

LE CELLULE DENDRITICHE NELL' IMMUNITA' ANTITUMORALE

Roberto M. Lemoli, Antonio Curti, Marina Ratta, Miriam Fogli, Sante Tura.

Istituto di Ematologia ed Oncologia Medica "L. & A. Seràgnoli", Università di Bologna, Bologna.

Le cellule dendritiche (DC) sono cellule professionali presentanti l' antigene (APC) e come tali sono specializzate nella "cattura" e nella processazione di antigeni (Ag) in frammenti peptidici che sono successivamente complessati con le molecole del sistema MHC e presentati alle cellule T per iniziare la risposta immunitaria. Le DC sono le cellule più potenti nell' indurre una risposta T-linfocitaria ed hanno la peculiare capacità di stimolare non solo cellule T-memoria ma soprattutto T-linfociti naive. Quindi, le DC hanno un ruolo centrale ("adiuvanti naturali") per l' induzione di una risposta immune Ag-specifica. Evidenze recenti in modelli sperimentali e nell' uomo hanno mostrato il potenziale ruolo delle DC in strategie di immunizzazione dirette a stimolare un' immunità specifica anti-tumorale.

Caratterizzazione biologica delle DC

Le DC sono cellule distribuite ubiquitariamente nel corpo umano, particolarmente nei tessuti che fungono da barriera con l'ambiente circostante (per esempio, le cellule di Langerhans nella cute e a livello delle mucose) e negli organi linfoidi (DC interdigitate), dove agiscono come "sentinelle" nei confronti degli agenti patogeni con cui l'organismo entra in contatto. Stimoli infiammatori, come TNF- α e IL-1 β , batteri, prodotti batterici (LPS) e virus, inducono la migrazione delle cellule dendritiche, che hanno "caricato" l'antigene,

dai tessuti periferici agli organi linfoidi secondari. Durante la migrazione, le DC subiscono un processo di maturazione, che le porta ad incrementare enormemente la propria capacità di attivare le cellule T. Questo processo consiste nell'aumentata espressione di membrana di alcune molecole chiave nell'interazione tra APC e linfocita: molecole di adesione, molecole del sistema HLA e molecole di costimolazione (1-6).

L'attività funzionale delle DC deriva da una serie di caratteristiche peculiari di queste cellule. La loro forma, caratterizzata da numerose estroflessioni citoplasmatiche e l'elevata espressione di membrana di alcune molecole di adesione ed integrine (LFA-3, ICAM-1, ICAM-3) estendono l'area di contatto con le cellule effettrici del sistema immunitario. Le DC esprimono intensamente gli antigeni HLA di classe II (HLA-DP, -DQ, -DR) e le molecole di costimolazione (CD80, CD86, CD40), le quali interagendo con il proprio ligando presente sui linfociti T (CD28, CTLA-4, CD40L), forniscono il "secondo segnale", indispensabile per indurre al momento del riconoscimento antigenico una risposta proliferativa e non anergia (1). Inoltre, le DC producono un vasto numero di citochine, tra cui IL-12, che ha la funzione di promuovere una risposta immunitaria di tipo citotossico attraverso la differenziazione delle cellule TH0 in cellule TH1, produttori interferon (IFN)- γ e IL-2 (7, 8). Recentemente è stato dimostrato che durante il riconoscimento antigenico, i linfociti T-helper attivano le DC mediante l'interazione CD40-CD40L e le DC così attivate sono capaci di stimolare una risposta T-killer (9-11).

Le DC si trovano nei tessuti periferici in uno "stato immaturo" e sono incapaci di attivare i linfociti T perchè mancano di tutti i segnali di membrana necessari per la loro attivazione. A questo livello di differenziazione, tuttavia, sono estremamente efficienti nel catturare antigeni solubili, antigeni particolati e microorganismi mediante fagocitosi, macropinocitosi e attraverso il recettore macrofagico del mannosio ed i recettori Fc γ e Fc ϵ

(1). La cattura dell'antigene induce le DC a maturare e ad esprimere più intensamente sulla membrana cellulare le molecole MHC e quelle di costimolazione, nonché gli antigeni associati al differenziamento in senso dendritico (CD83 e p55). Nel contempo, viene progressivamente perduta la capacità di catturare e processare l'antigene. Tuttavia, la completa attivazione delle DC dipende dal contatto con le cellule T attraverso l'interazione CD40-CD40L, che induce la produzione di IL-12. Pertanto, le funzioni principali delle DC (cattura dell'antigene, attivazione dei linfociti T) sono rigidamente associate a stadi successivi di differenziamento. A questo proposito, è interessante notare come IL-10 (12) e il vascular endothelial growth factor (VEGF), secreto dalle cellule neoplastiche (13) ostacolano la maturazione delle DC, inibendo l'efficace attivazione delle cellule T.

Generazione ex-vivo di DC

I monociti CD14+ circolanti, incubati con citochine specifiche, quali GM-CSF, IL-4 e TNF- α (14, 15) rappresentano la fonte più facilmente disponibile per la generazione ex-vivo di DC. Inoltre, sono stati individuati precursori delle DC nell'ambito della frazione cellulare CD34+ del midollo osseo (BM), del cordone ombelicale (CB) e del sangue periferico (PB) sia in condizione di steady-state che dopo mobilizzazione (16-22). Anche in questo caso il differenziamento delle cellule CD34+ a DC completamente funzionanti è rigidamente condizionato dalla stimolazione con alcune citochine ben determinate, quali GM-CSF, TNF- α , SCF, FLT-3L e IL-4. GM-CSF e IL-4 inducono il differenziamento di monociti CD14+ non proliferanti in DC immature, non aderenti, che esprimono a bassi livelli gli antigeni CD83 e p55 e sono scarsamente capaci di attivare linfociti T naive. Queste DC immature non sono completamente differenziate e a regrediscono ad uno stato di cellule aderenti monocitoidi se le citochine impiegate vengono rimosse dal mezzo di coltura.

L'aggiunta di citochine infiammatorie quali TNF- α , IL-1 β , LPS o PGE₂ per 1-2 giorni al mezzo di coltura contenente GM-CSF e IL-4 determina la maturazione delle DC ed aumenta notevolmente la loro capacità di stimolare le cellule T.

Complessivamente, queste osservazioni portano alla conclusione che DC immature, generate da cellule CD14+ in presenza di GM-CSF e di IL-4 si trovano in una condizione che le rende estremamente efficienti nel catturare e nel processare antigeni solubili, tra cui anche gli antigeni associati ai tumori (TAA). Tuttavia, tali cellule richiedono un ulteriore stimolo maturativo (TNF- α , CD40L, LPS) per diventare capaci di attivare le cellule T. Le DC immature sono il bersaglio ideale per la manipolazione genetica basata sull'impiego di vettori virali o batterici, infettanti cellule non replicanti. In questo caso, gli agenti patogeni trasformati sono di per sè capaci di indurre la completa maturazione delle DC. In alternativa, si possono studiare protocolli di vaccinazione basati sull'utilizzo di DC mature, che sono in grado di attivare una risposta T linfocitaria specifica per un determinato peptide associato con un tumore, anche senza averlo precedentemente catturato e processato, ma semplicemente complessandolo ab extrinseco alle numerose molecole HLA presenti sulla propria membrana cellulare (23).

Come accennato in precedenza, le cellule CD34+ possono essere indotte a differenziare in DC funzionalmente competenti, aventi caratteristiche che le fanno assomigliare alle cellule di Langerhans della cute. Molto recentemente le caratteristiche fenotipiche e funzionali delle DC di derivazione da precursori CD34+ mobilizzati nel sangue periferico e della loro controparte derivante da cellule CD34+ midollari sono state oggetto di una comparazione (19). I risultati pubblicati dimostrano che il G-CSF, usato come regime di mobilizzazione, determina un incremento sia numerico che in termini di capacità proliferativa dei precursori delle DC (CFU-DC) rispetto alla loro controparte midollare. Questo si traduce

nella generazione in coltura liquida di un più elevato numero di DC mature. Nonostante il pretrattamento con G-CSF, queste cellule mantengono la stessa capacità di attivazione su linfociti T allogenici che caratterizza le DC di derivazione da precursori midollari. Le DC derivanti da cellule CD34+ sono, inoltre, capaci di processare e presentare antigeni solubili a linfociti T autologhi sia come risposta immunitaria primaria che secondaria. L'utilità del siero autologo al posto di FCS in una prospettiva di applicazione clinica è stata confermata anche in questo studio. Inoltre, IL-4 si è dimostrata capace di modulare il differenziamento dendritico dalle cellule CD34+ bipotenti, durante le ultime fasi della coltura, come osservato per le DC di derivazione dai monociti. Pertanto, per l'immunoterapia dei tumori le cellule CD34+ mobilizzate nel sangue periferico potrebbero rappresentare un'ottima sorgente per la generazione di DC. Inoltre, dati recenti dimostrano la mobilitazione di un grande numero di precursori di DC mediante GM-CSF (24) e FLT-3L (25). In particolare, il FLT-3L somministrato in-vivo a topi ha mostrato la capacità di stimolare la proliferazione ed il differenziamento di tutti i subsets di DC (mieloidi, linfoidi) (26) e di indurre una risposta immunitaria DC-mediata anti-tumorale (27).

Delivery system di antigeni associati a tumori

Sono stati descritti numerosi metodi utilizzati dalle DC per "caricare" gli antigeni tumorali o tumor associated antigens (TAA). Il razionale è basato sull'osservazione che le cellule tumorali sono scarsamente immunogeniche a causa di una deficiente capacità di essere riconosciute dai linfociti T e di una ridotta espressione di membrana di molecole di attivazione e di costimolazione, tipiche delle APC. In questa ottica, Gong et al. (28) hanno costituito un ibrido, rappresentato dalla fusione di DC murine e cellule di una linea di

carcinoma della mammella (MC38) al fine di fornire alle cellule tumorali le caratteristiche funzionali delle DC. Le cellule derivanti da questa fusione mostrano tutte le peculiarità fenotipiche delle DC e si sono dimostrate capaci di prevenire la crescita tumorale quando i topi sono stati esposti alle cellule della linea. Inoltre, il trattamento con le cellule di fusione ha indotto una regressione di alcune metastasi polmonari. Recentemente sono stati individuati numerosi peptidi tumorali che sono presentati ai linfociti T in associazione con le molecole HLA di classe I e si sono dimostrati utili nell'induzione di una risposta CTL autologa sia in vitro che in vivo. Tuttavia, stimolare le DC con peptidi potrebbe non essere il sistema ideale per un'applicazione clinica a causa della rigida restrizione MHC della risposta immunitaria e della loro limitata stabilità. Inoltre, il "pulsing" con i peptidi potrebbe non essere in grado di indurre una risposta T-cellulare diretta contro le cellule tumorali che esprimono l'antigene vero e proprio. Sebbene le DC possano essere "caricate" con un cocktail di peptidi derivanti da diversi antigeni, tutti appartenenti allo stesso tumore, questo approccio alla vaccinazione è limitativo in quanto rende necessaria una selezione dei pazienti sulla base del fenotipo HLA. Un'alternativa affascinante è rappresentata dall'impiego, quando possibile, di proteine non frazionate di derivazione tumorale, di cellule apoptotiche (29), o lisati tumorali. Nell'ultimo caso l'ovvio svantaggio è costituito dalla possibilità di indurre una risposta immunitaria contro antigeni self, espressi su tessuti diversi dalle cellule tumorali.

Una ulteriore possibilità è rappresentata dalla trasduzione delle DC con vettori genici codificanti per TAA. Le DC possono essere ingegnerizzate in diversi modi, che si distinguono tra di loro per la capacità di applicarsi a cellule quiescenti, per la stabilità dell'integrazione genomica, per l'efficienza di trasfezione e per la capacità di stimolare il sistema immune. Le DC transdotte con retrovirus esprimono in modo costitutivo la

sequenza genica codificante per l'antigene tumorale e stimolano efficacemente una risposta T-cellulare specifica (30). Tuttavia, i vettori retrovirali sono caratterizzati da una bassa efficienza di trasfezione, sono in grado di infettare esclusivamente cellule attivamente replicantesi e possiedono il rischio teorico di una trasformazione oncogenica delle cellule bersaglio. Al contrario, gli adenovirus infettano sia cellule quiescenti che proliferanti e non si integrano nel DNA (31). Inoltre, sovranatanti con un alto titolo virale si possono facilmente ottenere. Recentemente, le DC sono state ingegnerizzate con adenovirus combinati con particelle liposomiali cationiche, ottenendo una efficienza di infezione che si avvicinava al 100% (32). La principale limitazione all'uso clinico degli adenovirus è rappresentata dalla loro alta immunogenicità che induce la produzione di anticorpi neutralizzanti ed il rapido sviluppo di CTL diretti contro le cellule infettate.

Vettori allestiti utilizzando vaccinia virus non inducono trasformazione neoplastica, non si integrano nel genoma e possono essere manipolati al fine di veicolare grandi frammenti di DNA eterologo (33). Tuttavia, questi virus sono tossici per le cellule bersaglio e la vitalità delle DC si approssima al 50%. Più recentemente, l'infezione delle DC con vettori batterici si è dimostrata capace di indurre la loro maturazione, in termini di nuova sintesi, traslocazione e stabilizzazione delle molecole MHC sulla superficie cellulare ed inoltre di attivare una risposta T-cellulare sia CD4 che CD8 (34). Di conseguenza, un antigene modello (ovoalbumina) espresso sulla superficie di una variante ricombinante di *Streptococcus Gordonii* è processato dalle DC e presentato sulle molecole MHC di classe I con una efficienza 10^6 volte maggiore rispetto alla proteina solubile di ovoalbumina. Pertanto, i vettori batterici sono potenzialmente utili per veicolare antigeni esogeni all'interno delle DC al fine di stimolare una risposta CTL tumore specifica. Molto recentemente, batteri trasformati sono stati somministrati per os nel topo per indurre una

specifica risposta anti-tumorale in-vivo ed il meccanismo di azione si è visto essere mediato dalle DC (35). Un approccio differente è stato seguito da Boczkowsky et al (36), che hanno transfettato le DC con l'RNA totale estratto dalle cellule tumorali e combinato con lipidi cationici al fine di amplificare l'efficienza di infezione. Analogamente all'uso dei lisati tumorali, questa strategia può essere applicata a quei casi in cui manca un marker antigenico tumore specifico, anche se esiste il rischio di indurre una risposta di tipo autoimmune.

Impiego delle DC nell'immunoterapia cellulare

Il ruolo centrale delle DC nell'induzione di una risposta immunitaria tumore-specifica è stato ampiamente dimostrato sia in vitro che in modelli animali (30, 36-41). Mentre le DC murine "pulsate" con proteine o peptidi tumorali oppure ingegnerizzate con geni codificanti per TAA si sono dimostrate capaci di indurre un rigetto di cellule tumorali impiantate artificialmente e la regressione di carcinomi preformati, rimane da stabilire quale delle numerose strategie di immunoterapia cellulare proposte risulti essere quella più efficace. Non è da escludere che differenti tipi di tumore possano richiedere differenti approcci.

Nell'uomo, studi preliminari sono stati realizzati in pazienti affetti da melanoma utilizzando le DC "pulsate" con il peptide MAGE (42, 43). L'iniezione delle DC veicolanti il peptide induceva la migrazione di CTL MAGE-specifici nel sito di iniezione ed aumentava il numero di CTL tumore specifici circolanti. Più recentemente, Nestle et al. (44) hanno sottoposto pazienti, affetti da melanoma in stadio avanzato e tipizzati per quanto riguarda il profilo HLA, ad iniezioni intranodali di DC "pulsate" con peptidi o lisati tumorali. Gli autori hanno riportato l'induzione di una risposta T-cellulare peptide-

specifica in tutti i casi. Inoltre, in 5 pazienti su 16 si è verificata una risposta clinica obiettiva. In questo studio, le DC erano state generate ex-vivo a partire da monociti in presenza di IL-4 e GM-CSF ed iniettate direttamente in un linfonodo inguinale al fine di raggiungere le aree T-dipendenti.

Peptidi tumorali (frammenti dell'antigene specifico della prostata, PSA) sono stati impiegati per stimolare le DC in pazienti con carcinoma della prostata resistenti alla terapia ormonale (45). Sette su 51 pazienti hanno mostrato una parziale risposta mentre nessuno dei pazienti del gruppo di controllo, cui era stato iniettato il peptide da solo, ha evidenziato alcuna risposta. Nelle neoplasie della linea B, la sequenza genica paziente-specifica dell'idiotipo (Id) e la proteina codificata rappresentano il target ottimale per strategie di vaccinazione, come dimostrato in precedenza in modelli murini e nell'uomo. Hsu et al hanno riportato il caso di 4 pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin (NHL) a basso grado resistenti alla chemioterapia convenzionale o ricaduti e trattati con DC "pulsate" con l'idiotipo come antigene solubile (46). Una risposta T-cellulare tumore specifica è stata osservata in tutti i casi, associata in un caso ad una regressione della massa tumorale. A tutt'oggi, sono stati trattati 16 pazienti ed una risposta cellulare tumore specifica è stata osservata in 8 pazienti (R. Levy, comunicazione personale). La stessa strategia basata sull'idiotipo è stata proposta dallo stesso gruppo per indurre una risposta immunitaria T-cellulare in pazienti con mieloma multiplo (47). Peraltro, in quest'ultimo caso si è avuta una risposta Id-specifica solo in 2/12 pazienti. Contrariamente a Nestle, in questi studi preliminari le DC sono state isolate direttamente dal sangue periferico attraverso cicli successivi di arricchimento e sono state poi reinfuse per via endovenosa. Sebbene un numero nettamente superiore di DC siano state somministrate nei pazienti con NHL rispetto ai pazienti affetti da melanoma ($3-20 \times 10^6$ DC vs 1×10^6), questo approccio

presenta alcuni interrogativi sia per quanto riguarda la capacità di DC isolate direttamente dal sangue periferico di stimolare efficacemente le cellule T sia la capacità delle APC veicolanti l'idiotipo di raggiungere gli organi linfatici secondari, superando l'intrappolamento da parte del filtro polmonare.

In conclusione, i pochi dati clinici disponibili tendono a dimostrare che cellule dendritiche autologhe, generate ex-vivo e reinfuse in pazienti affetti da neoplasie, sono efficaci nell'indurre una risposta immune anti-tumorale. Questo è il risultato di una complessa rete di relazioni tra diverse popolazioni cellulari, coinvolte nell'immunità dei tumori. Peraltro, l'immunoterapia cellulare basata sulle DC deve essere ancora standardizzata.

Allo stadio attuale e sulla base principalmente di studi su modelli animali, possiamo dire che l'immunoterapia dei tumori basata sulle DC potrebbe essere lo strumento per esercitare nell'uomo un potente effetto anti-tumore.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Bancherau J, Steinman, RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-52.
- 2) Guery JC, Adorini L. Dendritic cells are the most efficient in presenting endogenous naturally processed self-epitopes to class II-restricted T cells. *J Immunol* 1995; 154: 536-544.
- 3) Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Steinman RM. Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific MHC-restricted T cells in situ. *J Exp Med* 1990; 172: 631-40.
- 4) Young JW, Steiman RM. Dendritic cells stimulate primary human cytolytic lymphocyte responses in the absence of CD4+ helper T cells. *J Exp Med* 1990; 171: 1315-20.
- 5) Bhardwaj N, Bender A, Gonzales N, et al. Influenza virus-infected dendritic cells stimulate strong proliferative and cytolytic responses from human CD8+ T cells. *J Clin Invest* 1994; 94: 797-801
- 6) Metha Damani A, Markowicz S, Engleman EG. Generation of antigen-specific CD8+ CTLs from naive precursors. *J Immunol* 1994; 153: 996-1003.
- 7) Macatonia SE, Hosken NA, Litton M et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of TH1 cells from the naive CD4+ T cells. *J Immunol* 1995; 154: 5071-79.
- 8) Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, et al. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances t cell stimulatory capacity:T-T help via APC activation. *J Exp Med* 1996; 184: 747-52.
- 9) Bennet SRM, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JFAP, Heath WR. Help for cytotoxic T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 1998; 394: 478-80.
- 10) Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 1998; 394: 474-78.

11) Schoenberger SP, Toes REM, van der Voort EIH, Offringa R, Melief CJM. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 1998; 394: 480-83.

12) Kock F, Stanzl U, Jennewein P, et al. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and down regulation by IL-4 and IL-10. *J Exp Med* 1996; 184: 741-47.

13) Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR , et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2: 1096-1103.

14) Romani N, Gruner S, Brang D, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; 180: 83-93.

15) Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and down regulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994; 179: 1109-1118.

16) Caux C, Dezutter-Dambuyant S, Schmitt D, Bancherau J. GM-CSF and TNF- α cooperate in the generation of dendritic Langherans cells. *Nature* 1992; 360: 258-61.

17) Fisch P, Kohler G, Garbe A, et al. Generation of antigen-presenting cells for soluble protein antigens ex vivo from peripheral blood CD34+ cells hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Eur J Immunol* 1996; 26: 595-600.

18) Reid CDL, Stackpole A, Meager A, Tikepae J. Interaction of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34+ progenitors in human bone marrow. *J Immunol* 1992; 149: 2681-88.

- 19) Ratta M, Rondelli D, Fortuna A, et al. Generation and functional characterization of human dendritic cells derived from CD34+ cells mobilized into peripheral blood: comparison with bone marrow CD34+ cells. *Br J Haematol* 1998; 101: 756-65.
- 20) Siena S, Di Nicola M, Bregni M, et al. Massive ex vivo generation of functional dendritic cells from mobilized CD34+ blood progenitors for anticancer therapy. *Exp Hematol* 1995; 23: 1463-71.
- 21) Strunk D, Rappersberger K, Egger C, et al. Generation of human dendritic cells/Langerhans cells from circulating CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996; 87: 1292-1302.
- 22) Szabolcs P, Moore MAS, Young JW. Expansion of immunostimulatory dendritic cells among the myeloid progeny of human CD34+ bone marrow precursors cultured with c-Kit ligand, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and TNF- α . *J Immunol* 1995; 154: 5851-61.
- 23) Bhardwaj N, Young JW, Nisanian AJ, Biggers J, Steinman RM. Small amounts of superantigen, when presented on dendritic cells, are sufficient to initiate T cell responses. *J Exp Med* 1993; 178: 633-42.
- 24) Haug JS, Todd G, Bremer R, Link D, Brown R, DiPersio JF. Mobilization of CD80+ dendritic cells into the peripheral circulation by GM-CSF but not G-CSF. *Blood* 1998; 92 (Suppl. 1): 444a.
- 25) Lebsack ME, Maraskowsky E, Roux E et al. Increased circulating dendritic cells in healthy human volunteers following administration of FLT3 ligand alone or in combination with GM-CSF or G-CSF. *Blood* 1998; 92 (Suppl.1):507a.

- 26) Maraskowsky E, Roux E, Teepe M et al. Dramatic increase in the number of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* 1996; 184: 1953-62.
- 27) Pulendran B, Smith JL, Jenkins M et al. Prevention of peripheral tolerance by a dendritic cell growth factor: Flt3 ligand as an adjuvant. *J Exp Med* 1998; 188: 2075-82.
- 28) Gong J, Chen D, Kashiwaba M, Kufe D. Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nat Med* 1997; 3: 558-61.
- 29) Albert LM, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998; 392: 86-9.
- 30) Reeves ME, Royal RE, Lam JS, Rosenberg SA, Hwu P. Retroviral transduction of human dendritic cells with a tumor-associated antigen gene. *Cancer Res* 1996; 56: 5672-77.
- 31) Gong J, Chen L, Chen D, et al. Induction of antigen-specific antitumor immunity with adenovirus-transduced dendritic cells. *Gene Ther* 1998; 4: 1023-28.
- 32) Dietz AB, Vuk-Pavlovic S. High efficiency adenovirus-mediated gene transfer to human dendritic cells. *Blood* 1998; 91: 392-98.
- 33) Di Nicola M, Siena S, Bregni M, et al. Gene transfer into human dendritic antigen-presenting cells by vaccinia virus and adenovirus vectors *Cancer Gene Ther* (in press).
- 34) Rescigno M, Citterio S, They C, et al. Bacteria-induced neo-biosynthesis, stabilization, and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5229-34.
- 35) Paglia P, Medina E, Arioli I et al. Gene transfer in dendritic cells induced by oral DNA vaccination with *Salmonella Typhimurium*, results in protective immunity against a murine fibrosarcoma. *Blood* 1998; 92: 3172-76.

- 36) Boczkowski D, Nair KS, Snyder D, Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med* 1996; 184: 465-72.
- 37) Mayordomo JL, Zorina T, Storkus WJ, et al. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumor peptides elicit protective and therapeutic antitumor immunity. *Nat Med* 1995; 1: 1297-1302.
- 38) Celluzzi CM, Mayordomo JL, Storkus WJ, Lotze MT, Falo LD. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med* 1996; 183: 283-87.
- 39) Paglia P, Chiodoni C, Rodolfo M, Colombo MP. Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. *J Exp Med* 1996; 183: 317-22.
- 40) Porgador A, Snyder D, Gilboa E. Induction of antitumor immunity using bone marrow-generated dendritic cells. *J Immunol* 1996; 156: 2918-26.
- 41) Flamand V, Sornasse T, Thielemans K, et al. Murine dendritic cells pulsed in vitro with tumor antigen induce tumor resistance in vivo. *Eur J Immunol* 1994; 24: 605-10.
- 42) Hu X, Chakraborty NG, Sporn JR, et al. Enhancement of cytolytic T lymphocyte precursors frequency in melanoma patients following immunization with the MAGE-1 peptide loaded antigen presented-based vaccine. *Cancer Res* 1996; 56: 2479-83.
- 43) Mukherji B, Chakraborty NG, Yamasaki S, et al. Induction of antigen specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8078-82.
- 44) Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998; 4: 328-32.

45) Salgaller ML, Tjoa BA, Lodge PA, et al. Dendritic cell-based immunotherapy of prostate cancer. *Crit Rev Immunol* 1998; 18: 109-19.

46) Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2: 52-8.

47) Reichardt VL, Okada CY, Liso A et al. Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma-A feasibility study. *Blood* 1999; 93: 2411-19.