptors de la família TNF per aquestes citocines, provoca l'activació de NF- κ B (O-Sullivan, et al. 2002).
- La interacció amb els limfòcits T, també provoca la maduració de la cèl·lula dendrítica, via CD40L, i per la secreció de IFN- γ que sinergitza amb altres senyals maduratives i estimula la secreció de IL-12 (Morel, et al. 2001).
- Altres situacions poden provocar la maduració de les cèl·lules dendrítiques, com és la presència de proteïnes d'estrès tèrmic (p.e. HSP-70) (Todryk, et al. 1999), com a resultat d'una destrucció tissular, en els cultius *ex-vivo*, s'ha descrit que la pròpia disgregació dels contactes cèl·lula-cèl·lula provoca la maduració. En resum, faria referència a totes els senyals anomenats de "perill" per on el sistema immunitari reconeixeria una situació patològica (Singh-Jasuja, et al. 2000).
- De manera continuada es descriuen factors nous que provoquen o modulen la maduració.
- Per contra alguns factors s'han descrit com a inhibidors de la maduració de les cèl·lules dendrítiques, i per tant de la seva funcionalitat. La presència de IL-10 en el moment d'induir la maduració inhibeix l'expressió de CD80, CD86, i de les molècules de MHC II, també té un efecte inhibitori en l'expressió de CD83 i de la secreció de citocines, en concret IL-12 (quan han sigut activades amb LPS), i TNF- α . La IL-10 no té el mateix efecte en cèl·lules plenament madures, i no sembla afectar a la seva funcionalitat.
- Major controvèrsia susciten les prostaglandines (en concret PGE₂). Alguns estudis la presenten com una molècula inhibidora de la maduració, mentre que en altres situacions esdevé un factor clau en la maduració "total" de les DCs. No sembla afavorir la secreció de IL-12 (Kalinski, et al. 2001), però incrementa tant l'expressió de les molècules coestimuladores, així com l'expressió *de novo* de CCR7 (Scandella, et al. 2002), receptor de quimiocines que dirigeix a la cèl·lula dendrítica cap als ganglis limfàtics. És molt possible que el benefici que aporta en l'augment

de la capacitat estimuladora de les cèl·lules dendrítiques madures en presència de PGE₂ (Jonuleit, et al. 1997), pugui contrarestar l'efecte antagonístic que té sobre la IL-12 (Wan, et al. 2001). La vacunació de pacients de melanoma amb cèl·lules dendrítiques madures amb la barreja de citocines més la PGE₂, carregades amb pèptids derivats de MAGE-3, mostra que els precursors cel·lulars específics generats presenten un perfil de secreció de citocines de tipus Th1, no sembla afectar la PGE₂ i la seva interacció amb la IL-12, en la generació d'aquesta resposta (Schuler-Thurner, et al. 2002).

Es requereixen diversos agents estimuladors, principalment d'estímuls bacterians (LPS, CpG) amb ajuda de la senyalització T a través de CD40-CD40L (Lapointe, et al. 2000), per assolir la maduració completa de la cèl·lula dendrítica i molt possiblement la secreció de la forma activa de la IL-12 només tingui lloc dins una curta finestra d'activació (8-16 hores).

La família de les molècules coestimuladores B7, també es veu fortament regulada durant la maduració i influencia la polarització cap a Th1 o Th2. Per exemple, CD86 augmenta marcadament durant la maduració, i s'expressa *de novo* en els clusters de MHC-pèptids. Altres molècules que augmenten són B7-DC/PD-L2, que estimulen la producció de citocines de tipus Th1 per limfòcits T immadurs (Wilcox, et al. 2002). B7-H3, una molècula homòloga a B7, clonada en cèl·lules dendrítiques, la qual estimula la producció de IFN- γ . Per contra, durant la maduració disminueix la expressió del lligand de ICOS, el qual potencia la polarització cap a Th2.

Un concepte molt recent que s'està introduïnt és l'estadi semi-madur de les cèl·lules dendrítiques (Lutz, et al. 2002). Les DCs en aquest estadi podrien induir tolerància. Entre els factors que induirien aquest estadi de semi-maduració hi hauria: el TNF- α , la flora intestinal, les cèl·lules apoptòtiques, etc... Les DCs semi-madures expressarien nivells elevats de molècules presentadores d'antigen, alts nivells de molècules coestimuladores, però no produirien les citocines responsables de la generació d'una resposta per part dels limfòcits T. Les cèl·lules dendrítiques en aquest estat serien el major component de l'homeostasi immunitària, l'establiment d'una tolerància activa i permanent i la inducció de limfòcits T CD4⁺ reguladors. En aquest estat, les cèl·lules són susceptibles de respondre a estímuls de tipus LPS, a través de TLRs, acabar la seva maduració i generar en aquest cas una resposta immunitària.

Migració

Les cèl·lules dendrítiques immadures migren des dels vasos sanguinis cap als teixits perifèrics on actuen com a sentinelles fins que capturen un antigen i reben senyals de “perill o alerta”. Un dels aspectes que provoca la maduració de les cèl·lules dendrítiques és la remodelació del perfil de receptors de quimiocines que expressen i que faciliten la migració cap als òrgans limfoides on presentaran aquest antigen capturat en perifèria a les cèl·lules T i B del gangli, i on poden desencadenar la resposta antitumoral (Kirk, et al. 2001).

En les cèl·lules dendrítiques immadures derivades *in vitro* a partir de monòcits s’han descrit diversos receptors de quimiocines: C5aR, CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR1, CXCR2 i CXCR4, i migren en resposta a quimiocines de tipus CC com MCP-3, MCP-4, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β i MIP-5, i a la quimiocina SDF-1 de tipus CXC. CCR2 i CCR5 en cèl·lules dendrítiques derivades de monòcits (a través de MIP-1 α i β i RANTES) i CCR6 principalment en cèl·lules de Langerhans i dendrítiques derivades a partir de CD34⁺, representen un mecanisme fonamental per la quimioatracció de precursors cel·lulars als llocs inflamatoris epiteliais. En contrast, les cèl·lules dendrítiques madures, desensibilitzen o bé inhibeixen aquests receptors que les mantenen en la perifèria, però adquireixen resposta a 6Ckine i MIP-3 β per mitjà de l’expressió de CCR7 que atrau d’una manera selectiva i potent al gangli limfàtic via els limfàtics aferents a les dendrítiques madures. Possiblement les cèl·lules dendrítiques que acaben d’arribar, poden ser fonts en sí mateixes de 6Ckine i MIP-3 β permetent l’amplificació i/o persistència del senyal quimiotàctic per cèl·lules dendrítiques i per cèl·lules T memòria que també expressen CCR7 (Vanbervliet, et al. 2002).

La migració de les cèl·lules madures al gangli, no només serveix per activar als limfòcits T, pot contribuir també a la disseminació d’una infecció en l’hoste, així la captura del virus HIV-1 pel receptors de tipus lectina (DC-SIGN), no permet la seva internalització en la dendrítica, però reté el virió en forma infectiva en la membrana permetent el transport del virus cap als teixits limfoides on es promou la infecció *in trans* de les cèl·lules T CD4⁺ (Engering, et al. 2002) i transmetre una vigorosa infecció a les CD4⁺ en absència de replicació en les cèl·lules dendrítiques.

Captura de l'antigen

Una de les característiques més importants de les cèl·lules dendrítiques immadures és la seva capacitat eficient de captura d'antígens per vies molt diverses:

- Per macropinocitosis. És un procés constitutiu, depenent del citoesquelet i que permet a una cèl·lula captar l'equivalent a la meitat del seu volum en una hora.
- Endocitosi mediada per receptors, lectines de tipus C (DEC-205) o DC-SIGN (Engering, et al. 2002), receptors Fc γ de tipus I (CD64) o tipus II (CD32) (captura d'immunocomplexes o partícules opsonitzades) i receptors de tipus Fc ϵ . També presenten receptors de tipus manosa que contenen gran quantitat de carbohidrats involucrats en la internalització d'una gran varietat de glicoproteïnes. A diferència dels receptors Fc, que són degradats amb la seva càrrega, els receptors de manosa es separen dels seus lligands al pH endosomal i permet el seu reciclatge. Això permet la captura i acumulació de molts lligands amb un nombre baix de receptors. S'ha implicat la fagocitosi a través dels receptors Fc γ en el procés de crosspresentació d'antígens per part de les cèl·lules dendrítiques, segons la manera d'entrada dels antígens seguirien la via clàssica o la via alternativa (Amigorena, 2002).
- Fagocitosi de partícules tal com boles de làtex, fragments apoptòtics i necròtics (involucrant CD36 i les integrines $\alpha\nu\beta 3$ i $\alpha\nu\beta 5$), partícules virals, bacteries i paràsits intracel·lulars (*Leishmania major*). Des d'una perspectiva evolutiva, la captura de bacteris o partícules bacterianes és fisiològicament la forma més rellevant de captura d'antígens (Urban, et al. 2001). És particularment aquesta via, també implicada en l'eliminació de cossos apoptòtics i necròtics, la que estaria implicada en el fenomen de crosspresentació d'antígens captats del medi extracel·lular i presentats per classe I, generant una resposta CTL.
- També internalitzen proteïnes d'estrès tèrmic associades a pèptids (gp96 i Hsp70), a través de mecanismes no del tot coneguts, però mediat per receptors com es dedueix de la capacitat de CD91 d'interaccionar i endocitar aquestes proteïnes d'estrès (Basu, et al. 2001).
- Per últim, la formació de vesícules recobertes de clatrina, és un procés continuat durant tot el procés de maduració, per tant, les cèl·lules dendrítiques madures no deuen ser considerades completament incapaces d'endocitar partícules.

És de sospitar que els diferents estímuls rebuts per la cèl·lula dendrítica puguin donar lloc a estats madurats qualitativament diferents, suggerint que a través dels diferents receptors implicats en la captura d'antigen (també amb els TLR), la DC pugui descodificar senyals ambientals (Pulendran, et al. 2001), permetent el desenvolupament d'una cèl·lula madura capaç de polaritzar la resposta T o d'induir tolerància.

La resposta immunitària s'inicia en els ganglis secundaris, en les àrees T, on limfòcits T immadurs, interaccionen amb les cèl·lules dendrítiques que presenten els antigens capturats en els teixits perifèrics o localment. Per tant, antigens que no tinguin accés a les cèl·lules dendrítiques seran ignorats per les cèl·lules T, mentre que aquells que sí que tinguin accés a les DCs, poden estimular la proliferació i diferenciació de les T immadures, o en circumstàncies especials la seva delecció o anèrgia.

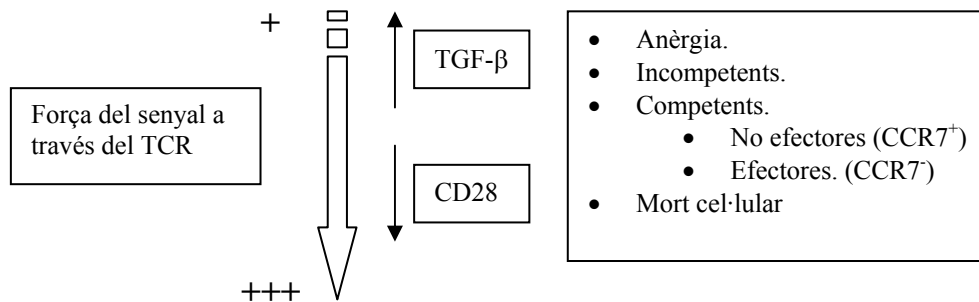
Per reconèixer l'antigen, les cèl·lules T necessiten establir un contacte amb la cèl·lula presentadora d'antigen, i formar l'anomenada sinapsi immunitària. Per mitjà d'aquesta sinapsi el receptor de la cèl·lula T (TCR) i les molècules coestimuladores queden congregades en l'àrea central d'un anell envoltat per molècules d'adhesió (Agadjanyan, et al. 1999). Les interaccions seriadades amb el TCR per part del complex MHC-pèptid, inicia la cascada de senyalització en la qual la magnitud i duració d'aquesta interacció determina que la cèl·lula T immadura entri en cicle cel·lular. La quantitat de senyal que rep una cèl·lula T és depenent de tres factors:

1. El nivell de complexos MHC-pèptids que inicien la transducció de senyals.
2. El nivell de molècules coestimuladores que amplifiquen el procés de senyalització.
3. L'estabilitat de la sinapsi que determina per quant temps es sosté el procés de senyalització.

En cèl·lules T activades, efectores i memòria, la interacció amb el TCR està eficientment associat amb la via de transducció de senyals i aquestes cèl·lules ràpidament responen a baixes dosi d'antigen inclòs en absència de molècules coestimuladores. En canvi, les cèl·lules T naive, en absència de coestimulació, només poden ser estimulades per dosi extremadament altes (no-fisiològiques) d'antigen i durant un temps llarg, per contra, en presència de coestimulació responen a dosi 100 vegades més baixes d'antigen i d'una manera més ràpida.

Hi ha evidències de que la duració de l'estimulació amb el TCR, junt amb citocines polaritzadores, determina la progressiva diferenciació de les cèl·lules CD4⁺

(Moser, et al. 2000), portant a la generació de cèl·lules efectores parcial o terminalment diferenciades. Una cèl·lula T CD4⁺ que rep un estímul curt pel TCR en absència de IL-12, prolifera però no es diferencia en cèl·lula efectora. Un estímul prolongat en presència de IL-12 o IL-4 diferencia cap a Th1, productores de IFN- γ , o cap a Th2, productores de IL-4, IL-5 i IL-13 (Lanzavecchia, et al. 2000). Com a part del seu programa de diferenciació, perden els receptors de migració a gangli i adquireixen la capacitat de migrar cap a teixits no limfoides inflamats i executar les seves funcions efectores. El model de diferenciació progressiva es suporta per l'existència de diferents poblacions de cèl·lules T memòria que perden la seva funció efectora i porten el receptor CCR7 per migrar al gangli.



El nombre i propietats de les cèl·lules dendrítiques presents a la zona T en el gangli reflexen d'una manera sensible i dinàmica les condicions del teixit d'on prové el drenatge. Es poden discutir dos possibles escenaris:

- Sota situacions “calmades” *steady-state*, una petita fracció de DCs residents, maduren de manera espontània i migren cap als ganglis limfàtics que drenen la zona, portant antígens i cossos apoptòtics capturats en els teixits perifèrics. La presentació antigènica en aquestes condicions porta a la selecció de cèl·lules T i a una tolerància perifèrica (Steinman, et al. 2000). La ingesta de cèl·lules apoptòtiques no és una situació nul·la, però modula la maduració de les cèl·lules dendrítiques, aquestes secreten TNF- α quan després de fagocitar cossos apoptòtics reben un estímul extern amb LPS, però no secreten IL-12 (Stuart, et al. 2002). De fet en aquestes condicions les cèl·lules T CD8⁺ específiques per antígens perifèrics, s'activen, però pateixen poques divisions i moren sense adquirir les funcions efectores. Aquestes dendrítiques madures d'una manera espontània poden donar senyals qualitativament

toleritzants (Gunzer, et al. 2000). Alternativament, la baixa freqüència i la curta vida mitja de les DCs (McLellan, et al. 2000), junt amb els baixos nivells de les molècules B7, poden donar senyals dèbils i estimulacions transients, les quals no són suficients per iniciar la proliferació i diferenciació.

- Quan hi ha presència de patògens (o adjuvants) en els teixits perifèrics, les DC residents s'activen en massa i migren. Al mateix temps, els monòcits són reclutats al teixit inflammat, on possiblement es diferencien ràpidament cap a cèl·lules dendrítiques amb capacitat de capturar antigen, mantenint així el cicle. El paper relatiu de les cèl·lules dendrítiques residents en teixit, tal com cèl·lules de Langerhans o dendrítiques dèrmiques (Randolph, 2002), versus les DCs reclutades, tal com les derivades de monòcits i molt possiblement les cèl·lules plasmacitoides, no està establert. La producció d'interferons de tipus I per les cèl·lules plasmacitoides, pot promoure la maduració de les DCs mieloides i protegir-les de l'efecte citopàtic de molts virus (Cella, et al. 2000). L'alta densitat de DCs, els nivells alts d'antigen i de molècules de tipus B7 proporcionen una activació forta i sostinguda per les cèl·lules T específiques, i una ràpida proliferació i diferenciació.

Estudis recents indiquen que les DC immadures podrien controlar la tolerància induint la diferenciació de cèl·lules T reguladores (Jonuleit, et al. 2000). De les cèl·lules T reguladores, una de les millor caracteritzades de la subpoblació CD4⁺, és definida per l'expressió constitutiva de la cadena α del receptor de IL-2 (CD25) (Woo, et al. 2002). Moltes evidències apunten a que aquestes cèl·lules podrien provenir del timus, per una via alterada en la selecció negativa a antígens propis. L'efecte supressiu vist tant *in vitro* com *in vivo* es relacionat amb l'expressió també constitutiva de CTLA-4 (Egen, et al. 2002); s'ha vist que una alta proporció de les cèl·lules TILs que infiltren tumors de pulmó de cèl·lules grans corresponen a aquests fenotip CD4⁺CD25⁺, exhibint propietats immunoreguladores (Sutmuller, et al. 2001). En humans, cal realitzar una preactivació d'aquestes cèl·lules per posar de manifest les seves capacitats supressives, en cèl·lules aïllades de sang perifèrica, mentre que altres autors troben que es requereix l'activació d'aquestes cèl·lules, però no cal que sigui d'una manera específica amb l'antigen. La secreció de nivells alts de IL-10 per part d'aquestes cèl·lules reguladores, contribuiria a mantenir a les cèl·lules dendrítiques en un estat immadur que en absència d'inflamació crearia una tolerància a antigens inhalats, proteïnes de la ingesta, o bé cossos apoptòtics

provinents del propi recanvi dels teixits cel·lulars, i que malgrat no induir la maduració de la cèl·lula dendrítica, si que facilita l'expressió de CCR7. En situacions inflamatòries, el paper d'aquestes cèl·lules reguladores podria ser bloquejar les funcions efectores de cèl·lules T madures autoreactives.

Cèl·lules dendrítiques i tumors.

Anàlisis immunohistoquímics al principi dels 90 van demostrar que l'increment de cèl·lules dendrítiques infiltrant diversos tipus de tumors, es correlacionava amb un millor pronòstic.

Estudis més funcionals mostraven que cèl·lules dendrítiques aïllades de carcinomes de cèl·lula basal tenien una baixa capacitat al·loestimuladora, un indicador d'una immunogenicitat alterada. En un anàlisi més acurat de les cèl·lules dendrítiques infiltrants de metàstasis de melanoma, d'un mateix pacient, les DCs de les lesions en regressió presentaven un fenotip i característiques de cèl·lules madures (capacitat al·loestimuladora potent i alta expressió de les molècules CD80, CD83, CD86); en contra, les cèl·lules aïllades de lesions en progressió, tenien una expressió reduïda de CD83, CD86, i una reducció de la capacitat de resposta al·logènica de l'ordre de cinc vegades. De manera interessant, aquestes DCs, generaven una anèrgia de cèl·lules T. L'alteració de la funcionalitat de les cèl·lules dendrítiques sembla anar més enllà del tumor, ja que DCs de sang perifèrica de pacients en estadis III i IV de tumor de mama, tenen una capacitat al·loestimuladora reduïda, i una disminució en l'expressió de CD80-CD86.

Si les cèl·lules dendrítiques infiltren tumors o bé es troben localitzades en la proximitat de la lesió, per què no indueixen (aparentment) una immunitat antitumoral efectiva?

No és fàcil la resposta a aquesta pregunta, i sovint es basa en evidències experimentals o bé en hipòtesis més o menys contrastades, però actualment es pot acceptar que:

- A. La cèl·lula dendrítica no accedeix al tumor.
- B. El tumor es pot protegir de les reaccions immunològiques específiques via la producció de diversos factors.

- C. La cèl·lula dendrítica pot no reconèixer al tumor com a “perillós” i per tant no hi ha necessitat de generar una resposta immunitària.
- D. El tumors poden haver trobat vies de comprometre la funcionalitat de la cèl·lula dendrítica per tal de prevenir la inducció d’una immunitat tumoral efectiva.

Aplicacions clíniques.

Un dels inconvenients més grans de les teràpies convencionals del càncer és:

- La recaiguda a partir d’una malaltia mínima residual no detectable.
- La manca de control efectiu de les cèl·lules individuals disseminades. Això depèn en l’habilitat d’explorar totes les parts del cos, en combinació amb l’habilitat de reconèixer específicament i destruir cèl·lules individuals sense danyar els teixits normals.

En el moment del diagnòstic, el tumor s’ha adaptat i ha alterat de manera satisfactòria el sistema immunitari via:

1. Per esgotament.
2. Per ignorància.
3. Per tolerància.
4. Per inhibició de les cèl·lules presentadores d’antigen.
5. Per pèrdua d’antígens...

Quan un tumor evoluciona, representa, generalment, al menys una variant antigènica pel sistema immunitari de l’hoste del qual està adaptat. Les variacions genètiques fa a la cèl·lula tumoral invisible pel sistema immunitari.

Una vacunació efectiva no hauria de ser limitada a antígens immunodominats únics que provoquen un fort rebuig inicial del tumor. El repte actual és desenvolupar sistemes de vacunació que siguin capaços d’induir una resposta immunitària potent inclòs contra antígens molt dèbils (baixa immunogenicitat) (Gunzer, et al. 2001).

Us clínic de DC generades *ex vivo*.

Experiments en la dècada dels 90 van demostrar que era factible l’erradicació de tumors en ratolins (Mayordomo, et al. 1995), utilitzant cèl·lules dendrítiques carregades amb antígens associats a tumor. Les cèl·lules dendrítiques van ser carregades antigènicament amb pèptids de seqüència coneguda o de pèptids no definits aïllats per

elució àcida de línies tumorals (Zitvogel, et al. 1996); a part de demostrar la seva funcionalitat a nivell profilàctic, evitaven l'implantament de tumors per una immunitat induïda, també podien ser utilitzades terapèuticament per induir regressió de tumors ja preexistents.

Assatjos en humans.

Dues estratègies alternatives s'estan explorant per l'expansió de cèl·lules dendrítiques per a la seva utilització en protocols d'immunoteràpia: *ex vivo* e *in vivo* (Steinman, et al. 2001).

Ex vivo, mitjançant diversos cocktails definits de citocines, es poden generar cèl·lules dendrítiques immadures o madures derivades de monòcits o a partir de precursors CD34⁺. Algunes d'aquestes preparacions són compatibles per la seva utilització en grau clínic.

Per a la generació de cèl·lules dendrítiques derivades de monòcits, els protocols més habituals utilitzen un cocktail de citocines amb IL-4 i GM-CSF. Mentre que els protocols que parteixen de CD34⁺ (Banchereau, et al. 2001), s'afegeix al medi TNF- α i GM-CSF durant temps més curt de cultiu.

In vivo, la injecció de FLt3L en controls sans té com a conseqüència un increment en el número de cèl·lules dendrítiques, immadures i precursors circulants (Fong, et al. 2001), malgrat tot, no està establert que aquest augment en el número de cèl·lules tingui com a conseqüència un augment de la resposta contra antígens utilitzats en vacunes.

Font d'antígens.

L'objectiu final és la utilització d'una formulació antigènica que permeti un ampli repertori de presentació per CD4⁺ i CD8⁺ (Bonini, et al. 2001). La presentació eficient i estable per MHC I i MHC II s'obté quan els antígens són sintetitzats de manera endògena en la cèl·lula dendrítica. Aquesta expressió endògena d'antigen es pot aconseguir afegint RNA obtingut del tumor, o bé manipulacions genètiques de les cèl·lules dendrítiques (Heiser, et al. 2001). La vacunació "universal" (a nivell teòric) utilitzant mRNA codificant per un polipèptid de la telomerasa ha tingut èxit en la generació d'una resposta CTL específica de tumor i transferint una amplia

crossprotecció en ratolins amb tumors establerts (Nair, et al. 2000). La utilització de vectors virals per transferir gens a les DCs, pot interferir amb la maquinària de presentació antigènica de la cèl·lula dendrítica infectada, afectar a la seva maduració o induir apoptosi. Una altra estratègia per oferir antígens de manera endògena és la fusió de cèl·lules tumorals autòlogues amb cèl·lules dendrítiques. De manera pionera es van fusionar cèl·lules de carcinoma de colon de ratolí amb cèl·lules dendrítiques; es podia observar una potent resposta CTL *in vitro e in vivo* (Wang, et al. 1998), altres models experimentals també han pogut reproduir aquest procediment. En humans s'ha aplicat en pacients afectats de carcinoma renal amb evidències de respostes clíniques¹ (Kugler, et al. 2000).

Una manera alternativa és afegir l'antigen de manera exògena. Es poden utilitzar pèptids coneguts derivats del tumor o bé pèptids desconeguts aïllats del propi tumor. Degut al mecanisme en que van ser caracteritzats, els pèptids derivats de tumor (en melanoma), corresponen a pèptids immunodominats, que indueixen una resposta mediada per CTL molt forta *in vitro* (Bettinotti, et al. 1998). Actualment es posa en dubte la necessitat exclusiva d'aquests pèptids immunodominats en la generació d'una resposta antitumoral efectiva, degut a que els pèptids de menys immunogenicitat poden generar precursors de nou, sense que aquests hagin rebut estímuls tolerogènics. Aquests pèptids afegits a les cèl·lules dendrítiques només resideixen en la membrana cel·lular per un període curt de temps (hores) i limiten la seva utilització per pacients que expressen un haplotip determinat. A més, com ja s'ha comentat prèviament, la generació d'una resposta CTL efectiva, no garanteix una resposta immunitària efectiva *in vivo* (Lee, et al. 1999). Per tant s'han desenvolupat estratègies que no requereixen el coneixement previ de l'haplotip del pacient o del pèptid antigènic; utilitzant el propi tumor com a font d'antígens. La fagocitosi de fragments de tumors o de cèl·lules tumorals pot proporcionar una diversitat de presentació de pèptids associats a tumor. Aquests pèptids poden ser presentats per classe I o classe II degut al fenomen de la crosspresentació. Aquest fenomen va ser descrit inicialment per pèptids virals de cèl·lules infectades. Després es va veure que les cèl·lules dendrítiques podien presentar pèptids processats després de capturar cèl·lules apoptòtiques o necròtiques per classe I. D'aquesta manera es possible generar una resposta en les cèl·lules T naive contra un

¹ Aquest treball, malgrat la seva aplicabilitat potencial, ha aixecat una forta polèmica.

ampli espectre d'antígens compartits i reconeixen pèptids processats de manera natural en el tumor.

Una altre possible font d'antígens és la utilització d'exosomes derivats del tumor (Wolfers, et al. 2001). Aquests contenen antígens tumorals nadius citosòlics i/o endosòmics i proteïnes d'estrès tèrmic constitutives. Així transfereixen els antígens tumorals a les cèl·lules dendrítiques i indueixen una resposta CTL efectiva restringida per MHC I en limfòcits de pacients de melanoma. A més, en model murins, poden protegir en situacions de vacunació al·logènica, suggerint que poden transferir antígens tumorals compartits (They, et al. 2001).

En el cas d'utilització de cèl·lules tumorals per carregar les cèl·lules dendrítiques, és d'un interès especial saber en quina forma s'han d'oferir a les cèl·lules dendrítiques. S'ha vist que el lisat d'unes determinades línies tumorals murines, que provenien de cèl·lules necròtiques, indueixen la maduració de les cèl·lules dendrítiques. Aquest efecte es pot atribuir als nivells de proteïnes d'estrès tèrmic que es poden detectar en aquests lisats, i que no es detecten en teixits primaris no tumorals (Somersan, et al. 2001). Les cèl·lules dendrítiques carregades amb un lisat tumoral al·logènic eren capaces d'estimular *in vitro* l'expansió de limfòcits T citotòxics contra diferents antígens específics de melanoma (Berard, et al. 2000). Aquests fenòmen indicava que les cèl·lules dendrítiques podrien crosspresentar antígens tumorals derivats de lisats de línies tumorals. Les primeres dades experimentals sobre aquest aspecte indicaven que per produir-se la crosspresentació d'antígens associats al tumor als limfòcits T CD8⁺ calia que les cèl·lules dendrítiques fagocitessin cèl·lules en apoptosi (Shaif Muthana, et al. 2000) o bé, en situacions de necròsi cel·lular (Chen, et al. 2001). A mida que s'han introduït línies tumorals humanes i controlant els sistemes experimentals, la visió actual és que les cèl·lules apoptòtiques no generen cap tipus d'activació, no seria un procés nul, ja que es pot desenvolupar una tolerància activa, però no es provocaria una activació limfocitària. Per contra la fagocitosi de cèl·lules necròtiques o en fases tardanes d'apoptosi implica un senyal maduratiu parcial de la cèl·lula dendrítica, documentat pel fenotip de la cèl·lula dendrítica i la seva capacitat immunoestimuladora (Pietra, et al. 2001). Aquest senyal maduratiu no és suficient per aconseguir una crosspresentació antigènica eficient a CTL, a no ser que la cèl·lula dendrítica rebi uns senyals maduratius més forts (TNF- α). Una altra possibilitat és que

la immunogenicitat de les cèl·lules tumorals no depengui si són apotòtiques o necròtiques, sino dels senyals maduratius que estimulin a la cèl·lula dendrítica (Kotera, et al. 2001). Per últim, el fenomen de la crosspresentació no està acceptat per tothom com una situació que es doni fisiològicament, i que les dades publicades corresponen a resultats de situacions experimentals molt definides i forçades, amb antígens altament immunogènics, i amb sistemes on s'utilitzen transfectants (Zinkernagel, 2002). Caldrà veure en un futur les possibilitats reals de la crosspresentació antigènica *in vivo* i el seu paper en la inducció d'una resposta antitumoral.

Un àrea en interès creixent és la utilització de proteïnes d'estrès tèrmic per carregar les cèl·lules dendrítiques. Aquestes proteïnes actuen com a xaperones cel·lulars, i constitueixen, quan són alliberades al medi extracel·lular, els senyals de perill que activen al sistema immunitari. A més d'actuar com activadores de les cèl·lules dendrítiques, també porten associades una representació dels pèptids intracel·lulars sintetitzats per la cèl·lula, aquests pèptids poden ser presentats per la cèl·lula dendrítica i activar la resposta cel·lular T. En un futur esdevindran una font molt important de proteïnes autòlogues per vacunació, sense o amb cèl·lules dendrítiques (Castelli, et al. 2001).

Aplicacions clíniques.

La vacunació amb cèl·lules dendrítiques ha portat a la regressió tumoral en pacients avançats de càncer seleccionats (Fong, et al. 2000). Els assatjos estan encara en fase I (per demostrar la seguretat de la teràpia i les vies d'aplicació), amb diversos dissenys de l'estudi, monitorització i execució (**taula 5**).

Hi ha encara molt debat sobre el tipus de preparació de les cèl·lules dendrítiques, els antígens, el carregat, la dosi, les vies d'injecció, el protocol de vacunació, així com la monitorització de la resposta clínica e immunitària.

Taula 5: Tipus d'immunoteràpia amb cèl·lules dendrítiques.

1. Estimulació de les DC *in vivo*
 - Administració d'adjuvants intra-/peritumoral (BCG) o sensibilitzadors per contacte (DNCB)
 - Administració sistèmica o intratumoral de citocines i/o factors estimuladors de les DCs (tals com Flt3-L, GM-CSF, CD40L)
 - Transfecció de cèl·lules tumorals amb gens de citocines estimuladores de les DCs.

- Administració oral, de bacteries activadores de les DC, amb antígens tumorals
2. Administració de DC generades *ex vivo*
- 2.1. Origen cel·lular de les DC.
 - Aïllament *ex vivo* dels progenitors CD34⁺ seguit del subseqüent cultiu *in vitro*
 - Aïllament *ex vivo* dels monòcits CD14⁺, i la diferenciació *in vitro* cap a DC
 - Aïllament directe *ex vivo* de les DC de sang perifèrica
 - 2.2. Origen genètic de les DC.
 - DC autòlogues
 - DC al·logèniques amb MHC-compartits
 - DC completament al·logèniques (fusionades a cèl·lules tumorals autòlogues).

Com ja s'ha vist en capítols anteriors, l'ontogènia de les cèl·lules dendrítiques és complexa i es poden originar a partir de diferents vies hematopoiètiques, per tant s'han utilitzat les diferents subpoblacions de cèl·lules dendrítiques que es poden obtenir, aïllades directament a partir de cèl·lules circulants, derivades de monòcits (Nestle, et al. 1998) o a partir de cèl·lules progenitores CD34⁺ (Banchereau, et al. 2001). Les cèl·lules CD123^{hi} limfoides, malgrat tenir la capacitat de processar i presentar antigen, no han estat utilitzades fins al moment en cap protocol de vacunació, degut al desconeixement que es té de la seva relació amb la biologia del tumor. Una qüestió important en la immunoteràpia amb cèl·lules dendrítiques, fa referència a la utilització de cèl·lules immadures o madures. La injecció dins el gangli limfàtic de cèl·lules semi-madures derivades de monòcits indueixen respostes clíniques objectives en pacients seleccionats (Nestle, et al. 1998). També en pacients de melanoma o en voluntaris sans la immunitat s'indueix amb cèl·lules madures (Dhodapkar, et al. 2001). En càncer de pròstata, cèl·lules dendrítiques immadures derivades de monòcit, carregades amb pèptids derivats del PSMA (Fong, et al. 2001), combinada amb radioteràpia i teràpia hormonal, produeixen respostes clíniques objectives e immunològiques (Tjoa, et al. 2000). També cèl·lules dendrítiques aïllades directament i amb un curt període de cultiu indueixen respostes clíniques objectives e immunitàries en pacients amb limfomes B (Timmerman, et al. 2002). Per altra banda s'ha descrit la inhibició de la funció de cèl·lules T en voluntaris sans i en pacients de melanoma, vacunats amb cèl·lules dendrítiques immadures contra pèptid de la matriu del virus de la influença (Dhodapkar, et al. 2001). De manera molt interessant, també la inoculació de cèl·lules dendrítiques immadures té com a resultat l'expansió d'una subpoblació de cèl·lules CD8⁺

reguladores (Dhodapkar, et al. 2002), amb les seves capacitats lítiques inhibides; aquest efecte només pot ser atribuït parcialment a la IL-10, ja que amb la seva neutralització, millora en un 50% les seves capacitats, hi ha per tant altres factors implicats. En pacients afectats de melanoma, la inoculació intranodal de cèl·lules dendrítiques immadures té com a resultat una menor expansió de precursors específics pels pèptids tumorals, que si la inoculació es fa amb cèl·lules dendrítiques madures (Jonuleit, et al. 2001).

La situació més senzilla per la vacunació amb cèl·lules dendrítiques és la utilització del lisat tumoral autòleg com a font d'antígens. S'obtenen un gran nombre d'antígens, que encara que no s'ha generat una resposta adequada (el tumor s'ha desenvolupat), és possible que amb la combinació amb cèl·lules dendrítiques madures (en un context estimulador) la resposta sigui l'apropiada. No hi ha toxicitats associades en aquesta manera de vacunar, ni manifestacions autoimmunitaries, i es poden observar respostes clíniques, encara que febles (Chang, et al. 2002, Nestle, et al. 1998).

Un dels majors avantatges de la utilització de cèl·lules dendrítiques és la seva potent capacitat immunoestimuladora amb independència de l'antigen. Hi ha en marxa diferents estratègies utilitzant pèptids sols o bé un pannel amb diferents pèptids antigènics, per tal d'evitar mecanismes d'escapament, combinació de pèptids citotòxics amb pèptids "helpers"; o utilització de pèptids amb diferents afinitats. En un estudi en que s'utilitzava la vacunació amb cèl·lules dendrítiques derivades de precursors CD34⁺ amb una combinació de 4 pèptids de 4 antigens de melanoma (Melan A/MART-1, tirosinasa, MAGE-3 i gp100) la progressió del tumor només es veia en 1 dels 10 pacients que responien contra 3 ó 4 pèptids (Banchereau, et al. 2001). Les proteïnes recombinants eliminen la restricció HLA, i podrien oferir la possibilitat de generar epítops no immunodominants però importants per a la inducció d'una resposta efectiva. També s'ha reconsiderat la vacunació amb cèl·lules completes i afegir-les a les cèl·lules dendrítiques: pel carregat de les DCs es requeriria material apoptòtic o necròtic per l'òptima presentació. Finalment s'estan utilitzant antigens tumorals "universals" o compartits entre tumors com la telomerasa o HER-2/neu (Ikuta, et al. 2002), per millorar el càrregat òptim de les cèl·lules dendrítiques.

Via d'inoculació.

El lloc de la injecció de les cèl·lules s'ha demostrat important en la generació de la resposta en ratolins; així injeccions subcutànies i intradèrmiques són més efectives en la generació d'una resposta antitumoral que les injeccions intravenoses i l'activitat antitumoral es correlaciona amb l'acumulació de cèl·lules dendrítiques en els ganglis limfàtics. En un estudi publicat per Fong et al. van analitzat la resposta de tres grups de pacients amb càncer de pròstata metastàtic, on les inoculacions es feien intradèrmiques, intravenoses i intralimfàtiques (Fong, et al. 2001). Malgrat es produeix una estimulació similar dels limfòcits T, independentment de la ruta d'injecció escollida, varia la qualitat de la resposta, mentre que les inoculacions i.d., i.l. provoquen l'expansió de limfòcits T productors de IFN- γ , la inoculació i.v. provoca la generació d'anticossos específics per l'antigen. Moltes de les cèl·lules inoculades per via i.v. es recuperen en els pulmons i fetge; però tampoc es coneix l'eficiència de migració de les cèl·lules dendrítiques inoculades i.d. o i.l. El consens actual és que l'administració parenteral convencional, via la pell (intradèrmica millor que subcutània) és preferible a l'administració endovenosa. L'administració intralimfàtica és una opció tant adequada com les altres, però més difícil. Una nova aproximació és la injecció directa de les cèl·lules dendrítiques en els dipòsits tumorals. Cal tenir present que la migració de les cèl·lules pot dependre del tipus de cèl·lula dendrítica escollida, així com el seu estat maduratiu (la presència de diferents receptors de quimiocines). La millora de les condicions de migració de les cèl·lules dendrítiques inoculades, pot augmentar l'eficàcia de la seva aplicació terapèutica. En diversos estudis reportats no més d'un 10% de les cèl·lules injectades podien ser identificades en els ganglis limfàtics drenants.

Poc encara està descrit sobre les pautes de vacunació, i moltes deriven de les vacunacions amb malalties infeccioses. De manera normal s'utilitzen pautes setmanals amb recordatoris mensuals, o bé pautes mensuals. L'optimització d'aquesta variable també és un factor important, particularment quan s'ha vist que en models animals, una sobrevacunació pot ser perjudicial. En situacions de laboratori, el que vindria a ser una vacunació molt seguida i repetitiva, té com a resultat la inducció de cèl·lules CD4⁺ amb capacitat reguladora (Chakraborty, et al. 1999). És molt difícil d'extrapolar aquestes dades, a l'efecte de la vacunació *in vivo*, ja que no sabem realment, si amb les diferents vacunacions, hi ha una estimulació de les mateixes poblacions de limfòcits.

Evidentment es poden tenir en compte moltes altres consideracions que puguin ajudar i millorar l'eficàcia de la vacunació amb cèl·lules dendrítiques, combinacions amb altres teràpies (quimio o radioteràpia), combinacions amb citocines diverses, o combinació amb alguna teràpia antiangiogènica.

Existeix en la utilització de cèl·lules dendrítiques, un important forat metodològic, que fa referència a la quantificació de la intensitat i durada dels complexos MHC-pèptids, que exposen les DCs sota les diferents condicions de càrrega d'antigen.

Problemes de la utilització de cèl·lules dendrítiques.

Les cèl·lules dendrítiques activades (madures) poden trencar la tolerància induïda pel tumor. Els antígens tumorals inclouen també antígens específics de teixit, tals com melanoma/melanòcit, així com antígens expressats en teixits normals. Per tant en la utilització d'aquests antígens tumorals per immunoteràpia, s'hauria de considerar el risc de problemes autoimmunitaris (Yee, et al. 2000). Per exemple, una de les reaccions més comuns dels pacients que reben immunoteràpia amb antígens naturals derivats del melanòcit/melanoma, o també amb la infusió de clons CD8⁺ específics per MART-1, i que sovint es troba relacionada amb una resposta antitumoral favorable, és el vitiligo. Un altre aspecte fa referència a l'antigen utilitzat per carregar les cèl·lules dendrítiques. L'ús d'antígens compartits per teixits sans, pot portar a problemes autoimmunitaris de gravetat relativa al teixit afectat (pancrees, teixit cardíac, neuronal, etc...) (Ludewig, et al. 2000). Una puntualització és que aquestes evidències provenen de situacions experimentals molt forçades en models murins, amb transfectants, i que no corresponen a les situacions reals de vacunació. Fins al moment, cap dels treballs publicats utilitzant les cèl·lules dendrítiques amb diferents antígens o vacunes amb lisats o cèl·lules senceres han descrit reaccions autoimmunitàries greus. Malgrat tot és una situació a tenir present, que obliga a fer un seguiment dels pacients per descartar processos autoimmunitaris. Una consideració teòrica seria que en aquells casos on hi ha una remissió del tumor com a conseqüència de l'activació del sistema immunitari, s'està generant una resposta autoimmunitària contra un tumor, que és un element propi.

El melanoma.

El melanoma és un tipus de càncer que s'origina en els melanòcits o cèl·lules pigmentaries de la pell. Representa un 3% de les neoplàsies cutànies, però en canvi, suposa el 65% de les morts per càncer de pell. El risc de patir aquesta malaltia durant el curs de la vida, ha passat des d'una de cada 1500 persones al 1935 fins a una de cada 70 persones al 2000. La incidència de la malaltia creix a un ritme del 5% anual a tot el mon.

En el melanoma es poden diferenciar dos tipus de creixement, el radial i el vertical. Durant la fase radial el tumor creix en sentit superficial, però no en profunditat, degut possiblement al control del sistema immunitari. Aquest tipus de creixement pot durar mesos o anys. El creixement vertical, es dona posteriorment al radial (encara que es pot donar al mateix temps) i precisament quan el sistema immunitari ja no pot controlar el creixement tumoral. En aquest creixement vertical hi son implicats diversos factors, tant del hoste com de les cèl·lules tumorals: la angiogènesi, l'adhesivitat cel·lular, els factors de creixement, les citocines, els limfòcits reguladors i efectors, etc... Precisament aquest creixement en profunditat s'utilitza per al estadiatge de la malaltia (Buzaid, et al. 1997) (**taula 6**) i també, com a factor pronòstic. A més de les característiques del tumor primari, també es tenen en compte el grau d'afectació ganglionar de la malaltia (N), i l'existència de metàstasi a distància. Aquest estadiatge de la malaltia condiciona el posterior tractament que s'aplicarà al pacient.

Està ben establert que el càncer és una malaltia progressiva, que té lloc en una sèrie d'etapes ben definides, típicament iniciat com a conseqüència de mutacions activadores (oncogens) o mutacions inhibidores (gens supressors de tumor) en cèl·lules proliferants. Un únic succés mutagènic no té com a resultat la formació d'un tumor maligne. Són necessaris aconteixements genètics i epigenètics addicionals per a la progressió a tumor. Les cèl·lules inicials requereixen alteracions que les facin autosuficients per a créixer, insensitives als senyals inhibitoris de creixement, resistents als programes de diferenciació terminal, senescència, o apoptosi, així com una capacitat il·limitada de renovació, l'habilitat d'iniciar i dirigir el procés d'angiogènesi, la capacitat d'envair i colonitzar teixits ectòpics. Agafant en conjunt les observacions en models animals així com en càncer en humans, el desenvolupament d'un tumor segueix

una via anàloga, en forma, a una evolució Darwinista, en la qual una successió de canvis genètics, cadascun d'ells conferint algun tipus d'avantatge en el creixement, porta a la conversió progressiva d'una cèl·lula normal cap a una cèl·lula tumoral (Hanahan, et al. 2000). Una vegada transformada, aquesta cèl·lula crea una xarxa de diferents tipus cel·lulars que col·laboren entre elles per afavorir el creixement maligne (Berger, et al. 2002).

Taula 6. Estadiatge de la AJCC del melanoma maligne, en colors ordre creixent de gravetat. A sota es representa els tractaments estàndards que s'apliquen als malalts en cada estadiatge.

<ul style="list-style-type: none"> • Ia, B ≤ 1 mm • Ib, B ≤ 1mm amb ulceració o B = 1.01 - 2 mm • IIa, B = 1.01 - 2 mm amb ulceració o B = 2.01 - 4 mm • IIb, B = 2.01 - 4 mm amb ulceració o B > 4 mm • IIc, B > 4 mm amb ulceració • IIIa, micrometàstasis en un NL • IIIb, macrometàstasis en un NL o micrometàstasis en 2-3 NL • IIIc, macrometàstasis en > 2 NL, o metàstasis en trànsit/satel·litàsi • IV, metàstasis a distància
<ul style="list-style-type: none"> ● RISC INTERMIG: IFN-α2 a dosi baixa ● RISC ALT: IFN-α2 a dosi elevada ● METASTATIC: <ul style="list-style-type: none"> — ALTES DOSI DE IL-2r (endovenosa) — BIOQUIMIOTERAPIA: IL-2r + IFN-α2 + POLIQUIMIOTERAPIA

Característiques patològiques i tractament.

Com la resta de tumors sòlids, el melanoma maligne (MM) es cura quan es realitza un diagnòstic precoç (estadis 0 i Ia) seguit d'una resecció quirúrgica total. Normalment, s'extreu el tumor primari, i després de la confirmació histopatològica de melanoma maligne, es realitza una segona intervenció quirúrgica, anomenada ampliació de marges. En aquesta segona intervenció el que es pretén és eliminar alguna possible cèl·lula maligna que ja hagués abandonat el tumor primari.

El MM ocupa un nivell molt alt dins del “ranking” de mortalitat dels diferents càncers. Això, es degut a que metastatitza molt aviat. De fet, es podria dir que, en funció del grossor del tumor primari, és un dels càncers que ho fa més aviat. Així quan el grossor (Breslow) supera 1 mm, el tumor primari ja pot començar a enviar cèl·lules malignes, a la resta de l'organisme. Aquesta migració s'efectua per 3 vies:

1. Pels espais intracel·lulars (metàstasi en transit).
2. Pels conductes limfàtics (metàstasi ganglionars).
3. Pels vasos sanguinis (metàstasi a distància).

S'ha comprovat empíricament que el pronòstic del MM està directament relacionat amb el grossor de Breslow del tumor primari. Així, els MM primaris amb un Breslow < 1mm, tenen un bon pronòstic, amb una tasa de curació propera al 100 %. En canvi, els MM primaris amb un Breslow > 4 mm, tenen un pronòstic molt dolent.

Quan el MM s'extén als ganglis limfàtics regionals (estadi III), el pronòstic de la malaltia és dolent, i en general, menys del 50 % dels pacients sobreviuen, malgrat que se'ls hi faci una resecció quirúrgica dels paquets ganglionars (axilars o angonals) més propers. En aquest grup de malalts (estadi III), es poden aplicar els anomenats tractament adjuvants. S'anomenen així, perquè s'apliquen després de la resecció quirúrgica dels paquets ganglionars afectats, quedant el pacient aparentment lliure de malaltia. El que es pretén amb aquests tractaments adjuvants, és eliminar alguna cèl·lula maligne aïllada residual a la cirurgia ganglionar. El tractament adjuvant per excel·lència ha sigut el IFN α 2a o el IFN α 2b. Així, la FDA Norteamericana va aprovar la seva utilització com a conseqüència dels resultats presentats per Kirkwood (Kirkwood, et al. 1996), que demostraven un augment de la supervivència dels malalts de MM que eren tractats en adjuvència amb IFN α 2, en front d'un grup de malalts només tractats quirúrgicament. Cal dir que els estudis multicèntrics Europeus, no van aconseguir

reproduir els resultats d'en Kirkwood, i que molt recentment, s'ha qüestionat el tractament estadístic del treball d'en Kirkwood (Lens, et al. 2002).

Quan el MM presenta metàstasi a distància (estadi IV), el pronòstic és fatal. De fet, menys del 10 % dels pacients de MM en estadi IV sobreviuen als 5 anys, i això, independentment de que se'ls apliqui tractament amb quimioteràpia, poliquimioteràpia, immunoteràpia (IFN- α , IL-2) o bé múltiples combinacions d'aquests agents; l'anomenada bioquimioteràpia (Legha, et al. 1998). Cap d'aquests tractaments ha demostrat augmentar significativament l'esperança de vida d'aquest grup de malalts, exceptuant potser la bioquimioteràpia. De fet, la vida mitja dels malalts en estadi IV oscil·la entre els 6 i els 9 mesos, de manera independent al tractament aplicat (Ahmann, et al. 1989), amb la bioquimioteràpia s'aconsegueix una supervivència mitja d'uns 11 mesos. En realitat, la distribució de la supervivència no és uniforme, sino que es concentra en un petit grup de malalts, al voltant d'un 5-10 %. El que succeeix és que aquest petit percentatge de pacients presenten remissions completes i de llarga durada de la malaltia metastàsica (alguns autors parlen de curacions), en canvi, la majoria els malalts (aprox. 90 %) no responen en absolut al tractament. El gran inconvenient de la bioquimioteràpia és l'elevada toxicitat, de fet, hi ha una mortalitat associada a aquest tractament, que oscil·la entre el 2 i el 4 %. Aquest fet, juntament amb la impossibilitat de determinar a priori els malalts que respondran, i la marcada disminució de la qualitat de vida dels pacients tractats, fa que molts metges es plantegin utilitzar la bioquimioteràpia. Un abordatge terapèutic completament diferent, són les anomenades vacunes terapèutiques, com hem mencionat anteriorment, la seva eficàcia real és discutida, però no s'associen a efectes secundaris tòxics, ni afecten a la qualitat de vida dels pacients.

En resum, quan abans de la resecció quirúrgica del MM primari, aquest ja ha enviat micrometàstasi, el pronòstic de la malaltia és molt dolent, i a més, no hi ha un tractament d'elecció eficaç.

OBJECTIUS.

Com a objectiu general d'aquesta tesi es va plantejar el desenvolupament i aplicació de vacunes terapèutiques en pacients afectats de melanoma metastàtic. La posada en marxa d'aquesta terapèutica ha implicat (i encara implica) la creació d'una infraestructura per la manipulació, amb les màximes condicions de seguretat possibles, de cèl·lules *ex vivo* que posteriorment han de ser inoculades a pacients. Un dels aspectes que més ens ha preocupat ha estat la seguretat en el desenvolupament i aplicació d'aquestes vacunes, i la manca d'efectes secundaris importants deguts a una manipulació incorrecte.

Un altre punt important d'aquesta tesi ha estat poder determinar si la vacunació terapèutica en qualsevol de les seves formes (amb cèl·lules tumorals completes al·logèniques o amb cèl·lules dendrítiques) genera una activitat antitumoral evidenciable en pacients afectats de melanoma metastàtic. La reacció antitumoral en aquests pacients, pot obrir la possibilitat d'augmentar el nombre de pacients vacunats, incloure pacients amb un estadiatge més inicial, i estendre les vacunes terapèutiques a altres tipus de càncer.

Aquests dos objectius principals es basen en una sèrie de punts importants a tenir present, i que calien anar optimitzant:

1. Obtenció d'un nombre suficient de línies tumorals de melanoma, i de diferents localitzacions, per a seleccionar aquelles que formessin part de la vacuna.
2. Un cop caracteritzades i seleccionades les línies tumorals, era necessari expandir-les en quantitat i qualitat idònies per a ser inoculades en humans. Cal trobar les condicions adequades de creixement.
3. A part de descartar efectes secundaris tòxics derivats de la vacuna, calia demostrar la seva eficàcia per a la inducció d'una resposta antitumoral. Aquesta resposta, mesurada clínicament, s'ha d'intentat correlacionar amb la mesura d'algun paràmetre immunitari. La presència d'alguna correlació, podria permetre avaluar quin subgrup de pacients s'està beneficiant de les vacunes, i a la llarga predir quins pacients puguin respondre a les vacunes.

Respecte a la introducció de les cèl·lules dendrítiques, com adjuvants naturals de les vacunes, es van posar a punt les condicions d'obtenció i creixement de les cèl·lules.

4. Substitució dels medis de cultiu convencionals (amb suplementes proteics d'origen animal), per un medi de cultiu totalment lliure de proteïnes d'origen animal. Aquest canvi en la manera de cultivar les cèl·lules dendrítiques, no havia d'afectar a la seva funcionalitat i les seves propietats.
5. L'optimització de les situacions de maduració de les cèl·lules, per tal d'investigar altres vies d'inoculació de les cèl·lules, diferents de la via intraganglionar.
6. A l'igual que amb la vacunació amb cèl·lules completes, era important descartar efectes secundaris associats a la inoculació de cèl·lules, i a l'observació de respostes antitumorals clíniques.
7. Valorar si amb una vacunació amb un lisat de cèl·lules al·logèniques, es podia generar una resposta contra les cèl·lules del tumor autòleg. Al menys amb la inoculació amb cèl·lules dendrítiques, ja que a nivell teòric, és un sistema més potent.

MATERIALS I MÈTODES.

1. Obtenció i cultiu de les cèl·lules tumorals.

Les línies tumorals de melanoma van ser derivades per disgregació física de biòpsies de lesions de melanoma de diferents localitzacions en tampó salí fosfat (PBS). Després de l'eliminació dels teixits residuals sans, s'obtenen cèl·lules tumorals per mitjà d'un raspall suau o bé a partir de trossos de tumor tallats que es resuspenen en un medi de cultiu de tipus DMEM, ric en glucosa 4500 mg/l (Sigma), suplementat amb: un 10 % de sèrum boví fetal d'origen australià*, amb 200 mM L-glutamina (Gibco BRL, Life Technologies) i 100 U/ml de penicil·lina sòdica i 100 µg/ml d'estreptomicina (Gibco BRL, Life Technologies).

Malgrat s'ha intentat fer créixer les diferents línies tumorals en medis que no requereixen suplement de sèrums externs fetals (medis sintètics), les cèl·lules tumorals no creixen de manera eficient. Perden l'adherència, que permet la proliferació de les cèl·lules tumorals. Degut a que cada una de les línies cel·lulars tenen una taxa de proliferació diferent no hi ha un temps de duplicació i passi establert general, depèn del seguiment visual dels cultius.

Per desenganxar les cèl·lules tumorals, que creixen adherides, aquestes s'han de rentar afegint PBS al flascó de cultiu, eliminar el PBS sense afectar a les cèl·lules i posteriorment afegir 1 % de Tripsina i 0,5 mM d'EDTA, a 37°C aproximadament durant 5' amb agitacions suaus. Ràpidament s'inactiva la tripsina amb medi de cultiu amb 10% de sèrum fetal i es realitzen tres rentats per eliminar la tripsina. Ja disposem de les cèl·lules en suspensió.

En el cas de que les cèl·lules s'hagin de fenotipar, no s'ha d'utilitzar tripsina, ja que produeix la proteòlisi de moltes molècules expressades en la membrana i podríem perdre molècules del nostre interès; les cèl·lules es poden desenganxar afegint PBS fred amb un 0,5 mM d'EDTA.

* S'ha utilitzat suplement fetal d'aquest origen degut a que a Austràlia no s'ha detectat malalties provocades per prions i permet el seu ús per la manipulació de cèl·lules que posteriorment s'inocularan en pacients.

2. Caracterització de les molècules de la membrana cel·lular.

La presència de determinades molècules de superfície en les línies de melanoma establertes i generades en cultiu van ser caracteritzades utilitzant anticossos monoclonals produïts en el nostre laboratori (Dr. Ramón Vilella. Servei d'Immunologia. Hospital Clínic. Barcelona). És van utilitzar els següents: 193-49 (HLA-A2), 31-2B1 (monomòrfic HLA-DR), 100-1A5 (CD-1b), 134-2C2 (CD-26), 72-5D3 (CD-45), 122-2 (CD-46), 143-30 (CD-55) i 120-2A3 (CD-71). ASH 1646 (β 2-microglobulina), BRA 4F1 (CD15), i NK-1 (CD-57), obtinguts de Bioprobe, Holanda. 16B7 (CD-41), 17E6 (CD-51), LM609 (CD51/CD61), AP3 (CD61), 14E2 (200 KD), 11D1 (β 5-integrina), P1F6 (α v- β 5 integrina), 2A10 (GD3), proporcionats per MERCK, Barcelona ; i MUC 18 (CD-146), CD-10 i CD-13, proporcionats pel Dr. Sánchez Madrid (Hospital de la Princesa, Madrid).

L'anàlisi dels antigens de la membrana cel·lular rep el nom de fenotipar; aquest anàlisi es fonamenta en la disponibilitat d'anticossos monoclonals i en la seva especificitat. Els anticossos poden unir-se a fluorocroms, que quan són excitats per una longitud d'ona (generalment UV) emeten un senyal lumínic d'una longitud d'ona diferent (en l'espectre visible). El citofluorímetre analitza les característiques de tamany/volum, rugositat i emissió de llum (Ac-Mo-fluorocrom) cèl·lula a cèl·lula. La rapidesa en l'anàlisi i major objectivitat (sobre tot pel que fa referència a la mesura de la intensitat de la fluorescència), ha fet del citofluorímetre una eina clau en l'estudi de les diferents subpoblacions cel·lulars del sistema immunitari, així com la resta de cèl·lules d'altres orígens (per exemple, tumorals), i també diferenciar els estats maduratius de les cèl·lules, permet detectar la presència d'un determinat antigen en la membrana cel·lular o caracteritzar el grau de puresa d'una determinada població de cèl·lules en cultiu.

La immunofluorescència és directa quan és el primer anticòs el que porta el fluorocrom, per contra si aquest anticòs no està marcat, ens caldrà un anti-anticòs marcat d'una altre espècie. Degut a que en el mercat existeixen diferents fluorocroms, és possible fer combinacions de diferents AcMo per fer marcatges dobles o triples, que permetrà una millor definició de la població a estudiar.

Protocol.

1. Rentar les cèl·lules en suspensió a fenotipar en PBS a 4°C, dues vegades.
2. Resuspendre les cèl·lules a una concentració aproximada 10^6 cel/ml en tampó d'incubació a 4°C (PBS, amb 2% FCS, 0.1% azida sòdica, pH 7,2).
3. Afegir 50µl de les cèl·lules als tubs de citometria, i afegir 50µl del sobrenedant de l'híbrid productor de l'AcMo, o bé el volum d'anticòs purificat descrit per la casa comercial. Agitar d'una manera suau els tubs per assegurar la barreja de l'anticòs amb les cèl·lules.
4. Incubar durant 30' a 4°C. Protegit de la llum en el cas de que l'AcMo porti fluorocrom.
5. Rentar les cèl·lules amb el tampó de rentat dues vegades per tal d'eliminar l'excés d'anticòs.
6. En el cas de ser necessari afegir un segon anticòs marcat amb un fluorocrom, aquest s'afegirà diluït en el tampó d'incubació (1/50-1/200).
7. Repetir el protocol a partir del punt 4.
8. En aquest moment les cèl·lules ja estan preparades per ser adquirides i analitzades pel citofluorímetre.

És important portar tot el procés a 4°C, ja que a aquesta temperatura s'eviten els processos de *capping* o els processos d'internalització de receptors que podrien afectar els resultats de la tècnica.

Una variant consisteix en la detecció d'antígens que no s'expressen en la membrana (per exemple S-100). Prèviament al protocol esmentat, cal permeabilitzar les cèl·lules amb algun tampó comercial amb detergent, 15' a t.a., o bé afegint al tampó d'incubació 0.05% de saponina. (cal establir les condicions més idònies pels diferents tipus de cèl·lules). Aquesta permeabilització afecta a l'estabilitat de la membrana i permet l'entrada de l'anticòs al citosol. El marcatge intracel·lular requereix el tractament de les cèl·lules amb suavitat ja que es poden lisar amb molta facilitat.

3. MLTR.

Una de les tècniques clàssiques en immunologia és la reacció de cultiu mixte limfocitari. Utilitzada per al reconeixement de cèl·lules T de molècules de MHC

al·logèniques, i com a model *in vitro* de rebuig al·logènic, és poden utilitzar els cultius mixtes per tenir una idea aproximada de la presència de precursors específics per alguna proteïna determinada, o bé la reactivitat de limfòcits de sang perifèrica dels pacients en diferents moments de la vacunació en contra de les cèl·lules tumorals irradiades que componen la vacuna. Les cèl·lules específiques proliferen, i aquesta divisió cel·lular es pot detectar afegint timidina- H^3 durant les últimes 16-18 hores de cultiu. De manera rutinària les cèl·lules es deixen durant 6 dies en cultiu per a respostes primàries i 48 hores per a respostes que es sospiten secundàries. Una alternativa consisteix en utilitzar aquest mateix sistema, però no per detectar la proliferació cel·lular si no el tipus de citocines que secreten els limfòcits al ser enfrontats a cèl·lules tumorals al·logèniques o bé autòlogues. Aquests sobrenedants es guardaran a $-80^{\circ}C$ fins a la seva determinació per ELISA de la concentració de citocines.

Els resultats que es poden obtenir amb aquest tipus de cultiu mixte, no corresponen als cultius mixtes clàssics on es detecta la resposta de PBLs contra altres PBLs irradiades. En el nostre cas, la manca de molècules coestimuladors en les cèl·lules tumorals, i la manca també de secreció de citocines immunoestimuladores (IL-2) per part de les cèl·lules tumorals, fa que les respostes siguin baixes si les comparem amb les reaccions mixtes limfocitàries.

Protocol MLTR.

1. Afegir 10^5 PBMC• plaques de 96 pous en triplicats en fons en U conjuntament amb $5 \cdot 10^3$ cèl·lules tumorals irradiades (50Gy), en medi de cultiu complet en un volum de 200 μ l.
2. S'incuben durant 6 dies a $37^{\circ}C$ amb un 5 % de CO_2 a l'estufa de cultiu.
3. L'incorporació de timidina- H^3 es detecta afegint als cultius $1\mu Ci/pou$ durant les últimes 16-18 h de cultiu.
4. La lectura es realitza de manera automàtica en el comptador β , quan totes les cèl·lules de la placa s'han passat a filtres de nitrocel·lulosa.
5. S'obtenen els valors en cpm (comptes per minut), que s'hauran de referir sempre a un estat basal de proliferació de les cèl·lules sense estímuls.

Cultius similars es van portar a terme en plaques de 24 pous on s'incorporaven 10^6 PBL i $5 \cdot 10^4$ (50Gy) cèl·lules de melanoma irradiades, en un volum de 1ml per mesurar la secreció de citocines. En aquest cas el cocultius es van deixar 48 hores. Els sobrenedants dels cultius es poden congelar a -80°C i conservar fins a les determinacions. No es convenient descongelar els sobrenedants a analitzar varies vegades ja que la detecció de citocines es pot veure afectada.

4. ELISA.

Una altre tècnica clàssica en immunologia és la detecció d'alguna molècula per mitjà d'un ELISA. Consisteix en la utilització d'una parella d'anticossos monoclonals que reconeixen la mateixa molècula en epítops diferents. Un dels monoclonals s'enganxa en una placa de plàstic. Serà el que retengui la molècula (en aquest cas citocina) diana a detectar, mentre que l'altre anticòs s'utilitzarà per revelar aquesta presència. En aquest treball aquesta tècnica ha estat utilitzada per la detecció de les citocines produïdes en el context d'un cultiu mixte limfocitari contra les cèl·lules tumorals de la vacuna, també s'ha utilitzat per la caracterització de la secreció de citocines per part de les cèl·lules dendrítiques en les diferents situacions maduratives, i per últim també s'ha fet servir l'ELISA per la detecció de les citocines secretades pels limfòcits T generats per estimulació amb cèl·lules dendrítiques madures amb diferents estímuls.

Protocol ELISA.

Els ELISA utilitzats són comercials (OptEIATM, Pharmingen, San Diego, CA) i per tant cal seguir les intruccions que la casa comercial proporciona. Els reactius es compren de manera independent, i els ELISES es montaven en el laboratori. En general el procediment seguit es pot resumir com segueix:

1. Sensibilització per adherència a la placa d'ELISA (Plaques Nunc-Immuno Plate MaxiSorptm) de l'anticòs de captura (a una concentració de 5-10 $\mu\text{g/ml}$), en un tampó carbonat pH 9.6, durant tota un nit a 4°C .

* Recollit i aïllats per gradient de Ficoll a diferents punts de la vacunació i emmagatzemats en N_2 fins a la seva utilització en el mateix moment de les determinacions.

2. Es realitzen tres rentats amb el tampó de rentat PBS+ Tween (0.05%), i posteriorment la placa es bloqueja amb 200 µl de PBS+1% de albúmina sèrica bovina (10% de sèrum fetal) durant 1 hora a t^a.
3. S'elimina el tampó de bloqueig i s'afegeixen als pouets les mostres a analitzar, incloent els control positius. Conjuntament s'afegeix l'anticòs secundari biotinat.
4. S'incuben les mostres el temps necessari (aproximadament 2 hores a t.a.) i es renta la placa 3 vegades amb tampó de rentat, i 1 rentat final amb PBS sol.
5. S'afegeix 100 µl de estreptoavidina, a una dilució aproximada de 1/10.000 en tampó de bloqueig, durant 30-40 minuts a t^a ambient.
6. Adició de 200 µl del substrate, que prové de barrejar a parts iguals DMAB i MBTH, més 10 µl d'aigua oxigenada, just immediatament abans de la seva utilització. Les plaques es protegeixen de la llum.
7. La reacció s'atura als 20-30 minuts amb 50 µl d'àcid sulfúric 2M.
8. Lectura de la placa amb un lector d'ELISA a la longitud d'ona adequada. (en aquest cas a 600 nm).

Reactius.

- Tampó de copulat: 0,1M Na₂CO₃ pH 9,6.
- Tampó de rentat: PBS + 0,05 % tween.
- Tampó de bloqueig: PBS + 0,05 % tween + 1 % albumina (Albuminin fraction V, Merck, nc: 12018).
- Biotina (Sigma: N-hydroxysuccinimidobiotin, NHS-d-biotin, aprox. 98 %. Cn: H-1759) pel marcatge de l'anticòs de detecció.
- Estreptoavidina (Boehringer Mannheim, Streptavidin-POD, cn: 1089153).
- DMAB (3-DiMethylAminoBenzoic acid, Sigma, cn: D0787) i MBTH (3-Methyl-2BenzoThiazolinone Hydrazone, hydrochloride, Sigma, cn: M-8006) pel revelat.
- SO₄H₂
- H₂O₂

5. ELISPOT.

És un sistema de detecció de cèl·lules T específiques per antigen. Metodològicament es basa en el mateix principi que l'ELISA, però amb algunes variacions que la fan una tècnica molt valuosa per a la detecció de cèl·lules precursors específiques productores d'una citocina determinada, a diferència de l'ELISA que ens proporciona la seva concentració. Per exemple, l'ELISPOT posa de manifest un número determinat i concret de cèl·lules secretores de la citocina. L'anticòs de captura s'enganxa sobre un filtre de nitrocel·lulosa que recobreix una placa de 96 pouets de PVDF (MAIP S45, Millipore) o de nitrocel·lulosa, i a sobre s'afegeixen les cèl·lules bé siguin circulants o purificades amb l'antigen a analitzar i amb medi de cultiu la placa s'incuba a l'estufa de cultius el temps requerit per a la detecció de la citocina. Les citocines secretades quedaran retingudes pels anticossos al voltant de la cèl·lula activada. Després dels rentats i revelats de la placa, ens quedaran punts que representen (segons el tamany) una única cèl·lula secretora de la citocina determinada, i podem tenir idea del percentatge de cèl·lules específiques d'un número total de cèl·lules, per exemple, circulants.

En el nostre treball, l'ELISPOT, s'ha utilitzat per posar de manifest el número de cèl·lules circulants específics pel lisat de les cèl·lules de la vacuna, en els pacients vacunats amb cèl·lules dendrítiques abans d'iniciar la vacunació i a diferents temps durant la vacunació. En alguns pacients que ja es comentaran el l'apartat de resultats, també es va analitzar la resposta contra tumor autòleg, per intentar veure si la vacunació amb cèl·lules al·logèniques també induïa una resposta contra el tumor autòleg (al menys *in vitro*).

Protocol.

1. Incubació de l'anticòs de captura en les plaques de 96 pous, en tampó de copulació Na_2CO_3 0,1 M pH 9,6, a 4°C, durant tota la nit. (anticossos comercials de Mabtech. Suècia).
2. Rentat dels pous 4 vegades amb PBS.
3. Bloqueig dels pous amb 200 μl RPMI+10% sèrum fetal durant al menys 2 hores 37°C (estufa de cultiu).

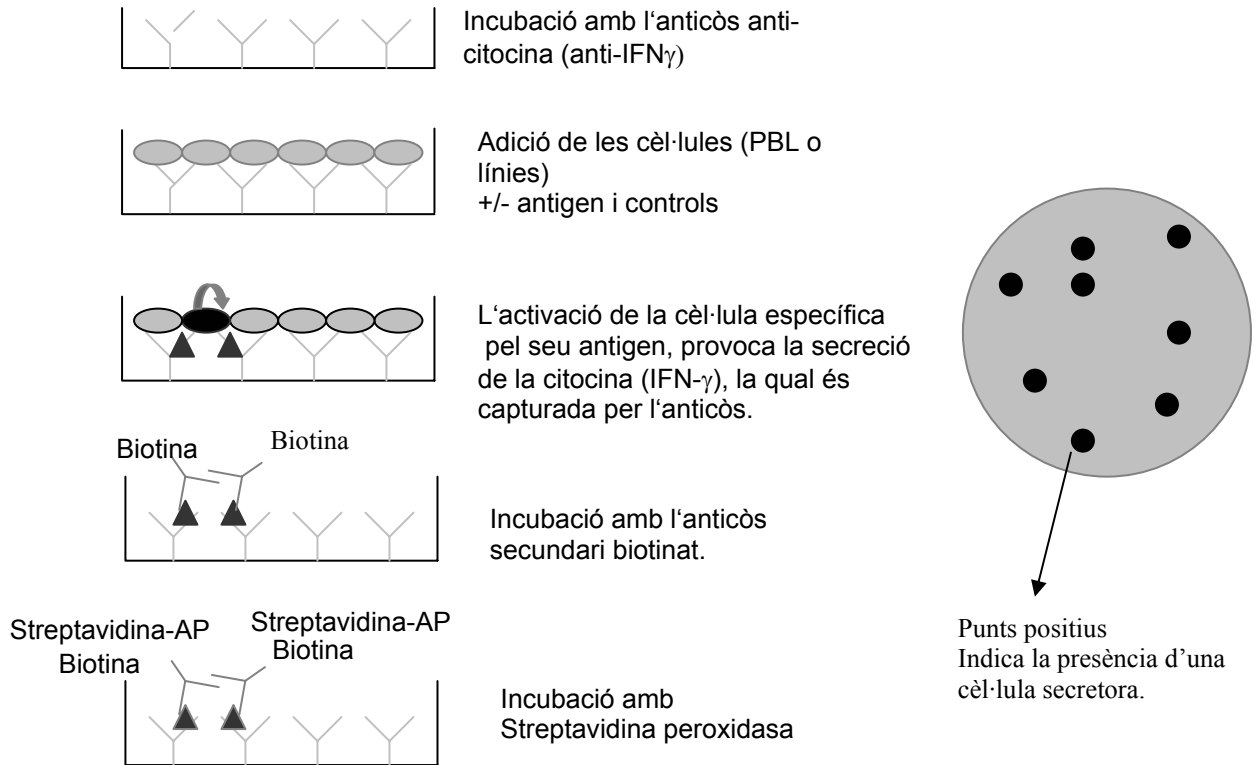
4. Preparació de les mostres provinents de cultius cel·lulars, o bé congelades. En el cas d'utilitzar cèl·lules congelades, es recomanable descongelar-les el dia anterior i mantenir-les a l'estufa de cultiu. Resuspensió de les cèl·lules en CM i ajustar a la concentració de treball. Normalment $1-3 \cdot 10^6$ cel/ml, per tant $1-3 \cdot 10^5$ cel/100 μ l.
5. Eliminació de la solució bloquejant de la placa, i sense necessitat de més rentats s'afegeixen 100 μ l/pou de les cèl·lules de la mostra (en duplicats) i 100 μ l/pou de l'antigen (proteïna, lisat o pèptid) a la concentració òptima d'estimulació. Dos pous han de ser control negatiu i altres dos els control positius d'estimulació (1% PHA).
6. Incubació durant 16-20 hores, en el cas de que s'utilitzin pèptids per estimular, i 48 hores si l'antigen és una proteïna completa, a l'estufa de cultiu a 37 °C i a 5% CO₂.
7. 6 rentats de la placa amb PBS+0,05% Tween.
8. S'afegeixen 50 μ l/pouet del segon anticòs biotinat a una concentració de 1 μ g/ml diluït en PBS i s'incuba a t.a. durant 3 hores.
9. 6 rentats amb PBS+0,05% Tween
10. S'afegeixen 50 μ l/pouet del conjugat fosfatasa estreptoavidina-alcalina diluïda en PBS. Incubació durant 1 hora a t.a.
11. 6 rentats amb el tampó de rentat.
12. Adició del substrate cromogènic de la fosfatasa alcalina, diluïda 1:25 en aigua desionitzada.
13. Revelat durant uns 30 minuts en la foscor, fins que els punts siguin visibles.
14. Eliminació del color i rentat de la placa en aigua de l'aixeta.
15. Deixar assecar les plaques.
16. Comptatge dels punts a la lupa o analitzador d'imatge i càlcul de les freqüències de cèl·lules específiques.

Es pot utilitzar com a revelador el complex Avidina-peroxidasa (Vectastain Kit), i per tant el punt 12 el revelador es substitueix per di-amino-benzidina més níquel (DAB)

En aquesta **figura 3** s'intenta esquematitzar el procés detallat prèviament per intentar clarificar el protocol.

Figura 3

IFN γ ELISPOT



6. Preparació de la vacuna.

En el moment de l'administració de la vacuna, les cèl·lules tumorals s'han de descongelar. La descongelació cel·lular és un procés que s'ha de fer de manera ràpida, ja que en la congelació de les cèl·lules, s'utilitza DMSO (dimetil sulfòxid), un crioprotector, que a t.a. és molt tòxic per a les cèl·lules, i en pocs minuts provoca la mort cel·lular. Per tant el vial de les cèl·lules es dilueix en 25 ml de medi complet amb un 10% SVF, i es realitzen dos o tres rentats per tal d'eliminar tot el DMSO residual. Després de l'últim rentat, les cèl·lules tumorals s'inactiven per 100 Gy. d'irradiació en gel, per tal d'evitar la secreció de radicals lliures. Un cop irradiades, les cèl·lules es renten un altre cop, i s'afegeix a un 50% de les cèl·lules DNFB, per tal d'introduir canvis estructurals en les proteïnes de la membrana, i fer-les més immunogèniques, es deixen 30' a t.a., i posteriorment després de 3 rentats més en tampó fisiològic, les cèl·lules ja estan preparades per a la inoculació intradèrmica, en el cas de que per protocol així ho digui, s'afegirà BCG (només els primers 6 mesos) que actuarà com a

adjuvant de la vacuna. El volum final aproximat de 400 μ l (barreja de cèl·lules+BCG) s'inocula intradèrmicament a prop de les àrees ganglionars

7. Administració de la vacuna.



Figura 4

L'administració de la vacuna es realitza a prop de les àrees ganglionars, principalment en el braç, per via intradèrmica. La periodicitat és mensual durant el primer any de vacunació, trimestral durant el segon, cada sis mesos en el tercer any, i una darrera dosi de record al 4^a any.

8. Obtenció de cèl·lules dendrítiques.

Per a l'obtenció de les cèl·lules dendrítiques s'han derivat a partir de monòcits seguit el protocol descrit en 1994 (Romani, et al. 1994), amb algunes modificacions. Degut al baix nombre de cèl·lules dendrítiques circulants i a la seva distribució tissular, el seu estudi va ser difícil, fins a la descripció del mètode de generació de cèl·lules dendrítiques a partir de monòcits amb IL-4 i GM-CSF. La possibilitat de cultivar aquestes cèl·lules que juguen un paper clau en la immunitat, ha obert noves perspectives en el tractament de malalties que actualment no tenen tractaments efectius, i també obre les possibilitats experimentals per entendre com el sistema immunitari captura, processa i presenta els antígens, i com es genera la resposta. Per les aplicacions de cèl·lules en teràpies en humans, cal que aquestes compleixin tot una sèrie de normes que les fan GMP (good manufacturing practice) o bé que més s'ajustin, respecte a la qualitat farmacològica dels reactius utilitzats (De-Vries, et al.).

Protocol.

1. Obtenció de cèl·lules de sang perifèrica* (veure Ficoll), i separació dels monòcits. Els monòcits es poden aïllar amb separació magnètica de la resta de cèl·lules CD14⁺, o bé per adherència al plàstic.
2. S'afegeixen les cèl·lules de sang perifèrica a plaques de 6 pous o bé a un flascó de cultiu de 75 cm², i s'incuben a 37°C durant dues hores, en el nostre cas vam utilitzar tant en l'adherència com en el cultiu posterior medi sintètic per tal de minimitzar els efectes del sèrum xenogenic. S'eliminen les cèl·lules sobrenedants no adherents per decantació i es fan tres rentats amb medi precalentat a 37 °C. Ens quedem amb la fracció monocítica. Per a un total aproximat de 2-4*10⁶ cèl·lules adherents s'afegeix medi de cultiu suplementat amb 500 U/ml IL-4 i 1000 U/ml de GM-CSF.
3. Renovació de les citocines a les mateixes concentracions cada tres dies.
4. Al dia 6-7 de cultiu, s'obtenen cèl·lules dendrítiques immadures, cèl·lules grans, amb poques prolongacions.
5. En aquest punt, les cèl·lules poden ser incubades amb l'antigen, per a la seva fagocitosis, o bé afegir al cultiu les condicions de maduració adequades. En el nostre cas, hem utilitzat un cocktail maduratiu definit, descrit que indueix la maduració final de les cèl·lules dendrítiques, compostat per 1000 U/ml IL-6, 1 µg/ml IL-1, 1 µg/ml PGE₂, 10 µg/ml de TNF-α (totes les citocines adquirides a Sigma. USA).

Per a la caracterització de les cèl·lules dendrítiques generades, hem utilitzat una bateria d'anticossos monoclonals, per tal de definir el seu grau de puresa, i la seva capacitat de madurar. La llista d'anticossos monoclonals utilitzats és: CD1a-PE (Immunotech), CD40-PE (BD, pharmingen. USA), CD80-PE, CD83-PE, CD86-PE (Immunotech, Marsella. França), CD11c-PE, CD123-PE, CD14-FITC, DR-FITC, Classe II-FITC, CCR5-FITC (BD, Pharmingen), així com tots els marcadors de llinatge, i que s'han utilitzat per descartar la presència de limfòcits contaminants (CD3, CD8, CD19).

9. Preparació del lisat.

El carregat antigènic de les cèl·lules dendrítiques, es va realitzar amb un lisat de les línies de cèl·lules tumorals al·logèniques que formen la vacuna. Les cèl·lules tumorals de melanoma es van lissar per shock tèrmic, fent 5 incubacions de 5'-10' entre

* En el cas dels pacients se'ls va sotmetre a una leucoafèresi per obtenir un volum de cèl·lules adequades per a portar a terme les diferents vacunacions.

nitrogen líquid i a un bany a 37°C, les cèl·lules prèviament irradiades a 100 Gy. Posteriorment a la lisi cel·lular, es va descartar les restes cel·lulars de membranes i nuclis per mitjà d'una centrifugació a 2000 rpm, durant 10', la fracció citosòlica soluble s'aliqota a -80°C, fins a la seva utilització per carregar les dendrítiques.

Aquest lisat s'afegeix durant les últimes 48 hores de cultiu, juntament amb el cocktail maduratiu, abans de la inoculació de les cèl·lules dendrítiques. Quan encara les cèl·lules dendrítiques són immadures i tenen una alta capacitat de captació de partícules.

10. Administració de les cèl·lules dendrítiques.

Un cop les cèl·lules dendrítiques han madurat i canviat les seves capacitats degut a la incubació durant 48 hores amb el lisat de les línies tumorals i el cocktail maduratiu, les cèl·lules es recullen en un tub de 25 ml amb PBS estèril.

Cal rentar bé les cèl·lules per eliminar residus cel·lulars i la resta de citocines utilitzades per a la maduració. Per tant les cèl·lules es centrifuguen 4 vegades a 1500 rpm durant 10' amb PBS sol estèril, descartant cada vegada amb molta cura el sobrenedant.

Abans de l'últim rentat, cal comptar les cèl·lules i mirar la seva viabilitat. La viabilitat de les cèl·lules es mira resuspenent-les amb a una dilució 1:9 amb blau de tripan. El colorant penetra dins les cèl·lules mortes, que òbviament no s'han de contar, ens serveixen per mirar el percentatge de mortalitat.

Posteriorment després de l'últim rentat la vacuna de cèl·lules dendrítiques es resuspen en un volum aproximat de 200 µl de PBS (el n° total de cèl·lules dendrítiques varia entre $2 \cdot 10^6$, amb una viabilitat alta > 95%).

Les cèl·lules recollides en una xeringa d'insulina, s'inoculen per via ecogràfica (Servei de Radiodiagnòstic, Hospital Clínic) en un gangli limfàtic normal de la zona inguinal, amb una periodicitat mensual.

11. Seguiment dels pacients.

Apart del seguiment clínic dels pacients, en el servei de Dermatologia de l'Hospital Clínic; amb totes les proves que tenen estipulades per pacients en aquests estadiatges, es van recollir mostres de sèrum i de limfòcits circulants previ a la vacunació i posteriorment cada tres mesos. Aquestes mostres ens podrien permetre

investigar si havien canvis en algun paràmetre del sistema immunitari dels pacients durant el temps de vacunació. Com ja es comenta en altres parts d'aquest treball, no hi ha cap paràmetre descrit en aquest moment que ens pugui fer correlacionar qualsevol tipus de resposta mesurada en el laboratori amb les respostes clíniques, però sí ens permetrà establir, si al menys, la vacuna aconsegueix estimular el sistema immunitari dels pacients amb més o menys eficàcia.

Les PBLs van ser obtingudes després de la separació amb Ficoll, i posteriorment s'havien de congelar en nitrogen líquid i mantenir-les fins al seu anàlisi. També el sèrum recollit es mantenia a -80°C per a la seva conservació fins al moment de la mesura de les diferents citocines.

12. Generació de línies T específiques.

Les línies T constitueixen una població de limfòcits T que han estat estimulats amb algun antígen, i que com a conseqüència de la seva expansió el cultiu cel·lular presenta una freqüència més alta de cèl·lules específiques. Aquest sistema d'expansió de limfòcits T *in vitro*, permet un millor estudi de la resposta cel·lular, per aquelles poblacions de cèl·lules específiques en que la seva freqüència és molt baixa. Tot i no ser una població totalment homogènia (tal com són els clons de cèl·lules T), representa una situació que s'acosta més a la fisiològica.

Per a obtenir línies T específiques, s'afegeix al cultiu cel·lular l'antigen pel qual volem obtenir cèl·lules, i després d'un període de cultiu variable entre una setmana i 10 dies, s'afegeix rIL-2 a dosi no molt elevades de 10-20 U/ml. (ja en aquestes concentracions de IL-2 s'expandeixen cèl·lules no específiques per al nostre antígen, però si les dosi són més altes, pràcticament creixen la totalitat de les cèl·lules). Posteriorment després de la IL-2, el cultiu es deixa uns 10 dies, vigilant sempre que no hi hagi sobrecreixement, però cal que les cèl·lules entrin en un estat refractari a la IL-2. En aquest punt, és quan es pot analitzar l'especificitat de les línies en cultiu, afegint de nou l'antigen, i mesurant la resposta de cada un dels cultius (bé per incorporació de timidina, bé per la secreció de citocines, o bé per altres tipus de determinacions).

Una variació important que es pot introduir, és la utilització de cèl·lules dendrítiques (de la mateixa manera que es faria per obtenir cèl·lules del tipus IVS), com a cèl·lules presentadores d'antigen, i que degut a la seva capacitat presentadora, facilita

l'expansió i obtenció de limfòcits T específics, més quan no s'utilitza un antigen definit i concret, si no que s'utilitza un lisat cel·lular.

Carregat antigènic.

Com és evident, un aspecte determinant en l'eficàcia antitumoral de les cèl·lules dendrítiques és que siguin capaces d'incorporar l'antigen tumoral que se l'hi ofereix (i òbviament processar-lo i presentar-lo). Malgrat s'han seguit moltes estratègies *in vitro* o en models experimentals de carregat dels antigens associats a tumor, amb més o menys èxit, el procediment òptim pel carregat en teràpia en humans no està encara ben aclarit. Afegir pèptids pel seu carregat, implica una restricció per classe I, també implica que es carreguin en MHC buits. Algunes evidències mostren que les cèl·lules dendrítiques capturen cèl·lules necròtiques, apoptòtiques, o inclòs fragments de cèl·lules vives. Determinar les condicions òptimes del carregat, i l'efecte que aquest té sobre la cèl·lula dendrítica és un dels objectius en el procés d'optimització de la preparació de les cèl·lules dendrítiques. Per tal de començar a avaluar aquest aspecte, s'ha posat en marxa un sistema, en el qual és possible transfectar un plàsmid que codifica per una proteïna (canal de potassi), associada a un proteïna fluorescent verda que es detecta en el citòmetre. Fins al moment no s'ha tingut èxit en la transfecció del plàsmid a les línies tumorals de melanoma, ja que quan s'apliquen els sistemes de selecció per resistència a antibiòtics, aquestes cèl·lules tumorals aturen el seu creixement, però no moren, impossibilitant la selecció dels transfectants estables, s'està treballant en sistemes de transfecció diferents, més eficients, amb la utilització de retrovirus o adenovirus. Per tant aquests experiments encara no s'han pogut portar a terme de manera autòloga, si no que s'ha utilitzat una línia tumoral HELA-GFP molt amablement cedida per Dr. Jordi Petriz, del Servei de Criopreservació de l'Hospital Clinic, anomenada KB3.1, que disposem en el laboratori, i que emet una fluorescència verda de manera continua.

Breuement comentar que les cèl·lules KB3.1 són cèl·lules derivades d'un adenocarcinoma humà, transfectades de manera estable amb un plàsmid que codifica per una proteïna "green fluorescent protein" (GFP) fusionada a una proteïna de membrana anomenada gliproteïna-P. Aquesta proteïna de membrana es localitza en la membrana apical de cèl·lules endotelials, i tot i que no es coneix la seva funció, té dos llocs d'unió a ATP, i podria estar implicada en una bomba de membrana en el transport de metabòlits. Les cèl·lules transfectades es seleccionen en un medi amb 5 ng/ml de colchicina, per evitar el creixement de cèl·lules que hagin perdut el plàsmid.

S'incuben cèl·lules dendrítiques immadures en una relació 1:1 amb les KB 3.1 durant el temps a analitzar, en medi de cultiu complet i a 37°C en l'estufa de cultiu.

Pels estudis de captació s'ha utilitzat un anticòs CD45-PC5 (Immunotech) que actua com a tercer color, per tal de poder seleccionar les cèl·lules dendrítiques, i un cop seleccionades, s'analitza CD80 ó CD86 –PE, la selecció de les cèl·lules dendrítiques que tenen fluorescència verda ens dona el grau de captació. Després de la coincubació de les cèl·lules dendrítiques amb les KB.3.1, es realitzen dos rentats amb tampó fisiològic, i es segueix el protocol ja descrit pel fenotipatge, tenint sempre present que no podem afegir un monoclonal amb FITC, ja que no podríem diferenciar la seva fluorescència de la que emeten les cèl·lules transfectades.

Optimització de la maduració.

Un dels aspectes que pot ser determinant en l'eficàcia d'una vacuna de cèl·lules dendrítiques és el seu estat de maduració. Aquest aspecte pot condicionar la via d'inoculació, i la generació d'una resposta immunitària o bé la inducció de tolerància. No està clar en l'actualitat com funciona aquests processos, i en tots els protocols de vacunació en humans, s'utilitzen cèl·lules dendrítiques completament madures (bé amb cocktails definits de citocines, amb medis condicionats de monòcits, o amb la maduració que indueix la incubació amb el lisat tumoral). Per a fer els estudis experimentals que es comenten en l'apartat de resultats (cal aclarir que aquest apartat fa referència a estudis experimentals i no a la preparació de cèl·lules pels tractaments) es van generar cèl·lules dendrítiques derivades de monòcits, i es van cultivar en un medi amb un suplement d'un 5 % de SVF. Per a la inducció de la maduració, les cèl·lules es van incubar amb una dosi de LPS de 1µg/ml a 37°C, durant 1 o 6 hores i posteriorment van ser rentades amb tampó fisiològic d'una manera extensiva (4 cops), en volums grans, per tal d'eliminar el LPS, després del darrer rentat, les cèl·lules es van tornar a deixar en plaques de cultiu en 2 pous amb medi complet, durant 24 o 48 hores més, fins al moment de realitzar l'anàlisi dels marcadors de membrana, o bé la recollida dels sobrenedants per l'anàlisi de la secreció de citocines.

Determinació dels antígens tumorals MAGE-3, MART-1 i tirosinasa.

La determinació d'aquests antígens associats al melanoma es va realitzar en el Servei de Genètica de l'Hospital Clínic, a partir de les línies tumorals en cultiu. Es realitza una RT-PCR a partir del mRNA extret de les cèl·lules.

13. Criteris d'avaluació clínica.

Com a resposta completa es defineix com la desaparició total de totes les metàstasi, durant al menys 3 mesos sense creixement o aparició de noves lesions; la resposta parcial es defineix com la reducció igual o superior al 50 % del promig del diàmetre de la malatia mesurable, mantingut durant al menys tres mesos sense el creixement o aparició de noves lesions; resposta mixta, reducció igual o superior a un 50% de la lesió, amb creixement d'altres metàstasis; estabilització, increment de tamany de la lesió inferior a un 25 %.

RESULTATS.

1. Obtenció de les línies tumorals.

Un cop establertes les condicions adequades pel cultiu de les cèl·lules tumorals de melanoma, es van començar a derivar línies a partir de biòpsies de pacients. En general, a partir de la disgregació mecànica de la peça tumoral comencen a créixer cèl·lules, la majoria de les vegades adherides al plàstic, és possible que les línies derivades a partir de metàstasi creixin en suspensió, i en un temps variable que va de les 3-4 setmanes fins als 2-3 mesos. Aquesta variabilitat en l'establiment de les diferents línies pot estar relacionat (és un aspecte que no s'ha mirat) amb l'agressivitat del tumor *in vivo* i de les diferents mutacions que presenten, però el que sí que hi ha constància és que les línies derivades a partir de metàstasis creixen amb més facilitat, en general, i es dupliquen d'una manera més ràpida que les línies derivades a partir de tumors primaris (cèl·lules amb menor agressivitat). El seu creixement com es pot observar és del tot desordenat en totes les direccions de la placa (**figura 5**), han perdut la inhibició per contacte del creixement i en general són cèl·lules molt resistents.

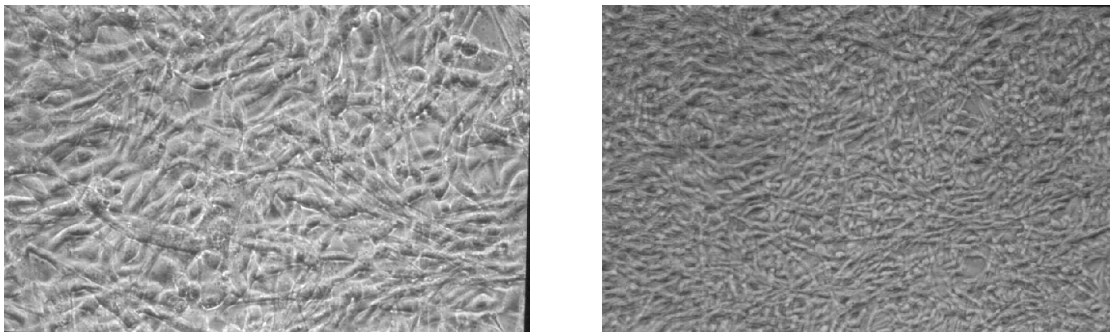


Figura 5. Detall de línies tumorals en cultiu, on es pot veure el creixement de les cèl·lules en totes les direccions del pla adherides al fons de la placa, i on no existeix inhibició per contacte, fet característic de les cèl·lules tumorals.

Alguna precaució a tenir present durant la manipulació de teixits biològics humans i en concret tumorals o cèl·lules tumorals, és la correcta desinfecció de tot el material utilitzat, ja sigui en el procés de derivació de les línies com en el procés de cultiu cel·lular. Malgrat no es treballa amb mostres infectades amb virus, no s'ha de

descartar la presència de virus encara no coneguts i per tant cal prendre les mesures adequades.

2. Caracterització de les línies tumorals de melanoma.

Un dels aspectes més importants en la generació de la vacuna, i que segur pot tenir repercussió final en la seva eficàcia, és la selecció de les línies tumorals que finalment la composaran. No hi ha en l'actualitat cap paràmetre que ens pugui indicar que una cèl·lula tumoral hagi de ser més o menys immunogènica, independentment dels antígens tumorals o no tumorals, coneguts, que pugui expressar; molts altres antígens encara no descrits podrien conferir aspectes més immunogènics. No tots els pèptids immunodominants descrits, poden dirigir a la resposta antitumoral. Com ja s'ha comentat en la introducció molt possiblement les línies metastàsiques derivades en cultiu han desenvolupat mecanismes tolerogènics *in vivo*, i a més a més la inevitable selecció que s'introdueix quan ens quedem les cèl·lules que millor creixen en cultiu. El melanoma pot metastatitzar pràcticament a totes les localitzacions del cos, i és molt possible de que tingui preferències per determinades regions, per exemple el melanoma uveal té una preferència de metastatització pràcticament exclusiva al fetge. Per tant de quantes més localitzacions possibles estigui representada la vacuna, contra més "tipus cel·lulars" es podria induir immunitat. Nosaltres i seguint alguns criteris prèviament publicats vam seleccionar inicialment 10 línies de melanoma en funció d'algunes característiques que a continuació s'expliquen.

2.1 Fenotip.

Degut a la disponibilitat d'una gran bateria d'anticossos monoclonals generats en el nostre laboratori contra antígens de diferenciació leucocitària, es van caracteritzar les línies de melanoma que s'anaven establint. També es van afegir alguns anticossos monoclonals que s'han descrit tenir una expressió més restringida en les cèl·lules de melanoma. En la **taula 7** es mostra aquells marcadors fenotípics que presentaven diferències entre línies, i només es presenten els resultats de les 10 seleccionades per compondre la vacuna, es van fenotipar de l'ordre de 40 línies de melanoma derivades amb tots els marcadors.

És interessant ressaltar, que en un primer moment es van seleccionar línies de localitzacions anatòmiques diferents, intentant la màxima representativitat possible (en

l'actualitat disposem d'algunes línies derivades de metàstasi viscerals que s'estan avaluant).

Totes les línies són positives per l'expressió de MHC I, i dues d'elles (M-13 i M-17) ho són per MHC II, així com l'expressió homogènia del gangliòsid GD3 en la totalitat d'elles, com ja s'ha comentat l'expressió d'aquest gangliòsid es correlaciona amb la malignitat del melanòcit. No hi ha expressió de molècules de coestimulació CD40, CD80, CD86 ni de CD1a, com ja era d'esperar, i tampoc hi ha expressió de FasL (CD95L), un mecanisme implicat inicialment en l'escapament tumoral, del qual s'havia de descartar la seva presència ja que podria eliminar les subpoblacions de limfòcits específics, però que en l'actualitat no està clar que aquesta molècula pugui jugar un paper *in vivo* com a mecanisme d'escapament tumoral.

2.2 Anàlisi microbiològic.

Un requisit indispensable és l'absència total de virus i bacteris, coneguts fins al moment. Per tant, d'entrada es van derivar línies cel·lulars a partir de pacients amb una serologia negativa per a qualsevol agent infecció, amb excepció del CMV. A més, en l'elaboració de cada lot de vacuna, es descarta la presència de virus i bacteris en les cèl·lules tumorals. Aquests anàlisi es va portar a terme al departament de Microbiologia de l'Hospital Clínic. Cada lot de vacunes que es prepara, i es manté en nitrogen líquid, també es sotmet a aquests control microbiològic exhaustiu.

2.3 Propietats de creixement.

Un dels avantatges que confereix la vacunació amb cèl·lules al·logèniques és que les vacunes es poden tenir en stock, i això permet la seva aplicació d'una manera pràcticament immediata. Per tant, cap de les línies seleccionades havia de presentar dificultat en el creixement. És difícil establir els paràmetres de duplicació ja que són diferents per a cada línia cel·lular, i per tant requereix del seguiment visual dels cultius. En la **taula 7** es mostren les propietats de creixement de les línies seleccionades inicialment per compondre la vacuna, on de manera arbitrària es considera el valor de 1 per un creixement lent, i el valor de 4 representa una alta capacitat proliferativa. Es pot observar com les línies M13¹ i M13² derivades de 2 metàstasi diferents del mateix malalt, són fenotípicament molt diferents.

Melanoma	M3	M9	M13¹	M13²	M16	M17	M23	M28	M36	M35			
línia derivada de ^a :	mp	p	mc	mc	mc	mc	mc	mc	m lcr	mc			
creixement ^c	3	3	1	2	3	3	1	4	3	2			
tipus ^b		n	a	a		es		a	men	n			
												promig	DS
W6/32	99	100	94	99	100	91	97	98	95	98		97	3
b2-microglob	98	98	55	92	100	72	57	34	92	35		73	26
A2	0	0	3	4	30	71	2	96	20	0		23	34
DR	26	16	2	88	0	90	0	5	2	0		23	36
CD1 (100-1A5)	12	91	90	6	36	44	77	6	0	2		36	37
CD1 (100-3C6)	16	51	67	13	34	13	2	10	3	2		21	22
CD10	0	0	30	24	30	0		1	0	59		16	21
CD13	70	0	95	2	75	0	97	0	0	100		44	47
CD15s FH6	0	0	16	1	16	0	15	2	0	1		5	7
CD26(134-2C2)	1	3	59	12	48	5	89	7	2	100		33	38
CD26(202-36)	0	0			28	0		0	0			5	11
CD41 16B7	11	44	0	3	2	11	0	1	6	3		8	13
CD45	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0		0	0
CD46	49	98	10	10	93	30	6	19	2	8		33	36
CD51 17E6	100	99	58	60	95	78	92	43	4	93		72	31
CD51/CD61	100	97	1	42	55	50	11	5	2	6		37	38
CD54	17	100	45	96	92	81	82	89	70	45		72	27
CD55	99	93	44	58	94	75	57	82	7	10		62	33
CD57	89	57	1	95	3	12	0	99	26	0		38	42
CD58	94	99	11	99	87	81	14	89	11	24		61	40
CD61 AP3	98	97	1	34	25	42	4	3	3	14		32	37
CD71	0	14	4	5	26	20	3	32	1	0		11	12
200KD 14E2	14	10	0	2	5	21	0	45	2	1		10	14
Beta-5 Integ.	10	48	49	1	94	2	62	10	0	86		36	36
AlfaV-beta-5	9	15	5	1	36	1	6	2	0	1		8	11
GD3 2A10	22	100	47	77	1	74	14	99	94	96		62	38
CD146 MUC18TEA 1/8	79	0		1	84	0		0	0	99		33	45
CD146 MUC18TEA 1/34	1	96		87	5	74		89	67	0		52	43

Taula 7: Fenotip de les línies seleccionades per la vacuna.

a mp=metàstasi pleural; p=primari; mc=metàstasi cutània; mlcr= metàstasi líquid cefalorraquidi.

b n=nodular; a=acral; es=extensió superficial; men= líquid cefalorraquidi.

c veure text. (2.3).

2.4 Selecció de les línies de la vacuna.

En funció de la seva negativitat en els paràmetres microbiològics analitzats, de l'expressió heterogènia de marcadors de membrana, de la presència de MHC I, i d'una taxa de creixement adequat, es van seleccionar 10 línies per a compondre la vacuna. Un cop seleccionades, aquestes línies es van expandir, per tal de disposar d'un gran volum

de cèl·lules, necessàries per a la preparació de la vacuna, i per la generació de lisats, amb els quals serien carregades les cèl·lules dendrítiques.

A part de les característiques fenotípiques ja esmentades, es va descartar la secreció (almenys en condicions basals de cultiu) de citocines immunoreguladores, com IL-10 i TGF- β , implicades en una inhibició de la resposta immunitària i que favoreixen per tant l'escapament tumoral.

2.5 Antígens tumorals.

Posteriorment un cop seleccionades les 10 línies de melanoma per la vacuna, es va determinar l'expressió d'alguns marcadors específics de tumor. Es va mirar la presència de la proteïna S-100 (cadena α intracel·lular) com un possible indicador de malignitat, així com la presència d'antígens específics de melanoma (MAGE-3, tirosinasa, MART-1). Aquests antígens tumorals presenten nombrosos epítops que poden ser reconeguts per limfòcits T, determinades seqüències són immunodominants, utilitzades àmpliament en protocols de vacunacions. Es va determinar la presència del mRNA d'aquestes proteïnes per mitjà d'una RT-PCR, que de manera rutinària es realitza en el departament de genètica.

S-100.

La detecció de la cadena α de la proteïna S-100 es va fer per marcatge intracel·lular. És un marcador que pot indicar la malignitat cel·lular, i la seva determinació en sèrum pot servir com un indicador de la presència de tumor, encara que la seva absència no vol dir que les cèl·lules no siguin tumorals. En la **figura 6** es pot veure la presència de S-100 representats en els histogrames d'expressió de la S-100 α intracel·lular en 6 línies de melanoma de la vacuna. El fet de que la seva expressió no sigui homogènea pot ser com a conseqüència a l'hetogeneïtat cel·lular dels cultius, i fins i tot algunes línies tumorals no l'expressen, com per exemple M-35. Aproximadament un 60 % dels melanomes són positius per aquesta proteïna, i s'utilitza la seva mesura en sèrum i els seus canvis de nivells, com un marcador tumoral de malaltia.

Figura 6. Detecció de la cadena α de la proteïna S-100 per marcatge intracel·lular.

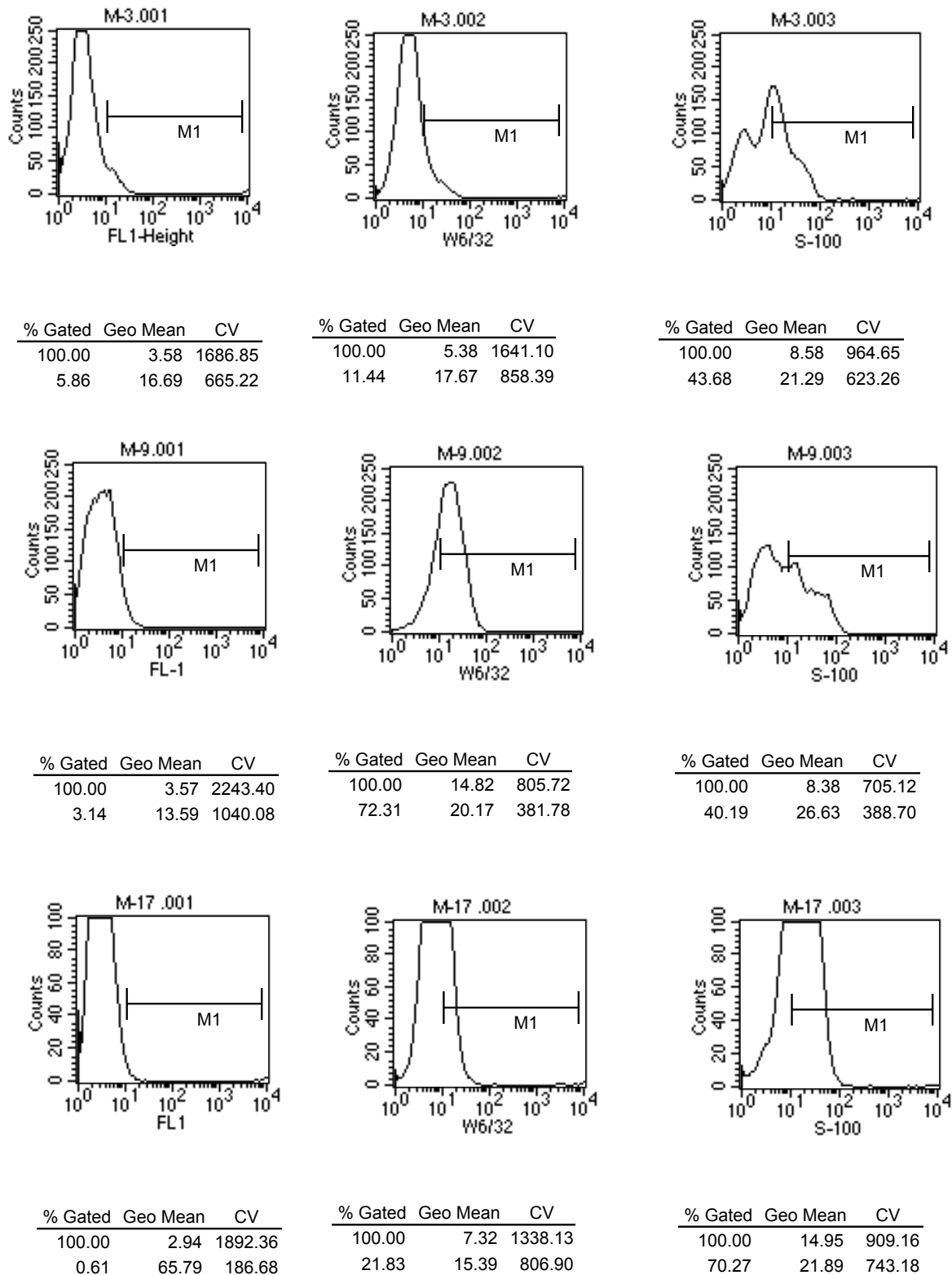
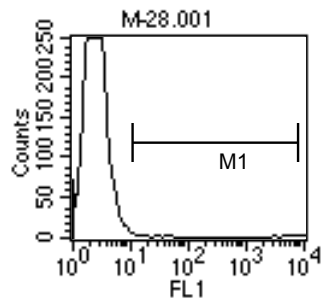
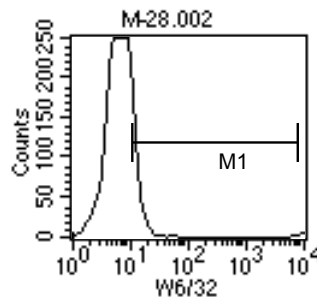


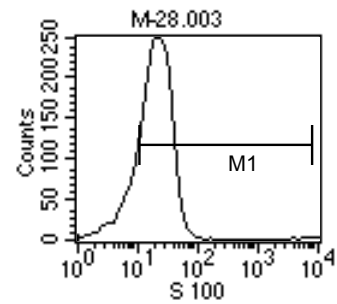
Figura 6 continuació.



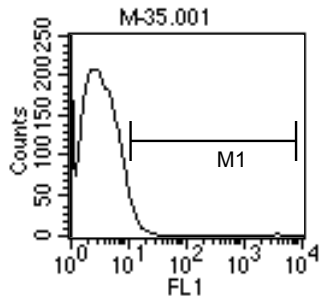
% Gated	Geo Mean	CV
100.00	2.56	1411.12
0.77	496.85	100.68



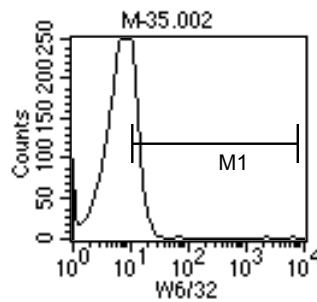
% Gated	Geo Mean	CV
100.00	6.42	1374.26
10.81	15.28	619.71



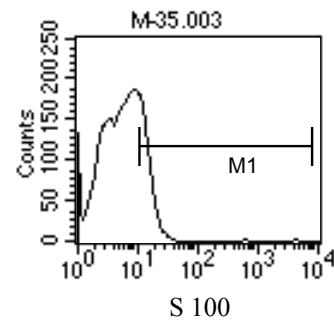
% Gated	Geo Mean	CV
100.00	17.22	888.11
80.28	22.16	799.72



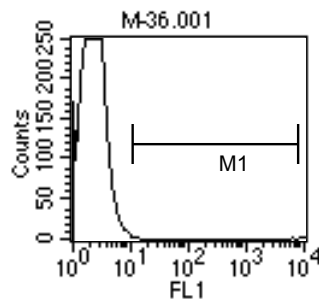
% Gated	Geo Mean	CV
100.00	3.06	1647.06
2.78	17.24	474.06



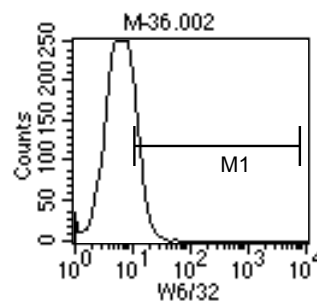
% Gated	Geo Mean	CV
100.00	6.45	1152.03
18.60	13.87	861.38



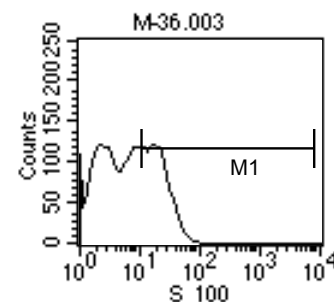
% Gated	Geo Mean	CV
100.00	5.34	968.55
19.22	14.37	755.93



% Gated	Geo Mean	CV
100.00	2.26	2287.81
0.27	175.47	144.47



% Gated	Geo Mean	CV
100.00	6.05	1310.99
14.75	14.11	950.74



% Gated	Geo Mean	CV
100.00	6.53	1003.71
36.11	19.69	746.82

Melan A/MART-1, MAGE-3 i tirosinasa.

En la **taula 8** que a continuació es presenta es resumeix l'expressió dels diferents antígens en 7 línies tumorals de la vacuna. Aquests antígens, representatius de la malignitat dels melanòcits sovint representen dianes per a la generació de la resposta immunitària. S'han descrit molts epítops immunodominants que provenen de seqüències d'aquestes proteïnes. Les diferents combinacions d'epítops que es poden generar en el conjunt de les línies tumorals que componen la vacuna, degut a les diferents molècules d'histocompatibilitat, juntament amb la molt possible expressió d'altres antígens tumorals (coneguts o no), fa que hi hagi una àmplia representativitat antigènica en la vacuna utilitzada.

Totes les cèl·lules analitzades expressen MAGE-3, antígen que s'ha implicat en l'expansió de limfòcits T citotòxics; mentre que la presència dels altres marcadors tumorals fa, que a nivell teòric també es puguin generar epítops per classe II.

Taula 8: Expressió de diferents antígens en línies de melanoma.

Línea tumoral	MART-1	MAGE-3	Tirosinasa
M-3	-	+	-
M-9	+	+	+
M-13 GE	+	+	+
M-16	-	+	-
M-17	+	+	+
M-28	+	+	+
M-36	+	+	+

La determinació de l'expressió d'aquests antígens en les cèl·lules de la vacuna, així com la confirmació de l'expressió d'alguns d'ells en el tumor, ens permetrà en un futur la millor monitorització de la resposta immunitària dels pacients vacunats per mitjà de la utilització de pèptids.

3 Vacuna.

3.1 Elaboració de la vacuna.

Cada dosi de la vacuna està composta per alíquotes de $4 \cdot 10^5$ cèl·lules tumorals congelades de cada una de les deu línies de melanoma barrejades, cosa que fa un total de $4 \cdot 10^6$ cèl·lules tumorals per vacuna. Es poden mantenir en nitrogen líquid el temps que sigui necessari fins al dia de la vacunació, en un contenidor de nitrogen exclusiu per aquesta finalitat. Per a la vacunació d'un número important de pacients, cal tenir un bon stock de cèl·lules, cosa que implica el manteniment de manera independent de cada un dels cultius cel·lulars, en uns volums adequats per a l'obtenció del número de cèl·lules necessàries. Cada lot de vacunes que es prepara s'analitza microbiològicament, per descartar la presència de contaminants que s'hagin pogut introduir durant la fase de cultiu, ja que les cèl·lules d'origen són negatives pels diferents controls.

4 Grup de pacients vacunats.

Es va aprovar pel Comitè Ètic de l'Hospital Clínic l'aplicació de la vacuna polivalent a un grup de pacients de melanoma, que complien una sèrie de requisits. Aquest grup inicial contemplava pacients metastàsics (estadi IV), així com pacients d'alt risc (estadi III, i IIb, de l'antiga classificació de l'AJCC) amb les següents situacions:

- Estadis IV amb la/les metàstasis extirpades i sense evidència de malaltia.
S'inclouen també l'estadi IV amb metàstasis cutànies múltiples amb un estudi d'extensió negatiu (no extirpables i que no hagin respòs al tractament estàndard) o que per la seva edat, patologia de base, situació geogràfica, o no acceptació, puguin ser inclosos en el tractament estàndard.
- Estadis III amb buidament i sense evidència de malaltia.
S'inclouen també l'estadi III (adenopaties +, afectació visceral -), que no puguin o vulguin, rebre el tractament estàndard pels motius comentats abans. Com a complement, al finalitzar el tractament estàndard (en aquells casos de risc elevat i que no hagin entrat en un estudi protocolitzat).
- Estadis IIb i IIa (Breslow >1,5) sense afectació ganglionar o visceral, que no puguin, o no vulguin rebre el tractament estàndard pels motius mencionats abans.

5 Resposta a les vacunes.

No hi ha descrit cap paràmetre que ens pugui permetre valorar l'efecte d'una vacuna antitumoral sobre el sistema immunitari. Com ja s'ha comentat en la introducció, hi ha moltes proves de laboratori que es poden fer si en la vacunació s'utilitzen pèptids. La utilització de lisats o de cèl·lules senceres com a vacuna dificulta aquesta monitorització. Una pràctica relativament habitual és afegir al lisat o conjuntament a les cèl·lules que s'utilitzen com a fonts d'antigen una molècula altament immunogènica (KLH, pèptids del virus de la grip) i es mesuren els canvis de la resposta immunitària contra aquestes molècules. Molt recentment s'ha demostrat que aquesta pràctica, a més de donar només informació sobre l'estat immunitari general del pacient, i no de la seva resposta antitumoral, també podria tenir uns efectes contraproductius, ja que es genera una expansió dels precursors que reconeixen aquestes molècules immunodominants en perjudici dels precursors que reconeixen antigens tumorals molt menys immunogènics (Palmowski, et al. 2002). És evident que es pot crear una competència entre les poblacions de cèl·lules madures pels factors que permeten la supervivència de les mateixes, per exemple IL-15, i una sobreexpansió d'una determinada població específica de cèl·lules memòria (contra la KLH, per exemple), pot afectar a la supervivència de cèl·lules específiques contra els antigens tumorals. Un altre aspecte que també sembla molt clar, és que no s'ha pogut establir fins al moment correlació entre les respostes immunitàries mesurades *in vitro* amb la resposta clínica; sovint hi ha un augment de la immunitat i dels precursors específics sense cap efecte clínic.

5.1 Seguiment de la resposta immunitària.

Un dels nostres objectius de l'anàlisi de la immunitat del pacient en front les cèl·lules de la vacuna polivalent, és poder determinar algun paràmetre que ens permeti predir, quins pacients responen a la vacunació, avaluar quin tipus de resposta és la més adequada per a l'eliminació del tumor (tot i que sembla que una de tipus Th1, no s'han d'excloure d'altres), i d'una manera més hipotètica determinar quins pacients poden ser més susceptibles de rebre vacunes. De tota manera aquestes prediccions tan es refereixen a l'estat immunitari del pacient com al tipus de tumor que ha desenvolupat. Hi ha molts aspectes que es poden mesurar, però ens vam centrar en la proliferació de les cèl·lules de sang perifèrica contra les cèl·lules tumorals que componen la vacuna. Les

determinacions es van fer abans de començar les vacunes (pre-vacunació) i durant el programa de vacunes (post-vacunació). Aquesta reacció s'anomena cultiu mixte limfocitari antitumoral o MLTR; i també es va determinar la producció de citocines de les PBLs en contacte amb les cèl·lules tumorals. Les citocines que es van mesurar són: IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ , per tal d'establir respostes de tipus Th1/Th2. Tot i que la sensibilitat d'aquestes proves és molt baixa, i també ho són els nivells de citocines detectats, són proves directes, on els paràmetres mesurats corresponen a l'efecte directe que provoquen les cèl·lules tumorals sobre els limfòcits de sang perifèrica, i no a efectes indirectes d'activadors policlonals que poden donar respostes inespecífiques, que no corresponen a la realitat. En la **taula 9** es mostren els valors de les diferents citocines sèriques i sobrenedants dels MLTR dels pacients en estadi IV que han pogut ser avaluables. Els resultats es presenten com la diferència de producció de citocines durant la vacunació respecte als nivells que considerem basals, previs a la vacunació. El grup de pacients s'ha separat en dos grups en funció si havia progressió de malaltia durant la vacunació, o bé si havia una estabilització i/o regressió de la malaltia.

Citocines sèriques.						
	IL-4s	IFN- γ s	IL-12s	TNF- α s	IL-10s	
progressors	3,4	7,9	13,2	-1,4	-2,0	Mitja
	12,0	28,2	114,3	6,6	6,0	DS.
no-progressors	0,5	3,0	3,7	0,0	0,3	Mitja
	1,3	31,1	9,0	0,0	0,8	DS.
Citocines sobrenedants MLTR.						
	IL-4c	IFN- γ c	IL-12c	TNF- α c	IL-10c	
progressors	-0,9	-103,7	0,3	-88,0	-233,4	Mitja
	15,8	212,4	16,6	130,7	359,8	DS.
no-progressors	-3,0	-8,6	0,4	138,4	260,8	Mitja
	30,4	18,5	8,0	368,5	368,6	DS.

Taula 9. Els valors d'aquesta taula representen l'increment en els nivells de citocines secretades degut a la vacunació, respecte als valors inicials, previs a les vacunes. S'expressen en pg/ml. * **p=0.004**

També es van analitzar la presència de citocines en el sèrum dels pacients a diferents temps durant la vacunació. Els nivells sèrics van ser indetectables pràcticament i no són informatius i la detecció d'alguna citocina és només en casos molt puntuals, i és difícil considerar-ho com a conseqüència del tumor o de la resposta, per contra sí que es

detecten nivells més alts de citocines en el MLTR. Podem considerar que és una resposta específica contra les línies tumorals, encara que com s'ha anat repetint en aquesta tesi, no es pot excloure que la resposta no sigui pròpiament antitumoral sino que sigui una resposta al·logènica. Al menys en els casos de remissió de la malaltia, s'està produint una resposta antitumoral, possiblement afavorida per la reacció al·logènica.

Durant la vacunació, i en aquells pacients on hi ha un control de la malaltia, inclouen les tres regressions completes, hi ha un augment molt important dels nivells de TNF- α , i sobre tot de IL-10 ($p=0,004$), degut a la vacunació. El TNF- α és una citocina implicada en la citotoxicitat que media de manera directe la lisi cel·lular, i es secretada principalment per macròfags, cèl·lules dendrítiques (durant la seva maduració), i limfòcits T citotòxics CD8⁺. No tenim una explicació encara per l'augment de IL-10 que detectem en aquests pacients; possiblement aquesta citocina es secreti com a conseqüència d'una activació forta dels limfòcits de tipus Th1 (en humans) i aquesta secreció fisiològica durant l'activació pugui tenir un paper en el control de la resposta i que aquesta no es faci descontrolada, per evitar un dany de teixits sans normals, o bé de manera directe s'ha implicat la IL-10 com un factor de supervivència per limfòcits T CD8⁺ que han estat activats (Fujii, et al. 2001).

Respecte a la resposta proliferativa, simplement comentar que no hem trobat canvis en la incorporació de timidina en els diferents controls de la vacunació respecte al controls previs. Degut a aquesta manca de proliferació, es pot interpretar que no s'ha produït una expansió detectable dels precursors T CD4⁺, que són els que incorporen timidina tritiada, en aquests tipus de cultiu.

5.2 Seguiment clínic.

El seguiment clínic es realitza en el servei de Dermatologia de l'Hospital Clínic, i constitueix el fet més important de la vacunació, de poc serveixen les dades de la resposta immunitària, sigui positiva o no, si la vacunació no té cap mena d'efecte en el desenvolupament del melanoma. Implica controls de la progressió de la malaltia que es realitza cada 4 mesos. L'extensió de la malaltia s'avalua per TACS corporals, gammagrafia òssia, resonàncies cranials o bé TACS de la regió (o regions) afectada. També es té en compte la supervivència global del grup de pacients (**figura 7**), encara que no s'ha realitzat un estudi randomitzat adequat que ens permeti valorar la supervivència global del grup respecte a altres tractaments, sí que podem comparar la supervivència del grup de pacients vacunats respecte a les descrites en la literatura amb

altres tractaments i fer referència a les dades històriques ja publicades. Pel grup de pacients amb estadi IV, que són els que actualment podem avaluar la supervivència, ja que la progressió de la malaltia és ràpida, i es poden veure diferències amb temps de seguiment no gaire llargs. Per aquells pacients sense evidència de malaltia (n=15) a l'inici de la vacunació la supervivència promig és de 24,8 mesos, limitat a un període de seguiment de 39 mesos; mentre que es de 19,1 mesos en el grup de 23 pacients amb presència de malaltia a l'iniciar la vacunació.

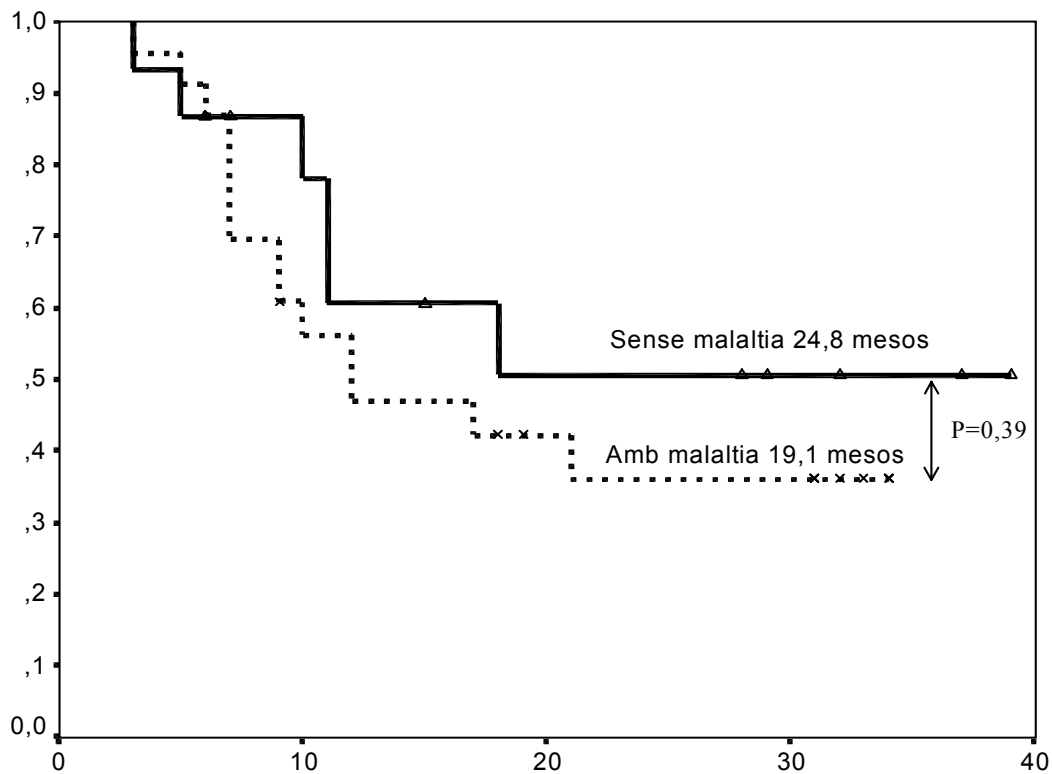


Figura 7. Supervivència del grup de pacients vacunats. Estadis IV, separats en funció de la presència o no de malaltia evident, en el moment d'iniciar les vacunes.

PACIENTSAmb malaltia avaluable: 23RESPOSTES: 6 (**26%**)

3 COMPLETES (18, 10+, 24+) MESOS

2 PARCIALS (8, 16+) MESOS

1 MIXTA (30+)

Sense malaltia avaluable: 155 (**33%**) sense progressió

En la figura 8 es fa un resum de les respostes clíniques del grup de pacients amb estadi IV vacunats.

Per finalitzar aquesta part de resultats clínics, en la **figura 9** es representa l'evolució de les tres pacients que van experimentar respostes completes, dues d'elles mantingudes en l'actualitat. Observar que hi ha controls ecogràfics de l'afectació ganglionar, i que en la malaltia amb múltiples afectacions cutànies, la regressió es va confirmar per diagnòstic histopatològic.

La pacient de la part superior de la imatge, correspon a una dona de 70 anys, amb lesions en la cama esquerra, aparegudes 4 anys després de l'exèresi del tumor primari. 4 mesos després d'iniciar les vacunes, va començar a experimentar una regressió de les lesions, fins la desaparició total de la malaltia durant 18 mesos, fins a l'aparició d'un nodul subcutàni, la pacient continua viva després de més de 34 mesos d'iniciar les vacunes.

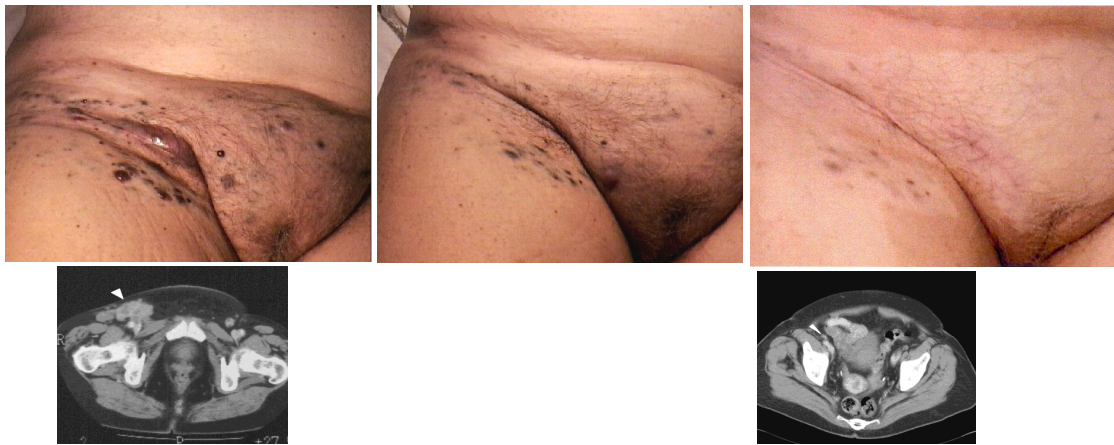
La pacient que es representa en el centre de la figura correspon a una dona de 69 anys, amb múltiples afectacions cutànies amb afectació ganglionar, que no havia respós a altres tractaments previs, després de 4 vacunacions va començar a experimentar una resposta amb evolució a completa a l'any de tractament. En l'actualitat està lliure de malaltia (+10 mesos).

Per últim, la pacient de la figura C, es representa l'evolució de les lesions d'una dona de 37 anys, amb múltiples lesion en la cama dreta, amb una resposta completa de 24 mesos de durada. Aquesta dona està lliure de malaltia en l'actualitat.

A. Remisió completa després d'un any de tractament.



B. Remisió completa cutània i ganglionar després de 10 mesos de tractament.



C. Eliminació de lesions cutànies multiples confirmat per estudi patològic després de 2 anys de tractament.

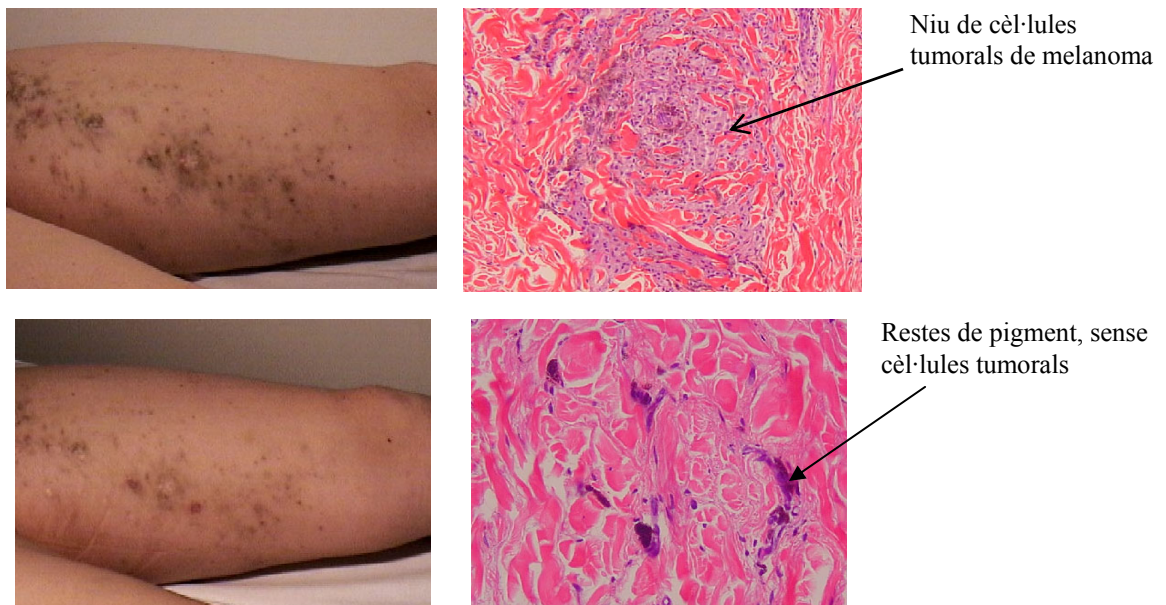


Figura 9. Fotografies de l'evolució de les tres respostes completes del grup de pacients vacunats.

6 Obtenció de cèl·lules dendrítiques.

Degut a la necessitat d'obtenir les cèl·lules dendrítiques amb les condicions per aplicació en humans més adequades, aquestes es van generar i cultivar en un medi sintètic sense cap suplement exogen de proteïnes. Es va caracteritzar aquest sistema de generació de cèl·lules per tal de comprovar que no hi havia diferències importants amb altres sistemes més estàndards de cultiu descrits de les cèl·lules dendrítiques amb suplementes exògens de sèrum*.

Degut a que les característiques descrites per les cèl·lules dendrítiques poden variar segons el mètode de cultiu utilitzat, afectar la seva funcionalitat, i per tant l'objectiu final de provocar una estimulació del sistema immunitari del pacients, es va determinar de les cèl·lules dendrítiques, el seu fenotip, la capacitat de maduració amb diversos estímuls maduratius, les propietats de generar resposta al·logènica, el perfil de secreció de citocines, i també van ser utilitzades per mesurar la resposta en els pacients (seguiment immunològic).

Hi ha un aspecte important en la generació de cèl·lules dendrítiques, i és en referència a la seva estabilitat. Els monòcits cultivats en presència de IL-4 i GM-CSF deriven cap a cèl·lules dendrítiques, amb propietats i característiques similars a les cèl·lules dendrítiques obtingudes directament *ex vivo*. Fins al moment no hi ha evidències de que aquestes cèl·lules dendrítiques derivades de monòcits existeixin *in vivo*, no es coneix quina seria la font de les elevades concentracions de IL-4 que es requereixen per a la seva derivació, malgrat que algunes evidències mostren que els monòcits en el procés de transmigració pateixen canvis i adopten un aspecte similar a les dendrítiques amb un fenotip similar. Aquests aspecte és important, perquè les MoDC, si es veuen deprivades de IL-4 i GM-CSF, inclòs quan les cèl·lules ja estan totalment diferenciades a dendrítiques immadures (dia 7 de cultiu), aquestes reverteixen a monòcits, expressant de nou CD14⁺, i molt possiblement alguns aspectes relacionats amb la funcionalitat de les cèl·lules dendrítiques importants en la resposta antitumoral (capacitat de crosspresentar antígens solubles per la via de classe I) es veurien seriosament afectats (**figura 10**). De les imatges es dedueix que l'inducció de la maduració amb un cocktail maduratiu, CM (una barreja de citocines IL-1, IL-6, TNF- α i prostaglandina E₂) no evita aquesta reversió, i molt possiblement es veu afavorida per

* Degut a la possible presència de factors inhibidors solubles en el plasma o sèrum autòleg, es va descartar generar els cultius de dendrítiques amb suplementes autòlegs.

la presència de IL-6 (Chomarat, et al. 2000), encara que no es poden descartar altres citocines, o el paper de la PGE₂. Per tant si el que es volen són cèl·lules dendrítiques, amb tota la seva funcionalitat, ja sigui per utilitzar-les com a vacunes, o bé per ser utilitzades en qualsevol experiment, cal tenir present aquesta reversió si es deixen temps relativament curts (dos dies, aprox.) sense IL-4 i GM-CSF, i que les característiques fenotípiques i sobre tot funcionals es vegin afectades. Molts protocols per induir la maduració de les cèl·lules dendrítiques les renten i eliminen la presència de les citocines, i com hem vist la maduració no evita la reversió.

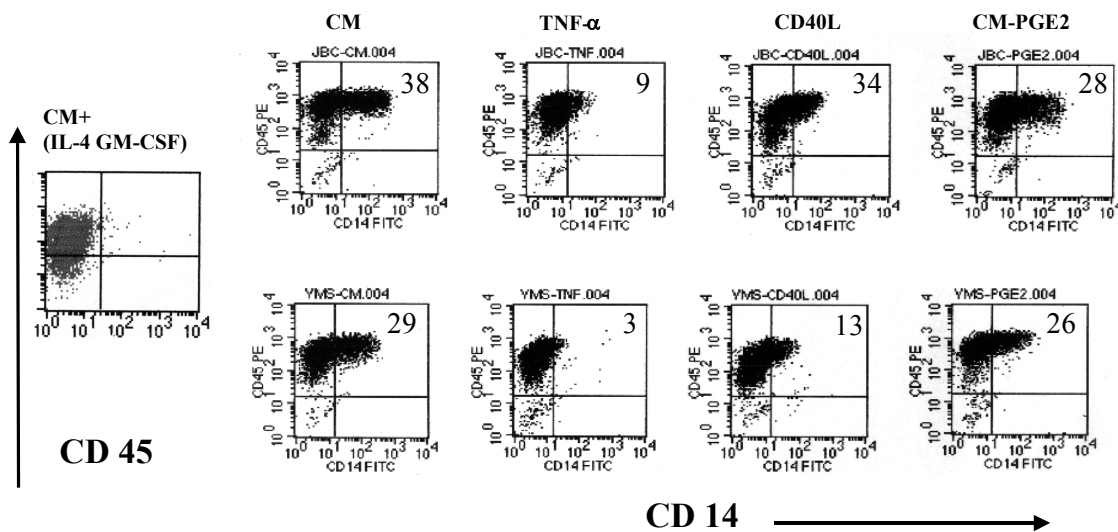


Figura 10. Reversió del fenotip de cèl·lula dendrítica cap a monòcit, en absència de IL-4 i GM-CSF. En la figura es mostren cèl·lules dendrítiques de dos pacients. Si la maduració es porta a terme en presència de citocines el fenotip és CD14⁻, però si s'elimina del medi la IL-4 hi ha una recuperació de la molècula CD14.

7 Caracterització de les cèl·lules dendrítiques

7.1 Fenotip.

No hi ha un marcador característic que defineixi a les cèl·lules dendrítiques i les diferents subpoblacions. Són les combinacions de diferents marcadors, i l'absència d'uns altres el que defineix els diferents subtipus de cèl·lules dendrítiques i el seu estat maduratiu. Les cèl·lules dendrítiques que s'obtenen a partir de monòcits es defineixen, fenotípicament, per la manca de marcadors de linatge, en especial la manca de CD14, que defineix als monòcits-macròfags, la presència de molècules presentadores d'antigen

MHC I, MHC II, CD1a, molècules coestimuladores CD40, CD80, CD83, CD86, molècules d'adhesió CD11a,b,c, CD18, CD50, CD54, CD58, receptors de quimiocines CCR5, CCR7, receptors de fagocitosi CD32, CD36, CD64, DEC 205, i altres marcadors del tipus CD2, CD25, CD95, etc...

En la **taula 10** es mostra el resultat del fenotipat ampli amb diferents marcadors de membrana que es van realitzar a cèl·lules dendrítiques provinents de diferents pacients, per tal de caracteritzar millor l'expressió de determinades molècules i els canvis que patien en induir la maduració amb la barreja de citocines i PGE₂ que indueixen una forta maduració **taula 11**.

Hi ha un augment molt important tant en el percentatge d'expressió com en la seva intensitat en molècules d'adhesió CD54, CD50, CD44, així com per les molècules implicades en la presentació antigènica

	VBA		ZBS		AGC	
	%	INTENSITAT	%	INTENSITAT	%	INTENSITAT
CD4	41	34	26	19	7	198
CD8	4	50	12	26	0	
CD11a	95	69	91	41	45	98
CD14	24	37	45	23	4	263
CD20	2	48	17	21	5	352
CD25	2	42	16	21	8	597
CD26	2	37	24	22	4	610
CD27	16	45	14	37	7	253
CD43	96	413	95	391	89	596
CD45	99	382	96	164	92	291
CD45RO	74	37	87	26	9	122
CD45RA	11	37	7	23	6	367
CD48	95	64	36	37	35	94
ICAM-1	99	90	84	42	74	104
CD18	99	999	97	454	91	823
CD50	98	80	78	46	70	115
CD53	99	229	89	149	89	206
CD71	28	37	38	23	12	250
CD76	42	162	47	64	12	398
CD81	97	160	91	57	69	165
CD84	46	31	44	20	5	170
CD100	2	42	22	21	3	459
CD148	76	31	92	26	7	271
CLASS II	99	592	96	144	93	433
W6/32	99	139	97	135	85	179
CD57	4	51	24	25	7	831
CD13	99	199	96	184	89	259
CD19	18	44	22	22	5	352
CD16	3	115	39	67	25	863
LFA-3	98	103	91	56	85	105
CD6	20	50	18	25	9	321
CD31	99	86	96	55	44	108
CD36	99	227	95	89	79	190
CD41	13	29	18	21	27	102
CD44	100	2638	94	364	84	1536
CD46	83	30	69	22	9	200
CD55	10	29	22	20	7	720
CD59	88	119	97	101	65	205
$\beta 2\mu$	100	443	95	112	96	445

Taula 10 Alguns marcadors en cèl·lules dendrítiques immadures dels que no són normalment utilitzats per definir els seus estats maduratiu. Existeix en alguns marcadors variabilitat entre pacients, que poden dependre de les condicions del cultiu, o venir determinat genèticament.

% indica el percentatge de cèl·lules fluorescentes.

Intensitat. Fa referència a la intensitat de fluorescència (relacionat amb el nombre de molècules per cèl·lula).

	VBA		ZBS		AGC	
	%	INTENSITAT	%	INTENSITAT	%	INTENSITAT
CD4	36	38	8	28	20	69
CD8	6	34	2	40	2	160
CD11a	86	49	33	30	52	63
CD14	37	94	36	87	21	117
CD20	4	32	1	136	9	123
CD25	67	70	38	29	39	96
CD26	4	30	3	47	6	126
CD27	20	40	9	37	14	155
CD43	98	270	99	194	93	330
CD45	100	350	99	125	94	196
CD45RO	65	37	44	27	9	121
CD45RA	17	30	2	49	10	189
CD48	89	50	51	33	43	74
ICAM-1	98	204	97	94	82	198
CD18	99	484	100	168	93	348
CD50	96	71	75	30	72	82
CD53	96	111	81	55	72	90
CD71	62	38	29	30	47	101
CD76	41	102	21	75	20	161
CD81	92	108	84	53	62	81
CD84	60	32	31	25	50	69
CD100	6	29	2	36	8	268
CD148	93	43	57	24	50	64
CLASS II	97	1099	99	710	94	1519
W6/32	99	373	99	369	93	508
CD57	4	39	6	78	9	198
CD13	97	137	99	135	88	178
CD19	23	38	8	29	12	104
CD16	15	66	14	55	42	691
CD80	92	63	96	56	78	130
CD86	23	31	38	26	33	84
LFA-3	96	140	99	87	89	202
CD6	21	38	8	29	13	195
CD31	96	65	77	29	46	69
CD36	96	90	42	33	65	74
CD41	14	43	6	29	65	60
CD44	99	1814	98	810	92	1103
CD46	94	55	76	27	64	79
CD55	63	31	14	24	37	59
CD59	99	397	99	152	93	525
$\beta 2\mu$			100	316	99	1706

Taula 11. Els mateixos marcadors van ser determinats, després d'induir la maduració de les cèl·lules dendrítiques durant dos dies amb el cocktail maduratiu. Alguns marcadors canvien la intensitat d'expressió, i d'altres canvien el percentatge d'expressió

% indica el percentatge de cèl·lules fluorescentes.

Intensitat. Fa referència a la intensitat de fluorescència (relacionat amb el nombre de molècules per cèl·lula).

7.2 Immadures/madures. Estudi amb diferents estímuls maduratius.

Un dels aspectes més importants de la generació de cèl·lules en un medi sintètic, era de veure la seva capacitat de madurar en rebre els estímuls adequats. Com ja s'ha comentat en la introducció, per a que les cèl·lules dendrítiques generin una forta resposta dels limfòcits T, cal que les dendrítiques estiguin madures. Una població de cèl·lules immadures podria estimular la proliferació de cèl·lules reguladores o la inducció d'anèrgia. A part dels diferents marcadors que hem vist que canvien amb la maduració, de manera clàssica es defineix la maduració per un augment en la expressió de CD40, CD80 i CD86, així com l'expressió de CD83 (no s'expressa en madures), com a molècules coestimuladores, i també un augment en les molècules de classe I i classe II.

Els cultius també es fa un seguiment visual, ja que amb dos dies de maduració les cèl·lules canvien de manera dramàtica el seu aspecte, passant de ser rodones i amb poques prolongacions, a ser cèl·lules amb nombroses dendrites (**figura 11**).

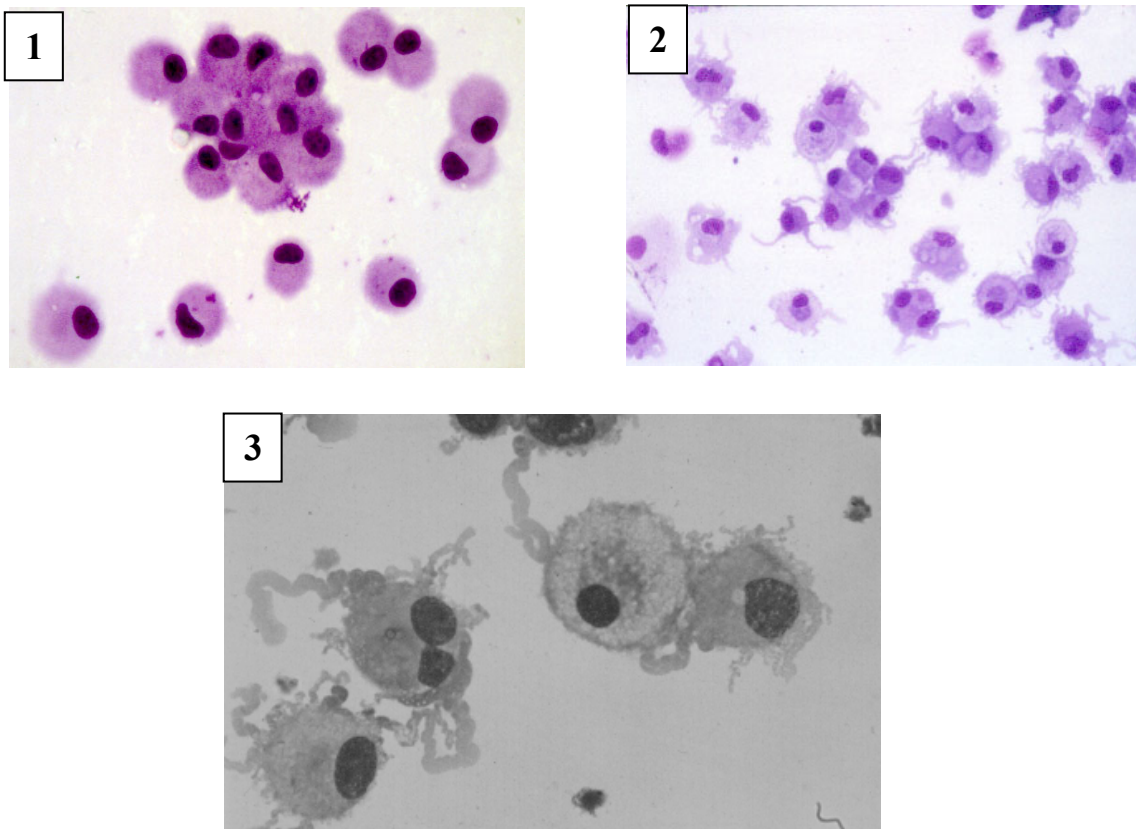


Figura 11

1. Dendrítiques immadures.
- 2/3 Dendrítiques madures, es poden veure les prolongacions que apareixen i caracteritzen a aquestes cèl·lules.

En la **figura 12** es pot observar com les cèl·lules dendrítiques obtingudes amb medi sintètic de cultiu poden madurar al rebre estímuls maduratius durant 24 hores amb la barreja de citocines que s'ha demostrat més eficaç (IL-1, IL-6, TNF- α i PGE₂). Aquesta maduració és molt similar a la que s'aconsegueix amb cultius suplementats amb sèrums exògens, respecte a l'expressió en superfície de molècules coestimuladores, encara que les cèl·lules immadures generades amb el medi sintètic tenen una menor expressió de CD40, CD80 i CD86. És pot veure un augment molt significatiu de les molècules coestimuladores CD40, CD80 i CD86, l'expressió de nou de CD83, com a molècula que clarament defineix l'estat maduratiu de les cèl·lules dendrítiques, encara que no es coneix la seva funció, i si té algun paper durant la presentació antigènica, com suggereix la seva funcionalitat en la generació de la resposta cel·lular (Scholler, et al. 2002). També es pot veure un augment en l'expressió de les molècules de classe I i classe II (DR), aquest fenotip correspon a un estat on predomina la presentació d'antigen i la generació d'una resposta immunitària. L'elevada presència de CD80 i CD86 en la superfície de la cèl·lula presentadora d'antigen, fa que amb la interacció amb la cèl·lula T específica, la resposta generada sigui de tipus Th1.

Cèl·lules dendrítiques immadures.

24 hores CM

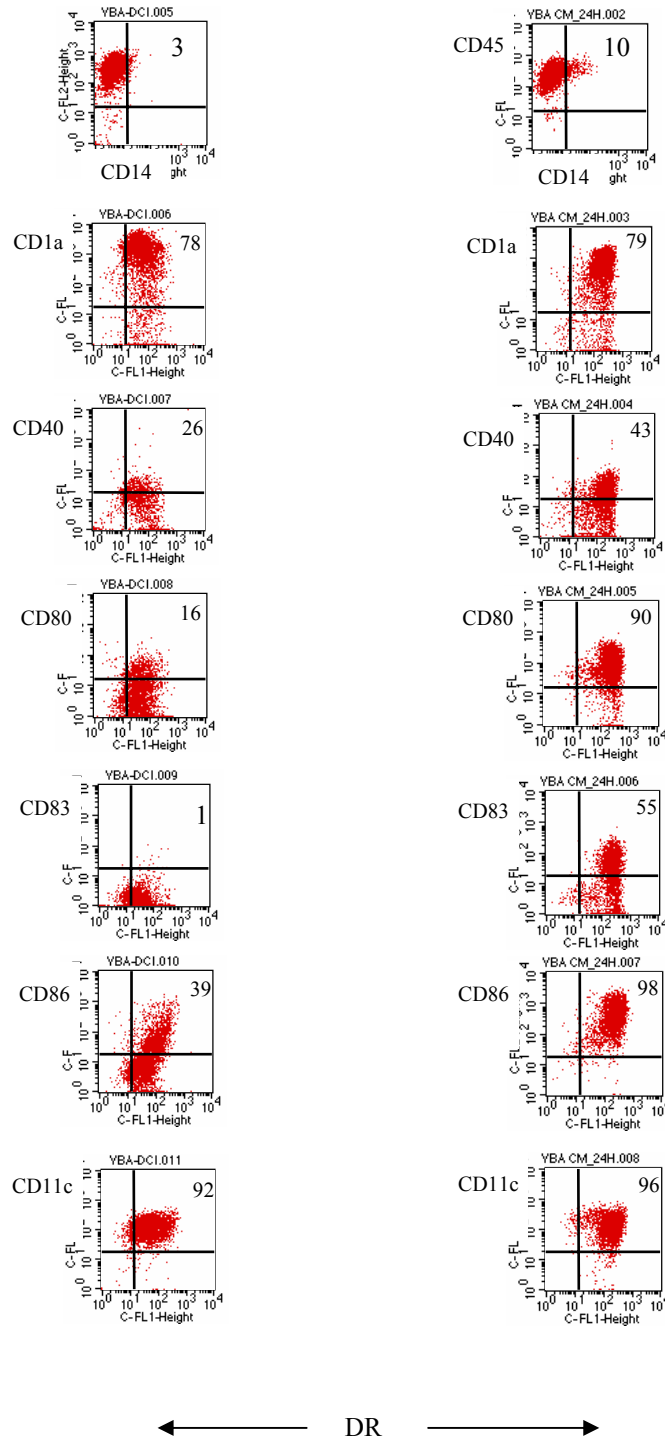


Figura 12. Canvis en l'expressió d'algunes molècules de superfície que evidencien la maduració de les cèl·lules dendrítiques en afegir una barreja de citocines durant 24 hores, en un medi sintètic sense suplement exogen de sèrum. Els valors indiquen el % de cèl·lules doble positives.

Es pot observar en detall en un histograma senzill (**Figura 13**), aquest augment significatiu de molècules importants en la presentació antigènica i en la generació d'una resposta immunitària, a priori cap a Th1, en aquests histogrames senzills. Pel que respecte a les molècules coestimuladores, i també una clara expressió de la molècula CD83, marcadora de maduració.

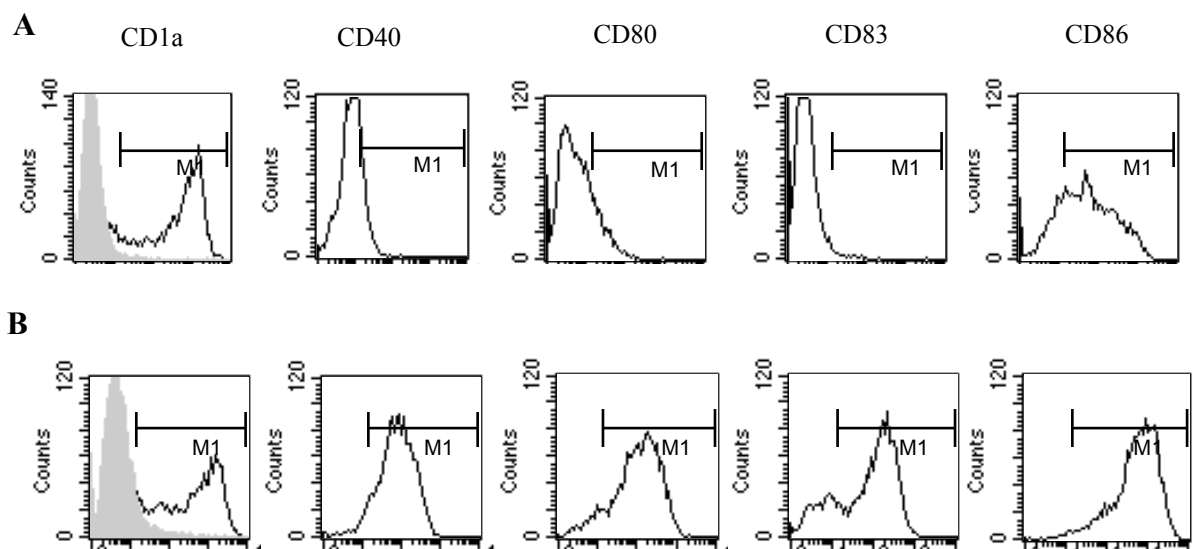


Figura 13. Augment de l'expressió d'algunes molècules de superfície de les cèl·lules dendrítiques, que caracteritzen la maduració d'aquestes cèl·lules.

A: Cèl·lules dendrítiques immadures.

B: Cèl·lules dendrítiques madurades amb el CM.

7.3 Propietats al·loestimuladores.

Una de les propietats més analitzades en la literatura de les cèl·lules dendrítiques és la seva capacitat de generar una forta resposta al·lògena de cultiu mixte, resposta que possiblement depengui de l'elevat nivell d'expressió de molècules coestimuladores quan maduren i en menor mesura de la producció de determinades citocines per les cèl·lules dendrítiques en maduració; malgrat és una prova àmpliament utilitzada per la caracterització d'aquestes cèl·lules, només dona idea de la seva capacitat immunogènica, però no ens dona cap tipus d'informació sobre si hi ha processament i presentació d'antigen.

La maduració de les cèl·lules dendrítiques amb el CM, en aquest sistema de cultiu en medi sintètic, genera cèl·lules madures amb una elevada capacitat al·loestimuladora (**figura 14**). Aquesta propietat, depenent en part de l'expressió de

molècules de coestimulació, només s'inhibeix en presència de IL-10, que també inhibeix tant l'expressió de molècules de coestimulació, com de molècules d'hiscompatibilitat, implicades en la presentació antigènica (**figura 15**). La presència d'altres citocines durant el cultiu no sembla alterar aquesta resposta al·logènica.

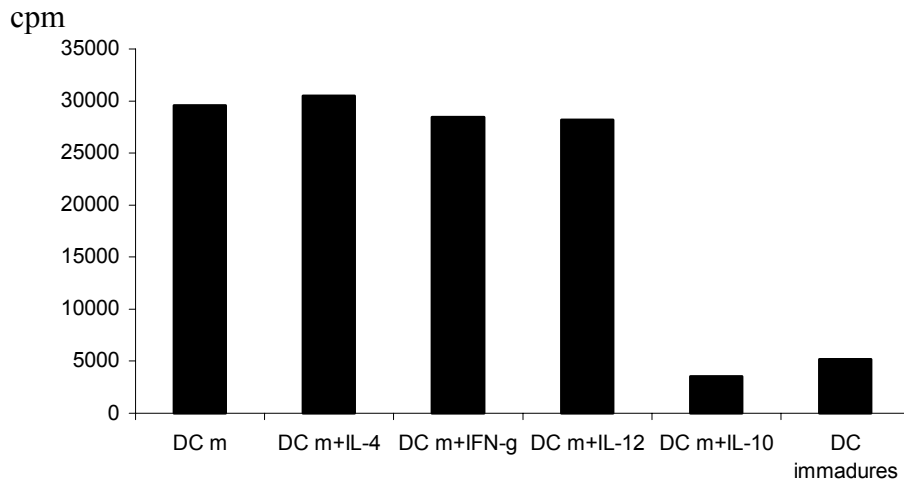


Figura 14. La presència de diverses citocines immunoreguladores en el nostre sistema no afecta a la capacitat immunogènica de les cèl·lules dendrítiques (IL-4, IFN- γ , IL-12) madures, en canvi la presència de IL-10 sí que inhibeix la resposta proliferativa.

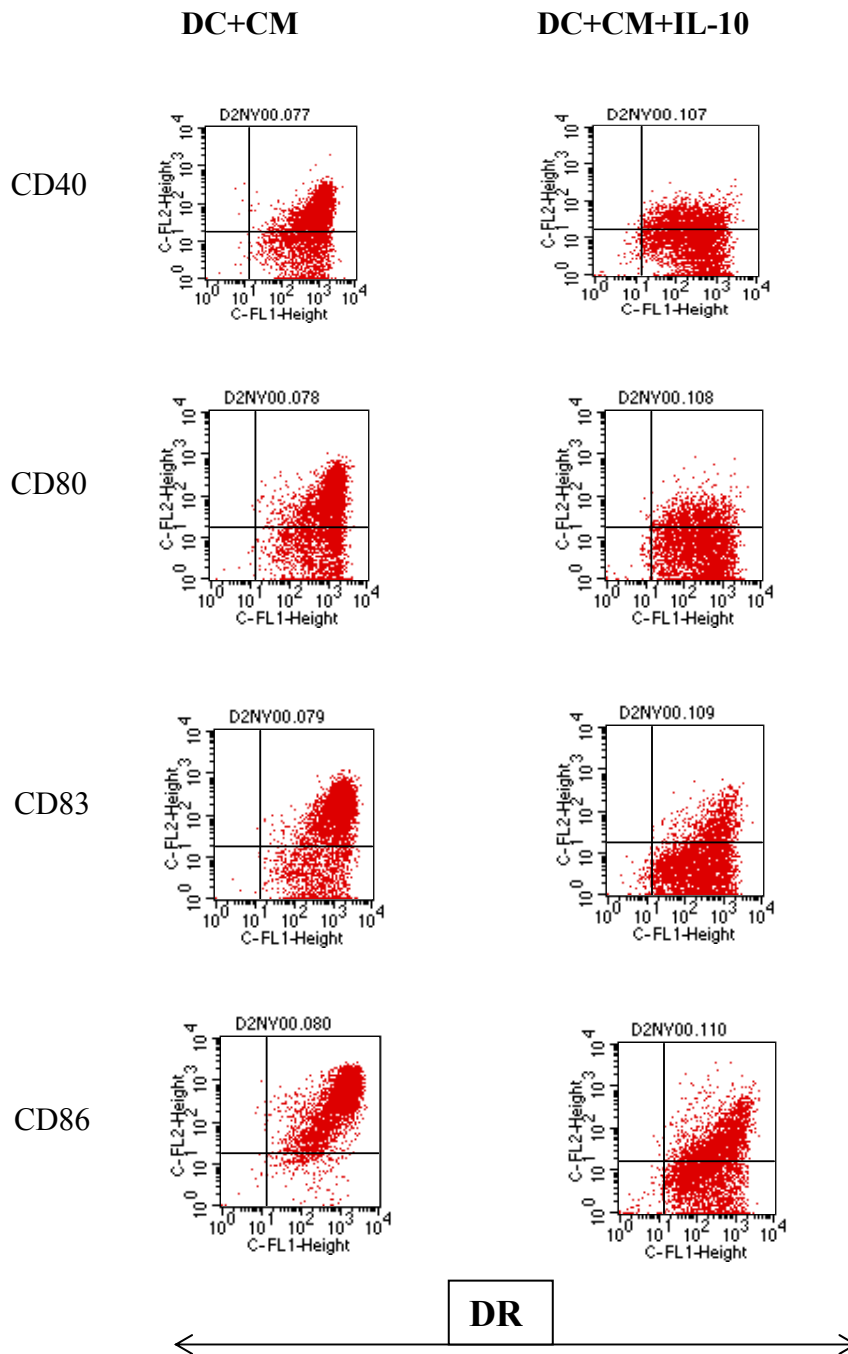


Figura 15. Inhibició de molècules de coestimulació i del DR en cèl·lules dendrítiques madurades amb el CM, amb o sense presència de IL-10 durant la maduració. S'observen canvis en el % i en la intensitat.

Per altra banda, la màxima resposta s'observa quan s'utilitza cèl·lules dendrítiques madurades amb el cocktail maduratiu (CM), mentre que amb altres estímuls maduratius les respostes disminueixen (**figura 16a**), aquests altres estímuls estarien implicats en la semi-maduració de les dendrítiques.

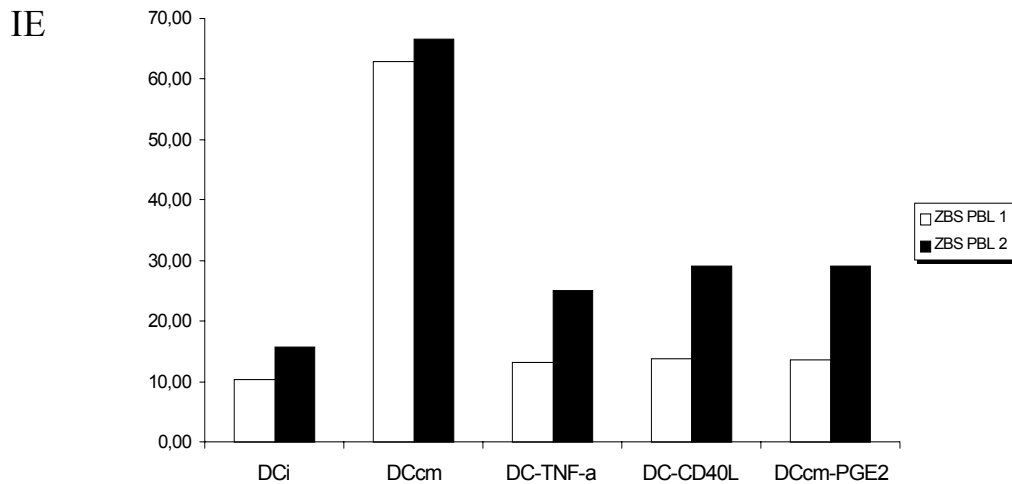


Figura 16a. Respostes proliferatives, expressades com a índex d'estimulació (IE, cpm estímulo/cpm basal), induïdes per cèl·lules dendrítiques immadures amb diferents estímuls maduratius. DC_{CM}.(CM: IL-1+ IL-6+TNF- α + PGE₂)

Per una altra banda, i com correspon al concepte de que la maduració de les cèl·lules dendrítiques és un procés seqüencial, i que possiblement s'inicia amb estímuls bacterians o citocines inflamatòries i que finalitzaria amb la senyalització que li proporciona el limfòcit T, en afegir a les condicions de maduració CD40L, augmenta la resposta al·logènica que indueixen les cèl·lules dendrítiques (**figura 16b**).

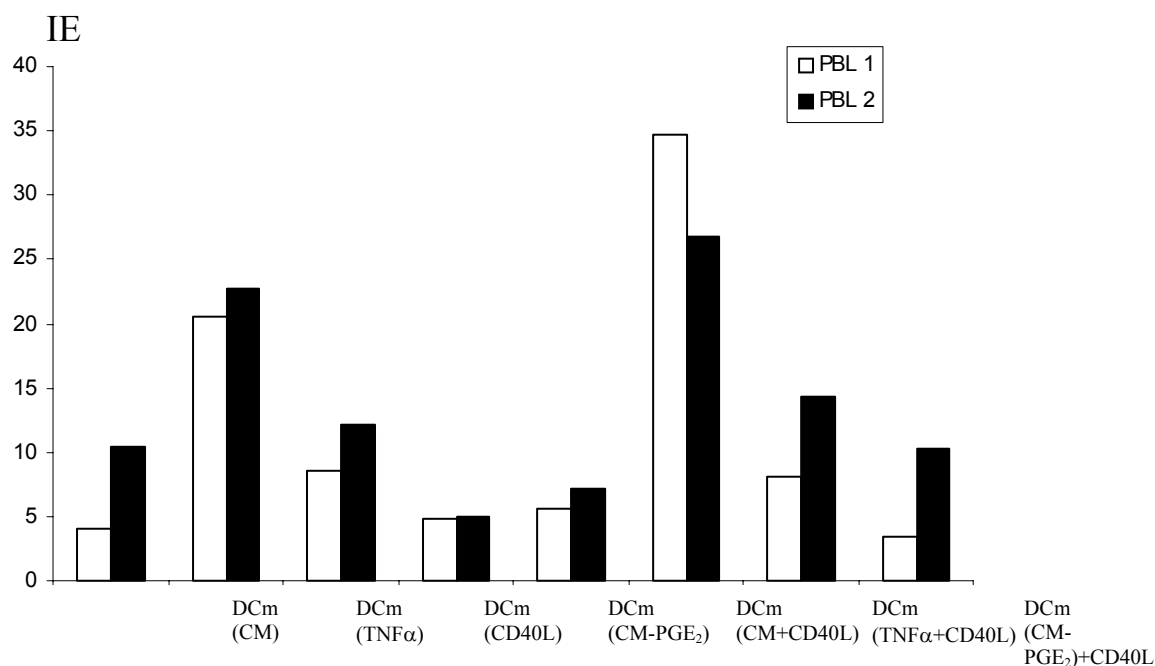


Figura 16b. En aquest gràfic es mostra la gran capacitat de provocar resposta al·logènica amb un número molt baix de cèl·lules dendrítiques ($2000\text{ DC}:1 \cdot 10^5$ limfòcits). És compara la maduració entre el cocktail de citocines (CM) i altres estímuls. Es mostra la resposta de dos PBL independents.

7.4 Secreció de citocines.

La secreció de citocines pot ser un element clau en el tipus de resposta que es genera. De la mateixa manera que l'expressió de molècules coestimuladores en la membrana de la cèl·lula dendrítica és determinant en l'inici de la resposta, les citocines secretades són importants en el tipus de resposta generada. La secreció de IL-12 és un element clau en la generació d'una resposta de tipus Th1. Malgrat tot la seva regulació és complexa i la forma bioactiva (p70), només es secreta sota estímuls bacterians LPS, CpG, acompanyats per senyals T (CD40L i IFN- γ). Per tant, tot i que vam buscar IL-12 p70, amb diferents estímuls maduratius, i a diferents temps, només es va detectar quan les cèl·lules s'estimulaven amb LPS. No existeix un defecte en la via de secreció de la citocina perquè sí que hi ha secreció de IL-12 p40. El nivell de secreció de la IL-12 p40, varia amb els diferents estímuls maduratius sent màxima amb el CM. Tot i no ser la molècula biològicament activa, o millor dit no participa de les respostes que s'atribueixen a la IL-12, aquest augment en la seva expressió fa que si la cèl·lula

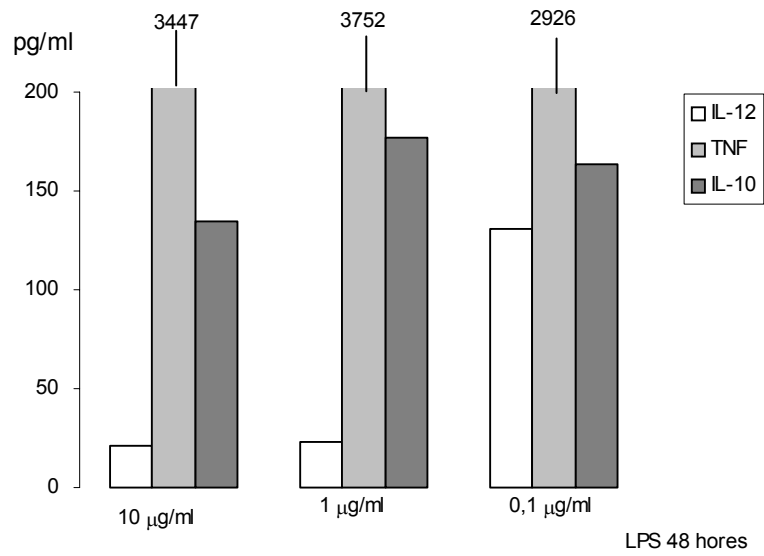
dendrítica rep els senyals adequats per a la inducció de la forma p35 de la IL-12 (senyals per cèl·lules T o bé pel propi dany tissular en el moment de la injecció), es puguin assolir elevades concentracions de la forma de la molècula activa (p70).

L'espectre de citocines que secreten les cèl·lules dendrítiques durant la seva activació, condiona el tipus de resposta per part dels limfòcits T. És molt possible que aquesta resposta no depengui d'una única citocina, sino de l'equilibri o proporció relativa entre les diferents citocines secretades en un moment determinat. En la **figura 17a** es mostra el perfil de secreció de citocines, a l'estimular les cèl·lules dendrítiques amb LPS durant 48 hores (en cèl·lules que havien estat generades en un medi sintètic). La valoració de les citocines secretades quan són estimulades amb el cocktail maduratiu és difícil, ja que com hi ha TNF- α en aquesta barreja, no podem estar segurs si el TNF- α detectat és secretat de nou, o és el que hem afegit al cultiu; de totes maneres, sembla clar que la presència de TNF- α durant la maduració, actua com un "feedback positiu", estimulant la seva producció de manera autocrina. Com ja s'ha comentat, en aquestes condicions no es detecta l'heterodímer de la IL-12 p70 (només detectat amb estímuls bacterians), però sí que hi ha una modulació en els nivells de IL-12 p40 a l'estimular les cèl·lules dendrítiques amb el cocktail maduratiu o amb d'altres estímuls (**figura 17b**). Cal ressaltar que la presència de lisat de línies tumorals autòlogues, provoca la secreció de IL-12 (p40), encara que en el nostre model, en afegir lisat de cèl·lules tumorals als cultius, no té cap efecte en la secreció d'altres citocines com per exemple TNF- α i té un efecte molt petit en el fenotip (**figura 17b**).

La secreció de citocines per part de les cèl·lules dendrítiques determina el tipus de resposta generada en els limfòcits T amb els que interactuen. La utilització de PGE₂ durant la maduració és un aspecte en controvèrsia, ja que en alguns models sembla inhibir la secreció de IL-12. Per altra banda la seva presència és determinant en l'efectiva maduració de les cèl·lules dendrítiques generades en medi sintètic, i en l'alt nivell d'expressió de CD80 i CD86. Degut a que de manera clàssica la IL-12 era l'element clau en la generació de Th1, però en el nostre model aquesta citocina no es produïa, vam voler comprovar quin tipus de resposta es generava, en estimular de manera autòloga, cèl·lules de sang perifèrica, amb cèl·lules dendrítiques carregades amb tumor autòleg i amb diferents estímuls de maduració (**figura 18**). La gràfica de la part de sota de la figura, es pot veure de que amb la vacunació amb cèl·lules dendrítiques madurades amb una barreja de citocines amb presència de PGE₂, no estavem induïnt

una resposta de tipus Th2, al menys *in vitro*, i podríem estar valorar com una resposta de tipus Th0/Th1, ja que en cap cas es va detectar IL-4, i la presència de IL-10, no és un element restringit per la població Th2 en limfòcits humans. En aquest punt, cal comentar que la IL-10 tot i ser una citocina immunoreguladora, i quan s'afegeix externament inhibeix la funcionalitat de la cèl·lula dendrítica madura (Steinbrink, et al. 1999); no està clar el seu paper quan es secretada per les cèl·lules dendrítiques estimulades amb LPS i CM, ja que no afecta al fenotip, i tampoc quin és el seu paper fisiològic ja que les cèl·lules de tipus Th1 humanes secreten IL-10 de manera específica. Molt possiblement sigui l'equilibri entre les diferents citocines el que condicioni la seva funcionalitat i tinguin un paper immunoregulador quan l'antigen desapareix i s'atura la secreció d'altres citocines com el IFN- γ i TNF- α .

a



b

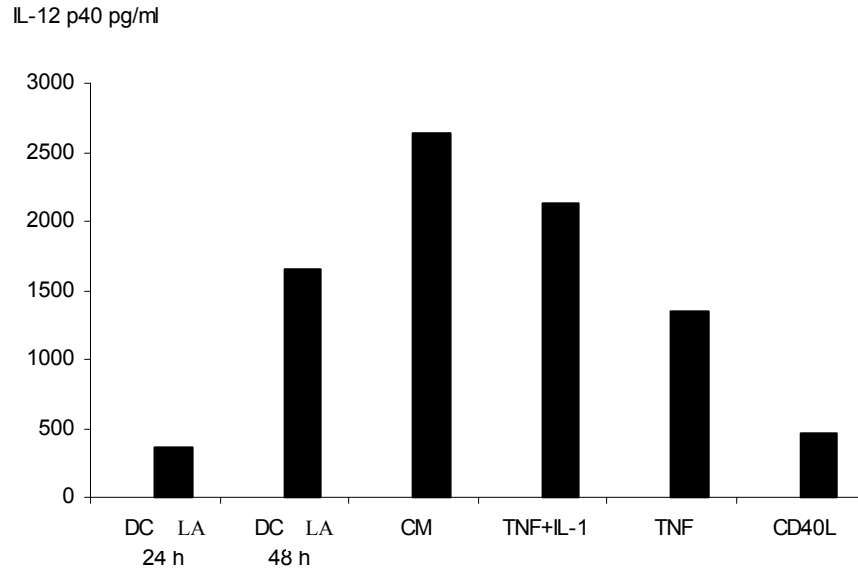


Figura 17. Producció de citocines de cèl·lules dendrítiques cultivades amb un medi sintètic.

- a. Producció de IL-12p70, TNF- α , i IL-10 per estimulació amb LPS durant 48 h.
- b. Producció de IL-12 p40 per estimulació amb lisat autòleg (LA), CM i altres estímuls.

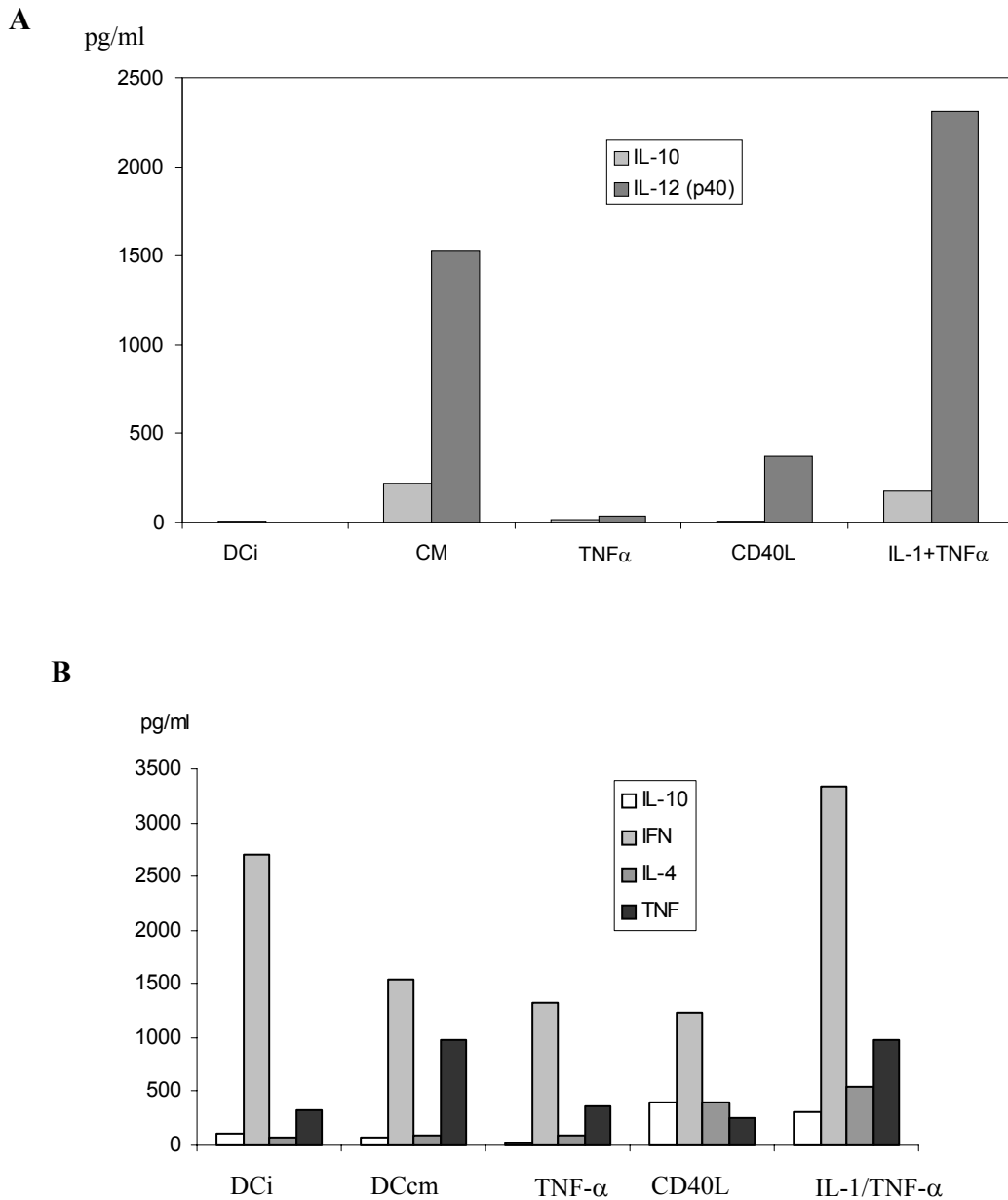


Figura 18. Estimulació de limfòcits T autòlegs amb cèl·lules dendrítiques autòlogues “carregades” amb antígens tumoral autòlegs, preparades amb diferents estímuls maduratius.

A. Nivells de citocines dels sobredants a les 48 h de cultiu de les cèl·lules dendrítiques.

B. Nivells de citocines en els sobredants a les 48h de cultiu després d’activar els limfòcits T amb CD3 i CD28.

7.5 Resposta contra tumor *in vitro*.

La utilització d'un lisat cel·lular per carregar les cèl·lules dendrítiques, dificulta tant la monitorització de la resposta immunitària *in vitro*, així com els estudis funcionals. Sembla clar, que un pèptid o una proteïna recombinant és un sistema molt més net, que permet un millor estudi i seguiment. Un altre dels aspectes que vam estudiar, és que la generació de cèl·lules dendrítiques madures, i el sistema de carregat antigènic funcionés. Per tal de portar a terme aquests estudis, les cèl·lules dendrítiques es van cultivar directament en plaques de 96 pous, per tal de minimitzar els efectes de les posteriors manipulacions de les cèl·lules. A aquests cultius amb o sense madurar, es van afegir lisats de la vacuna polivalent, o bé les cèl·lules de la mateixa vacuna sense lisar, però irradiades. Després de deixar els cultius dos dies, les cèl·lules dendrítiques es van irradiar, a la mateixa placa, i es van afegir limfòcits als diferents pous. La resposta proliferativa es va mesurar després d'una setmana de cultiu. Veiem que durant dos dies d'incubació amb el lisat, les cèl·lules dendrítiques capturen i presenten antígens a les PBL. En aquest sistema no poden excloure una reacció de cultiu mixte, i no específica de tumor, però en el moment en que es van realitzar els experiments no es disposava de la línia tumoral autòloga. Com posteriorment es comentarà en relació als resultats de la monitorització de la resposta immunitària generada per la vacunació amb les cèl·lules dendrítiques, sí que hi ha una resposta contra el tumor autòleg, malgrat que la vacunació s'ha fet amb tumor al·logènic, això ens fa pensar, que o bé la resposta contra la vacuna polivalent és antitumoral, o bé la resposta al·logènica que es genera en aquest context, ajuda a generar una resposta antitumoral autòloga. Quan el "carregat" de les cèl·lules dendrítiques es fa amb les línies tumorals senceres irradiades, o bé la captura d'antígens no és tant eficient o bé existeixen elements en la membrana o molècules secretades (diferents de IL-10 i TGF- β) de les cèl·lules tumorals que inhibeixen aquesta resposta, o bé hi ha impediments estèrics, al quedar les cèl·lules dendrítiques "diluides" entre les cèl·lules tumorals (el nombre d'interaccions cel·lulars entre els limfòcits i les cèl·lules dendrítiques és menor); un aspecte que també ens podria fer excloure la possibilitat de la reacció per cultiu mixte. La resposta detectada prové de la proliferació de limfòcits T ja que en afegir IL-2 a dosi molt baixa (1 U/ml) l'últim dia de cultiu, la resposta s'amplifica, no sabem quines poblacions limfocitàries estan implicades en aquesta resposta.

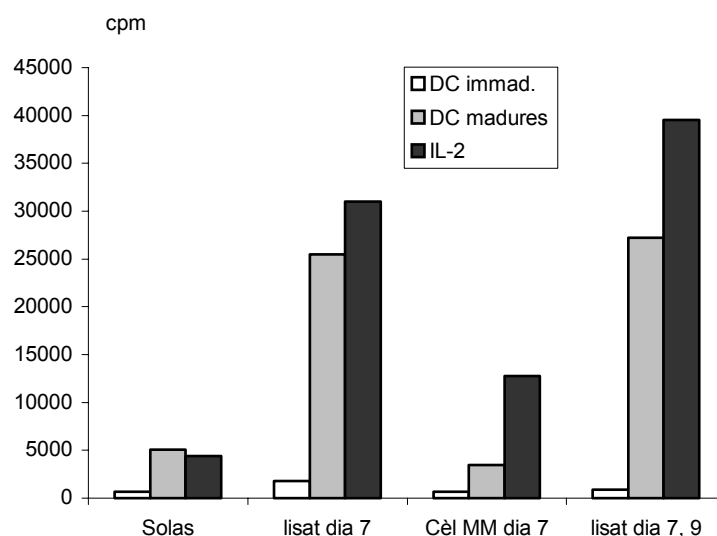


Figura 19. Mesura de la resposta proliferativa en front lisats o cèl·lules de la vacuna polivalent. La resposta es veu amplificada en afegir rIL-2 l'últim dia del cultiu. No hi ha gaire diferència en afegir el lisat el dia 7.

7.6 Carregat antigènic.

No disposem d'un mètode directe per avaluar si el lisat de la vacuna de línies al·logèniques, i en concret els antigens associats a tumor que expressen, són carregats i processats de manera eficient per les cèl·lules dendrítiques en el protocol que vam portar a terme. Per a estudiar els processos de captació antigènica es van utilitzar cèl·lules Hela tansfectades amb una proteïna autofluorescent recombinant GFP, aquestes cèl·lules que anomenarem KB3.1 emeten una fluorescència verda que pot ser detectada amb el citofluorímetre. L'expressió permanent d'aquesta proteïna fluorescent en la membrana permet el seu seguiment, i és possible la seva detecció en l'interior de cèl·lules dendrítiques. En la **figura 20** es pot observar com és possible seguir la captura de cèl·lules tumorals KB3.1 per part de cèl·lules dendrítiques immadures (regió R2), i que almenys en períodes curts de cultiu, la presència d'un estímul maduratiu com és el TNF- α , ajuda a la captura de cèl·lules o partícules cel·lulars. La inducció de la maduració amb aquest estímul, no atura la captura d'antigens de manera immediata, i possiblement es requereix temps més llargs, fins que les cèl·lules dendrítiques estiguin completament madures, per aturar el procés de fagocitosi. Malgrat que en la incubació s'ha afegit cèl·lules KB3.1 totalment viables, no es pot descartar que la fagocitosi es realitzi dels fragments cel·lulars del cultiu, o potser representa la captura de fragments de membrana

a partir de cèl·lules vives, com ja s'ha demostrat en models no humans . Un altre aspecte que es pot observar (**figura 21**) és que la captura de fragments de les KB.3.1 indueix un lleuger augment en les molècules coestimuladores CD80 i CD86. Possiblement aquest augment, no sigui suficient per generar una resposta per part dels limfòcits T, ja que els nivells d'expressió són baixos en comparació amb els que s'assoleixen amb les maduració amb altres estímuls.

No sabem quin efecte pot tenir la maduració o els diferents estímuls maduratius sobre la capacitat de fagocitosi de les cèl·lules dendrítiques. En els sistemes estudiats s'accepta que les cèl·lules amb un estat madur no fagociten amb facilitat, però no se sap que passa durant el procés de maduració. **En la figura 22** es pot veure que els estímuls maduratius més forts (com és la barreja de citocines, CM) disminueix el percentatge de cèl·lules dendrítiques amb partícules incorporades, però encara hi ha una incorporació que possiblement es produeix quan les cèl·lules encara no estan del tot madures.

En l'actualitat està en marxa un sistema per transfectar la proteïna recombinant GFP a les línies de melanoma, i poder establir un model de captura totalment autòleg; fins al moment no hem tingut èxit en la transfecció del plàsmid a les cèl·lules de melanoma, ja que el sistema de selecció de les cèl·lules que han incorporat el plàsmid no ens permet eliminar aquelles cèl·lules que no l'han incorporat. En afegir el medi selectiu, totes les cèl·lules aturen el seu creixement, tant les que han incorporat el plàsmid com aquelles que no l'han incorporat, i no és possible establir la selecció. Això ens dona idea de la malignitat de les cèl·lules tumorals de melanoma. S'està treballant en altres sistemes de transfecció del plàsmid més eficient de les cèl·lules tumorals que implica la utilització de virus, que requereixen uns espais de treball degudament acondicionats.

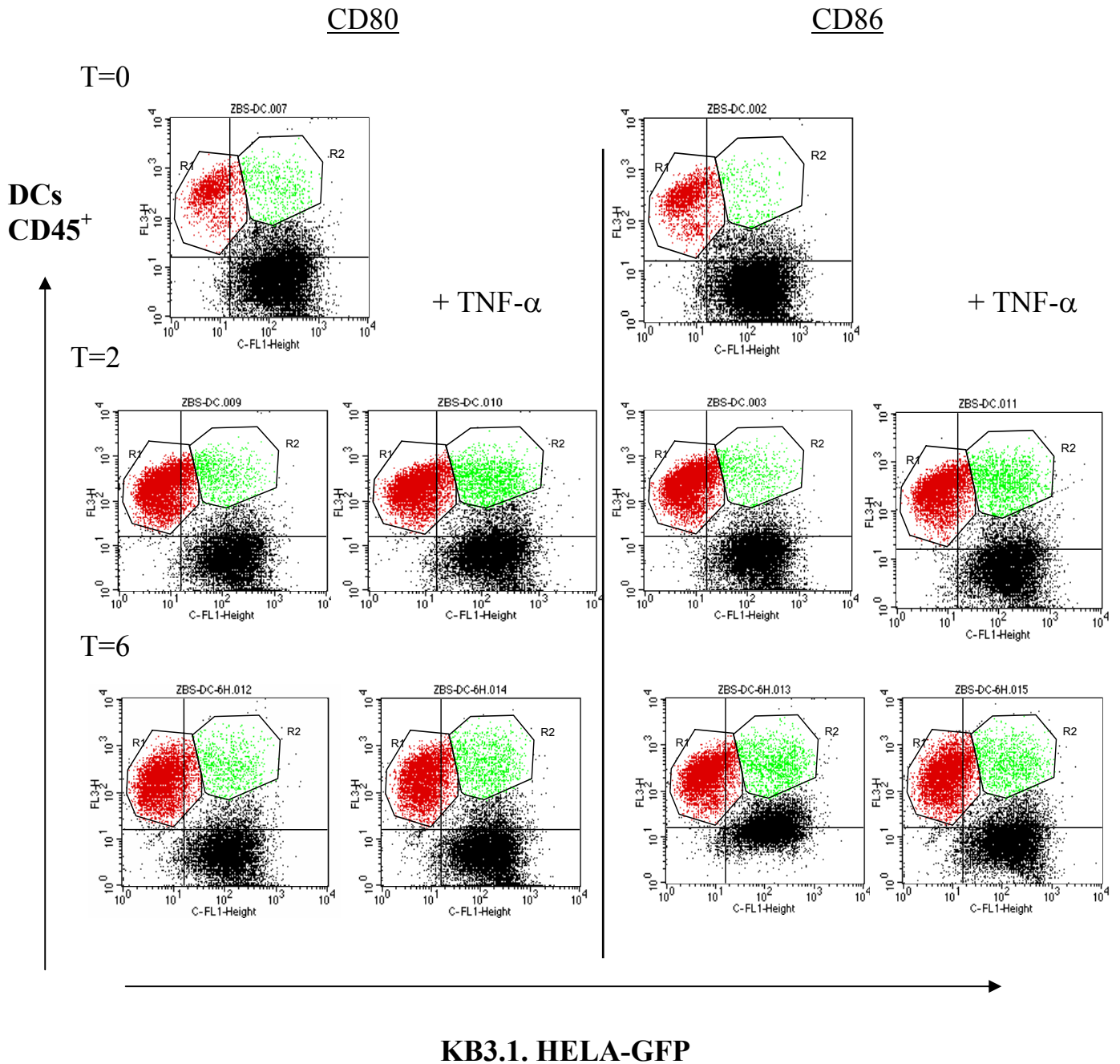


Figura 20. Seguiment de la captura de les cèl·lules KB3.1 per part de cèl·lules dendrítiques immadures. A un temps curt (2 hores) s'assoleix una bona incorporació de partícules. El TNF- α estimula en les primeres etapes d'incubació la incorporació de fragments GFP. Selecció per CD80 o per CD86 com a segon color (PE-FL-2), CD45 com a tercer color (FL-3).

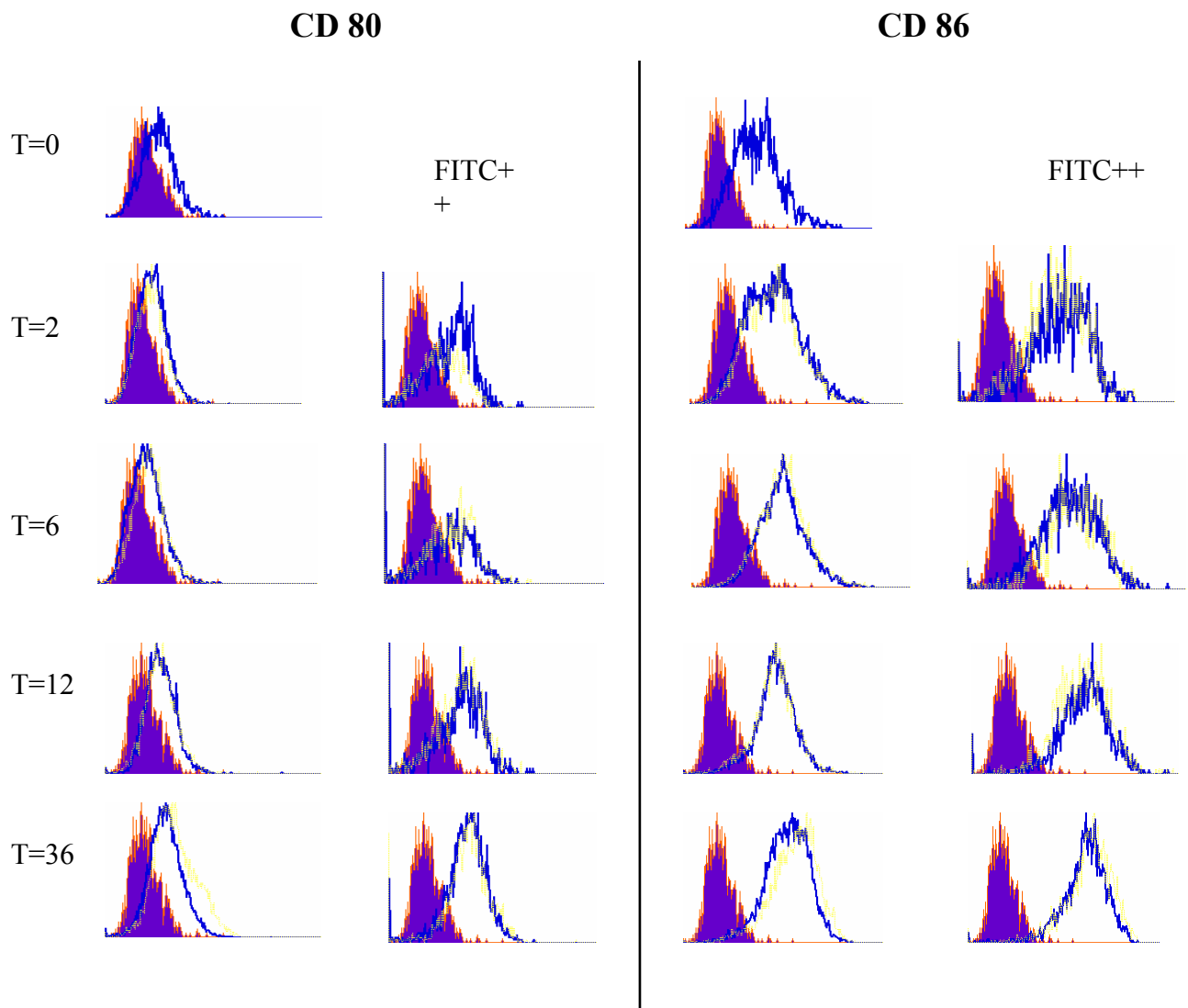


Figura 21. Si seleccionem de la regió CD45⁺, FITC intensa, representen les cèl·lules dendrítiques que han fagocitat més partícules de les KB3.1. En aquest histograma podem veure que aquestes cèl·lules han patit un augment en l'expressió de CD80 i CD86 (línea en blau), i la seva intensitat no es veu afectada per la presència de TNF- α (línea en groc).

% d'incorporació de KB3.1

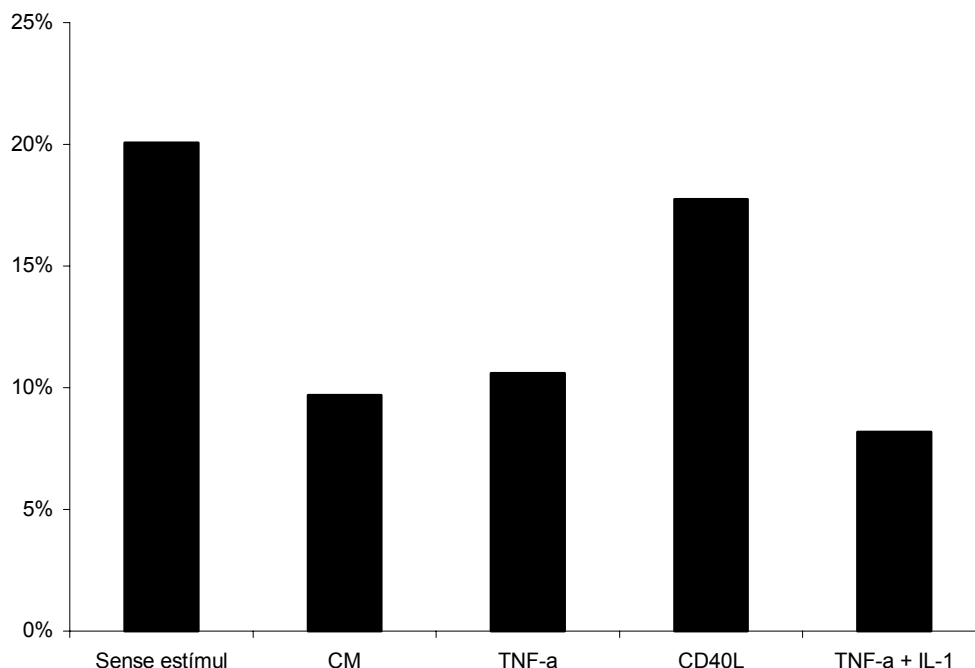


Figura 22. Percentatge d'incorporació de KB3.1, per cèl·lules dendrítiques a les 24 hores d'incubació, amb diferents estímuls maduradors,

7.7 Optimització de la maduració.

Un dels aspectes poc clars quan vam iniciar les primeres aplicacions terapèutiques amb les cèl·lules dendrítiques és el de la relació entre l'estat maduratiu de les cèl·lules i la via més adequada per inocular-les. Si bé, la teoria deia que les DC immadures es troben a la perifèria on capturen activament antígens i que sota determinats senyals inicien una maduració, que comporta la seva migració cap als ganglis limfàtics regionals i un canvi de la seva capacitat de captació cap a una presentació antigènica. Per tant, si les cèl·lules a inocular eren madures i les inoculèssim per via intradèrmica o subcutània, podria passar que quedessin retingudes a la perifèria i que no assolissin els ganglis limfàtics regionals. D'altra banda, si les DC a inocular fossin immadures, i les inoculèssim per alguna de les vies senyalades, podria passar que no rebessin els senyals maduradors, i per tant també quedessin retingudes a la perifèria. Per obviar aquesta dificultat i seguint el protocol d'en Nestle (Nestle, et al. 1998), en el nostre primer grup de malalts, vam preparar DC madurades *in vitro*, i les vam inocular intraganglionarment, per via ecogràfica. D'aquesta manera estavem segurs de que les

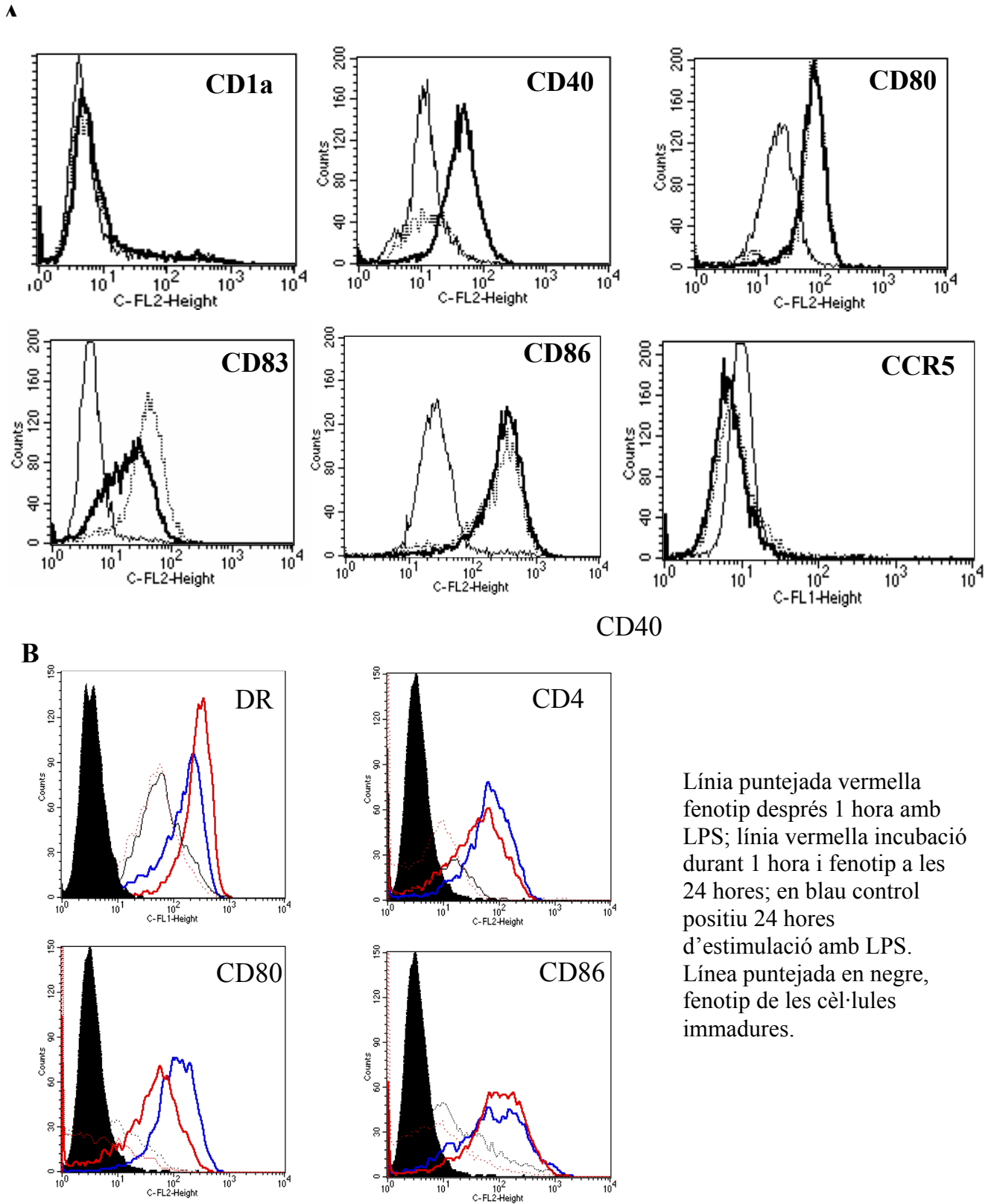
DC carregades amb els antígens tumorals, assolirien els ganglis. De tota manera, calia buscar la manera d'aplicar les DC d'una manera més senzilla.

Estudis portats a terme en el ratolí, indiquen que només pel fet de la seva inoculació intradèrmica, les DC immadures reben els senyals maduratius, que no solament provoquen la seva maduració sino també canvis en els receptors de quimiocines que provocarien el desplaçament de les DC cap als ganglis limfàtics. De fet, estudis molt recents en el ratolí, indiquen que les DC madures són les que millor es desplacen cap als ganglis limfàtics.

Com ja s'ha comentat en diverses parts d'aquesta tesi, hi ha nombroses molècules que poden estimular la maduració de les cèl·lules dendrítiques. El LPS i d'altres components de la paret bacteriana, semblarien els més adients per a conferir una resposta de tipus Th1 (Koski, et al. 2001). De fet, en les nostres mans, el LPS és l'únic dels estímuls maduratius que vam provar, capaç de induir a més de la maduració, la producció de IL-12 p70. El LPS té però, dos inconvenients; el primer és que la incubació de les DC durant 24-48 hores provoca un grau significatiu de mortalitat. El segon, és que el LPS pot produir l'anomenat "shock sèptic", de conseqüències fatals, i per tant la seva utilització en humans amb la finalitat terapèutica és questionable.

Un aspecte interessant que vam observar, és que les DC immadures incubades amb LPS (1µg/ml, durant 1 hora), reben un senyal maduratiu, equivalent a una incubació de 24-48 hores, sense que es produeixi una mortalitat apreciable de les cèl·lules dendrítiques. amb aquesta curta incubació amb LPS, seguida d'uns rentats, i cultivant amb medi de cultiu sol durant 24 hores, les DC maduren (**figura 23 i 24**) i produeixen IL-12p70 i TNF-α (**figura 25**). Durant aquest procés de maduració induït per una incubació curta amb LPS, les cèl·lules són sensibles a citocines inhibidores, com per exemple IL-10 (Corinti, et al. 2001), a diferència de les cèl·lules madures que són insensibles a aquestes citocines immunoreguladores, i la presència de IL-10 condiona l'expressió de les molècules coestimuladores i deixa a la cèl·lula dendrítica amb un estat immadur (**figura 26**). Molt interessant és el manteniment de CD40 en aquesta situació en la qual la cèl·lula dendrítica sembla adoptar un fenotip immadur, degut a que les cèl·lules dendrítiques immadures s'han implicat en la generació de poblacions de limfòcits T reguladors, podria jugar un paper important en la generació i expansió d'aquestes cèl·lules T reguladores, és una possibilitat que encara no ha estat estudiada, ni documentada.

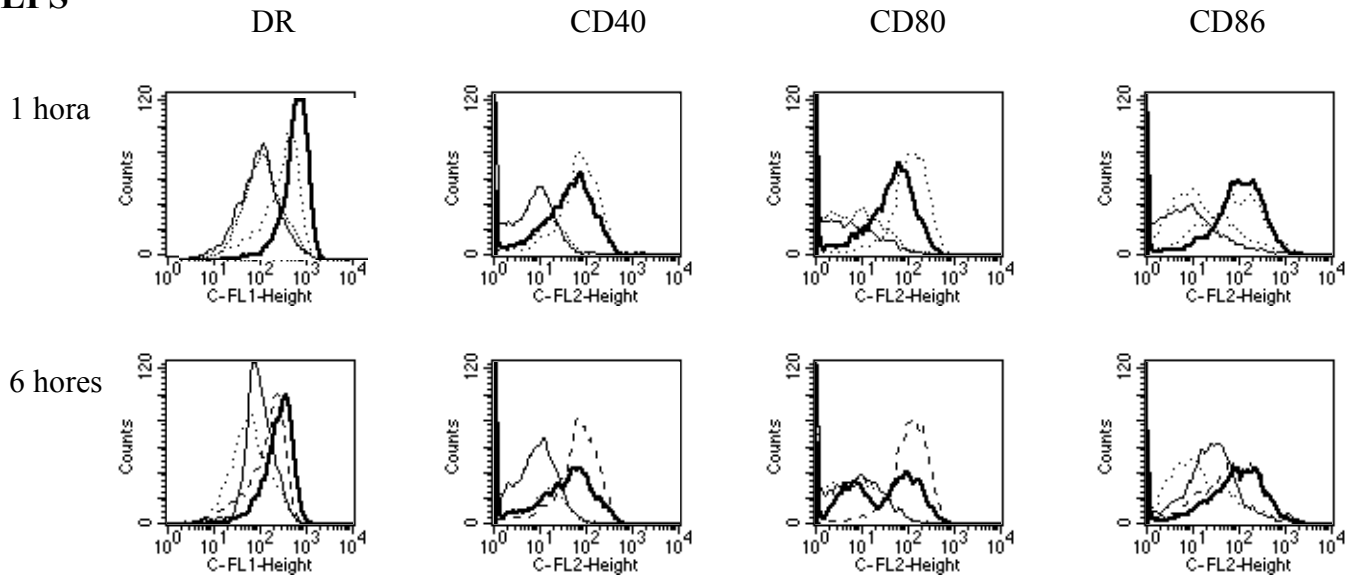
Aquesta situació de poder dirigir la maduració de les cèl·lules dendrítiques a partir d'un estat immadur, obriria la possibilitat de inocular cèl·lules dendrítiques immadures intradèrmiques, amb tots els senyals necessaris per a la seva eficient maduració (s'evitaria els efectes negatius de les cèl·lules dendrítiques immadures) i molt possiblement amb la capacitat de migrar a gangli limfàtic. Aquesta situació representa possiblement a la situació fisiològica en la qual les cèl·lules dendrítiques reben els estímuls dels patògens durant curts períodes de temps en els teixits perifèrics, captarien els antígens, i després durant la seva migració cap al gangli acabarien el seu programa de maduració.



Línia puntejada vermella fenotip després 1 hora amb LPS; línia vermella incubació durant 1 hora i fenotip a les 24 hores; en blau control positiu 24 hores d'estimulació amb LPS. Línia puntejada en negre, fenotip de les cèl·lules immadures.

Figura 23. Les cèl·lules dendrítiques que reben un estimul amb LPS durant 1 hora (línea de punts), assolixen els mateixos nivells d'expressió de molècules coestimuladores que amb una estimulació durant 24 hores amb el mateix estimul (línea negre gruixuda). També hi ha pèrdua del receptor de quimiocines de cèl·lules dendrítiques immadures CCR5. Línia negra prima el control de cèl·lules immadures.

LPS



CM

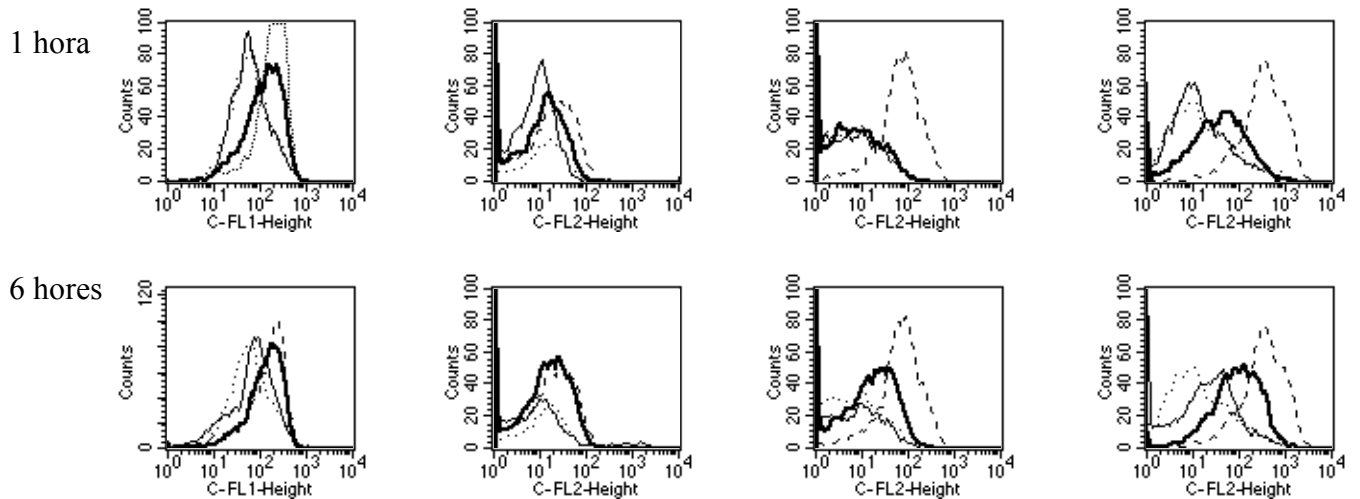
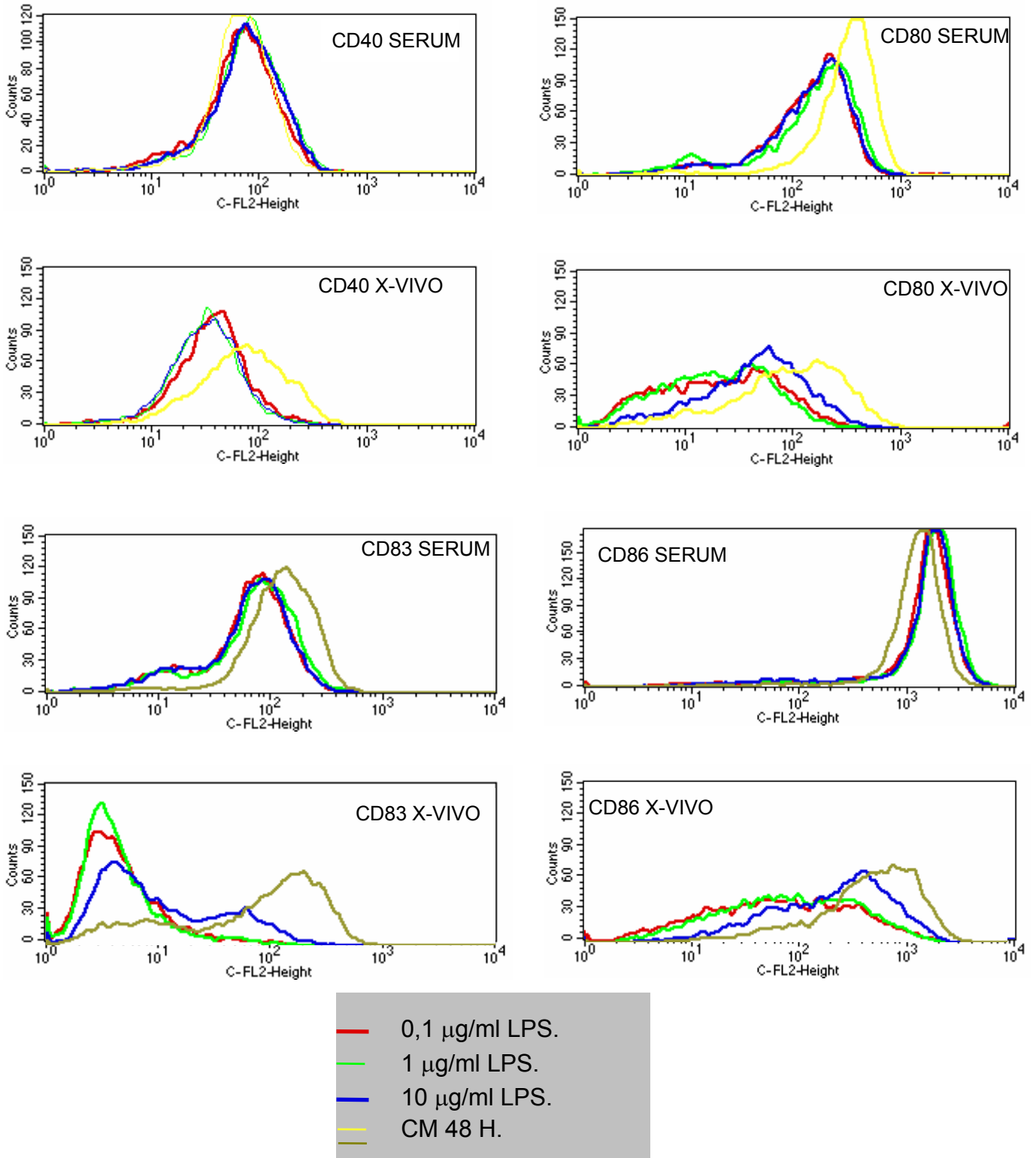


Figura 24. Fenotip de les cèl·lules dendrítiques després d'una incubació durant 1 ó 6 hores amb LPS i CM. Fenotipat a les 24 hores de cultiu un cop eliminats aquests estímuls. Línia puntejada representa els nivells d'expressió de les cèl·lules immadures, la línia contínua indica l'expressió després de rebre l'estímul maduratiu (1 ó 6 hores), la línia gruixuda representa el fenotip a les 24 hores després de rebre els estímuls maduratius, i la línia discontinua és el fenotip de les cèl·lules en rebre l'estímul maduratiu continuat durant les 24 hores.

Figura 24. En aquestes gràfiques es interessant destacar dues coses. La primera fa referència a la dosificació del LPS que indueix la maduració a les 24 hores amb una incubació durant 1 hora. Per altra banda es poden veure les diferències respecte al medi de cultiu utilitzat. Cal un suplement de sèrum per poder observar aquest fenomen de la maduració induïda.



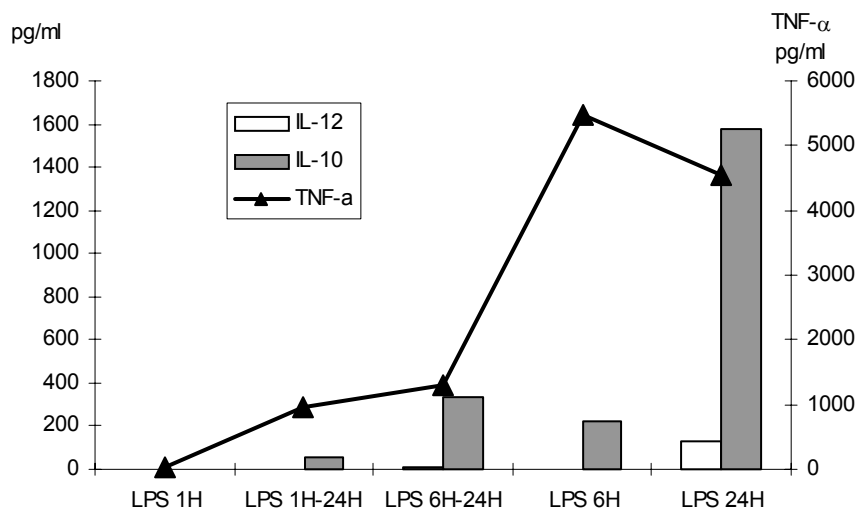


Figura 25. Producció de citocines amb estímuls curts de maduració, recollides a les 24 hores de cultiu, o bé just després de l'estimulació (1 ó 6 hores).

I on prèviament s'havia comprovat que un dosi de 1 µg/ml era suficient per produir aquest efecte en la secreció de citocines i en la maduració fenotípica de la cèl·lula.

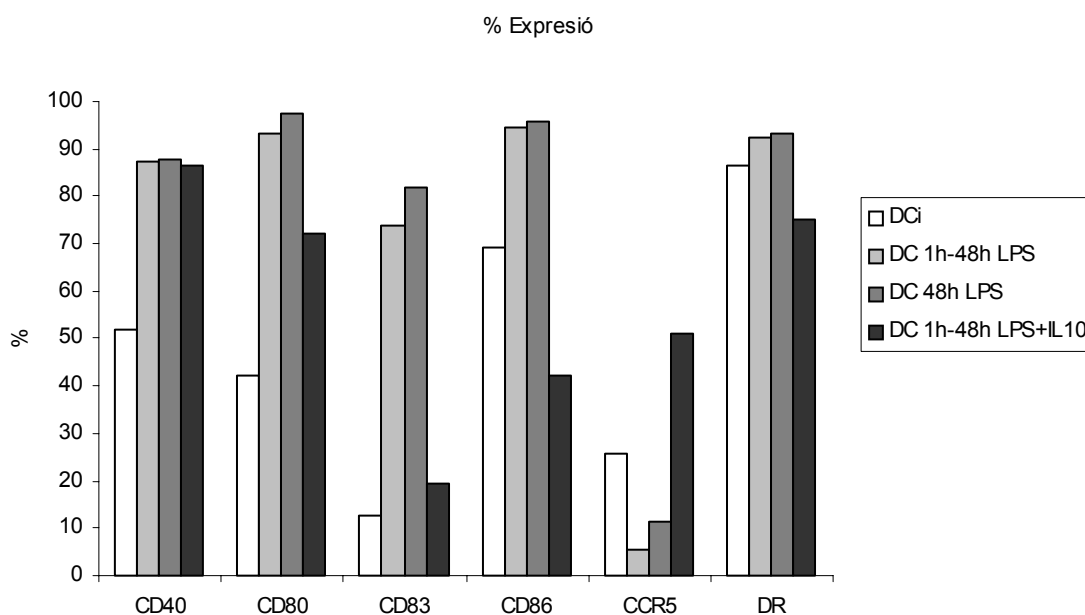


Figura 26. Efecte de la IL-10 exògena, en el procés de maduració induït per una curta estimulació amb LPS. En aquest cas, les cèl·lules s'han deixat 48 hores de cultiu. Excepte CD40, la resta de molècules coestimuladores es veuen afectades. Hi ha un manteniment del receptor de quimiocines CCR5 present en l'estat immadur.

8 Grup de pacients.

Es van seleccionar un grup de 11 pacients de melanoma metastàsics. Aquests grup havia rebut altres tractaments, i tots eren refractaris a la bioquimioteràpia, amb presència de malaltia en múltiples localitzacions en el moment de l'inici de la vacunació. És el grup de malalts amb pitjor pronòstic, i la seva esperança de vida en aquesta situació és entre 2-4 mesos. La veritat és que es fa difícil poder avaluar l'eficàcia de la vacunació amb cèl·lules dendrítiques en melanoma, en aquest grup de pacients, però donat que calia fer un estudi de toxicitat, i demostrar alguna activitat antitumoral, és un estudi en fase I. Per posteriorment passar a vacunar un grup de pacients menys avançats.

Taula 12: Característiques clíniques de la població d'estudi.

Pacients		11
Sexe		
Homes		5
dones		6
malaltia avaluable		
Sí		11
No		-
Edat		45 (23-62)
Lloc de les metàstasi		
Viscerals		10
No-viscerals*		1
Viscerals + No-viscerals		4
LDH		
Normal		10
Alta		1
Tractaments previs		
bioquimioteràpia		11
poliquimioteràpia		1
Interferon α	5	
Perfusió de les extremitats		2
Vacunes polivalents	3	
Sense tractament		-
Karnofsky		>40%

No-viscerals = cutània + ganglis limfàtics + teixits tous.

9 Resposta a la vacuna amb cèl·lules dendrítiques.

No hi ha descrit cap paràmetre que ens permeti establir, que una vacunació amb cèl·lules dendrítiques sigui o no efectiva. Tampoc trobar una resposta immunitària es correlaciona amb una bona resposta clínica, hi ha molts factors implicats, ja descrits en aquesta tesi, que poden explicar aquests aspectes. El seguiment clínic es va portar a terme en el servei de Dermatologia de l'Hospital Clínic.

Respecte a l'aspecte immunològic, a part de les dades clíniques, vam voler veure si la inoculació de cèl·lules dendrítiques provocava una estimulació del sistema immunitari, i si aquesta era específica del tumor.

9.1 Seguiment de la resposta immunitària.

A diferència de la vacunació amb pèptids, que tenen una monitorització més senzilla, amb l'ús de lisats no hi ha dades publicades sobre el seu seguiment. Sovint les vacunacions s'acompanyen d'alguna molècula que serveixi de traçador, com KLH, o pèptids del virus de la grip, etc...Aquestes molècules serveixen per informar d'un estat immunitari, però no de que s'hagi generat una resposta antitumoral. Un altre aspecte que descartaria afegir aquestes molècules "traçadores" és que sembla que afegir molècules altament immunogèniques, pot ser perjudicial per a l'expansió de limfòcits T específics per antígens tumorals de més baixa immunogenicitat (Kedl, et al. 2000).

Per tal d'avaluar els efectes de la vacunació amb cèl·lules dendrítiques, i establir possibles correlacions amb les respostes clíniques, es van recollir mostres de sang perifèrica abans de començar la vacunació, i posteriorment un control cada 4 mesos durant la vacunació. Els estudis s'han pogut portar a terme en 7 pacients que van viure el temps suficient per recollir els controls. En la **figura 27** és pot observar com hi ha un augment en la resposta proliferativa en front les cèl·lules que componen la vacuna polivalent en 5 dels 7 pacients analitzats, mentre que en dos pacients no hi ha un augment apreciable. Les respostes no corresponen al que clàssicament s'espera dels cultius mixtes ja que les cèl·lules tumorals no presenten molècules coestimuladores i els nivells de classe II i I són baixos i per tant no induïxen una resposta de cultiu mixte. Tampoc es pot excloure que la resposta que es detecta durant la vacunació sigui una reacció al·logènica. De manera interessant disposem de tres línies de tumor autòleg per les quals també es va analitzar la proliferació contra elles, les dades indiquen que és possible que la resposta generada sigui contra algun antígen tumoral, ja que la

proliferació contra les cèl·lules del tumor autòleg també s'augmenta respecte a l'inici de la vacunació. Un altre aspecte que es va mesurar és la secreció de determinades citocines recollides en la situació de cultiu mixte limfòcit-cèl·lules tumorals. Es va determinar el IFN- γ i TNF- α com a citocines implicades en els processos de citotòxicitat, IL-4 com a citocina característica d'una resposta de tipus Th2, i la IL-10 i TFG- β com a possibles citocines implicades en immunoregulació (sovint associades a inhibició, encara que està per definir el seu paper fisiològic en humans). En la **figura 28** es pot observar els canvis en la secreció de citocines. Hi ha un augment en la secreció de IFN- γ , TNF- α , IL-10, mentre que no hi ha variació en els nivells de TFG- β , i en cap moment es detecta IL-4, cosa que ens fa descartar que per efecte de la vacunació amb cèl·lules dendrítiques estiguem generant una resposta de tipus Th2, que almenys a nivell teòric no seria l'adequada.

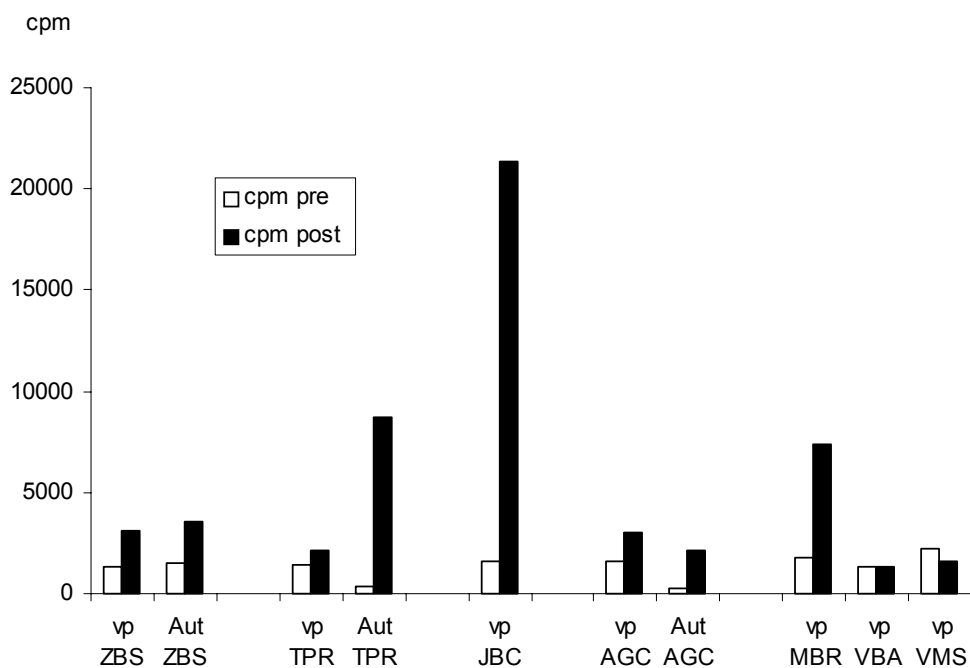


Figura 27. Respostes proliferatives de les PBLs, en front de les cèl·lules al·logèniques (vp) i autòlogues (Aut) en tres casos dels que es disponia línies tumorals autòlogues.

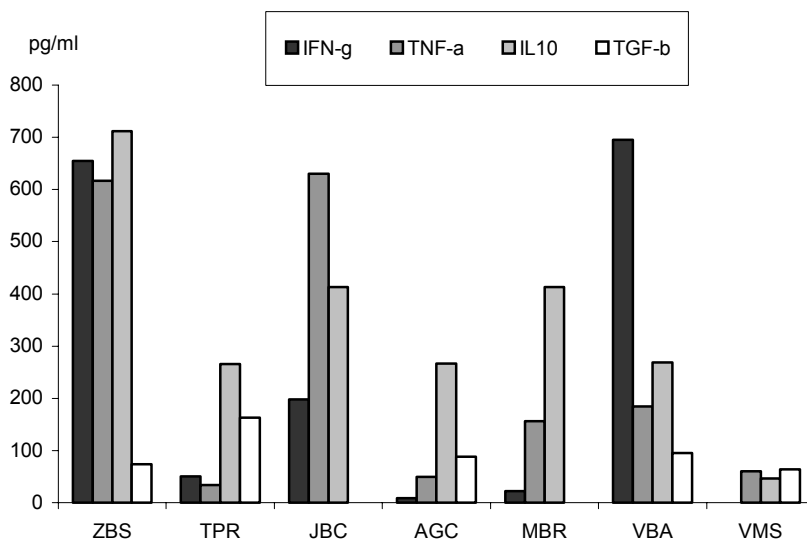


Figura 28. Increment en la producció de citocines durant la vacunació. Es representa com la diferència entre el nivell de citocina durant el primer control als 4 mesos de vacunes respecte al nivell de producció inicial, en els sobredants dels cultius entre PBL i les cèl·lules tumorals (vacuna al·logènica).

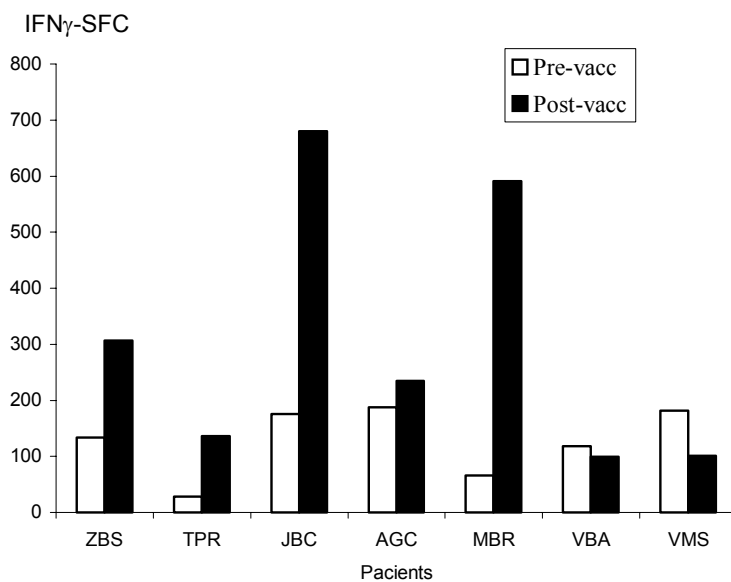


Figura 29. Elispot: PBLs pre i post- vacunació estimulades amb lisat al·logènic durant 48 h.

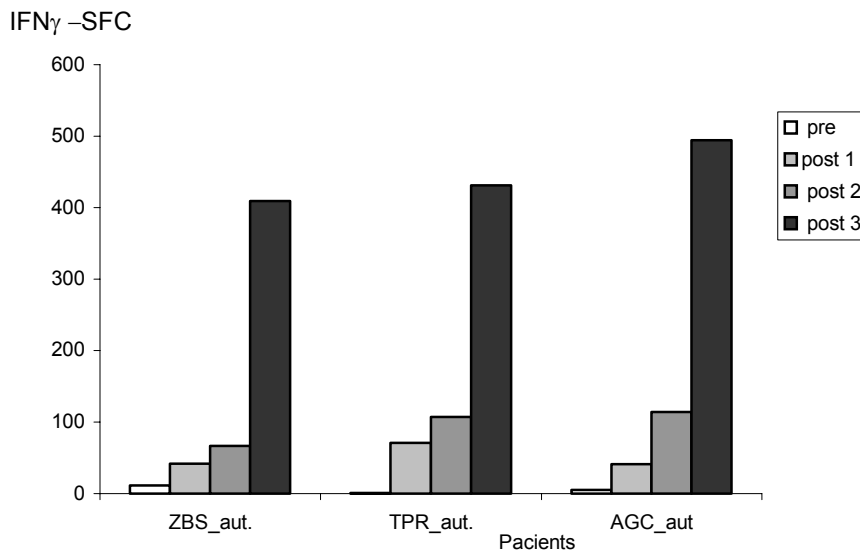


Figura 30 Elispot: PBLs pre i post- vacunació estimulades durant 48 h amb lisat autòleg (en els tres casos en que aquest estava disponible).

En la **figura 29 i 30** es mostra el número de precursors específics secretors de IFN- γ , mesurats per ELISPOT. Aquesta determinació ens dona idea de si hi ha un augment en el nombre de cèl·lules específiques, i quin percentatge representa del conjunt de cèl·lules perifèriques. Degut a l'estat físic dels pacients, les mostres recollides a cada control van ser mínimes, i no ens ha permès fer estudis de quines cèl·lules (CD4⁺ o CD8⁺, memòries o “naive”, etc) estan implicades en la secreció d'aquesta citocina. En la primera figura es pot veure com hi ha un augment dels precursors en 5 del 7 pacients analitzats. A l'igual que el que s'ha comentat per la resposta proliferativa, no es pot excloure que la detecció de IFN- γ sigui conseqüència d'una reacció al·logènica. La disponibilitat de tumor autòleg de tres pacients ens ha permès veure l'augment en el nombre de cèl·lules precursors que el reconeixen i aquesta pujada es fa més evident a mida que augmenten les vacunacions.

9.2 Seguiment clínic.

El seguiment clínic es va portar a terme en el servei de Dermatologia de l'Hospital Clínic. D'aquest seguiment només es comentarà alguns aspectes rellevants.

És important determinar si la vacunació amb cèl·lules dendrítiques té algun impacte en la supervivència global del grup de pacients. En la **figura 31** es mostra la

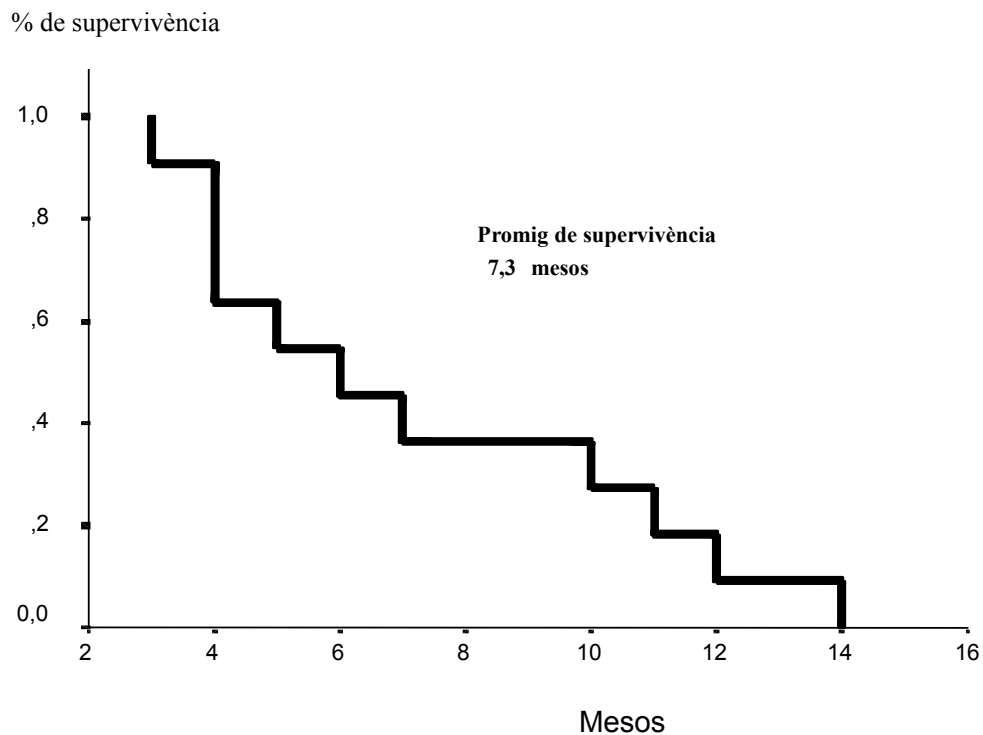
gràfica Kaplan-Meier del grup de 11 pacients vacunats. Aquesta gràfica ens presenta la supervivència mitja del grup sencer. La literatura té recollit que aquests pacients metastàsics que han rebut bioquimioteràpia i no ha sigut eficaç, tenen una esperança de vida entre 2-4 mesos. El nostre grup de pacients va viure un promig de 7,3 mesos, als quals s'hauria d'afegir 1-2 mesos necessaris, per que els malalts poguessin recuperar-se del tractament previ amb bioquimioteràpia i poder així recuperar els nivells de leucòcits circulants, necessaris per poder obtenir cèl·lules dendrítiques. Per poder demostrar que hi ha un augment de supervivència cal una comparació en estudis randomitzats que no s'han realitzat, però el que les dades impliquen que hi ha un enlentiment en la progressió de la malaltia en aquests pacients, fins a un màxim de 14 mesos. Possiblement l'avançat estat de la malaltia en tots els pacients fa que no hi hagi temps per veure l'activitat antitumoral induïda.

Tenim documentada alguna evidència de l'activitat antitumoral de la resposta, i les evidències clíniques de reducció. En **la figura 32** es mostren les imatges d'una reducció d'una gran massa tumoral ganglionar (marques negres en la figura), acompanyada d'una reducció molt important (superior al 50 %) de la lesió cutània que s'extenia des del colze del braç esquerre fins a tota la mama esquerra. Per histologia es va confirmar la desaparició de tota la lesió pigmentada, es van normalitzar també els nivells de la LDH sèrica, com a marcador tumoral, i va poder desenvolupar la seva vida normal durant 5 mesos (va poder eliminar el tractament diari amb opiàcids). Posteriorment als 5 mesos de l'inici de la regressió, va aparèixer novament malaltia, despigmentada aquest cop, que va progressar d'una manera molt ràpida. Altres observacions clíniques no reportades fan referència a la reducció en altres pacients d'algunes lesions tumorals, acompanyades a vegades de l'aparició de noves.

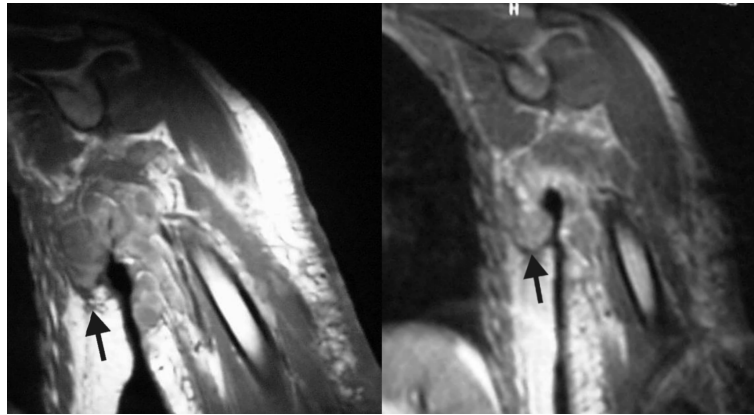
En resum, es pot concloure que, al menys en aquests grup de pacients tant avançats, no es pot establir una correlació entre la resposta immunitària analitzada, i l'evolució de la malaltia, mesurada com a respostes clíniques (que va ser fatal en aquest grup de pacients). Tot i la potència de les cèl·lules dendrítiques en l'activació del sistema immunitari i per induir una immunització que és capaç de reconèixer tumor autòleg, i de generar algunes respostes clínicament evidents, l'heterogeneïtat del tumor, l'avançat estat de la malaltia, i possiblement la debilitat orgànica d'aquests pacients que han rebut tractaments molt tòxics i agressius amb bioquimioteràpia i quimioteràpia, pot comprometre l'eficàcia de les cèl·lules dendrítiques.

L'optimització de l'obtenció de cèl·lules dendrítiques en estats més idonis per la vacunació i la selecció d'aquells pacients en estadis més inicials de la malaltia, en els quals la potenciació del sistema immunitari tingui com a resultat una activitat antitumoral, i aquesta tingui temps de desenvoluparse, ben segur tindrà com a resultat respostes antitumorals més eficaces.

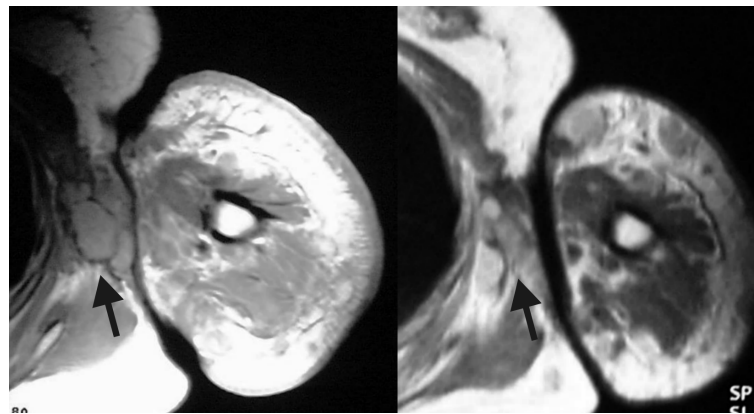
Figura 31 Corva de supervivència Kaplan-meier, del grup de pacients vacunats.



Imatge Coronal



Imatge Transversal



Maig 2000

Setembre 2000

Figura 32. Imatges de la reducció de lesió tumoral en una pacient.

DISCUSSIÓ.

El camp de la immunoteràpia del càncer ha patit un important desenvolupament en els darrers 15 anys. Aquest avanç ha vingut afavorit per l'impuls de la biotecnologia, que ha permès desenvolupar molècules recombinants per la seva aplicació tant *in vivo* com *in vitro*, i millorar la tecnologia aplicada. La teràpia biològica del càncer es desenvolupa com a conseqüència a la ineficàcia en el tractament de molts tumors metastàsics amb productes químics (quimioteràpia, o les diverses combinacions) i a l'elevada toxicitat que comporten. Aquests fets, fan necessària la recerca de tractaments aplicables en adjuvència, que estiguin exents d'efectes tòxics.

El sistema immunitari tindria la capacitat per activar-se i eliminar aquests petits dipòsits tumorals, situats en diferents localitzacions anatòmiques de l'organisme. Hi ha molts factors que impedeixen que aquesta activació es porti a terme, alguns d'ells coneguts, i d'altres sota activa investigació. Intentar trencar aquesta tolerància vers les cèl·lules tumorals i els seus antígens més o menys específics, és l'objectiu principal de la vacunació terapèutica antitumoral. En l'actualitat hi ha centenars de protocols en marxa, per tal d'estimular el sistema immunitari i generar una resposta antitumoral que sigui efectiva. Degut a l'heterogeneïtat en els procediments aplicats, els diferents tipus de tumors tractats, així com els grups de pacients implicats, és difícil comparar quina estratègia terapèutica pot ser la més adequada, i tot i que els resultats globals encara no són gaire extensos, l'existència de resultats clínics evidenciables, i la manca d'efectes secundaris tòxics, fa de la immunoteràpia un àrea d'interès creixent en el tractament del càncer.

En comparació amb les malalties infeccioses, on l'èxit de la vacunació prové de la seva aplicació profilàctica, el repte en càncer és el domini en el tractament de malaltia ja preexistent. Hi ha tan poca experiència amb la immunoteràpia (vacunació) de infeccions ja establertes com amb la immunoteràpia de càncer ja preexistent. No es coneixen clarament quines són les raons que fan la teràpia profundament diferent de la profilaxis (Jäger, et al. 2002). De manera especulativa es pot pensar que la presència d'anticossos pot evitar el desenvolupament d'infeccions o l'implantament de tumors, però aquests no jugarien un paper important en l'eliminació de la malaltia establerta.

La utilització de vacunes contra el càncer, té molts aspectes optimitzables, prèviament comentats, que poden influenciar en la seva eficàcia i en la generació d'una resposta antitumoral, sobre els quals s'està treballant de manera molt intensa.

Un dels punts principals de la vacunació en càncer és escollir quin o quins antígens s'han d'utilitzar com a dianes. La llista d'antígens és molt àmplia i inclou antígens tumorals, antígens de diferenciació cel·lular o bé antígens mutats específics de tumor. En els tractaments inicials amb vacunes compostes per pèptids es van utilitzar els restringits per classe I (Boon, et al. 1997), degut a la seva facilitat de caracterització en les respostes citotòxiques contra les cèl·lules tumorals. La llista d'epítops específics d'antígens de melanoma és molt àmplia, i cada vegada s'en descriuen de nous. En l'actualitat la tendència és utilitzar per les vacunes una barreja d'epítops, que incloguin antígens restringits per classe I, amb els antígens restringits per classe II (Wang, 2001). La utilització d'antígens restringits per classe II, provoca l'expansió i activació de les poblacions de limfòcits T col·laboradors ("helpers"), importants per determinar quin tipus de resposta immunitària es desenvolupa, modulant la maduració de les cèl·lules dendrítiques, i molt possiblement implicats en el manteniment de la resposta citotòxica. L'eficàcia de la vacunació vindrà determinada per la selecció de diferents pèptids provinents de diferents proteïnes, i el desencadenament d'una resposta tant per part dels limfòcits T $CD4^+$ com dels T $CD8^+$, contra epítops no necessàriament immunodominants. Fins al moment, la major part dels treballs publicats, fan referència a l'ús d'un pèptid únic immunodominat, aquest aspecte fa que variants cel·lulars tumorals s'escapin de la pressió immunitària que es crea quan es genera una resposta antitumoral, perdent l'antigen pel qual la resposta s'ha generat, i quedant les cèl·lules tumorals de l'organisme invisibles al sistema immunitari. Una alternativa a la utilització de pèptids amb diferents restriccions és l'ús del propi teixit tumoral, sigui autòleg o al·logènic, i en forma de lisat de la pròpia peça del tumor, o bé a partir de cultius cel·lulars derivats *in vitro*. En el nostre cas vam escollir la utilització de cèl·lules tumorals senceres provinents de cultius cel·lulars, on l'aport d'antígens és molt elevat, i a més aquests són més immunogènics al trobar-se a la superfície de les cèl·lules tumorals (que actuen com a suports sòlids, augmentant la probabilitat del seu reconeixement).

En el context adequat de resposta, és esperable que les cèl·lules senceres al·logèniques generin un reconeixement d'antígens similar al que s'ha de produir en la superfície de la cèl·lula tumoral autòloga. També la reacció al·logènica que es pot generar amb la utilització de cèl·lules senceres heteròlogues és més gran que amb altres antígens; i no s'ha d'excloure la possibilitat de que una reacció al·logènica contra una determinada cèl·lula tumoral en una vacuna pugui beneficiar la resposta contra el tumor

autòleg. Aquest benefici es podria assolir per una expansió de limfòcits T CD4⁺, a través de la presentació d'antígens captats per cèl·lules presentadores d'antigen residents en els teixits perifèrics, que captarien fragments de les cèl·lules tumorals senceres introduïdes en la vacuna, un aspecte més improbable, però que no es pot descartar, és una expansió per reconeixement directe d'antígens en la superfície de la cèl·lula tumoral al·logènica.

Del que es pot despendre dels models animals, l'eficàcia de la vacunació terapèutica la trobaríem en aquelles situacions on la presència de malaltia és mínima, però on el risc de recurrència és pràcticament del 100 %. En aquesta situació de malaltia residual, el sistema immunitari podria reconèixer i eliminar petites lesions tumorals, i si la resposta es desenvolupa d'una manera eficaç no donar temps a l'aparició de cèl·lules resistents (a diferència del que es pot donar amb masses tumorals grans), de manera teòrica encara més ideal, la vacunació antitumoral és en models animals, molt eficaç quan s'aplica de manera profilàctica. És evident que una cosa són les situacions teòriques ideals, i altre la seva aplicabilitat en clínica; existeixen nombroses consideracions ètiques respecte a la vacunació profilàctica en càncer, més àmpliament comentat en la introducció d'aquesta tesi.

El melanoma és el tumor on més s'ha avançat en caracterització d'antígens tan associats a tumor, com de llinatge i antígens normals sobreexpressats durant la malignitat. S'ha considerat tradicionalment com el tumor més immunogènic, degut principalment, a que s'han observat algunes regressions espontànies de melanomes primaris. Però no hi han proves directes de que el melanoma sigui més immunogènic que altres càncers. Possiblement aquesta idea provingui de que és un tumor accessible, a que les cèl·lules tumorals es poden derivar i establir en cultiu amb relativa facilitat, i de manera important, en el cas d'afectació només cutània, el seu seguiment és més fàcil. De fet, hi ha moltes intervencions terapèutiques en altres tipus de tumors (pròstata, carcinoma renal, limfomes, colòrectals, ...) amb presència d'antígens associats (PSA, CEA) (Itoh, et al. 2002) que s'utilitzen com a antígens dianes i de manera molt interessant també s'estan introduïnt la utilització d'antígens amb una àmplia distribució en càncer, els que podríem anomenar com antígens "universals" (telomerasa, p53) (Nikitina, et al. 2002). Aquests antígens "universals" obren la possibilitat de poder induir una immunitat antitumoral contra tots aquells tipus de tumors que expressin aquests antígens, per exemple amb la telomerasa s'ha descrit la seva expressió de manera general en el 85% de tots els càncers en humans i on ja s'han vist la presència

de cèl·lules citotòxiques específiques per una de les subunitats catalítiques d'aquest enzim (hTERT) (Vonderheide, et al. 1999). Aquest enzim també s'expressa en cèl·lules normals no transformades, i la seva activitat és detectable en cèl·lules germinals i en limfòcits T i B que han estat activats antigènica, per tant podrien haver efectes no desitjats si s'escollís aquest antigen per la vacunació, o al menys s'hauria de tenir present aquesta possibilitat. La recerca de seqüències mutades d'aquests antigens universals poden afegir una especificitat de reconeixement de tumor, evitant el reconeixement d'aquestes proteïnes en teixits normals que les expressen, com molt recentment ha estat descrit per l'oncogen *ras* (Linard, et al. 2002) i fent la resposta antitumoral més específica contra aquelles cèl·lules transformades. Per tant aquests antigens "universals" compartits amb diversos tipus de càncer, obririen la possibilitat d'una vacunació més o menys general contra el càncer.

La vacunació terapèutica es pot dividir en autòloga o heteròloga (al·logènica). En funció si la font de tumor prové del mateix pacient o no. La primera requereix un temps llarg per poder establir les línies tumorals i disposar d'un nombre suficient per iniciar la vacunació, i clar, es necessita disposar del tumor, ja sigui per derivar les línies o per obtenir un lisat tumoral; mentre que la vacunació heteròloga no consumeix aquest temps, ja que es disposa d'un lot de vacunes en stock, i permet la vacunació sense disposar de tumor (es pot aplicar en adjuvència després de tractaments quirúrgics). És molt probable que a mida que es vagin descrivint nous antigens tumorals i quan les tècniques d'aïllament d'antigens tumorals autòlegs es perfeccionin i es facin més ràpides, s'incrementarà l'aplicació de les vacunes autòlogues. Molt recentment s'ha publicat el resultat de l'aplicació de proteïnes d'estrès tèrmic autòlogues (gp96) en càncer amb uns resultats modestos, però prometedors per a futures aplicacions, de la mateixa proteïna o d'altres de la mateixa família. La vacunació autòloga, representa a nivell teòric, la manera més específica de vacunació, ja que es poden utilitzar els mateixos antigens que el tumor ha necessitat per desenvolupar-se i evitar la resposta del sistema immunitari.

En el laboratori vam començar la vacunació terapèutica autòloga de 10 pacients afectats de melanoma, seguint el protocol descrit pel grup d'en Morton. Això implicava l'establiment i cultiu de totes les línies cel·lulars de manera independent. Com ja s'ha comentat prèviament, la vacunació autòloga té una sèrie d'inconvenients amb els quals ens vam trobar. La derivació de línies tumorals estables és un procediment que pot trigar entre 2-3 mesos (i no sempre és possible el seu establiment), durant aquest temps,

la malaltia progressa, i en molts casos, en el moment d'iniciar les vacunes, aquesta estava molt desenvolupada, cosa que dificultava encara més l'eficàcia de la vacunació. Un altre aspecte negatiu és la limitació del nombre de malalts que poden rebre vacunes. Aquesta limitació prové principalment de:

- La necessitat de la presència de malaltia, i accessibilitat, per poder disposar de tumor per derivar les línies. Això fa que no sigui possible l'aplicació de vacunes autòlogues en adjuvència o en malalts que la seva malaltia estigui en una localització no accessible.
- La limitació d'espai que impliquen els cultius cel·lulars individualitzats per cada pacient. Degut al gran volum de cèl·lules que es requereixen per a tot el programa de vacunes personalitzades, no disposàvem de l'espai, ni del temps necessaris per a portar a terme un nombre gran de pacients.

Aquests inconvenients ens van fer desenvolupar les vacunes heteròlogues amb cèl·lules al·logèniques seguint en part el mètode descrit per Morton. Per a portar a terme la vacunació al·logènica cal fer una selecció d'un número determinat de línies, i mantenir de manera constant la seva composició. Per tant, cal primer derivar un número elevat de cèl·lules tumorals, i després de descartar aquelles que pels controls microbiològics no són totalment negatives, o pel seu creixement defectuós, o bé per altres aspectes que les facin inadequades per ser utilitzades en la vacuna. No hi ha res descrit sobre què pot fer immunogènica a una cèl·lula tumoral, i per tant els criteris de selecció s'han de basar en aspectes purament tècnics (propietats de creixement), en paràmetres descriptius (fenotip general), encara que la presència de determinats antígens tumorals associats a melanoma (MAGE-3, tirosinasa i MART-1/Melan-A) i els complexos d'histocompatibilitat (classe I i II), poden beneficiar a la immunogenicitat. De fet encara que la tirosinasa és un enzim de la via de síntesi de melanina, i que per tant s'expressa en cèl·lules normals, només es detecten CTL específics per aquesta proteïna en pacients de melanoma i no en individus normals.

És d'esperar que la immunogenicitat del tumor depengui més del context en el qual són presentats els seus antígens que pròpiament en la composició del tumor. En la preparació de la vacuna heteròloga vam introduir un punt del protocol de les vacunes autòlogues, i aquest era el tractament de les cèl·lules amb DNFB. Un haptè que introdueix canvis en les proteïnes de la membrana cel·lular i pot alterar la seva immunogenicitat (Berd, et al. 1991). La dosi de DNFB que nosaltres vam utilitzar per

incubar les cèl·lules de la vacuna són molt més baixes, i a més només es tracten un 50 % de les cèl·lules.

Seguint el mètode d'en Morton, vam trobar un aspecte que pot ser criticable del seu procediment: resuspenien $25 \cdot 10^6$ de cèl·lules tumorals en 0,1 ml de volum; en canvi en les nostres mans, aquest nombre de cèl·lules ocupen un volum aproximat de 1,5 ml, (les cèl·lules tumorals viables són molt grans i ocupen molt d'espai). Una possible explicació es dedueix de la seva manipulació. Les cèl·lules tumorals es congelen després de la seva irradiació, congelació que es porta a terme en absència de proteïna. Aquest procediment de congelació després de la irradiació en absència de proteïna ens pot indicar que les vacunes no estan formades per cèl·lules completes, sinó molt possiblement per detritus cel·lulars

En referència als aspectes dels cultiu cel·lulars cal comentar, que no ha estat possible fer créixer o derivar línies de melanoma en medis sintètics en absència de sèrum. La única manera de derivar les línies tumorals ha sigut utilitzant un medi complementat amb sèrum fetal. Aquestes condicions de cultiu poden representar un problema per la seva aplicació en humans. La utilització de productes d'origen boví, en el cultiu de cèl·lules que després han de ser inoculades en humans, representa després del problema dels prions, un greu inconvenient. Tots els treballs publicats de vacunació amb cèl·lules tumorals utilitzen sèrum boví fetal, i no hi han descrits problemes associats, i a més nosaltres utilitzen un sèrum certificat d'origen australià, degut a que en Austràlia no s'han detectat malalties associades als prions. A part de la possibilitat de risc de contaminació per prions, hi ha el risc del shock anafilàctic per introducció de proteïnes d'una altra espècie. En aquest sentit, recentment, s'ha publicat la generació d'anticossos IgE com a conseqüència de la inoculació de cèl·lules cultivades en sèrum fetal, per via endovenosa. Estem treballant per establir les condicions adequades per complir els requeriments necessaris de manipulació en condicions de grau clínic (GMP), de productes que després han de ser inoculats en humans.

En comparació amb la vacunació terapèutica portada a terme per Morton, hi ha algunes diferències que es poden resumir en els següents punts:

- a) Nosaltres hem utilitzat 10 línies al·logèniques (i es continuen utilitzant), enfront les 3 línies tumorals utilitzades pel Morton. Aquesta situació fa, que el possible ventall d'antígens de melanoma que s'inoculen en cada dosi sigui més gran, i que per tant s'indueixi una immunitat contra les cèl·lules tumorals i les possibles variants que apareixin. Per contra en casos determinats, pot fer que els antígens tumorals més

específics d'una línia en concret, que puguin ser importants per l'eliminació d'un tumor en un pacient determinat, quedin diluïts en tota la "sopa antigènica" inoculada.

- b) Hi ha una millora de la viabilitat estructural de les cèl·lules utilitzades. Nosaltres irradiem les cèl·lules de la vacuna un cop descongelades. A més, congelem les cèl·lules en presència d'un 10% de proteïna. Aquests dos aspectes, congelació i irradiació, milloren la immunogenicitat de les nostres cèl·lules en comparació de les utilitzades pel Morton.
- c) Com a adjuvant de la vacuna, Morton utilitza BCG durant les dues primeres inoculacions, mentre que nosaltres ho fem durant les 6 primeres, encara que a una concentració de bacils molt inferior. T
- d) També és diferent el seguiment que es fa de la resposta immunitària. Partint de la premissa de que no hi ha cap mètode d'elecció que correlacioni d'una manera directe la resposta immunitària amb la clínica, i que ens pugui donar idea de l'eficàcia de la vacuna. Morton utilitza la medicació de la resposta cutània retardada (DTH) i la generació d'anticossos IgM contra les cèl·lules que componen la vacuna, per avaluar l'eficàcia de la seva vacuna. És difícil pensar com un augment dels anticossos IgM contra antigens tumorals poden dirigir la destrucció d'un tumor sòlid. És possible que evitin la disseminació del tumor. Per contra, nosaltres hem escollit la medicació de canvis en la resposta cel·lular, per tant d'avaluar també l'eficàcia de la vacuna i intentar correlacionar algun paràmetre amb la resposta clínica. Tot i que dels resultats presentats no es pot correlacionar cap paràmetre amb la clínica, es continua treballant en aquest aspecte.
- e) Per últim, i comú als articles de vacunes ja publicats. no hem observat cap toxicitat associada a les vacunes, que les fan en aquest moment, aptes per ser aplicades a malalts de càncer, i que poden ser aplicades en adjuvència en situacions d'absència de malaltia però amb un risc pràcticament del 100 % de recurrència.

En l'actualitat hi ha moltes estratègies per intentar provocar l'estimulació del sistema immunitari, i en la pagina web del NIH hi han recollits 107 protocols en marxa als Estats Units amb teràpia cel·lular de diversos tipus de tumors. La vacunació en càncer, bé utilitzant cèl·lules tumorals, o bé amb diferents combinacions amb DCs és part una disciplina en la teràpia tumoral, que està en una forta expansió.

Malgrat això molts aspectes han de ser millorats, i per aquestes millores, cal conèixer quin és el context, i com es produeix una resposta antitumoral *in vivo*. Tot i els

intents de correlacionar la mesura de la resposta immunitària *in vitro* contra els antígens utilitzats en la vacunació o bé contra antígens immunitàriament rellevants (KLH, virus de la grip, etc...) amb la resposta clínica, fins al moment no es troba la relació entre quina ha de ser la resposta immunitària que tingui com a conseqüència una resposta antitumoral. L'augment de precursors específics per algun antigen determinat, no implica que aquestes cèl·lules T puguin arribar al lloc del tumor i realitzar la seva funció; o bé que els mecanismes inhibidors de les cèl·lules tumorals limitin la resposta limfocitària.

Respecte a les situacions d'immunogenicitat dels tumors i el creixent interès que desperta per exemple el fenomen de crossreactivitat i el seu paper fisiològic *in vivo*, Zinkernagel i els seus col·laboradors (Ochsenbein, et al. 2001) ha descrit una sèrie de factors que poden afectar a la inducció de la resposta citotòxica, que entren en contradicció amb les tendències de la bibliografia. Els seus resultats provenen de l'estudi de l'evolució de diferents tipus de tumors murins segons la seva localització. En resum conclou que:

- La inducció de cèl·lules T citotòxiques antitumorals específiques, depèn de que arribin als òrgans limfàtics secundaris un nombre suficient de cèl·lules tumorals en una fase inicial de la malaltia i durant un temps adequat.
- Una invasió sistèmica difusa de les cèl·lules tumorals delecta les CTLs de l'organisme.
- Els tumors capaços de créixer fora dels òrgans limfàtics secundaris, o que en aquests òrgans ho fan separats de les cèl·lules T per algun tipus de barrera física, són ignorats pels limfòcits T.
- Sembla que la presència de molècules coestimuladores en la superfície de la cèl·lula tumoral no influeix en l'activació de CTLs immadures, però augmenta la resposta de CTLs ja activades contra tumors perifèrics sòlids.
- Sembla que la crosspresentació d'antígens tumorals per classe I i la crossactivació de les CTLs és ineficient i no protectora *in vivo*.

Aquestes conclusions controvertides, minimitzen el fenomen de la crosspresentació que es pugui donar *in vivo* amb els antígens tumorals, en condicions fisiològiques, i la inducció de la resposta immunitària, i entren en contradicció amb la majoria dels resultats publicats, on sembla atribuir-se un paper molt important a la crosspresentació de fragments fagocitats de cèl·lules necròtiques. És evident que cal treballar molt en

aquest aspecte, i focalitzar els estudis que es portin *in vitro* i tractar de reproduir les situacions més fisiològiques per tractar de veure el paper real d'aquest sistema de crosspresentació. Per Zinkernagel, la generació o no d'una resposta antitumoral efectiva depèn casi exclusivament de la localització del tumor primari, i de l'habilitat d'accedir als teixits limfàtics secundaris.

Resposta immunitària-resposta clínica.

No hi ha cap paràmetre immunitari que es pugui correlacionar amb l'evolució clínica de la malaltia. Amb la vacunació amb cèl·lules senceres al·logèniques encara es complica més el seguiment de laboratori dels pacients. De les mesures immunològiques que s'han realitzat no hem pogut establir cap correlació amb la clínica dels pacients. Les medicions de citocines sèriques no aporten cap mena d'informació, ja que sovint els valors són molt baixos, i la presència d'una citocina determinada pot no estar sempre correlacionada amb el tumor, hi ha altres aspectes que poden tenir la mateixa influència en les citocines sèriques (per exemple, pacients al·lèrgics). Respecte a les respostes cel·lulars més específiques contra les cèl·lules tumorals, són respostes dèbils (no hi ha diferències en la resposta proliferativa i les citocines són baixes) i no ens permeten establir cap mena de correlació amb les respostes clíniques.

L'augment de les citocines en incubar les cèl·lules de sang perifèrica amb les cèl·lules tumorals postvacunació respecte abans de les vacunes podria ser conseqüència d'una resposta al·logènica. Però les diferències que es detecten en els sobredants a nivell de responedors (amb respostes completes molt clares) i no responedors, anirien en contra d'una simple resposta al·logènica.

La manca de significació entre els valors dels responedors i no responedors podria ser deguda a:

1. El baix nombre de malalts que han pogut ser analitzats.
2. El fet de que encara que es produeixi una resposta immunitària aquesta no representa que es desenvolupi una resposta clínica.
3. Més endavant en parlar de les vacunacions amb cèl·lules dendrítiques, es pot veure un tipus de resposta similar, que també exclouria la possibilitat d'una resposta al·logènica.

Respecte a les respostes clíniques s'han pogut observar regressions clares i objectives (tres regressions completes) i tres respostes mixtes o estabilitzacions (un 26

% de respostes globals) d'un grup de 23 pacients amb malaltia avaluable al començament de les vacunes.

No s'ha d'excloure que s'estigui donant una resposta mediada parcialment per anticossos, implicada en evitar la disseminació de les cèl·lules pel cos, que evitaria la seva implantació en altres òrgans, i on també l'opsonització facilitaria la destrucció de la cèl·lula tumoral pels mecanismes de citotoxicitat mediada per anticossos.

L'augment de la immunitat sense cap tipus d'evidència clínica és una situació referenciada en la literatura. No és un fet estrany, i sovint hi ha una manca de correlació entre aquests dos events. Les raons que poden explicar aquesta manca de correlació és que les respostes immunitàries que es mesuren sempre es refereixen a l'expansió o augment de precursors específics CTL, és possible que en el control del creixement tumoral puguin intervenir altres branques de la immunitat, com per exemple la humoral, o que hi hagi una resposta de la immunitat innata, i de manera molt important la resposta del limfòcits T CD4⁺ específics per antígens tumorals.

Un aspecte que ens intriga molt, i pel qual no hi ha encara una explicació clara, és per què un pacient que experimenta una regressió completa, i que per les proves diagnòstiques d'imatge està lliure de malaltia durant un temps llarg, experimenta una progressió a partir d'un número molt petit de cèl·lules. Aquesta situació és habitual amb la quimioteràpia, quan després d'una regressió quasi completa, s'ha de retirar l'agent quimioterapèutic, degut a la seva toxicitat. Aleshores, les cèl·lules tumorals no eliminades tornen a proliferar, i en algunes situacions amb més agressivitat, degut a l'aparició de soques mutades resistents. La regressió deguda a la vacunació (i potser aquí també hauríem d'incloure les estabilitzacions) implica l'establiment d'una resposta immunitària específica i eficaç, que per definició conserva la memòria immunitària i reacciona davant l'aparició de noves cèl·lules tumorals, si la resposta antitumoral s'ha generat contra un únic epítot immunodominant, és possible que aquesta pressió immunitària impliqui l'aparició de cèl·lules tumorals que han perdut aquesta diana, però amb la utilització de cèl·lules senceres cal esperar que la resposta no es generi només contra un antigen, si no que sigui més àmplia. La mateixa reflexió serveix per a les respostes mixtes, que mentre hi ha lesions que desapareixen, n'apareixen d'altres de noves. L'establiment dels mecanismes de control d'aquesta malaltia mínima residual, que possiblement s'origina a partir de molt poques cèl·lules tumorals, pot implicar l'aplicació de les vacunes com a tractament en adjuvència, com per exemple després de la cirurgia, i controlar en el temps l'aparició de noves metàstasi.

Cèl·lules dendrítiques.

Diversos adjuvants del sistema immunitari s'utilitzen en combinació amb les vacunes, principalment BCG, o bé modificadors químics de molècules de membrana, que confereixen canvis conformacionals que poden ser immunològicament actius, i fan augmentar la immunogenicitat dels antígens. Per realitzar aquesta funció, molt recentment s'han utilitzat les cèl·lules dendrítiques (DCs) com a adjuvants naturals. Aquestes cèl·lules reuneixen les característiques adequades per a la inducció d'una resposta antitumoral efectiva. Són les encarregades d'iniciar la resposta immunitària, i dirigeixen el tipus de resposta dels limfòcits T, que determinarà la seva eficàcia.

La seva aplicació com adjuvants de les vacunes es deriva de les seves capacitats funcionals. Són les cèl·lules encarregades, de manera natural, de generar la resposta immunitària contra patògens externs. Aprofitar aquesta funcionalitat implica que es tracti de generar una resposta contra les cèl·lules tumorals de manera fisiològica.

Degut a que les DCs circulants es troben en una proporció molt baixa, fa que aquestes cèl·lules s'hagin d'obtenir a partir dels seus precursors amb cultius *in vitro*. Això comporta l'establiment de les condicions de cultiu idònies, tant per l'obtenció dels precursors, la derivació cap a DCs, com per la seva aplicació en humans. S'està treballant de manera molt intensa en totes les condicions d'optimització del procediment, obtenció de les cèl·lules, cultiu, maduració, font d'antigen, càrrega, vies d'inoculació, dosi, temps de vacunació, etc. Degut a l'heterogeneïtat dels pocs treballs publicats on s'apliquen DCs com a teràpia antitumoral, es fa difícil establir alguns conceptes generals d'ús.

La utilització de DCs immadures, pot tenir com a conseqüència la inactivació del sistema immunitari, i la generació d'un estat de tolerància. En aquest estat, les dendrítiques provoquen l'expansió d'una subpoblació de cèl·lules T reguladores implicades en controlar la resposta. Per tant, és un aspecte que s'ha de tenir present si les DCs de la vacuna són immadures. S'especula que la pròpia injecció, el dany tissular que es produeix, pot provocar la maduració de les DCs, però és aquests un aspecte que encara no està demostrat. Per tant, sembla acceptat que cal que les DCs rebin estímuls de maduració; el que manca aclarir és quin estímul maduratiu és el més adequat per la generació d'una resposta antitumoral. La presència de receptors específics (TLRs) per a determinades estructures conservades, fa que la maduració cel·lular no sigui un procés que es doni sempre de la mateixa manera, sinó que es produeix en funció de quin

patogen ha entrat a l'organisme i quin tipus de resposta pot ser la més adequada per la seva eliminació. Buscar quina és la millor resposta antitumoral, pot implicar buscar quina ha de ser la millor manera de madurar les DCs, que posteriorment desencadenaran la resposta mediada pels limfòcits.

Nosaltres vam seguir un protocol de vacunació on s'utilitzaven DCs totalment madures, que s'aconsegueix amb una barreja de citocines inflammatòries (IL-1, IL-6, TNF- α) més PGE₂. És en aquest estat quan tindrien la seva màxima capacitat estimuladora, i quan generarien la resposta immunitària inclòs en limfòcits T "naive" contra els antígens que presenta la cèl·lula. Per contra, les DCs madures, perdrien la capacitat de migració cap als ganglis secundaris i tenen reduïdes les propietats de fagocitosi. La inoculació de les DCs a l'interior del gangli, evita que aquestes s'hagin de desplaçar des del lloc de la inoculació (sovint via subcutània o intradèrmica), fins al gangli limfàtic que drena la zona. Treballs molt recents posarien en dubte la pèrdua de la capacitat de migració de les DCs madures, ja que la injecció de DCs amb un traçador radioactiu per poder-les seguir per l'organisme, s'ha pogut determinar que les DCs madures són les que més s'acumulen al gangli. No se sap si aquest senyal radioactiu al gangli prové de les pròpies cèl·lules inoculades, o bé de les DCs residents que captarien fragments o partícules radioactives durant la inoculació, i degut als senyals maduratsius que porten les DCs madures inoculades farien que les residents migressin al gangli. Aquest fet ve regulat, sobre tot, per l'expressió del receptor CCR7 i la pèrdua del CCR5, encara que és segur que altres receptors estiguin implicats en la migració (Randolph, 2002).

Una consideració a tenir present en la inoculació directe al gangli de les DCs és que no hi ha res que ens assegurï la seva correcta localització en la zona T, on ha d'estimular els limfòcits T. També hi ha la possibilitat de que la injecció intraganglionar desestructuri el gangli i la seva funcionalitat.

La maduració de les DCs és un procés continuat, que s'inicia amb la interacció amb els patògens, aquesta interacció fa que la cèl·lula dendrítica incrementi la incorporació de partícules al menys durant una franja de temps (al voltant de 4-6 hores), posteriorment durant la migració des dels teixits perifèrics cap als ganglis limfàtics, la cèl·lula pateix tota una sèrie de canvis, i finalment, durant la interacció amb el limfòcit T en el gangli, rep els senyals finals de la maduració a través del receptor CD40-CD40L i de la secreció de IFN- γ .

Un cop madures, les DCs perden pràcticament la capacitat de fagocitar, és per això que incubàvem les DCs immadures durant tota una nit amb el lisat de les cèl·lules tumorals, abans d'induir la maduració per dos dies. Ens assegura a priori la màxima incorporació del lisat tumoral. Aquesta maduració tan potent, a diferència d'estímul maduratiu més suaus com per exemple TNF- α , inhibeix la fagocitosi. Aquest sistema de carregat antigènic i de maduració, pot presentar alguns problemes que encara estan per dilucidar, com per exemple el desconeixement que tenim sobre quina és l'estabilitat dels antigens capturats per la cèl·lula dendrítica, i si als dos dies, la cèl·lula dendrítica encara presenta pèptids derivats dels possibles antigens tumorals en la seva superfície, tampoc sabem si hi ha crosspresentació d'antígens.

L'assaig clínic que es va portar a terme, pretenia sobre tot, avaluar la generació de DCs en nombre i amb una qualitat apte per la seva aplicació en humans, establir els procediments per la seva inoculació (la seva aplicació via ecogràfica en un gangli limfàtic), determinar si havien respostes, clíniques i de laboratori, i sobre tot descartar efectes tòxics que es poguessin derivar de les vacunes. El grup de pacients seleccionat per rebre cèl·lules dendrítiques correspon al de pitjor pronòstic, degut a l'avançat estat de la malaltia, i a la manca de resposta als tractaments previs estàndards de quimio i bioquimioteràpia, tractaments molt agressius, i que deixen l'activitat de l'organisme compromesa. En aquest quadre es sumaritza el procediment que es va portar a terme per a cada un dels 11 malalts que es van vacunar amb cèl·lules dendrítiques.

- **LEUCOAFÈRESI**
- **SEPARACIÓ DE LA FRACCIÓ MONONUCLEAR**
- **CONSERVACIÓ DE LES ALICUOTES EN N₂ LÍQUID**
- **SEPARACIÓ DELS MONÒCITS**
- **7 DIES DE CULTIU EN MEDI X-VIVO 15 AMB IL-4 + GM-CSF**
- **2 DIES DE CULTIU AMB LISAT DE MM + CM (IL-1, IL-6, TNF- α , PGE₂)**
- **ADMINISTRACIÓ INTRANODULAR VIA ECOGRÀFICA**

Com es pot veure en el procediment, la preparació de la vacuna no és immediat, per tal cal una coordinació per a disposar les DCs, necessitem 9 dies per a obtenir cèl·lules dendrítiques totalment madures, amb el dia de la vacunació ja que es requereix un ecografista expert per realitzar la inoculació, i en alguns casos els pacients venien de lluny. És de destacar que en cap cas de les pràcticament 100 aplicacions terapèutiques intraganglionars que es van realitzar no es va observar cap toxicitat greu, a part d'una

lleugera pujada de la temperatura, i dolor local, en alguns casos acompanyat d'imflamació.

Com es pot veure en les gràfiques del seguiment immunitari dels pacients, que van poder ser avaluats, hi ha una estimulació tumor específica contra la vacuna, tant per les cèl·lules polivalents al·logèniques com pel tumor autòleg. Hi ha un augment generalitzat de les citocines analitzades, produïdes com a conseqüència d'incubar limfòcits de sang perifèrica amb les cèl·lules tumorals de la vacuna (que componen el lisat amb el qual es carreguen les DCs) obtingudes durant la vacunació respecte a la producció inicial, en els 7 malalts que es van poder analitzar; a més la resposta proliferativa que les cèl·lules tumorals provoquen en els limfòcits postvacunació es veu augmentada respecte als valors d'abans d'iniciar les DCs. A l'igual que amb les vacunes es pot pensar que estem davant d'una resposta al·logènica, en aquest cas més intensa i potenciada per les cèl·lules dendrítiques, però els augments de resposta tant a nivell de precursors productors de IFN- γ , com a nivell de resposta proliferativa, paràmetres mesurats amb tumor autòleg en tres pacients que en disposàvem, ens fan pensar que no s'està donant un simple resposta al·logènica, sino que d'alguna manera hi ha antígens tumorals compartits sobre els quals s'esta induïnt una immunitat.

Com ja s'ha descrit, i es comenta més extensament en la introducció de la tesi, aquest augment en la resposta immunitaria no es correspon amb la clínica, hi ha molts factors que poden explicar aquesta manca de correlació, però molt possiblement tot es pugui resumir, en el nostre cas, a que s'intenta generar una resposta immunitària massa tard, quan el tumor ja ha evolucionat i crescut, desbordant la capacitat del sistema.

Hi ha altres possibilitats de seguiment de la resposta immunitària que es genera amb les vacunes (revisat àmpliament en la introducció). La utilització de tetràmers, ens permet tenir una estimació del nombre de limfòcits T circulants amb una especificitat definida, i que s'uneixen de manera altament específica a un tetràmer de classe I unit a un pèptid (el mateix de la vacunació) i tot el complex copulat a un fluorocrom que ens permet quantificar la unió. Per aplicar aquesta metodologia es precisen un gran nombre de cèl·lules, una restricció per classe I amb un HLA determinat (també estan disponibles tetràmers de classe II però el seu maneig és molt més complexe). Per aquests fets, no hem pogut aplicar aquesta metodologia. A més, els tetràmers ens indiquen quin percentatge de les cèl·lules s'uneixen a un determinat pèptid-HLA, però no ens dona idea de l'estat funcional de la cèl·lula.

La utilització d'antígens no tumorals, però altament immunogènics, en els protocols de vacunació és una pràctica molt freqüent. Facilita el seguiment de la resposta immunitària contra aquest antígen, ja que sovint és coneixen les seqüències peptídiques implicades en la resposta, i permet avaluar l'evolució de la resposta amb les vacunacions. Sovint s'associa la resposta immunitària contra aquests antígens no tumorals, amb la resposta antitumoral. Aquests antígens (KLH, seqüències del virus de la grip, OVA en models murins, etc...) són molt immunogènics, i sovint hi ha una resposta contra ells abans de les vacunacions, per tant, a part de només indicar-nos l'estat immunitari del pacient, pot tenir efectes contraproductius si s'utilitzen com a traçadors en les vacunacions, ja que la resposta immunitària es pot focalitzar contra aquests antígens i no contra els tumorals.

La mesura de la citotoxicitat contra les cèl·lules tumorals de la vacuna, o contra el tumor autòleg podria ser una determinació que ens donaria una informació més acurada del tipus de resposta que es busca amb la vacunació. La dificultat d'aquesta tècnica és que les cèl·lules tumorals de melanoma (que han de servir com a dianes de la citotoxicitat) creixen adherides al plàstic i en desenganxar-les es produeix una elevada mortalitat inespecífica cosa que dificulta la monitorització de la citotoxicitat específica. A més, les cèl·lules desenganxades no queden independents, sino que formen uns agregats, això dificulta el seu contacte i la correcta distribució en les rèpliques necessàries per mesurar acuradament la citotoxicitat. Per altra banda els clons de limfòcits CD8⁺ específics, estan en molt baixa proporció i cal un gran nombre de cèl·lules, per a poder detectar-los. Malgrat tot és una determinació a tenir present, ja que ens pot donar informació sobre si hi ha canvis en el nombre de cèl·lules circulants citolítiques específiques per les cèl·lules tumorals.

Un dels punts en el que estem treballant és en la maduració de les DCs. El fet de que aquesta es pugui induir d'una manera efectiva a partir de senyals molt curts de temps, d'una hora ja és suficient, tant per la secreció de citocines com sobre tot pel seu fenotip, obre possibilitats terapèutiques molt interessants. Aquestes possibilitats implicarien la disposició de DCs immadures amb totes les seves propietats de fagocitosi, però predeterminades a madurar, com es pot detectar a les 24 hores després de rebre aquests senyals curts d'una hora. Cal determinar si aquestes cèl·lules que han rebut l'estímul maduratiu *ex vivo* mantenen les capacitats migratòries *in vivo* un cop s'inocuessin per via intradèrmica. Un aspecte complicat en tot aquests processos és la utilització de LPS. És evident que pot comportar un risc, ja que és el factor implicat en

el shock sèptic, però la incubació de les DCs és fa a una dosi baixa (1 µg/ml), durant només 1 hora, i després el LPS s'elimina mitjançant rentats en grans volums de PBS, cosa que fa que la concentració final sigui indetectable. La via intradèrmica d'inoculació minimitza els efectes dels restes de LPS (indetectables), i per últim recordar que molts protocols de vacunació utilitzen BCG (que són bacils inactivats) o bé productes químics de molt alta toxicitat DNFB, i que no es deriven situacions de toxicitat associades a aquestes vacunacions. Malgrat tot s'hauria d'avaluar la toxicitat, i descartar qualsevol efecte secundari que se'n pogués derivar de la utilització de LPS.

Cèl·lules dendrítiques en la clínica.

L'erradicació de tumors en models murins utilitzant DCs carregades amb antígens associats del tumor, va demostrar la seva capacitat en la inducció d'una resposta antitumoral. Molts models experimentals s'han portat a terme, utilitzant DCs obtingudes des de teixits perifèrics, fins cèl·lules derivades del moll d'ós. En aquests estudis es podia detectar una potent resposta de CD8⁺ mediat per MHC-I. Les cèl·lules carregades amb antígens definits, pèptids de seqüència coneguda, o bé pèptids indefinits aïllats a partir de l'elució àcida dels pèptids de les cèl·lules tumorals, generaven una forta resposta antitumoral.

Respecte a la seva aplicació en humans, s'han pogut observar diverses respostes clíniques, utilitzant DCs d'origen diferent, carregades amb diferents antígens, i aplicades a diversos tumors. Sovint aquesta extrapolació del model murí a humans no ha donat els resultats esperats. En la **taula 13** es resumeixen els assatjos clínics on s'han utilitzat DCs de diversos orígens.

Taula 13. Resum dels diferents assatjos clínics on s'han utilitzat cèl·lules dendrítiques com a adjuvants de la vacuna (Adaptada a partir de Fong and Engleman 2000).

Malaltia	Antigen	Construcció antigènica	Tipus de DC	Institució	Investigador
Mama, colorectal, pàncrees, pulmó i melanoma	Derivat de tumor	Lisat cel·lular del tumor autòleg	Monòcits cultivats en GM-CSF + IL-4	Univ. De Michigan	Mule et al.(1998)
Mama, colorectal i pulmó	Derivat del mutant de <i>ras</i>	Pèptids de <i>ras</i>	Monòcits cultivats en GM-CSF + IL-4	Vanderbilt	Carbone et al.
Mama, colorectal i pulmó	Mutants de p53	DNA de p53	Monòcits cultivats en GM-CSF + IL-4	Vanderbilt	Carbone et al.
Mama i colorectal	CEA	Pèptid CAP-1	Monòcits cultivats en	USC	Weber et al.

Vacunes terapèutiques i cèl·lules dendrítiques en el melanoma

		restringit per HLA*A2	CF-CSF + IL-4		
Mama i colorectal	CEA	Pèptid CAP-1 (610M) restringit per HLA*A2	Dendrítiques aïllades per densitat. Mobilitzades amb FL	Standford	Fong et al.
Pulmó	CEA	Pèptid CAP-1 restringit per HLA*A2	Monòcits cultivats en GM-CSF + IL-4	Duke	Gilboa et al.
Pulmó	CEA	RNA CEA	Monòcits cultivats en GM-CSF + IL-4	Duke	Gilboa et al.
Melanoma	gp100, Mart-1 & tirosinasa	Pèptids restringits per HLA*A2	Monòcits cultivats en GM-CSF + IL-4	Uni. De Zurich	Nestle et al. (1998)
Melanoma	MAGE-3	Pèptids restringits per HLA*A1	Monòcits cultivats en GM-CSF + IL-4		Thurner et al.
Melanoma	gp100, Mart-1 & tirosinasa	Pèptids restringits per HLA*A2	Monòcits cultivats en GM-CSF + IL-4 ó CD34+	Uni. Pittsburgh	Lotze et al. (1997)
Melanoma	gp100 (210M), Mart-1 & tirosinasa	Pèptids restringits per HLA*A2	Monòcits cultivats en GM-CSF + IL-4	NCI	Marincola et al.
Melanoma	gp100, Mart-1, MAGE-3 & tirosinasa	Pèptids restringits per HLA*A2	CD34+ cultivades amb GM-CSF + TNF- α	Baylor	Bancherau et al
Melanoma	gp100 (210M), & tirosinasa	Pèptids restringits per HLA*A2	Monòcits cultivats en GM-CSF + IL-4	USC	Weber et al.
Mieloma múltiple	Idiotip d'immunoglobulina	Proteïna purificada	DC purificats per densitat	Stanford	Levy et al. (1996)
Mieloma múltiple	Idiotip d'immunoglobulina	Proteïna purificada	DC purificats per densitat	Dendreon	Valone et al.
Limfoma non-Hodgkin	Idiotip d'immunoglobulina	Proteïna recombinant	DC purificats per densitat	Stanford	Fong et al.
Pròstata	PAP xenogènica	Proteïna recombinant	DC purificats per densitat	Stanford	Fong et al.
Pròstata	PSMA	Pèptids restringits per HLA*A2	Monòcits cultivats en GM-CSF + IL-4	Northwest Biotherapeutics	Murphy et al. (1998)
Pròstata	PAP	Proteïna recombinants de fusió	DC aïllades per densitat	Dendreon	Valone et al. (1998)
Renal	Derivat de tumor	Fusió de cèl·lules tumorals + cèl. Dendrítiques	Monòcits cultivats en GM-CSF + IL-4	Univ. Göttingen	Kugler et al.
Renal	Derivat de tumor	Lisat autòleg	Monòcits cultivats en GM-CSF + IL-4	UCLA	Figlin et al.

Les conclusions que es poden treure d'aquests estudis és que les DCs es poden aplicar amb seguretat, que fins al moment no hi ha descrits efectes secundaris importants associats a la seva aplicació, i que en determinades situacions poden induir una resposta antitumoral, fins i tot respostes completes. La llista d'antígens és gran, i segur que augmentarà en els propers anys, així com la font de les DCs. L'aplicació de

les DCs en humans, pot implicar un esforç significat per assolir els resultats esperançadors que s'han vist en els models murins (Srivastava, 2000):

1. El càncer en humans no és comparable en cap mesura, als models animals on els models estan molt ben definits. Tumors generats a partir de línies tumorals molt caracteritzades i estudiades.
2. La complexitat de l'origen de les DCs, els estats de maduració, els mètodes de generació, són variables que han de ser testades de manera independent. A més de la naturalesa de l'antigen tumoral, el mètode òptim de carregat, i les vies d'inoculació.

Nosaltres ens vam proposar fer un assaig clínic amb DCs autòlogues carregades amb un lisat de cèl·lules tumorals al·logèniques. Aquest disseny, a part de les avantatges que representa en quant al temps que s'ha d'esperar per l'aplicació de la vacuna, ja comentat en la introducció, no cal d'una restricció per un determinat al·lel de HLA, com es necessari quan s'utilitzen pèptids. És evident que no saben si un determinat haplotip pot presentar els antígens tumorals d'una manera més o menys efectiva, cosa que implicaria la presència d'uns haplotips protectors, però a priori tots els malalts han de processar i presentar els diferents antígens tumorals.

La gràfica de supervivència (Kaplan-Meier) del grup de pacients als quals se'ls va aplicar les DCs, ens dona una supervivència promig de 7,2 mesos, amb un màxim de 14. Són uns resultats evidentment molt dramàtics on tots els pacients acaben morint, com corresponen a la gravetat del grup escollit i el pitjor pronòstic que tenen aquests pacients metastàsics. La supervivència descrita per aquest grup de malalts, als quals la bioquimioteràpia no ha funcionat i la malaltia continua progressant és de 2-4 mesos. Tot i que l'estudi no s'ha fet randomitzat i per tant no podem parlar de valors estadísticament significatius, podem considerar que la supervivència és superior a l'esperada, segons dades bibliogràfiques, i més encara si sumem un promig de dos mesos que es van necessitar per recuperar el nombre de leucòcits circulants adequats per a l'obtenció dels precursors de les DCs. A més també s'han pogut documentar respostes mixtes, amb una regressió molt important, superior al 50% de la massa tumoral, en una pacien, en la qual el seu tumor havia mostrat un creixement constant i imparabile malgrat els tractaments previs aplicats (IFN, i bioquimioteràpia. Malgrat la inducció d'una resposta antitumoral, la malaltia en aquests pacients estava molt avançada i possiblement ja havia desenvolupat diversos mecanismes d'escapament, és possible que

la intervenció fos massa tard, i el sistema immunitari no tingués temps de muntar la resposta antitumoral adequada.

De les dades de laboratori es pot interpretar que la vacunació amb DCs té com a resultat una estimulació del sistema immunitari contra els components amb els quals es carreguen les DCs. Hi ha un augment en la producció de citocines quan es posen en contacte les cèl·lules de sang perifèrica contra les cèl·lules tumorals de la vacuna, així mateix també hi ha un augment en la resposta proliferativa d'aquestes cèl·lules circulants, i que en els casos de disposar de tumor autòleg confirma que es genera una resposta antitumoral, o al menys dirigida contra les cèl·lules de melanoma. La confirmació d'aquestes dades venen en els resultats de precursors productors de IFN- γ (associats a una resposta citotòxica), on es pot detectar un augment d'aquestes cèl·lules en front les cèl·lules de la vacuna, i novament contra les cèl·lules de tumor autòleg. Com ja s'ha comentat no sembla haver una correlació entre la clínica d'aquests pacients i les dades de laboratori, possiblement calgui més temps per generar una resposta antitumoral específica contra un tumor que s'ha establert i que porta anys d'adaptació, també es possible que no estem mesurant el paràmetre adequat per valorar la resposta antitumoral, són aspectes sobre els quals s'està treballant. Un aspecte molt important és que carregant les DCs amb lisat de cèl·lules tumorals al·logèniques, s'indueix una resposta contra les cèl·lules del tumor autòlogues. No sabem si podem parlar d'una resposta antitumoral específica, o bé la conseqüència d'una resposta al·logènica que te com a resultat una activació general del sistema immunitari. Amb la futura utilització de pèptids derivats de proteïnes específiques del melanoma en la monitorització dels resultats, podrem respondre a aquesta qüestió.

Tant amb la vacunació amb cèl·lules al·logèniques com amb totes les intervencions amb DCs calia demostrar l'absència total de toxicitat, la facilitat d'aplicació, i la demostració de la seva activitat antitumoral, abans de passar a vacunar pacients en estadiatges més inicials de la malaltia, i amb més possibilitats de que l'activació del sistema immunitari pugui controlar de manera efectiva el desenvolupament de la seva malaltia.

El melanoma és un tumor que s'origina en els melanòcits. Aquestes cèl·lules tenen el paper principal de la síntesi de melanina, i protegir la pell de factors externs. És possiblement aquest paper fisiològic, el que fa aquest tumor especialment agressiu. Són cèl·lules programades a resistir agressions químiques i físiques importants, i que quan muten i es transformen no responen bé a tractaments quimioterapèutics. Tot i que el

melanoma es parla que és un tumor immunogènic i on s'han descrit nombrosos antígens associats, és possible que la dificultat per eliminar totes les cèl·lules tumorals sigui elevada.

CONCLUSIONS.

1. S'ha generat una vacuna polivalent composta per una barreja de línies tumorals de melanoma al·logèniques inactivades a partir de:
 - 1.1 L'establiment de les condicions per a l'obtenció i generació de línies cel·lulars estables. Aspecte que ha permès la caracterització i selecció de les més adequades per a compondre la vacuna
2. La vacunació implica un augment de la resposta immunitària contra els seus components en un subgrup de pacients.
 - 2.1 Hi ha un augment de la producció de citocines (IFN- γ , TNF- α , i de manera més significativa de IL-10), en el grup de pacients que hi ha un control de malaltia (estabilització), o que presenten regressions de les lesions (no-progressors), respecte al grup que no hi ha cap efecte clínic evidenciable (progressors).
3. Hem pogut mesurar la supervivència del grup de 42 pacients metastàsics vacunats.
 - 3.1 La supervivència promig del grup de pacients amb malaltia avaluable a l'inici de la vacuna (n=23) és de 19,1 mesos, mentre que pel grup de pacients sense presència de malaltia evident a l'inici de les vacunes (n=19) és de 24,8 mesos.
4. Un 26 % dels pacients, amb la malaltia a l'inici de la vacunació, han experimentat respostes clíniques, de les que destaquen 3 remissions completes de la malaltia.
5. S'han establert les condicions per a l'obtenció i generació de cèl·lules dendrítiques, en condicions adequades per a la seva utilització en la vacunació de pacients.
 - 5.1 Aquestes cèl·lules dendrítiques mantenen el seu fenotip i les seves característiques funcionals que les fan apropiades per intentar la generació d'una resposta immunitària antitumoral adequada.
 - 5.2 La incubació de les cèl·lules dendrítiques amb una barreja de citocines, indueix la maduració funcional de les cèl·lules, que determina la seva capacitat immunoestimuladora *in vitro*.
 - 5.3 Altres sistemes de maduració de les cèl·lules dendrítiques, com amb una incubació curta amb LPS, simulen les condicions fisiològiques més adequades per a la generació d'una resposta immunitària mediada per les cèl·lules dendrítiques.

- 5.3.1 Aquest sistema de maduració pot simplificar la via d'inoculació de cèl·lules. Ja que es poden injectar cèl·lules dendrítiques immadures, predeterminades a madurar *in vitro*, intradèrmicament.
- 5.4 La inoculació de cèl·lules dendrítiques per la via intraganglionar és un procés segur, sense efectes secundaris associats. I que genera una activitat antitumoral.
- 5.4.1 Clínicament es va observar una resposta parcial, amb reducció molt important de la massa tumoral, i diverses respostes mixtes.
- 5.4.2 Es detecta una resposta immunitària contra el lisat al·logènic de cèl·lules tumorals, i també contra tumor autòleg.
6. Com a conclusions generals les vacunes amb cèl·lules tumorals al·logèniques completes inactivades, i les vacunes composades per cèl·lules dendrítiques carregades amb un lisat de les vacunes polivalents:
- No tenen cap efecte secundari associat.
 - Són aplicables a un nombre elevat de pacients.
 - Han demostrat la seva capacitat d'induir una resposta antitumoral, i provocar l'estimulació del sistema immunitari.

ANNEX.

En aquest apartat s'adjunten les publicacions realitzades durant el desenvolupament d'aquesta tesi i dels resultats obtinguts.

Publicacions

Matilde Ramírez, Neus Fernández-Troy, Maria Buxadé, Ricardo P. Casaroli-Marano, Daniel Benítez, Cesar Pérez-Maldonado, and Enric Espel. Wortmannin inhibits translation of tumor necrosis factor- α in superantigen-activated T cells. *Int Immunol.* 199; 11: 1479-1489.

R. Vilella, D. Benítez y T. Castel. Inmunoterapia en el melanoma. Métodos terapéutico-diagnósticos de actualidad. *Medicina Interna.* 2000; 18: 381-396.

D. Benítez, P. García-Ortega, C. Picado, J. Milà, J. Vives, J. Martínez and R. Vilella. Specific immune response to Phleum pratense plant profilin in atopic patients and control subjects. *Allergol et Immunopathol.* 2001; 29:9-15.

R. Vilella, D. Benítez, J. Milà y T. Castel. Inmunoterapia en el melanoma maligno diseminado. *Inmunología.* 2001; 20: 161-172.

D. Benítez, P. García-Ortega, C. Picado, J. Milà, J. Vives, J. Martínez and R. Vilella. Specific immune response to Parietaria judaica plant profilin: a low T cell proliferative response supports high IgE and skin prick test. *Allergol et Immunopathol.* 2002; 30(2):62-69.

R. Vilella, D. Benítez, J. Milà, A. Vilalta, R. Rull, F. Cuellar, C. Conill, S. Vidal-Sicart, J. Costa, E. Yachi, J. Palou, J. Malvehy, S. Puig, R. Martí, B. Mellado and T. Castel. Treatment of patients with progressive unresectable metastatic melanoma with a heterologous polyvalent melanoma whole cell vaccine. *Int J Cancer* (en prensa).

BIBLIOGRAFIA.

1. M. G. Agadjanyan, J. J. Kim, N. Trivedi, D. M. Wilson, B. Monzavi-Karbassi, L. D. Morrison, L. K. Nottingham, T. Dentchev, A. Tsai, K. Dang, A. A. Chalian, M. A. Maldonado, W. V. Williams and D. B. Weiner. CD86 (B7-2) can function to drive MHC-restricted antigen-specific CTL responses in vivo. *J Immunol.* 1999; 162. 3417-3427.
2. L. Ahmann, E. T. Creagan, R. G. Hahn, J. H. Edmonson, H. F. Biesel and D. J. Schaid. Complete responses and long-term survivals after systemic chemotherapy for patients with advanced malignant melanoma. *Cancer.* 1989; 63. 224-227.
3. S. Akira, K. Takeda and T. Kaisho. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2001; 2. 675-680.
4. S. Amigorena. Fc gamma receptors and cross-presentation in dendritic cells. *J Exp Med.* 2002; 195. F1-3.
5. Ardavin, G. Martinez-del-Hoyo, P. Martin, F. Anjuere, C. F. Arias, A. R. Marin, S. Ruiz, V. Parrillas and H. Hernandez. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol.* 2001; 22. 691-700.
6. M. B. Atkins, M. T. Lotze, J. P. Dutcher, R. I. Fisher, G. Weiss, K. Margolin, J. Abrams, M. Sznol, D. Parkinson, M. Hawkins, C. Paradise, L. Kunkel and S. A. Rosenberg. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol.* 1999; 17. 2105-2116.
7. M. B. Atkins, J. Sparano, R. I. Fisher, G. R. Weiss, K. A. Margolin, K. I. Fink, L. Rubinstein, A. Louie, J. W. Mier and R. Gucalp. Randomized phase II trial of high-dose interleukin-2 either alone or in combination with interferon alfa-2b in advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 1993; 11. 661-670.
8. M. Ayyoub, M. Migliaccio, P. Guillaume, D. Lienard, J. C. Cerottini, P. Romero, F. Levy, D. E. Speiser and D. Valmori. Lack of tumor recognition by hTERT peptide 540-548-specific CD8(+) T cells from melanoma patients reveals inefficient antigen processing. *Eur J Immunol.* 2001; 31. 2642-2651.
9. Banchereau, F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran and K. Palucka. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18. 767-811.
10. Banchereau, A. K. Palucka, M. Dhodapkar, S. Burkeholder, N. Taquet, A. Rolland, S. Taquet, S. Coquery, K. M. Wittkowski, N. Bhardwaj, L. Pineiro, R. Steinman and J. Fay. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res.* 2001; 61. 6451-6458.
11. Banchereau, B. Pulendran, R. Steinman and K. Palucka. Will the making of plasmacytoid dendritic cells in vitro help unravel their mysteries? *J Exp Med.* 2000; 192. F39-44.
12. J. Banchereau, B. Schuler-Thurner, A. K. Palucka and G. Schuler. Dendritic cells as vectors for therapy. *Cell.* 2001; 106. 271-274.
13. J. Banchereau and R. M. Steinman. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998; 392. 245-252.

14. S. Basu, R. J. Binder, T. Ramalingam and P. K. Srivastava. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity*. 2001; 14. 303-313.
15. Baxevanis, I. F. Voutsas, O. E. Tsitsilonis, A. D. Gritzapis, R. Sotiriadou and M. Papamichail. Tumor-specific CD4+ T lymphocytes from cancer patients are required for optimal induction of cytotoxic T cells against the autologous tumor. *J Immunol*. 2000; 164. 3902-3912.
16. Berard, P. Blanco, J. Davoust, E. M. Neidhart-Berard, M. Nouri-Shirazi, N. Taquet, D. Rimoldi, J. C. Cerottini, J. Banchereau and A. K. Palucka. Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. *J Exp Med*. 2000; 192. 1535-1544.
17. Berd, H. C. Maguire, Jr., P. McCue and M. J. Mastrangelo. Treatment of metastatic melanoma with an autologous tumor-cell vaccine: clinical and immunologic results in 64 patients. *J Clin Oncol*. 1990; 8. 1858-1867.
18. Berd, G. Murphy, H. C. Maguire and M. J. Mastrangelo. Immunization with hapteneized, autologous tumor cells induces inflammation of human melanoma metastases. *Cancer Res*. 1991; 51. 2731-2734.
19. L. Berger, D. Hanlon, D. Kanada, M. Dhodapkar, V. Lombillo, N. Wang, I. Christensen, G. Howe, J. Crouch, P. El-Fishawy and R. Edelson. The growth of cutaneous T-cell lymphoma is stimulated by immature dendritic cells. *Blood*. 2002; 99. 2929-2939.
20. M. P. Bettinotti, C. J. Kim, K. H. Lee, M. Roden, J. N. Cormier, M. Panelli, K. K. Parker and F. M. Marincola. Stringent allele/epitope requirements for MART-1/Melan A immunodominance: implications for peptide-based immunotherapy. *J Immunol*. 1998; 161. 877-889.
21. Bindon, M. Czerniecki, P. Ruell, A. Edwards, W. H. McCarthy, R. Harris and P. Hersey. Clearance rates and systemic effects of intravenously administered interleukin 2 (IL-2) containing preparations in human subjects. *Br J Cancer*. 1983; 47. 123-133.
22. Bonini, S. P. Lee, S. R. Riddell and P. D. Greenberg. Targeting Antigen in Mature Dendritic Cells for Simultaneous Stimulation of CD4+ and CD8+ T Cells. *J Immunol*. 2001; 166. 5250-5257.
23. Boon, J. C. Cerottini, B. Van-den-Eynde, P. van-der-Bruggen and A. Van-Pel. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 1994; 12. 337-365.
24. T. Boon, P. G. Coulie and B. Van-den-Eynde. Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today*. 1997; 18. 267-268.
25. Brichard, A. Van-Pel, T. Wolfel, C. Wolfel, E. De-Plaen, B. Lethe, P. Coulie and T. Boon. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med*. 1993; 178. 489-495.
26. M. Burnet. Immunological aspects of malignant disease. *Lancet*. 1967; 1. 1171-1174.
27. Buzaid, M. I. Ross, C. M. Balch, S. Soong, W. H. McCarthy, L. Tinoco, P. Mansfield, J. E. Lee, A. Bedikian, O. Eton, C. Plager, N. Papadopoulos, S. S. Legha and R. S. Benjamin. Critical analysis of the current American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma and proposal of a new staging system. 1997; 15. 1039-1051.

28. Castelli, A. M. Ciupitu, F. Rini, L. Rivoltini, A. Mazzocchi, R. Kiessling and G. Parmiani. Human heat shock protein 70 peptide complexes specifically activate antimelanoma T cells. *Cancer Res.* 2001; 61. 222-227.
29. M. Cella, F. Facchetti, A. Lanzavecchia and M. Colonna. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol.* 2000; 1. 305-310.
30. N. G. Chakraborty, L. Li, J. R. Sporn, S. H. Kurtzman, M. T. Ergin and B. Mukherji. Emergence of regulatory CD4+ T cell response to repetitive stimulation with antigen-presenting cells in vitro: implications in designing antigen-presenting cell-based tumor vaccines. *J Immunol.* 1999; 162. 5576-5583.
31. Chang, B. G. Redman, J. R. Whitfield, B. J. Nickoloff, T. M. Braun, P. P. Lee, J. D. Geiger and J. J. Mule. A Phase I Trial of Tumor Lysate-pulsed Dendritic Cells in the Treatment of Advanced Cancer. *Clin Cancer Res.* 2002; 8. 1021-1032.
32. Chang, H. Yoshizawa, K. Sakai, M. J. Cameron, V. K. Sondak and S. Shu. Clinical observations on adoptive immunotherapy with vaccine-primed T-lymphocytes secondarily sensitized to tumor in vitro. *Cancer Res.* 1993; 53. 1043-1050.
33. C.-C. J. Chang, A. Wright and J. Punnonen. Monocyte-Derived CD1a+ and CD1a- Dendritic Cell Subsets Differ in Their Cytokine Production Profiles, Susceptibilities to Transfection, and Capacities to Direct Th Cell Differentiation. *J Immunol.* 2000; 165. 3584-3591.
34. Y. Chang, C. H. Chen, H. Ji, T. L. Wang, K. Hung, B. P. Lee, A. Y. Huang, R. J. Kurman, D. M. Pardoll and T. Wu. Antigen-specific cancer immunotherapy using a GM-CSF secreting allogeneic tumor cell-based vaccine. *Int J Cancer.* 2000; 86. 725-730.
35. P. Chaux, V. Vantomme, V. Stroobant, K. Thielemans, J. Corthals, R. Luiten, A. M. Eggermont, T. Boon and P. van-der-Bruggen. Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4(+) T lymphocytes. *J Exp Med.* 1999; 189. 767-778.
36. L. Chen, S. Ashe, W. A. Brady, I. Hellstrom, K. E. Hellstrom, J. A. Ledbetter, P. McGowan and P. S. Linsley. Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell.* 1992; 71. 1093-1102.
37. L. Chen, P. McGowan, S. Ashe, J. Johnston, Y. Li, I. Hellstrom and K. E. Hellstrom. Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *J Exp Med.* 1994; 179. 523-532.
38. Z. Chen, T. Moyana, A. Saxena, R. Warrington, Z. Jia and J. Xiang. Efficient antitumor immunity derived from maturation of dendritic cells that had phagocytosed apoptotic/necrotic tumor cells. *Int J Cancer.* 2001; 93. 539-548.
39. P. Chomarat, J. Banchereau, J. Davoust and A. K. Palucka. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol.* 2000; 1. 510-514.
40. W. Coley. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am. J. Med. Sci.* 1893; 105. 487-511.
41. S. Corinti, C. Albanesi, A. la Sala, S. Pastore and G. Girolomoni. Regulatory Activity of Autocrine IL-10 on Dendritic Cell Functions. *J Immunol.* 2001; 166. 4312-4318.

42. J. N. Cormier, A. Abati, P. Fetsch, Y. M. Hijazi, S. A. Rosenberg, F. M. Marincola and S. L. Topalian. Comparative analysis of the in vivo expression of tyrosinase, MART-1/Melan-A, and gp100 in metastatic melanoma lesions: implications for immunotherapy. *J Immunother.* 1998; 21. 27-31.
43. R. M. Dallal and M. T. Lotze. The dendritic cell and human cancer vaccines. *Curr Opin Immunol.* 2000; 12. 583-588.
44. J. De-Vries, A. A. Eggert, N. M. Scharenborg, J. L. Vissers, W. J. Lesterhuis, O. C. Boerman, C. J. Punt, G. J. Adema and C. G. Figdor. Phenotypical and functional characterization of clinical grade dendritic cells. *J Immunother.* 25. 429-438.
45. M. del-Hoyo, P. Martin, H. H. Vargas, S. Ruiz, C. F. Arias and C. Ardavin. Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature.* 2002; 415. 1043-1047.
46. M. V. Dhodapkar and R. M. Steinman. Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans. *Blood.* 2002; 100. 174-177.
47. M. V. Dhodapkar, R. M. Steinman, J. Krasovsky, C. Munz and N. Bhardwaj. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med.* 2001; 193. 233-238.
48. Egen, M. S. Kuhns and J. P. Allison. CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat Immunol.* 2002; 3. 611-618.
49. Engering, T. B. Geijtenbeek, S. J. van-Vliet, M. Wijers, E. van-Liempt, N. Demaurex, A. Lanzavecchia, J. Franssen, C. G. Figdor, V. Piguet and Y. van-Kooyk. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol.* 2002; 168. 2118-2126.
50. W. Fabre. The allogeneic response and tumor immunity. *Nat Med.* 2001; 7. 649-652.
51. T. Felzmann, M. Buchberger, M. Lehner, D. Printz, R. Kircheis, E. Wagner, H. Gadner and W. Holter. Functional maturation of dendritic cells by exposure to CD40L transgenic tumor cells, fibroblasts or keratinocytes. *Cancer Lett.* 2001; 168. 145-154.
52. Feng, Y. Zeng, L. Whitesell and E. Katsanis. Stressed apoptotic tumor cells express heat shock proteins and elicit tumor-specific immunity. *Blood.* 2001; 97. 3505-3512.
53. M. Fenyó, E. Klein, G. Klein and K. Swiech. Selection of an immunoresistant Moloney lymphoma subline with decreased concentration of tumor-specific surface antigens. *J Natl Cancer Inst.* 1968; 40. 69-89.
54. O. J. Finn and G. Forni. Prophylactic cancer vaccines. *Curr Opin Immunol.* 2002; 14. 172-177.
55. Fong, D. Brockstedt, C. Benike, L. Wu and E. G. Engleman. Dendritic Cells Injected Via Different Routes Induce Immunity in Cancer Patients. *J Immunol.* 2001; 166. 4254-4259.
56. Fong, D. Brockstedt, C. Benike, L. Wu and E. G. Engleman. Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients. *J Immunol.* 2001; 166. 4254-4259.
57. L. Fong and E. G. Engleman. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18. 245-273.

58. L. Fong, Y. Hou, A. Rivas, C. Benike, A. Yuen, G. A. Fisher, M. M. Davis and E. G. Engleman. Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98. 8809-8814.
59. M. Foss. Immunologic mechanisms of antitumor activity. *Semin Oncol*. 2002; 29. 5-11.
60. Frazer, R. De-Kluyver, G. R. Leggatt, H. Y. Guo, L. Dunn, O. White, C. Harris, A. Liem and P. Lambert. Tolerance or immunity to a tumor antigen expressed in somatic cells can be determined by systemic proinflammatory signals at the time of first antigen exposure. *J Immunol*. 2001; 167. 6180-6187.
61. J. Fuchs and P. Matzinger. Is cancer dangerous to the immune system? *Semin Immunol*. 1996; 8. 271-280.
62. S. Fujii, K. Shimizu, T. Shimizu and M. T. Lotze. Interleukin-10 promotes the maintenance of antitumor CD8(+) T-cell effector function in situ. *Blood*. 2001; 98. 2143-2151.
63. Gunzer, S. Janich, G. Varga and S. Grabbe. Dendritic cells and tumor immunity. *Semin Immunol*. 2001; 13. 291-302.
64. M. Gunzer, A. Schafer, S. Borgmann, S. Grabbe, K. S. Zanker, E. B. Brocker, E. Kampgen and P. Friedl. Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity*. 2000; 13. 323-332.
65. Hackstein, A. E. Morelli and A. W. Thomson. Designer dendritic cells for tolerance induction: guided not misguided missiles. *Trends Immunol*. 2001; 22. 437-442.
66. M. Halliday and S. Le. Transforming growth factor-beta produced by progressor tumors inhibits, while IL-10 produced by regressor tumors enhances, Langerhans cell migration from skin. *Int Immunol*. 2001; 13. 1147-1154.
67. Hanahan and R. A. Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100. 57-70.
68. Heiser, M. A. Maurice, D. R. Yancey, N. Z. Wu, P. Dahm, S. K. Pruitt, D. Boczkowski, S. K. Nair, M. S. Ballo, E. Gilboa and J. Vieweg. Induction of polyclonal prostate cancer-specific CTL using dendritic cells transfected with amplified tumor RNA. *J Immunol*. 2001; 166. 2953-2960.
69. W. Herr, J. Schneider, A. W. Lohse, K. H. Meyer-zum-Buschenfelde and T. Wolfel. Detection and quantification of blood-derived CD8+ T lymphocytes secreting tumor necrosis factor alpha in response to HLA-A2.1-binding melanoma and viral peptide antigens. *J Immunol Methods*. 1996; 191. 131-142.
70. Holmes. Immunology of tumor infiltrating lymphocytes. *Ann Surg*. 1985; 201. 158-163.
71. Hsueh, R. K. Gupta, K. Qi and D. L. Morton. Correlation of specific immune responses with survival in melanoma patients with distant metastases receiving polyvalent melanoma cell vaccine. *J Clin Oncol*. 1998; 16. 2913-2920.
72. M. Hu, H. Winter, W. J. Urba and B. A. Fox. Divergent roles for CD4+ T cells in the priming and effector/memory phases of adoptive immunotherapy. *J Immunol*. 2000; 165. 4246-4253.
73. L.-Y. Huang, C. Reis e Sousa, Y. Itoh, J. Inman and D. E. Scott. IL-12 Induction by a Th1-Inducing Adjuvant In Vivo: Dendritic Cell Subsets and Regulation by IL-10. *J Immunol*. 2001; 167. 1423-1430.

74. Hung, R. Hayashi, A. Lafond-Walker, C. Lowenstein, D. Pardoll and H. Levitsky. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med.* 1998; 188. 2357-2368.
75. Y. Ikuta, N. Katayama, L. Wang, T. Okugawa, Y. Takahashi, M. Schmitt, X. Gu, M. Watanabe, K. Akiyoshi, H. Nakamura, K. Kuribayashi, J. Sunamoto and H. Shiku. Presentation of a major histocompatibility complex class 1-binding peptide by monocyte-derived dendritic cells incorporating hydrophobized polysaccharide-truncated HER2 protein complex: implications for a polyvalent immuno-cell therapy. *Blood.* 2002; 99. 3717-3724.
76. T. Ito, R. Amakawa, T. Kaisho, H. Hemmi, K. Tajima, K. Uehira, Y. Ozaki, H. Tomizawa, S. Akira and S. Fukuhara. Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med.* 2002; 195. 1507-1512.
77. T. Itoh, Y. Ueda, I. Kawashima, I. Nukaya, H. Fujiwara, N. Fuji, T. Yamashita, T. Yoshimura, K. Okugawa, T. Iwasaki, M. Ideno, K. Takesako, M. Mitsuhashi, K. Orita and H. Yamagishi. Immunotherapy of solid cancer using dendritic cells pulsed with the HLA-A24-restricted peptide of carcinoembryonic antigen. *Cancer Immunol Immunother.* 2002; 51. 99-106.
78. Jager, Y. T. Chen, J. W. Drijfhout, J. Karbach, M. Ringhoffer, D. Jager, M. Arand, H. Wada, Y. Noguchi, E. Stockert, L. J. Old and A. Knuth. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med.* 1998; 187. 265-270.
79. Jäger, D. Jäger and A. Knuth. Clinical cancer vaccine trials. *Current Opinion in Immunol.* 2002; 14. 178-182.
80. Jonuleit, A. Giesecke-Tuettenberg, T. Tuting, B. Thurner-Schuler, T. B. Stuge, L. Paragnik, A. Kandemir, P. P. Lee, G. Schuler, J. Knop and A. H. Enk. A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer.* 2001; 93. 243-251.
81. Jonuleit, U. Kuhn, G. Muller, K. Steinbrink, L. Paragnik, E. Schmitt, J. Knop and A. H. Enk. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol.* 1997; 27. 3135-3142.
82. Jonuleit, E. Schmitt, G. Schuler, J. Knop and A. H. Enk. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med.* 2000; 192. 1213-1222.
83. Jonuleit, E. Schmitt, K. Steinbrink and A. H. Enk. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol.* 2001; 22. 394-400.
84. Kadowaki, S. Ho, S. Antonenko, R. W. Malefyt, R. A. Kastelein, F. Bazan and Y. J. Liu. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med.* 2001; 194. 863-869.
85. T. Kageshita, Y. Kawakami, S. Hirai and T. Ono. Differential expression of MART-1 in primary and metastatic melanoma lesions. *J Immunother.* 1997; 20. 460-465.
86. Kalinski, P. L. Vieira, J. H. Schuitemaker, E. C. de-Jong and M. L. Kapsenberg. Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood.* 2001; 97. 3466-3469.

87. Y. Kawakami, S. Eliyahu, C. H. Delgado, P. F. Robbins, L. Rivoltini, S. L. Topalian, T. Miki and S. A. Rosenberg. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91. 3515-3519.
88. Y. Kawakami, S. Eliyahu, C. H. Delgado, P. F. Robbins, K. Sakaguchi, E. Appella, J. R. Yannelli, G. J. Adema, T. Miki and S. A. Rosenberg. Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91. 6458-6462.
89. Kayaga, B. E. Souberbielle, N. Sheikh, W. J. Morrow, T. Scott-Taylor, R. Vile, H. Chong and A. G. Dalgleish. Anti-tumour activity against B16-F10 melanoma with a GM-CSF secreting allogeneic tumour cell vaccine. *Gene Ther.* 1999; 6. 1475-1481.
90. M. Kedl, W. A. Rees, D. A. Hildeman, B. Schaefer, T. Mitchell, J. Kappler and P. Murrack. T Cells Compete for Access to Antigen-bearing Antigen-presenting Cells. 2000; 192. 1105-1114.
91. N. W. Kim, M. A. Piatyszek, K. R. Prowse, C. B. Harley, M. D. West, P. L. Ho, G. M. Coviello, W. E. Wright, S. L. Weinrich and J. W. Shay. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 1994; 266. 2011-2015.
92. Kirk, D. Hartigan-O'Connor, B. J. Nickoloff, J. S. Chamberlain, M. Giedlin, L. Aukerman and J. J. Mule. T cell-dependent antitumor immunity mediated by secondary lymphoid tissue chemokine: augmentation of dendritic cell-based immunotherapy. *Cancer Res.* 2001; 61. 2062-2070.
93. M. Kirkwood, M. H. Strawderman, M. S. Ernstoff, T. J. Smith, E. C. Borden and R. H. Blum. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. 1996; 14. 7-17.
94. K. Koski, L. A. Lyakh and N. R. Rice. Rapid lipopolysaccharide-induced differentiation of CD14(+) monocytes into CD83(+) dendritic cells is modulated under serum-free conditions by exogenously added IFN-gamma and endogenously produced IL-10. *Eur J Immunol.* 2001; 31. 3773-3781.
95. Y. Kotera, K. Shimizu and J. J. Mule. Comparative analysis of necrotic and apoptotic tumor cells as a source of antigen(s) in dendritic cell-based immunization. *Cancer Res.* 2001; 61. 8105-8109.
96. Krug, S. Rothenfusser, V. Hornung, B. Jahrsdorfer, S. Blackwell, Z. K. Ballas, S. Endres, A. M. Krieg and G. Hartmann. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2001; 31. 2154-2163.
97. Kugler, G. Stuhler, P. Walden, G. Zoller, A. Zobywalski, P. Brossart, U. Trefzer, S. Ullrich, C. A. Muller, V. Becker, A. J. Gross, B. Hemmerlein, L. Kanz, G. A. Muller and R. H. Ringert. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat Med.* 2000; 6. 332-336.
98. Lanzavecchia and F. Sallusto. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science.* 2000; 290. 92-97.

99. Lapointe, J. F. Toso, C. Butts, H. A. Young and P. Hwu. Human dendritic cells require multiple activation signals for the efficient generation of tumor antigen-specific T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 2000; 30. 3291-3298.
100. Larsson, J. F. Fonteneau and N. Bhardwaj. Dendritic cells resurrect antigens from dead cells. *Trends Immunol.* 2001; 22. 141-148.
101. Lee, E. Wang, M. B. Nielsen, J. Wunderlich, S. Migueles, M. Connors, S. M. Steinberg, S. A. Rosenberg and F. M. Marincola. Increased vaccine-specific T cell frequency after peptide-based vaccination correlates with increased susceptibility to in vitro stimulation but does not lead to tumor regression. *J Immunol.* 1999; 163. 6292-6300.
102. S. Legha, S. Ring, O. Eton, A. Bedikian, A. C. Buzaid, C. Plager and N. Papadopoulos. Development of a biochemotherapy regimen with concurrent administration of cisplatin, vinblastine, dacarbazine, interferon alfa, and interleukin-2 for patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 1998; 16. 1752-1759.
103. Lens and M. Dawes. Interferon alfa therapy for malignant melanoma: a systematic review of randomized controlled trials. *J Clin Oncol.* 2002; 20. 1818-1825.
104. Li, M. Adibzadeh, T. Halder, H. Kalbacher, S. Heinzl, C. Muller, J. Zeuthen and G. Pawelec. Tumour-specific MHC-class-II-restricted responses after in vitro sensitization to synthetic peptides corresponding to gp100 and Annexin II eluted from melanoma cells. *Cancer Immunol Immunother.* 1998; 47. 32-38.
105. R. Lieberman and H. H. Fudenberg. Effects of BCG on lysozyme and "active" T cells in patients with malignant melanoma: a preliminary study. *Clin Immunol Immunopathol.* 1979; 12. 191-203.
106. Linard, S. Bézieau, H. Benlalam, N. Labarrière, Y. Guilloux, E. Diez and F. Jotereau. A ras-Mutated Peptide Targeted by CTL Infiltrating a Human Melanoma Lesion. *J Immunol.* 2002; 168. 4802-4808.
107. Ludewig, A. F. Ochsenbein, B. Odermatt, D. Paulin, H. Hengartner and R. M. Zinkernagel. Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease. *J Exp Med.* 2000; 191. 795-804.
108. Lurquin, A. Van-Pel, B. Mariame, E. De-Plaen, J. P. Szikora, C. Janssens, M. J. Reddehase, J. Lejeune and T. Boon. Structure of the gene of tum- transplantation antigen P91A: the mutated exon encodes a peptide recognized with Ld by cytolytic T cells. *Cell.* 1989; 58. 293-303.
109. Lutz and G. Schuler. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 2002; 23. 445.
110. R. B. Mailliard, S. Egawa, Q. Cai, A. Kalinska, S. N. Bykovskaya, M. T. Lotze, M. L. Kapsenberg, W. J. Storkus and P. Kalinski. Complementary dendritic cell-activating function of CD8+ and CD4+ T cells: helper role of CD8+ T cells in the development of T helper type 1 responses. *J Exp Med.* 2002; 195. 473-483.
111. Marincola, E. M. Jaffee, D. J. Hicklin and S. Ferrone. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol.* 2000; 74. 181-273.

112. P. Matzinger. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994; 12. 991-1045.
113. Mayordomo, T. Zorina, W. J. Storkus, L. Zitvogel, C. Celluzzi, L. D. Falo, C. J. Melief, S. T. Ildstad, W. M. Kast and A. B. Deleo. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat Med.* 1995; 1. 1297-1302.
114. McLellan, M. Heldmann, G. Terbeck, F. Weih, C. Linden, E. B. Brocker, M. Leverkus and E. Kampgen. MHC class II and CD40 play opposing roles in dendritic cell survival. 2000; 30. 2612-2619.
115. S. Mitchell, W. Harel, R. A. Kempf, E. Hu, J. Kan-Mitchell, W. D. Boswell, G. Dean and L. Stevenson. Active-specific immunotherapy for melanoma. *J Clin Oncol.* 1990; 8. 856-869.
116. Moreau-Aubry, S. Le-Guiner, N. Labarriere, M. C. Gesnel, F. Jotereau and R. Breathnach. A processed pseudogene codes for a new antigen recognized by a CD8(+) T cell clone on melanoma. *J Exp Med.* 2000; 191. 1617-1624.
117. Y. Morel, A. Truneh, R. W. Sweet, D. Olive and R. T. Costello. The TNF superfamily members LIGHT and CD154 (CD40 ligand) costimulate induction of dendritic cell maturation and elicit specific CTL activity. *J Immunol.* 2001; 167. 2479-2486.
118. Morgan, F. W. Ruscetti and R. Gallo. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science.* 1976; 193. 1007-1008.
119. Morton and A. Barth. Vaccine therapy for malignant melanoma. *CA Cancer J Clin.* 1996; 46. 225-244.
120. Moser and K. M. Murphy. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol.* 2000; 1. 199-205.
121. Nair, A. Heiser, D. Boczkowski, A. Majumdar, M. Naoe, J. S. Lebkowski, J. Vieweg and E. Gilboa. Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells. *Nat Med.* 2000; 6. 1011-1017.
122. Nanni, I. Rossi, C. De-Giovanni, L. Landuzzi, G. Nicoletti, A. Stoppacciaro, M. Parenza, M. P. Colombo and P. L. Lollini. Interleukin 12 gene therapy of MHC-negative murine melanoma metastases. *Cancer Res.* 1998; 58. 1225-1230.
123. O. Nestle, S. Alijagic, M. Gilliet, Y. Sun, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg and D. Schadendorf. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 1998; 4. 328-332.
124. Y. Nikitina, S. Chada, C. Muro-Cacho, B. Fang, R. Zhang, J. A. Roth and D. I. Gabrilovich. An effective immunization and cancer treatment with activated dendritic cells transduced with full-length wild-type p53. *Gene Ther.* 2002; 9. 345-352.
125. Nishimura, K. Iwakabe, M. Sekimoto, Y. Ohmi, T. Yahata, M. Nakui, T. Sato, S. Habu, H. Tashiro, M. Sato and A. Ohta. Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. *J Exp Med.* 1999; 190. 617-627.

126. O-Sullivan and R. Thomas. CD40 ligation conditions dendritic cell antigen-presenting function through sustained activation of NF-kappaB. *J Immunol.* 2002; 168. 5491-5498.
127. Ochsenbein, S. Sierro, B. Odermatt, M. Pericin, U. Karrer, J. Hermans, S. Hemmi, H. Hengartner and R. M. Zinkernagel. Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature.* 2001; 411. 1058-1064.
128. Palmowski, E. Man-Lik Choi, F. Hermans, S. Gilbert, J.-I. Chen, U. Gileazi, M. Salio, A. Van Pel, S. Man, E. Bonin, P. Liljestrom, P. Dunbar and V. Cerundolo. Competition Between CTL Narrows the Immune Response Induced by Prime-Boost Vaccination Protocols. *J Immunol.* 2002; 168. 4391-4398.
129. Pietra, R. Mortarini, G. Parmiani and A. Anichini. Phases of apoptosis of melanoma cells, but not of normal melanocytes, differently affect maturation of myeloid dendritic cells. *Cancer Res.* 2001; 61. 8218-8226.
130. Pulendran, P. Kumar, C. W. Cutler, M. Mohamadzadeh, T. Van-Dyke and J. Banchereau. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J Immunol.* 2001; 167. 5067-5076.
131. Rafiq, A. Bergtold and R. Clynes. Immune complex-mediated antigen presentation induces tumor immunity. *J Clin Invest.* 2002; 110. 71-79.
132. J. Randolph. Is maturation required for Langerhans cell migration? *J Exp Med.* 2002; 196. 413-416.
133. Ribas, L. H. Butterfield, S. N. Amarnani, V. B. Dissette, D. Kim, W. S. Meng, G. A. Miranda, H. J. Wang, W. H. McBride, J. A. Glaspy and J. S. Economou. CD40 cross-linking bypasses the absolute requirement for CD4 T cells during immunization with melanoma antigen gene-modified dendritic cells. *Cancer Res.* 2001; 61. 8787-8793.
134. Riker, J. Cormier, M. Panelli, U. Kammula, E. Wang, A. Abati, P. Fetsch, K. H. Lee, S. Steinberg, S. Rosenberg and F. Marincola. Immune selection after antigen-specific immunotherapy of melanoma. *Surgery.* 1999; 126. 112-120.
135. Romani, S. Gruner, D. Brang, E. Kampgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinka, P. O. Fritsch, R. M. Steinman and G. Schuler. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med.* 1994; 180. 83-93.
136. S. A. Rosenberg. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity.* 1999; 10. 281-287.
137. S. A. Rosenberg, M. T. Lotze, L. M. Muul, S. Leitman, A. E. Chang, S. E. Ettinghausen, Y. L. Matory, J. M. Skibber, E. Shiloni and J. T. Vetto. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med.* 1985; 313. 1485-1492.
138. S. A. Rosenberg, J. J. Mule, P. J. Spiess, C. M. Reichert and S. L. Schwarz. Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin 2. *J Exp Med.* 1985; 161. 1169-1188.

139. S. A. Rosenberg, J. C. Yang, D. E. White and S. M. Steinberg. Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response. *Ann Surg.* 1998; 228. 307-319.
140. Salio, D. Shepherd, P. R. Dunbar, M. Palmowski, K. Murphy, L. Wu and V. Cerundolo. Mature Dendritic Cells Prime Functionally Superior Melan-A-Specific CD8+ Lymphocytes as Compared with Nonprofessional APC. *J Immunol.* 2001; 167. 1188-1197.
141. Sallusto and A. Lanzavecchia. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994; 179. 1109-1118.
142. Scandella, Y. Men, S. Gillessen, R. Forster and M. Groettrup. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 2002; 100. 1354-1361.
143. Scholler, M. Hayden-Ledbetter, A. Dahlin, I. Hellstrom, K. E. Hellstrom and J. A. Ledbetter. Cutting edge: CD83 regulates the development of cellular immunity. *J Immunol.* 2002; 168. 2599-2602.
144. Schuler-Thurner, E. S. Schultz, T. G. Berger, G. Weinlich, S. Ebner, P. Woerl, A. Bender, B. Feuerstein, P. O. Fritsch, N. Romani and G. Schuler. 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. 1279-1288.
145. Sensi, C. Farina, C. Maccalli, R. Lupetti, G. Nicolini, A. Anichini, G. Parmiani and D. Berd. Clonal expansion of T lymphocytes in human melanoma metastases after treatment with a hapten-modified autologous tumor vaccine. *J Clin Invest.* 1997; 99. 710-717.
146. Shaif Muthana, C. McIntyre, K. Sisley, I. Rennie and A. Murray. Dead or alive: immunogenicity of human melanoma cells when presented by dendritic cells. *Cancer Res.* 2000; 60. 6441-6447.
147. Singh-Jasuja, H. U. Scherer, N. Hilf, D. Arnold-Schild, H. G. Rammensee, R. E. Toes and H. Schild. The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur J Immunol.* 2000; 30. 2211-2215.
148. J. Smyth, D. I. Godfrey and J. A. Trapani. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol.* 2001; 2. 293-299.
149. S. Somersan, M. Larsson, J. F. Fonteneau, S. Basu, P. Srivastava and N. Bhardwaj. Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells. *J Immunol.* 2001; 167. 4844-4852.
150. K. Srivastava. Immunotherapy of human cancer: lessons from mice. *Nat Immunol.* 2000; 1. 363-366.
151. K. Steinbrink, H. Jonuleit, G. Muller, G. Schuler, J. Knop and A. H. Enk. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood.* 1999; 93. 1634-1642.

152. K. Steinbrink, L. Paragnik, H. Jonuleit, T. Tuting and J. Knop. Induction of dendritic cell maturation and modulation of dendritic cell-induced immune responses by prostaglandins. *Arch Dermatol Res.* 2000; 292. 437-445.
153. Steinman and Z. A. Cohn. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 1973; 137. 1142-1162.
154. M. Steinman and M. Dhodapkar. Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future. *Int J Cancer.* 2001; 94. 459-473.
155. M. Steinman, S. Turley, I. Mellman and K. Inaba. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med.* 2000; 191. 411-416.
156. L. M. Stuart, M. Lucas, C. Simpson, J. Lamb, J. Savill and A. Lacy-Hulbert. Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation. *J Immunol.* 2002; 168. 1627-1635.
157. R. P. Suttmuller, L. M. van-Duivenvoorde, A. van-Elsas, T. N. Schumacher, M. E. Wildenberg, J. P. Allison, R. E. Toes, R. Offringa and C. J. Melief. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med.* 2001; 194. 823-832.
158. Tanaka, W. Hashimoto, H. Okamura, P. D. Robbins, M. T. Lotze and H. Tahara. Rapid generation of potent and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes by interleukin 18 using dendritic cells and natural killer cells. *Cancer Res.* 2000; 60. 4838-4844.
159. Taniguchi, H. Matsui, T. Fujita, C. Takaoka, N. Kashima, R. Yoshimoto and J. Hamuro. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature.* 1983; 302. 305-310.
160. They, M. Boussac, P. Veron, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, J. Garin and S. Amigorena. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol.* 2001; 166. 7309-7318.
161. M. Timmerman, D. K. Czerwinski, T. A. Davis, F. J. Hsu, C. Benike, Z. M. Hao, B. Taidi, R. Rajapaksa, C. B. Caspar, C. Y. Okada, A. van-Beekhoven, T. M. Liles, E. G. Engleman and R. Levy. Idiotypic-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood.* 2002; 99. 1517-1526.
162. Tjoa and G. P. Murphy. Development of dendritic-cell based prostate cancer vaccine [In Process Citation]. 2000; 74. 87-93.
163. S. Todryk, A. A. Melcher, N. Hardwick, E. Linardakis, A. Bateman, M. P. Colombo, A. Stoppacciaro and R. G. Vile. Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake. *J Immunol.* 1999; 163. 1398-1408.
164. S. L. Topalian, L. Rivoltini, M. Mancini, N. R. Markus, P. F. Robbins, Y. Kawakami and S. A. Rosenberg. Human CD4+ T cells specifically recognize a shared melanoma-associated antigen encoded by the tyrosinase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91. 9461-9465.

165. Urban, N. Willcox and D. J. Roberts. A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98. 8750-8755.
166. Valmori, C. Scheibenbogen, V. Dutoit, D. Nagorsen, A. M. Asemissen, V. Rubio-Godoy, D. Rimoldi, P. Guillaume, P. Romero, D. Schadendorf, M. Lipp, P. Y. Dietrich, E. Thiel, J. C. Cerottini, D. Lienard and U. Keilholz. Circulating Tumor-reactive CD8(+) T cells in melanoma patients contain a CD45RA(+)CCR7(-) effector subset exerting ex vivo tumor-specific cytolytic activity. *Cancer Res.* 2002; 62. 1743-1750.
167. J. Van-Den-Eynde, B. Gaugler, M. Probst-Kepper, L. Michaux, O. Devuyst, F. Lorge, P. Weynants and T. Boon. A new antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human kidney tumor results from reverse strand transcription. *J Exp Med.* 1999; 190. 1793-1800.
168. van-der-Bruggen, C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De-Plaen, B. Van-den-Eynde, A. Knuth and T. Boon. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science.* 1991; 254. 1643-1647.
169. Vanbervliet, B. Homey, I. Durand, C. Massacrier, S. Ait-Yahia, O. de-Bouteiller, A. Vicari and C. Caux. Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces. *Eur J Immunol.* 2002; 32. 231-242.
170. Vonderheide, W. Hahn, J. Schultze and L. Nadler. The Telomerase Catalytic Subunit Is a Widely Expressed Tumor-Associated Antigen Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes. *Immunity.* 1999; 10. 673-679.
171. Y. Wan, L. Lu, J. L. Bramson, S. Baral, Q. Zhu, A. Pilon and K. Dayball. Dendritic cell-derived IL-12 is not required for the generation of cytotoxic, IFN-gamma-secreting, CD8(+) CTL in vivo. *J Immunol.* 2001; 167. 5027-5033.
172. Wang, S. Saffold, X. Cao, J. Krauss and W. Chen. Eliciting T cell immunity against poorly immunogenic tumors by immunization with dendritic cell-tumor fusion vaccines. *J Immunol.* 1998; 161. 5516-5524.
173. Wang. Human tumor antigens: implications for cancer vaccine development. *J Mol Med.* 1999; 77. 640-655.
174. Wang. The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity. *Trends Immunol.* 2001; 22. 269-276.
175. R. F. Wang, P. F. Robbins, Y. Kawakami, X. Q. Kang and S. A. Rosenberg. Identification of a gene encoding a melanoma tumor antigen recognized by HLA-A31-restricted tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med.* 1995; 181. 799-804.
176. R. F. Wang, X. Wang, A. C. Atwood, S. L. Topalian and S. A. Rosenberg. Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen. *Science.* 1999; 284. 1351-1354.
177. R. A. Wilcox, A. I. Chapoval, K. S. Gorski, M. Otsuji, T. Shin, D. B. Flies, K. Tamada, R. S. Mittler, H. Tsuchiya, D. M. Pardoll and L. Chen. Cutting edge: Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells. *J Immunol.* 2002; 168. 4262-4267.

178. Winter, H. M. Hu, W. J. Urban and B. A. Fox. Tumor regression after adoptive transfer of effector T cells is independent of perforin or Fas ligand (APO-1L/CD95L). *J Immunol.* 1999; 163. 4462-4472.
179. Wolfel, M. Hauer, J. Schneider, M. Serrano, C. Wolfel, E. Klehmann-Hieb, E. De-Plaen, T. Hankeln, K. H. Meyer-zum-Buschenfelde and D. Beach. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science.* 1995; 269. 1281-1284.
180. Wolfers, A. Lozier, G. Raposo, A. Regnault, C. Thery, C. Masurier, C. Flament, S. Pouzieux, F. Faure, T. Tursz, E. Angevin, S. Amigorena and L. Zitvogel. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med.* 2001; 7. 297-303.
181. Y. Woo, H. Yeh, C. S. Chu, K. Schlienger, R. G. Carroll, J. L. Riley, L. R. Kaiser and C. H. June. Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol.* 2002; 168. 4272-4276.
182. S. Yang, G. P. Linette, S. Longerich and F. G. Haluska. Antimelanoma activity of CTL generated from peripheral blood mononuclear cells after stimulation with autologous dendritic cells pulsed with melanoma gp100 peptide G209-2M is correlated to TCR avidity. *J Immunol.* 2002; 169. 531-539.
183. Yee, J. A. Thompson, P. Roche, D. R. Byrd, P. P. Lee, M. Piepkorn, K. Kenyon, M. M. Davis, S. R. Riddell and P. D. Greenberg. Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo. *J Exp Med.* 2000; 192. 1637-1644.
184. Zeng. MHC class II-restricted tumor antigens recognized by CD4+ T cells: new strategies for cancer vaccine design. *J Immunother.* 2001; 24. 195-204.
185. R. M. Zinkernagel. On cross-priming of MHC class I-specific CTL: rule or exception? *Eur J Immunol.* 2002; 32. 2385-2392.
186. Zitvogel, B. Couderc, J. I. Mayordomo, P. D. Robbins, M. T. Lotze and W. J. Storkus. IL-12-engineered dendritic cells serve as effective tumor vaccine adjuvants in vivo. *Ann N Y Acad Sci.* 1996; 795. 284-293.
187. Zitvogel, J. I. Mayordomo, T. Tjandrawan, A. B. DeLeo, M. R. Clarke, M. T. Lotze and W. J. Storkus. Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J Exp Med.* 1996; 183. 87-97.
188. Zur-Hausen. Cervical carcinoma and human papillomavirus: on the road to preventing a major human cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93. 252-253.