

VACCINOTERAPIA NEI DISORDINI LINFOPROLIFERATIVI

M. Massaia, A. Pileri

Divisione di Ematologia dell'Universita' di Torino,

Azienda Ospedaliera San Giovanni Battista, Torino, Italy

Razionale e premesse

Le basi dell'immunita' adottiva sono la diversita' recettoriale, la memoria immunologica e la capacita' di discriminare il «self» dal «non-self». La vaccinazione profilattica contro gli agenti infettivi sfrutta queste proprieta' e rappresenta il classico esempio di manipolazione efficace del sistema immunitario. La vaccinazione a scopo protettivo contro le cellule tumorali cerca di sfruttare le stesse proprieta' dell'immunita' adottiva, ma i progressi finora non sono stati altrettanto rapidi. La definizione molecolare degli antigeni tumore-specifici, la conoscenza dei meccanismi che regolano l'attivazione dei linfociti T e dei meccanismi di escape tumorale hanno consentito negli ultimi anni la messa a punto di strategie vacciniche piu' razionali. Gli scopi specifici di tali strategie sono quelli di rompere la tolleranza immunologica, che protegge nell'ospite le cellule tumorali, ed attivare in modo specifico i meccanismi effettori dell'immunita' adottiva. Il risultato finale dovrebbe essere quello di generare una risposta immune tumore-specifica, protettiva e di lunga durata.

Il mieloma multiplo (MM) e' tuttora una neoplasia ad esito fatale con una sopravvivenza mediana inferiore ai 4 anni (1,2). La chemioterapia ad alte dosi seguita dal trapianto autologo con cellule midollari o progenitori emopoietici circolanti (PBPC) ha

sicuramente aumentato la percentuale di remissioni complete (CR) e la durata della remissione stessa (3-5). Ciononostante, la presenza di cellule tumorali residue e' invariabilmente documentata nella fase di remissione, anche dopo procedure ripetute di autotrapianto (6). La conseguenza e' che tutti i pazienti con MM sono destinati progressivamente a ricadere e la sopravvivenza globale e' finora solo lievemente migliorata. Un problema analogo e' incontrato nel trattamento dei linfomi, dal momento che le terapie convenzionali non sono in grado di curare una percentuale rilevante di pazienti. In particolare, e' tuttora problematico il trattamento ottimale dei linfomi a basso grado di malignita' dove sono stati tentati approcci sia conservativi che aggressivi (7,8). La maggior parte delle terapie sistemiche sono effettivamente in grado di indurre un'elevata percentuale di CR e cicli piu' intensivi, quando applicati a categorie selezionate di pazienti ad alto rischio, hanno migliorato la durata della remissione libera da malattia. Rimane il problema della ricaduta che indica come spesso non ci sia stata eradicazione della malattia. Sono quindi state applicate le procedure trapiantologiche anche ai linfomi a basso grado. La chemioterapia ad alte dosi seguita dall'infusione di PBPC e' in grado di indurre una remissione molecolare in circa il 70% dei pazienti con linfoma follicolare ed il 12% dei linfomi mantellari (9). Tuttavia, anche in questo caso non e' stato possibile identificare una fase di plateau nella curva di sopravvivenza libera da malattia e rimane da essere formalmente provato, in studi randomizzati, la superiorita' di tali strategie sulla sopravvivenza globale a lungo termine. Infine, c'e' da tenere conto che una quota rilevante di pazienti con linfoma a basso grado non ottiene la remissione molecolare anche dopo autotrapianto. La persistenza di malattia minima residua, identificata a livello molecolare

con metodiche di PCR, e' correlata con una prognosi peggiore perche' la ricaduta e' piu' probabile, piu' precoce ed i trattamenti di salvataggio meno efficaci.

Una possibilita' per cercare di migliorare le prospettive cliniche dei pazienti con MM e linfoma a basso grado potrebbe essere quella di prolungare la durata della fase di remissione inducendo una risposta immune specifica contro le cellule tumorali residue. I vaccini tumorali hanno effettivamente questa potenzialita', soprattutto in fase di malattia minima residua, quando un'ulteriore intensificazione della terapia non e' generalmente di alcun beneficio al paziente, sia per lo sviluppo di farmacoresistenza, sia per gli effetti tossici collaterali.

Il MM ed i linfomi B sono costituiti da espansione clonali di cellule linfoidi che hanno riarrangiato i geni delle immunoglobuline. Ogni immunoglobulina contiene degli epitopi (che coincidono generalmente con le sequenze di massima variabilita' deputate al riconoscimento antigenico) che possono essere riconosciuti dal sistema immunitario dell'ospite e che sono definiti singolarmente idiotipi e collettivamente idiotipo. L'idiotipo e' espresso in modo cosi' specifico da ogni linfocita B che e' ritrovabile solo ed esclusivamente nella sua progenie. In questo senso, l'idiotipo espresso da linfociti B tumorali puo' essere considerato come un marker tumore-specifico ed utilizzato come bersaglio di una risposta immune tumore-specifica. Modelli animali hanno dimostrato che l'uso di apteni, come la KLH, e di adiuvanti o citochine, come GM-CSF e IL-2, aumentano notevolmente l'immunogenicit  dell'idiotipo che diventa in grado di generare una risposta immune capace di proteggere l'animale dall'esposizione successiva a cellule tumorali esprimenti quel dato idiotipo (11). Sulla base di questi dati sperimentali, i vaccini idiotipici

sono stati introdotti nella clinica e sono stati utilizzati nei pazienti con linfoma a basso grado e nei pazienti con MM.

La vaccinazione idiotipica nei linfomi

Il primo studio di vaccinazione idiotipica è stato condotto in 9 pazienti che si trovavano in CR o in remissione parziale. Essi sono stati immunizzati mediante somministrazioni sottocutanee di idiotipo autologo coniugato alla KLH ed emulsionato in un adiuvante immunologico (12). È stata documentata la generazione di una risposta immune (umorale e/o cellulare) anti-idiotipo in 7/9 pazienti. Due pazienti che presentavano delle localizzazioni clinicamente evidenti prima della vaccinazione hanno mostrato una riduzione delle localizzazioni stesse. Questi risultati sono stati confermati in uno studio successivo che ha coinvolto 41 pazienti, inizialmente trattati con chemioterapia convenzionale (13). Questi pazienti sono stati trattati con somministrazioni sottocutanee di idiotipo autologo coniugato alla KLH ed emulsionato in un adiuvante immunologico. Circa il 50% dei pazienti ha generato una risposta immune idiotipo-specifica. La durata mediana della sopravvivenza libera da malattia è risultata significativamente aumentata rispetto ad un gruppo storico di controllo e ciò si è tradotto in un vantaggio in termini di sopravvivenza. Questo è il primo studio che dimostra come la vaccinazione idiotipica sia in grado di produrre un beneficio clinico nei linfomi a basso grado, anche se sono necessari studi prospettici randomizzati per una dimostrazione formale. Non è stato possibile valutare in modo adeguato l'effetto citoreducente sulla massa tumorale, in quanto la

maggior parte dei pazienti si trovava già in remissione. Inoltre, il monitoraggio immunologico non era specificatamente diretto a valutare la generazione di una risposta citotossica tumore-specifica. E' attualmente in corso uno studio, condotto dal Dr. L. Kwak presso il NCI di Bethesda, il cui scopo e' appunto quello di valutare la capacita' dei vaccini idiotipici di indurre dei linfociti T citotossici in grado di lisare le cellule tumorali autologhe ed ottenere l'eradicazione della malattia *in vivo*. Risultati preliminari dimostrano che la somministrazione sottocutanea di idiotipo autologo, coniugato a KLH in presenza di GM-CSF come immunoadiuvante, e' effettivamente in grado di indurre dei linfociti citotossici tumore-specifici e di eliminare dal sangue periferico le cellule tumorali residue. Questo studio e' condotto in pazienti con linfoma follicolare che si trovano in remissione dopo chemioterapia intensiva e la malattia minima residua e' monitorata mediante PCR.

Lo sviluppo di strategie immunoterapiche nei linfomi ha anche preso in considerazione l'uso delle cellule dendritiche (DC), nella convinzione che le APC piu' efficienti siano anche quelle in grado di indurre le risposte anti-tumorali piu' efficienti. Modelli sperimentali murini hanno dimostrato che e' possibile indurre un'immunita' specifica anti-idiotipo immunizzando gli animali con DC pulstate con l'idiotipo (14). La fattibilita' ed efficacia di tale approccio e' stata quindi valutata nei pazienti con linfoma (15). Sono stati studiati 4 pazienti affetti da linfoma follicolare che presentavano malattia residua dopo chemioterapia convenzionale. Essi sono stati sottoposti a 3 infusioni di DC autologhe, purificate direttamente dal sangue periferico, le quali sono state pulstate con l'idiotipo autologo e quindi reinfuse endovena. All'infusione di DC sono quindi seguite 5 somministrazioni sottocutanee di coniugato Id/KLH. Tutti i pazienti hanno sviluppato

una risposta T idiotipo-specifica ed in tutti i casi e' stata osservata una riduzione della massa tumorale.

Vaccinazione idiotipica nel MM

In uno studio pilota sono stati studiati 5 pazienti con MM i quali sono stati ripetutamente sottoposti a somministrazioni sottocutanee di idiotipo autologo precipitato in una sospensione di fosfato di alluminio come adiuvante (16). Quattro pazienti non erano mai stati trattati in precedenza, mentre il quinto si trovava in una fase di remissione parziale stabile dopo chemioterapia convenzionale. Il monitoraggio immunologico ha dimostrato che 3/5 pazienti hanno generato risposte umorali e cellulari idiotipo-specifiche, anche se di intensita' modesta e di durata breve. Lo stesso gruppo svedese ha quindi cercato di perfezionare la formulazione vaccinica nell'intento di indurre una risposta cellulare anti-idiotipo piu' efficace e duratura. Il protocollo e' stato quindi applicato ai MM in fase iniziale, perche' nel sangue periferico di questi pazienti e' presente una quota di linfociti T idiotipo-reattivi potenzialmente in grado di essere reclutati dal vaccino (17). La maggior parte di questi linfociti producono citochine Th1 a seguito della stimolazione *in vitro* con l'idiotipo autologo, mentre nei MM in stadio avanzato prevalgono i linfociti Th2. Si e' quindi ritenuto opportuno vaccinare nel momento in cui la frequenza di linfociti T in grado di sviluppare una risposta citotossica idiotipo-specifica fosse piu' alta. In questo studio, i pazienti hanno ricevuto una serie di somministrazioni sottocutanee di idiotipo autologo precipitato in fosfato di alluminio associato a GM-CSF ed e' stata dimostrato che tutti i pazienti hanno generato delle risposte cellulari idiotipo-specifiche ben documentabili

e di lunga durata. In un caso, e' stata anche osservata una diminuzione della componente monoclonale sierica a seguito della vaccinazione (18).

Anche presso la nostra Istituzione e' stata messo a punto un protocollo di vaccinazione basato sull'uso di idiotipo autologo coniugato a KLH che viene somministrato per via sottocutanea in presenza di GM-CSF o IL-2 come immunoadiuvanti. Sono stati inizialmente trattati 8 pazienti in recidiva o con malattia resistente ed abbiamo confermato che il trattamento e' ben tollerato e puo' essere somministrato in regime ambulatoriale. Abbiamo osservato un risultato interessante in 2 pazienti nei quali la malattia e' rimasta stabile per 20 mesi in assenza di altri trattamenti. Abbiamo quindi deciso di valutare l'uso della vaccinazione idiomatica come terapia di mantenimento dopo chemioterapia ad alte dosi e infusione di PBPC (19). Esistono numerose evidenze sperimentali che sottolineano come sia piu' importante la fase della malattia in cui il vaccino e' somministrato rispetto al numero di somministrazioni o alla durata del trattamento vaccinic. Nel caso del MM, molte delle anomalie fenotipiche e funzionali che caratterizzano i linfociti T sono regredite in fase di malattia minima residua. Inoltre, a questo punto si e' creato un rapporto tra cellule effettrici e cellule target molto favorevole nei confronti dell'ospite. Infine, la presentazione dell'idiotipo in forma immunogena durante la ricapitolazione dell'omeostasi T linfocitaria che avviene dopo l'autotrapianto potrebbe facilitare la rottura della tolleranza nei confronti dell'idiotipo stesso. Sono stati inseriti 12 pazienti in questo protocollo, dall'Agosto 1995 al Gennaio 1998. Undici pazienti hanno completato il trattamento, mentre 1 paziente non e' riuscito a terminarlo a causa della progressione della

malattia. Degli 11 pazienti che hanno completato il trattamento, 5 sono rimasti in remissione per un periodo compreso tra 12 e 35 mesi (dati aggiornati a fine Maggio 1999), mentre 6 pazienti sono ricaduti in un periodo compreso tra i 9 ed i 36 mesi. La durata della remissione è stata calcolata a partire dall'inizio del vaccino. È stata osservata la generazione di risposte proliferative specifiche all'idiotipo in 2/12 pazienti, mentre è stata documentata in 8/10 pazienti una risposta positiva alla reazione di ipersensibilità ritardata (DTH) all'idiotipo autologo. In un caso, abbiamo potuto dimostrare la specificità della DTH utilizzando dei peptidi sintetici derivati dalla regione variabile della catena pesante prodotta dalle cellule tumorali. In nessun caso, i pazienti hanno generato risposte solubili contro l'idiotipo (a differenza di quanto osservato nei linfomi), mentre abbiamo osservato che le risposte nei confronti della KLH sono state frequenti sia in termini di produzione di anticorpi (100% dei vaccinati), sia in termini di risposta proliferativa (80% dei vaccinati). Questi dati hanno dimostrato che: 1) il sistema immunitario dei pazienti con MM è in grado di generare risposte immuni contro l'idiotipo anche dopo autotrapianto; 2) le DTH rappresentano un test di semplice esecuzione ed affidabile per dimostrare che il vaccino è stato efficace nell'indurre *in vivo* una risposta immune anti-idiotipo; 3) l'immunità anti-idiotipo, per quanto specifica e duratura, non è in grado di esercitare un effetto citoriduttivo sulle cellule tumorali, anche in presenza di malattia minima residua. È quindi possibile che questo protocollo abbia indotto un'immunità anti-idiotipo in grado di esercitare un effetto regolatorio sulle cellule tumorali piuttosto che citotossico. Rimane da verificare se una risposta immune di questo tipo sia capace di migliorare la durata della remissione rispetto alle terapie di mantenimento che non hanno effetto immunomodulante.

Uno studio recente ha anche esaminato la possibilità di utilizzare DC pulsate con l'idiotipo autologo come terapia di mantenimento dopo autotrapianto con PBPC (20). Come nello studio precedentemente riportato nei linfomi, sono state purificate dal sangue periferico le DC mature circolanti, le quali sono state pulsate con l'idiotipo autologo e quindi infuse 2 volte per via endovenosa in un periodo compreso tra i 3 ed i 7 mesi dopo l'autotrapianto. Le infusioni di DC sono quindi state seguite da 5 somministrazioni sottocutanee di idiotipo coniugato a KLH. I risultati ottenuti sono molto simili a quelli osservati nel nostro protocollo. In particolare, solo 2/12 pazienti hanno sviluppato una risposta proliferativa all'idiotipo autologo, ma è stato dimostrato in un paziente su 3 che il vaccino ha indotto linfociti T citotossici in grado di riconoscere selettivamente e lisare un bersaglio costituito da fibroblasti autologhi trasdotti con l'idiotipo. Infine, anche in questo studio, la maggior parte dei pazienti ha generato una risposta proliferativa alla KLH, confermando quindi che lo stato di immunocompetenza dei MM dopo autotrapianto non è definitivamente compromesso.

Prospettive future

Le cellule deputate a presentare l'antigene (APC) hanno un ruolo centrale nello sviluppo dei vaccini per i disordini linfoproliferativi. Le uniche esperienze finora pubblicate riguardano le DC mature isolate dal sangue periferico. Il numero di queste cellule, tuttavia, è molto basso (circa l'0.1% delle cellule monucleate circolanti) e quindi è molto difficile e laborioso isolarle in quantità e purezza adeguate. Le DC sono tuttavia una popolazione cellulare molto eterogenea e DC molto efficienti possono essere ottenute anche

da altri tipi di cellule quali: cellule mononucleate del midollo, progenitori CD34+ del midollo, progenitori CD34+ del sangue periferico mobilizzati con fattori di crescita dopo chemioterapia, progenitori CD34+ isolati dal sangue di cordone ombelicale ed monociti isolati dal sangue periferico (21). La possibilita' di generare *ex-vivo* le DC, utilizzando le citochine ed i fattori di crescita piu' appropriati, consente anche di modulare e potenziare le loro proprieta' funzionali e forzare la risposta T linfocitaria in senso Th1 piuttosto che Th2. Al momento non e' ancora chiaro quale sia l'immunogeno migliore per pulsare le DC *ex-vivo*; possono essere utilizzati lisati ottenuti da cellule tumorali intere, idiotipo purificato, peptidi sintetici corrispondenti alle regioni ipervariabili dell'idiotipo, cosi' come potrebbero essere utilizzati antigeni tumorali diversi dall'idiotipo stesso. E' chiaro che il polimorfismo delle molecole HLA condiziona la messa a punto dei vaccini che prevedono una risposta T cellulare mediata dalle DC. Certamente l'uso di lisati cellulari o di molecole intere come l'idiotipo ha il vantaggio di offrire l'intera gamma di sequenze peptidiche potenzialmente immunogeniche e quindi c'e un minore rischio di restrizione da parte delle molecole HLA. Gli inconvenienti di tale approccio sono che i peptidi tumore-specifici potrebbero non raggiungere una concentrazione sufficiente per attivare una risposta tumore-specifica, perche' fortemente diluiti in una quantita' molto maggiore di peptidi non immunogenici o non tumore-specifici. Una conseguenza potrebbe essere quella di indurre risposte autoimmuni anziche' antitumorali. Inoltre, non e' detto che peptidi differenti, derivati dallo stesso antigene tumorale, possano stimolare con la stessa efficacia in associazione agli alleli HLA specifici di ciascun individuo. L'uso di peptidi sintetici offre alcuni vantaggi, ma anche alcuni inconvenienti come la maggiore restrizione HLA, il

rischio di indurre tolleranza e favorire l'emergenza di cloni tumorali che non esprimono quel determinato peptide. Dati recenti dimostrano però che l'uso di DC può evitare il rischio di indurre tolleranza quando si utilizzano vaccini peptidici (22), perché la presentazione di un peptide da parte della DC è fisiologica, mentre non lo è quando avviene tramite cellule che non sono APC professionali.

I B linfociti neoplastici possono diventare essi stessi delle APC efficienti e presentare in modo appropriato i peptidi derivati dai propri antigeni tumorali. Sono attualmente in corso alcune sperimentazioni precliniche e cliniche con questo obiettivo. Una prima possibilità è quella di fondere le cellule di mieloma con le DC. Il prodotto di fusione avrà così le caratteristiche funzionali della DC, ma anche la possibilità di processare direttamente e presentare l'intero repertorio antigenico della cellula mielomatosa. Gli ibridi ottenuti dalla fusione di DC e cellule mielomatose sono già stati utilizzati con successo come immunogeni in un modello sperimentale murino (23). Come alternativa, i linfociti B neoplastici possono essere trasformati in APC efficienti mediante la stimolazione della molecola di superficie CD40 con il suo ligando naturale CD40L (CD154). È stato infatti dimostrato che la stimolazione del CD40 rappresenta lo stimolo più efficace per indurre o aumentare nei linfociti B l'espressione di molecole di adesione, costimolatrici o del sistema MHC. Il risultato di tali modulazioni fenotipiche è che sia i linfociti B normali che quelli neoplastici aumentano la loro capacità di processare l'antigene e diventano delle APC efficienti (24).

L'ingegnerizzazione genetica è un altro approccio capace di trasformare i linfociti B neoplastici in potenti APC. La transfezione con sequenze di DNA che codificano per

citochine o molecole stimolatrici aumenta notevolmente la capacita' dei B linfociti neoplastici di generare una risposta immune anti-tumorale. Questo approccio e' stato recentemente utilizzato nel MM, sfruttando il fatto che le cellule mielomatose esprimono selettivamente dei recettori funzionali per gli adenovirus (23). Le cellule neoplastiche sono state trasdotte con vettori adenovirali che contenevano i geni per l'IL-2, l'IL-12 o il CD80. E' attualmente in corso un protocollo sperimentale di fase I nel quale pazienti con MM in remissione dopo chemioterapia ad alte dosi sono immunizzati con cellule mielomatose autologhe trasdotte con vettori adenovirali che codificano per l'IL-2.

Infine, l'ingegneria genetica ha consentito lo sviluppo di una nuova generazione di immunogeni, rappresentati dai vaccini a DNA. Sono state assemblate le sequenze relative alla regione variabile della catena pesante e della catena leggera dell'immunoglobulina tumore-specifica e questi costrutti sono stati utilizzati per produrre proteine ricombinanti in batteri o come vaccini plasmidici (25). L'efficacia immunizzante e' risulta migliore quando sono state inserite, come adiuvanti genici, delle sequenze specifiche per proteine xenogeniche. Sono anche in corso di messa a punto delle strategie che prevedono l'inserimento delle sequenze che codificano per la regione variabile dell'idiotipo nelle DC, utilizzando vettori retrovirali o adenovirali. Le DC cosi' trasdotte possono essere utilizzate come immunogeni. Infine, un altro approccio di terapia genica consiste nell'uso di gene-gun piuttosto che virus o plasmidi per inserire sequenze di DNA nelle cellule tumorali. Questo approccio e' gia' stato utilizzato con successo in un modello murino di mieloma (26).

Ringraziamenti

Questo lavoro e' stato realizzato in parte con il contributo dell'AIRC (Milano) e della Compagnia San Paolo di Torino (Torino).

References

- 1) Alexanian R, Dimopoulos M: The treatment of multiple myeloma. *New Engl J Med* 330: 484, 1994.
- 2) Boccadoro M, Pileri A: Diagnosis, prognosis, and standard treatment of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 11: 111, 1997
- 3) Gianni AM, Tarella C, Bregni M, Siena S, Lombardi F, Gandola L, Caracciolo D, Stern A, Bonadonna G, Boccadoro M, Pileri A: High dose sequential chemoradiotherapy, a widely applicable regimen, confers survival benefit to patients with high-risk multiple myeloma. *J Clin Oncol* 12: 503, 1994.
- 4) Attal M , Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF, Casassus P, Maisonneuve H, Facon T, Ifrah N, Payen C, Bataille R: A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *Intergroupe francais du myelome. N Engl J Med* 335: 91, 1996.
- 5) Vesole DH, Tricot G, Jagannath S, Desikan KR, Siegel D, Bracy D, Miller L, Cheson B, Crowley J, Barlogie B: Autotransplants in multiple myeloma: What have we learned? *Blood* 88: 838, 1996.
- 6) Corradini P, Voena C, Astolfi M, Ladetto M, Tarella C, Boccadoro M, Pileri A: High-dose sequential chemoradiotherapy in multiple myeloma: residual tumor cells are

detectable in bone marrow and peripheral blood cell harvests and after autografting. *Blood* 85:1596, 1995..

7) Longo DL, Young RC, DeVita VT.. What is so good about the "good prognosis" lymphoma? In Williams CJ, Whithouse JMA (eds): Recent Advances in Clinical Oncology Edinburgh, Churchill-Livingstone, pp. 223-231, 1982.

8) Longo DL. What's the deal with follicular lymphomas? *J Clin Oncol* 2:202, 1993.

9) Corradini P, Astolfi M, Cherasco C, Ladetto M, Voena C, Caracciolo D, Pileri A, Tarella C Molecular monitoring of minimal residual disease in follicular and mantle cell non-Hodgkin's lymphomas treated with high-dose chemotherapy and peripheral blood progenitor cell autografting. *Blood* 89:724, 1997

10) Bierman PJ, Vose JM, Anderson JR, Bishop MR, Kessinger A, Armitage JO: High-dose therapy with autologous hematopoietic rescue for follicular low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 15:445, 1997

11) Bianchi A, Massaia M: Idiotypic vaccination in B-cell malignancies. *Mol Med Today* 3:435, 1997

12) Kwak LW, Campbell MJ, Czerwinski DK, Hart S, Miller RA, Levy R: Induction of immune responses in patients with B-cell lymphoma against the surface-immunoglobulin idiotype expressed by their tumors. *N Engl J Med* 327: 1209, 1992.

13) Hsu FJ, Caspar CB, Czerwinski D, Kwak LW, Liles TM, Syrengelas A, Taidi-Laskowski B, Levy R: Tumor-specific idiotype vaccines in the treatment of patients with B-cell lymphoma: long-term results of a clinical trial. *Blood* 89: 3129, 1997

- 14) Flamand V, Sornasse T, Thielemans K, Demanet C, Bakkus M, Bazin H, Tielemans F, Leo O, Urbain J, Moser M. Murine dendritic cells pulsed *in vitro* with tumor antigen induce tumor resistance *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* 24: 605, 1994.
- 15) Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R: Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 2: 52, 1996.
- 16) Bergenbrant S, Yi Q, Osterborg A, Bjorkholm M, Osby E, Mellstedt H, Lefvert AK, Holm G: Modulation of anti-idiotypic immune response by immunization with the autologous M-component protein in multiple myeloma patients. *Br J Haematol* 92:840, 1996.
- 17) Lefvert AK, Yi Q, Osterborg A, Bergenbrant S, Mellstedt H, Holm G: Idiotype-reactive T-cell subsets and tumor load in monoclonal gammopathies. *Blood* 86:3043, 1995.
- 18) Osterborg A, Yi Q, Henriksson L, Fagerberg J, Bergenbrant S, Jeddi-Tehrani M, Ruden U, Lefvert AK, Holm G, Mellstedt H: Idiotype immunization combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in myeloma patients induced type I, major histocompatibility complex-restricted, CD8- and CD4-specific T-cell responses. *Blood* 91:2459, 1998.
- 19) Massaia M, Borrione P, Battaglio S, Mariani S, Beggiato E, Napoli P, Voena C, Bianchi A, Coscia M, Besostri B, Peola S, Even J, Novero D, Boccadoro M, Pileri A: Idiotype vaccination in human myeloma: generation of tumor-specific immune

responses after high-dose chemotherapy. *Blood*, in press.

20) Reichardt VL, Okada CY, Liso A, Benike CJ, Stocker-Goldstein KE, Engleman EG, Blume KG, Levy R: Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma. A feasibility study. *Blood* 93:2411, 1999.

21) Hart D: Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90:3245, 1997.

22) Toes RE, van der Voort EI, Schoenberger SP, Drijfhout JW, van Bloois L, Storm G, Kast WM, Offringa R, Melief CJ: Enhancement of tumor outgrowth through CTL tolerization after peptide vaccination is avoided by peptide presentation on dendritic cells. *J Immunol* 160:4449, 1998.

23) Anderson KC, Lust JA: Role of cytokines in multiple myeloma. *Seminars Hematol* 36:14, 1999 (suppl 3).

24) Schultze JL, Cardoso AA, Freeman GJ, et al: Follicular lymphomas can be induced to present alloantigen efficiently: a conceptual model to improve their tumor immunogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8200, 1995.

25) Stevenson FK, Zhu D, King CA et al: Idiotypic DNA vaccines against B-cell lymphoma. *Immunol Rev* 145:211, 1995.

26) Turner JG, Tan J, Crucian BE, et al: Broadened clinical utility of gene gun-mediated, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor cDNA-based tumor cell vaccines as demonstrated with a mouse myeloma model. *Hum Gene Ther* 9:1121, 1998.