



Inmunología

www.elsevier.es/inmunologia



Revisión

Células dendríticas II: utilización clínica en vacunación antitumoral

Manuel Sureda*, M. Begoña Vázquez y Joseba Rebollo

Plataforma de Oncología, USP Hospital San Jaime, Torrevieja, Alicante, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 9 de mayo de 2011

Aceptado el 21 de octubre de 2011

On-line el 17 de enero de 2012

Palabras clave:

Inmunoterapia

Células dendríticas

Carcinoma de próstata

Sipuleucel-T

Keywords:

Immunotherapy

Dendritic cells

Prostate cancer

Sipuleucel-T

R E S U M E N

La inmunoterapia contra el cáncer busca obtener un beneficio terapéutico a través de la movilización del sistema inmune. Puede hacerse de forma activa, mediante vacunación.

Las células dendríticas (CD) ejercen un papel central en la respuesta inmune. El tipo de respuesta inmune generada depende de la regulación ejercida por las CD. La generación de CD ex vivo y la carga de las mismas con antígeno ha permitido utilizarlas con éxito en la vacunación para mejorar la inmunidad de pacientes con cáncer e infección crónica por HIV, dando así la prueba preliminar de la validez de las vacunas con CD. Nueve preparados para vacunación antitumoral en pacientes han alcanzado los estudios fase III. De ellos, únicamente el sipuleucel-T, para tratamiento del carcinoma de próstata diseminado independiente de andrógenos que utiliza CD, ha recibido la aprobación preliminar de la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos.

© 2011 Sociedad Española de Inmunología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

DENDRITIC CELLS II: Clinical use for antitumor vaccination

A B S T R A C T

Cancer immunotherapy seeks to mobilize the patient's immune system for therapeutic benefit. It can be active, as in vaccination. Dendritic cells play a central role in immune response. The type of immune response obtained depends on the regulation by the DC. Ex vivo generated and antigen-loaded DC have been used as vaccines to improve immunity in patients with cancer and chronic HIV infection, thus providing a "proof-of-principle" that DC vaccines can work. Nine preparations for antitumoral vaccination in patients have achieved phase III studies. Between them, only sipuleucel-T, for the treatment of metastatic hormone refractory prostate cancer, using DC, has received a preliminary approval of the FDA of the United States.

© 2011 Sociedad Española de Inmunología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: manuel.sureda@usphospitales.com (M. Sureda).

0213-9626/\$ – see front matter © 2011 Sociedad Española de Inmunología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

doi:10.1016/j.inmuno.2011.10.002

Introducción

La inmunoterapia contra el cáncer busca obtener un beneficio terapéutico a través de la movilización del sistema inmune. Puede ser pasiva mediante la transferencia al paciente de células citotóxicas activadas como los *tumor infiltrating lymphocytes* (TIL) o las *lymphokine-activated killer* (LAK) o de anticuerpos, o activa mediante vacunación¹.

Desde las observaciones de Cohn y Steinman y Steinman et al, se conoce el papel central de las células dendríticas (CD) en la respuesta inmune^{2,3}. Las CD maduras presentan una morfología característica, definida por la presencia de numerosos procesos membranosos que pueden tomar la forma de dendritas, pseudópodos o velos. Contienen altas concentraciones de estructuras intracelulares relacionadas con el procesamiento de antígenos, como endosomas, lisosomas o los gránulos de Birbeck de las células de Langerhans de la epidermis. Están presentes en tejidos y órganos linfoides y no linfoides, así como circulantes en linfa aferente y sangre periférica. Reciben diferentes nombres según la ubicación, pero guardan características y funciones similares entre sí.

Los diferentes tipos de CD y sus correspondientes aspectos morfológicos y funcionales básicos se han descrito ampliamente en la primera parte de esta revisión.

Algunas observaciones sugieren que las CD pueden eliminar directamente células tumorales⁴. Por otro lado, constituyen las células presentadoras de antígenos más potentes que se conocen, superando a los macrófagos o los linfocitos B. Pueden activar linfocitos T citotóxicos o inducir la estimulación de linfocitos T reguladores, dependiendo así el tipo de respuesta inmune generada del control de las CD. Además de su papel central en la activación de los linfocitos T, las CD interactúan directamente con células NK, células NKT y linfocitos B.

A pesar de que la aparición clínica del cáncer se asocia habitualmente con condiciones del medio que dificultan la activación de CD, hay estudios que sugieren que pacientes con cantidades elevadas de CD en su tumor viven más que los que tienen cantidades escasas de las mismas⁵.

Las estrategias necesarias en inmunoterapia han de limitar la generación o la función supresora de los linfocitos T reguladores, evitando la aparición de tolerancia, y favorecer el desarrollo de CD4+ *helper* y T citotóxicos¹, promoviendo la reactividad inmune antitumoral.

La capacidad de las CD para generar respuestas antitumorales *in vivo* ha sido documentada en modelos animales y en estudios clínicos humanos¹. Además en los últimos años, diferentes trabajos han establecido una clara relación entre la efectividad de la radioterapia o determinados citostáticos y su capacidad para desencadenar respuestas antitumorales mediadas por el sistema inmune del paciente e inducidas a través de sus CD⁵⁻⁸. Se han estudiado y definido algunos de los mecanismos moleculares instaurados en el proceso de daño celular, críticos para la adecuada activación de la respuesta, como la exposición de calreticulina, *heat shock protein* 90 (HSP90), o *high-mobility group box 1 protein* (HMGB1)⁵.

Obtención y preparación de las CD

La mayoría de los estudios referidos en la literatura especializada implican el aislamiento de CD o sus precursores, seguido de la carga con antígenos tumorales y la posterior infusión de estas CD portadoras de antígenos.

En humanos se intentó inicialmente la obtención de precursores de CD de sangre periférica mediante centrifugación en gradiente de densidad, método poco útil por la baja frecuencia de los mismos (constituyen menos del 2% de las células mononucleares circulantes).

La introducción de la técnica de aféresis ha permitido mejorar notablemente el rendimiento del proceso, al obtenerse cifras elevadas de precursores que pueden ser manipulados y expandidos *ex vivo*. Si los precursores obtenidos son monocitos se seleccionan por inmunoselección, elutriación o adherencia, diferenciándose posteriormente en presencia de factor estimulador de colonias de linfocitos y macrófagos (GM-CSF) e interleuquina 4 (IL4).

Para la obtención de células CD34+, otra fuente de precursores, puede utilizarse la médula ósea o sangre de cordón umbilical. También pueden obtenerse mediante aféresis. En este caso cabe efectuar previamente una movilización de las mismas desde la médula ósea hacia sangre circulante con citoquinas como el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) para aumentar el rendimiento de la aféresis. Finalmente se cultivan con GM-CSF, factor de necrosis tumoral (TNF), IL 6, IL 1b y prostaglandina E2 independientemente del modo de obtención.

La exposición al antígeno puede hacerse siguiendo diferentes estrategias. La más frecuente es la incubación de las CD con péptidos derivados de proteínas tumorales restringidos por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y con epítomos definidos para la estimulación de linfocitos T, principalmente CD8+. Se han utilizado para ello péptidos derivados de antígenos tumorales como MART-1, MAGE-1, gp100, CEA, PSMA o HER-2/neu⁹⁻¹¹. Esta metodología se basa en algoritmos predictivos que identifican péptidos con alta afinidad por la molécula de antígeno leucocitario humano (HLA), más comúnmente con los alelos HLA*A0201. Tiene las ventajas de evitar procesos autoinmunes y el no requerimiento de células o tejido tumoral. Sus principales inconvenientes son la necesidad de conocer los epítomos tumorales y la posibilidad de aplicarla únicamente a los pacientes cuyo HLA sea el adecuado. Para evitar los mecanismos de escape tumoral, es frecuente el uso de varios péptidos simultáneamente, en lugar de un único péptido.

En caso de que el epítomo no esté definido, se puede utilizar la proteína tumoral completa. De esta forma se evita la restricción por un HLA concreto. Se han utilizado diferentes métodos para introducir las proteínas solubles en interior de las CD, como microinyección¹², fusión mediada por liposomas¹³, electroporación¹⁴, o a través de su unión a otras moléculas que faciliten su transporte, como pueden ser fragmentos de receptor de la porción Fc de las inmunoglobulinas¹⁵, toxinas bacterianas¹⁶ o proteínas víricas¹⁷.

Con el objeto de intentar inducir una respuesta dirigida contra el mayor número de antígenos tumorales posibles, se han desarrollado estrategias en las que se cargan las CD con

todos los antígenos derivados de las células tumorales completas; esto también reduce la posibilidad del escape tumoral que puede ocurrir si la vacunación se hace con un pequeño número de antígenos. La congelación repetida o la sonicación de las células tumorales generan extractos que pueden aplicarse en este tipo de protocolos^{18,19}. Otra opción es el uso de células tumorales a las que previamente se ha inducido apoptosis²⁰ o necrosis²¹. Se han definido ya algunos de los mecanismos moleculares instaurados en el proceso de daño celular, críticos para la adecuada activación de la respuesta, mencionados anteriormente.

Una estrategia más reciente emplea la fusión de las CD con las células tumorales mediante técnicas de electroporación²² o polietilenglicol²³. La incorporación en un hibridoma del genoma completo de ambas células parece favorecer el procesamiento y exposición a los linfocitos T de todos los antígenos tumorales susceptibles de inducir activación inmune.

Por último, existen técnicas en las que se introduce en la CD el ARN^{24,25} o ADN^{26,27} que codifican la proteína antigénica o sus fragmentos, para que sea la propia maquinaria celular la encargada de producir y procesar los antígenos tumorales. Así se consigue su expresión selectiva y posterior presentación en la membrana unidos al MHC.

La cuestión de cuál es el momento de maduración óptimo para la utilización de las CD en el proceso de vacunación permanece abierta. Con la maduración las CD adquieren una gran motilidad y pierden su capacidad de capturar antígenos al disminuir la expresión de receptores de fagocitosis y endocitosis. Las CD maduras optimizan el procesamiento de antígenos aumentando la expresión de los componentes de la maquinaria enzimática responsable del proceso, y adquieren la capacidad de presentar antígenos y estimular a los linfocitos T tras el incremento en la expresión de moléculas del MHC y de moléculas de adhesión y co-estimulación.

Aunque el paradigma general es que las CD maduras son superiores a las inmaduras en la inducción de respuesta, no se conoce con certeza si la maduración se ha de inducir *in vitro* o *in vivo*. La comparación de datos provenientes de 32 estudios con más de 500 pacientes que utilizaban CD maduras o inmaduras, e incluso diferentes combinaciones de citoquinas para la maduración, no reveló diferencias significativas en términos de respuesta clínica u objetiva a favor de uno u otro grupo de pacientes²⁸.

Vacunación antitumoral basada en CD en pacientes. Datos preliminares

La generación de CD *ex vivo* y la carga de las mismas con antígeno ha permitido utilizarlas con éxito en la vacunación para mejorar la inmunidad de pacientes con cáncer¹ e infección crónica por HIV¹, dando así la prueba preliminar de la validez de las vacunas con CD.

La ruta de administración de las CD constituye un punto clave en el proceso de vacunación. Se han administrado por vía subcutánea, intradérmica, intraganglionar²⁹, intralinfática e intravenosa^{30,31}, comprobándose diferentes patrones de distribución en el organismo y tipo de respuesta inmune inducida dependiendo de la ruta empleada. No se ha definido todavía una ruta inequívocamente superior a las otras,

postulándose la administración combinada a través de diferentes rutas como la opción que probablemente permita llegar a mayor número de localizaciones, con activación de mayor número de vías de la inmunidad^{32,33}.

Se han definido 4 objetivos a conseguir mediante la vacunación para optimizar la inmunidad y mejorar los resultados clínicos: a) inducción de inmunidad celular extensa, con linfocitos T citotóxicos específicos contra diferentes antígenos tumorales; b) capacidad de generar rápidamente células efectoras que sean multifuncionales, p. ej. capaces de secretar citoquinas y lisar células tumorales; c) generación de memoria inmune antitumoral antígeno-específica, y d) disminución de la expansión y función de los linfocitos T reguladores antígeno-específicos para el tumor¹. Algunos protocolos clínicos han conseguido ya aproximarse significativamente a dichos objetivos³⁴.

Las vacunas basadas en CD se han utilizado en diferentes tumores. Los casos de melanoma constituyen la gran mayoría, habiéndose comprobado la regresión mantenida de tumores metastásicos en una pequeña fracción de pacientes¹. Los diversos estudios han sido recogidos en trabajos de revisión previos^{28,32,35-37}. Sin embargo, el tratamiento del carcinoma de próstata diseminado independiente de andrógenos ha sido el campo en el que la relevancia clínica de los hallazgos obtenidos ha alcanzado hasta el momento mayor significación.

Utilización clínica de las vacunas basadas en CD

Los estudios de vacunación publicados que incluyen pacientes de melanoma son muy heterogéneos en sus características, lo que impide un metaanálisis de los mismos. Pese a ello, dejan abierta la cuestión de por qué las respuestas clínicas son tan escasas y qué se puede hacer para mejorar los resultados. La solución probablemente radica en la optimización de la metodología de preparación y las formas de administración de las CD, así como en la utilización conjunta con otros agentes que potencien sus efectos, como la linfo-deplección con quimio y/o radioterapia previa a la administración de la vacuna o la combinación con anticuerpos anti-CTLA4³².

Nueve preparados para vacunación antitumoral en pacientes, de diferente composición y dirigidos contra diversos antígenos y tumores, han alcanzado los estudios fase III tras completar las evaluaciones preclínicas y los estudios fase I y II. De ellos, únicamente el sipuleucel-T (APC 8015, Provenge®, Dendreon Corp., Seattle WA), para tratamiento del carcinoma de próstata diseminado independiente de andrógenos, ha recibido la aprobación preliminar de la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos^{38,39}. Si bien en el producto de aféresis no se efectúa ninguna selección celular, las células linfo-mononucleares extraídas son cuantificadas para determinar el número de CD54+ obtenidas a fin de garantizar un número mínimo de las mismas. Aunque el CD54 no es un marcador específico de CD, es común a células presentadoras de antígenos autólogas, que se expresa durante el proceso de maduración, lo que lo convierte en especialmente útil para la cuantificación de precursores. Posteriormente, son cargadas *ex vivo* con una proteína de fusión recombinante (PA2024), que incluye las moléculas completas de la fosfatasa ácida

prostática (un antígeno tumoral de origen prostático, FAP) y el GM-CSF, necesario para la diferenciación y maduración de las CD⁴⁰. Ambas moléculas están unidas por un enlace glicina-serina entre el extremo carboxi de la FAP y el extremo amino del GM-CSF.

La vacuna se prepara a partir de células CD54+ obtenidas de la sangre periférica del paciente mediante aféresis. Una vez completada la aféresis, el producto celular es remitido a Dendreon para su manipulación. Tras 40 horas aproximadamente de incubación con la proteína recombinante se lavan las células para retirar la PA2024 libre y se suspende la preparación en 250 cc de lactato de Ringer, siendo reinfundidas al paciente a las 48 horas de la aféresis.

La FAP constituye un antígeno específico de órgano y, por lo tanto, específico del tumor. La porción GM-CSF de la PA2024 se une a la CD a través del receptor correspondiente, exponiendo a continuación la porción FAP en el contexto de las moléculas de membrana expresadas por la CD. Así se promueve la generación de inmunidad específica contra la FAP mediada por linfocitos T. Pese a tratarse de un solo antígeno, puede inducirse una respuesta inmune polivalente si los linfocitos reconocen más de un epítipo.

Los estudios de fase I y II revelaron una disminución de los niveles de antígeno prostático específico (PSA) de más del 50% en el 10% de los pacientes con carcinoma de próstata independiente de andrógenos en progresión. En un paciente se constató una respuesta objetiva. La comparación con controles históricos objetivó un alargamiento del tiempo a progresión en aquellos pacientes que presentaron respuesta inmune anti-FAP⁴¹. En otro estudio fase II en pacientes con carcinoma de próstata dependiente de andrógenos, en progresión bioquímica (elevación del PSA) tras tratamiento local de intención radical (cirugía o radioterapia) se observó disminución moderada del PSA (menor del 50%) en 7 de 18 pacientes (39%). Trece de los 18 pacientes mostraron un alargamiento del tiempo de doblamiento del PSA, con una mediana de incremento del 62% (4,9 meses antes del tratamiento vs. 7,9 meses tras el mismo)⁴².

En los primeros estudios se administraba el sipuleucel-T a intervalo mensual y posteriormente cada 3 semanas. También se administraban inyecciones subcutáneas periódicas de PA2024 como refuerzo inmune una vez finalizadas todas las dosis de sipuleucel-T. Al avanzar el conocimiento de la pauta se definió como el esquema más adecuado la administración bisemanal por un total de 3 dosis, sin inyecciones de PA2024, y ya se utilizó así en los últimos protocolos.

Los 2 estudios iniciales de fase III se diseñaron para detectar un incremento del tiempo a progresión de 4 a 7,7 meses, doble ciego, aleatorizados 2:1, contra placebo, en pacientes con carcinoma de próstata independiente de andrógenos en progresión, asintomáticos. Aquellos que recibían tratamiento con bifosfonatos o análogos de la hormona liberadora de hormona luteinizante continuaron dicha terapia. Los pacientes fueron seguidos hasta el fallecimiento o durante 36 meses⁴³.

No se observaron diferencias significativas en el tiempo a progresión. Sin embargo, aunque no fuera un objetivo específico de los estudios, la mediana de supervivencia global fue de 4,5 meses mayor en el brazo de sipuleucel-T, con una estimación de hazard ratio de 1,71 ($p=0,01$). Pese a la falta de

significación estadística en el análisis del tiempo a progresión, las curvas de ambos brazos en la gráfica de Kaplan-Meier se separaban a partir de los 3 meses de la aleatorización. En la gráfica de supervivencia actuarial desde los 10 meses de seguimiento se separaban ambas curvas y permanecían separadas.

A partir de estos datos el Comité Asesor de Terapia Génica, Celular y Tisular de la FDA recomendó a la agencia la aprobación del tratamiento con sipuleucel-T, otorgándose una primera aprobación y requiriendo a la empresa la investigación de nuevos datos sobre eficacia y el proceso de fabricación.

Recientemente se han publicado los resultados definitivos del estudio *Immunotherapy for Prostate Adenocarcinoma Treatment* (IMPACT). Al igual que los anteriores se trataba de un estudio doble ciego, aleatorizado 2:1, contra placebo, en pacientes con carcinoma de próstata independiente de andrógenos en progresión. A diferencia de aquellos, el objetivo primario era valorar el impacto en supervivencia, constituyendo el impacto en el tiempo a progresión el objetivo secundario.

Se incluyeron un total de 512 pacientes (341 en el brazo de sipuleucel-T y 171 en el brazo control). La mediana de supervivencia fue 4,1 meses mayor en el grupo tratado que en el control (25,8 vs. 21,7 meses, $p=0,02$). El efecto en la supervivencia se mantuvo en todos los subgrupos de pacientes, incluyendo aquellos que presentaban características conocidas de mal pronóstico como altos niveles de PSA, elevación de LDH y/o fosfatasa alcalina, múltiples metástasis óseas, índice de Gleason alto, estado funcional afectado o presencia de dolor. Un paciente en el grupo tratado presentó respuesta parcial objetiva. No se observaron diferencias significativas en el tiempo a progresión, ni objetiva ni clínica, entre ambos grupos.

El análisis de parámetros inmunes reveló que los pacientes en el grupo de sipuleucel-T que alcanzaban un título de anticuerpos contra PA0224 o FAP superior a 400 tras el inicio del tratamiento presentaban una supervivencia significativamente mayor que los que se mantenían por debajo de dicho título. La inducción de inmunidad celular se valoró mediante proliferación de linfocitos T expuestos al antígeno y se midió con timidita tritiada. No se detectaron diferencias significativas en supervivencia entre los pacientes tratados que presentaban proliferación de linfocitos T tras la exposición a PA0224 o FAP y los que no la presentaban⁴⁴.

En un intento de complementar la actividad del sipuleucel-T, se llevó a cabo un estudio con administración simultánea de bevacizumab hasta progresión. El efecto esperado de este agente era la potenciación de la inmunomodulación por su antagonismo del *vascular endothelial growth factor* (VEGF), sustancia producida por el tumor y con capacidad de interferir la actividad de las CD, además de promover la neoangiogénesis tumoral. El estudio incluyó 22 pacientes con carcinoma de próstata dependiente de andrógenos, en progresión bioquímica (elevación del PSA) tras tratamiento local de intención radical (cirugía o radioterapia). Se observó disminución moderada del PSA (menor del 50%) en 7 de 18 pacientes (39%). Nueve de 21 pacientes evaluables mostraron descenso del PSA. Se observó también un alargamiento del tiempo de doblamiento del PSA (mediana de 6,9 meses antes del tratamiento vs. 12,7 meses tras el mismo, $p=0,01$). En todos los

pacientes se demostró la presencia de reactividad inmune contra PA2024 tras el tratamiento. Aunque los datos son atractivos, el tamaño y las características del estudio no permiten extraer conclusiones, precisando confirmación en un estudio más amplio⁴⁵.

Conclusiones

La inmunoterapia contra el cáncer busca obtener un beneficio terapéutico a través de la movilización del sistema inmune. Las CD ejercen un papel central en la respuesta inmune. No son una única estirpe celular, existiendo diferentes tipos de CD con sus correspondientes aspectos morfológicos y funcionales. Las CD pueden eliminar directamente células tumorales, activar linfocitos T citotóxicos o inducir la estimulación de linfocitos T reguladores. El tipo de respuesta inmune generada depende de la regulación ejercida por las CD.

Se ha establecido una clara relación entre la efectividad de la radioterapia o determinados citostáticos y su capacidad para desencadenar respuestas antitumorales mediadas por el sistema inmune del paciente e inducidas a través de sus CD.

La utilización experimental y clínica de las CD en protocolos de vacunación implica el aislamiento de CD o sus precursores, seguido de la carga con antígenos tumorales y la posterior infusión de estas CD portadoras de antígenos. Para los 3 pasos existen diferentes posibilidades, sin que hasta el momento ninguna haya demostrado aisladamente datos definitivos de superioridad sobre las demás.

La utilización con éxito de las CD en la vacunación para mejorar la inmunidad de pacientes con cáncer e infección crónica por HIV ha dado la prueba preliminar de su validez. Se han definido 4 objetivos a conseguir mediante la vacunación para optimizar la inmunidad y mejorar los resultados clínicos: a) inducción de inmunidad celular extensa, con linfocitos T citotóxicos específicos contra diferentes antígenos tumorales; b) capacidad de generar rápidamente células efectoras que sean multifuncionales, p. ej. capaces de secretar citoquinas y lisar células tumorales; c) generación de memoria inmune antitumoral antígeno-específica, y d) disminución de la expansión y función de los linfocitos T reguladores antígeno-específicos para el tumor.

Las vacunas basadas en CD se han utilizado en diferentes tumores. Los casos de melanoma constituyen la gran mayoría, habiéndose comprobado la regresión mantenida de tumores metastásicos en una pequeña fracción de pacientes. Sin embargo, el tratamiento del carcinoma de próstata diseminado independiente de andrógenos ha sido el campo en el que la relevancia clínica de los hallazgos obtenidos ha alcanzado hasta el momento mayor significación. El sipuleucel-T, preparado celular para tratamiento del carcinoma de próstata diseminado independiente de andrógenos, ha recibido la aprobación preliminar de la FDA de los Estados Unidos. Ha demostrado a través de los diferentes ensayos clínicos aumento significativo de la supervivencia en todos los subgrupos de pacientes tratados, sin efecto en el tiempo a progresión. En un intento de mejorar su eficacia hay estudios preliminares de administración conjunta con otros agentes inmunomoduladores.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Palucka AK, Ueno H, Fay J, Banchereau J. Dendritic cells: a critical player in cancer therapy? *J Immunother*. 2008;31:793-805.
2. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice, I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973;137:1142-62.
3. Steinmann RM, Kaplan G, Witmer MD, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice, V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med*. 1979;149:1-16.
4. Bonmort M, Dalod M, Mignot G, Ullrich E, Chaput N, Zitvogel L. Killer dendritic cells: IKDC and the others. *Curr Opin Immunol*. 2008;20:558-65.
5. Melief CJ. Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity*. 2008;29:372-83.
6. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:59-73.
7. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, André F, Tesniere A, Kroemer G. The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *J Clin Invest*. 2008;118:1991-2001.
8. Kepp O, Tesniere A, Zitvogel L, Kroemer G. The immunogenicity of tumor cell death. *Curr Opin Oncol*. 2009;21:71-6.
9. Nestle FO, Aljagac S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med*. 1998;4:328-32.
10. Alters SE, Gadea JR, Sorich M, O'Donoghue G, Talib S, Philip R. Dendritic cells pulsed with CEA peptide induce CEA-specific CTL with restricted TCR repertoire. *J Immunother*. 1998;21:17-26.
11. Tjoa BA, Erickson SJ, Bowes VA, Ragde H, Kenny GM, Cobb OE, et al. Follow-up evaluation of prostate cancer patients infused with autologous dendritic cells pulsed with PSMA peptides. *Prostate*. 1997;32:272-8.
12. Diacumakos EG, Holland S, Pecora P. A microsurgical methodology for human cells in vitro: evolution and applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1970;65:911-8.
13. Poste G, Papahadjopoulos D, Vail WJ. Lipid vesicles as carriers for introducing biologically active materials into cells. *Methods Cell Biol*. 1976;14:33-71.
14. Li Y, Ke Y, Gottlieb PD, Kapp JA. Delivery of exogenous antigen into the major histocompatibility complex class I and class II pathways by electroporation. *J Leukoc Biol*. 1994;56:616-24.
15. Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Théry C, Rescigno M, et al. Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med*. 1999;189:371-80.
16. Haicheur N, Bismuth E, Bosset S, Adotevi O, Warnier G, Lacabanne V, et al. The B subunit of Shiga toxin fused to a tumor antigen elicits CTL and targets dendritic cells to allow MHC class I-restricted presentation of peptides derived from exogenous antigens. *J Immunol*. 2000;165:3301-8.
17. Fawell S, Seery J, Daikh Y, Moore C, Chen LL, Pepinsky B, et al. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:664-8.

18. Fields RC, Shimizu K, Mulé JJ. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:9482-7.
19. Lambert LA, Gibson GR, Maloney M, Durell B, Noelle RJ, Barth Jr RJ. Intranodal immunization with tumor lysate-pulsed dendritic cells enhances protective antitumor immunity. *Cancer Res*. 2001;61:641-6.
20. Hoffmann TK, Meidenbauer N, Dworacki G, Kanaya H, Whiteside TL. Generation of tumor-specific T-lymphocytes by cross-priming with human dendritic cells ingesting apoptotic tumor cells. *Cancer Res*. 2000;60:3542-9.
21. Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med*. 2000;191:423-34.
22. Imura K, Ueda Y, Hayashi T, Itoh T, Shimizu K, Tamai H, et al. Induction of cytotoxic T lymphocytes against human cancer cell lines using dendritic cell-tumor cell hybrids generated by a newly developed electrofusion technique. *Int J Oncol*. 2006;29:531-9.
23. Gong J, Avigan D, Chen D, Wu Z, Koido S, Kashiwaba M, et al. Activation of antitumor cytotoxic T lymphocytes by fusions of human dendritic cells and breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:2715-8.
24. Heiser A, Maurice MA, Yancey DR, Wu NZ, Dahm P, Pruitt SK, et al. Induction of polyclonal prostate cancer-specific CTL using dendritic cells transfected with amplified tumor RNA. *J Immunol*. 2001;166:2953-60.
25. Heiser A, Maurice MA, Yancey DR, Coleman DM, Dahm P, Vieweg J. Human dendritic cells transfected with renal tumor RNA stimulate polyclonal T-cell responses against antigens expressed by primary and metastatic tumors. *Cancer Res*. 2001;61:3388-93.
26. Irvine AS, Trinder PK, Laughton DL, Ketteringham H, McDermott RH, Reid SC, et al. Efficient nonviral transfection of dendritic cells and their use for in vivo immunization. *Nat Biotechnol*. 2000;18:1273-8.
27. Walter E, Dreher D, Kok M, Thiele L, Kiama SG, Gehr P, et al. Hydrophilic poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres for the delivery of DNA to human-derived macrophages and dendritic cells. *J Control Release*. 2001;76:149-68.
28. Engell-Noerregaard L, Hansen TH, Andersen MH, Thor Straten P, Svane IM. Review of clinical studies on dendritic cell-based vaccination of patients with malignant melanoma: assessment of correlation between clinical response and vaccine parameters. *Cancer Immunol Immunother*. 2009;58:1-14.
29. De Vries IJ, Krooshoop DJ, Scharenborg NM, Lesterhuis WJ, Diepstra JH, Van Muijen GN, et al. Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer Res*. 2003;63:12-7.
30. Kyte JA, Mu L, Aamdal S, Kvalheim G, Dueland S, Hauser M, et al. Phase I/II trial of melanoma therapy with dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA. *Cancer Gene Ther*. 2006;13:905-18.
31. Fong L, Brockstedt D, Benike C, Wu L, Engleman EG. Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients. *J Immunol*. 2001;166:4254-9.
32. Lesterhuis WJ, Aarntzen EH, De Vries IJ, Schuurhuis DH, Figdor CG, Adema GJ, et al. Dendritic cell vaccines in melanoma: from promise to proof? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;66:118-34.
33. Adema GJ, De Vries IJ, Punt CJ, Figdor CG. Migration of dendritic cell based cancer vaccines: in vivo veritas? *Curr Opin Immunol*. 2005;17:170-4.
34. Badovinac VP, Messingham KA, Jabbari A, Haring JS, Harty JT. Accelerated CD8+ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination. *Nat Med*. 2005;11:748-56.
35. Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:296-306.
36. Fay JW, Palucka AK, Paczesny S, Dhodapkar M, Johnston DA, Burkeholder S, et al. Long-term outcomes in patients with metastatic melanoma vaccinated with melanoma peptide-pulsed CD34(+) progenitor-derived dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2006;55:1209-18.
37. Palucka AK, Ueno H, Connolly J, Kerneis-Norvell F, Blanck JP, Johnston DA, et al. Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8+ T-cell immunity. *J Immunother*. 2006;29:545-57.
38. Finke LH, Wentworth K, Blumenstein B, Rudolph NS, Levitsky H, Hoos A. Lessons from randomized phase III studies with active cancer immunotherapies-outcomes from the 2006 meeting of the Cancer Vaccine Consortium (CVC). *Vaccine*. 2007;25 Suppl 2:B97-109.
39. Gulley JL, Drake CG. Immunotherapy for prostate cancer: recent advances, lessons learned, and areas for further research. *Clin Cancer Res*. 2011;17:3884-91.
40. Small EJ, Fratesi P, Reese DM, Strang G, Laus R, Peshwa MV, et al. Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells. *J Clin Oncol*. 2000;18:3894-903.
41. Burch PA, Breen JK, Buckner JC, Gastineau DA, Kaur JA, Laus RL, et al. Priming tissue-specific cellular immunity in a phase I trial of autologous dendritic cells for prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2000;6:2175-82.
42. Beinart G, Rini BI, Weinberg V, Small EJ. Antigen-presenting cells 8015 (Provenge) in patients with androgen-dependent, biochemically relapsed prostate cancer. *Clin Prostate Cancer*. 2005;4:55-60.
43. Small EJ, Schellhammer PF, Higano CS, Redfern CH, Nemunaitis JJ, Valone FH, et al. Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24:3089-94.
44. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*. 2010;363:411-22.
45. Rini BI, Weinberg V, Fong L, Conry S, Herschberg RM, Small EJ. Combination immunotherapy with prostatic acid phosphatase pulsed antigen-presenting cells (provenge) plus bevacizumab in patients with serologic progression of prostate cancer after definitive local therapy. *Cancer*. 2006;107:67-74.