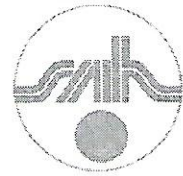


Células dendríticas: su papel en la respuesta inmune y aplicaciones clínicas

Cristina Bertinetti, Benjamín Koziner

Unidad de Investigaciones Oncohematológicas
Agrelo 3038 Buenos Aires, Argentina
E-mail: bkoziner@netizen.com.ar



ARTÍCULO DE
REVISIÓN

HEMATOLOGIA, Vol. 4 N° 3: 105-111
Setiembre-Diciembre, 2000

RESUMEN

Las células dendríticas (CD) son consideradas las más eficientes células presentadoras de antígenos. Las CD derivan de células progenitoras de la médula ósea y circulan por el torrente sanguíneo como precursores inmaduros. Bajo un estímulo apropiado, las CD maduran y migran a los órganos linfáticos secundarios donde presentan antígenos a linfocitos T e inducen una respuesta inmune. Las CD pueden ser generadas y manipuladas *in vitro* para presentar antígenos específicos de tumor o de patógenos. Una vez activadas pueden ser reinfundidas en el paciente y actuar como vacunas celulares, constituyendo la base de numerosos ensayos clínicos de inmunoterapia del cancer.

INTRODUCCIÓN

Las células dendríticas (CD) de la piel fueron descritas por Langerhans en 1868, pero no fue sino hasta el año 1973 que Steinman y Cohn¹ identificaron CD en bazo y nódulos linfáticos de ratón e iniciaron una serie de experimentos que demostraron que las CD tienen un rol fundamental en la generación de la respuesta inmune primaria y secundaria contra antígenos específicos.

Morfológicamente, las CD se caracterizan por presentar numerosas y delgadas prolongaciones citoplasmáticas (dendritas), particularidad que pareciera adecuarse a su función que consiste en la captura, procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos.

A diferencia de los linfocitos B, los linfocitos T son incapaces de reconocer antígenos en estado nativo. Por medio de los receptores antigénicos (TCRs) reconocen complejos formados por fragmentos de antígenos unidos a moléculas del complejo mayor de

histocompatibilidad (CMH) clase I y II presentes en la superficie de las células presentadoras de antígenos (CPA).

La presentación antigénica es llevada a cabo de manera más eficiente por las células dendríticas que por otras CPAs como las células B y los macrófagos y, probablemente, son las únicas células con capacidad de disparar una respuesta T primaria. Esta propiedad radica en la alta expresión de moléculas de adhesión y moléculas co-estimuladoras que proveen una segunda señal sinérgica esencial para la inducción de una respuesta inmune².

Las CD comprenden una amplia población de células que se encuentran presentes en numerosos órganos y en sangre periférica. De acuerdo a su ubicación reciben diferentes nombres: **células de Langerhans** de la piel y células relacionadas de tejidos epiteliales (CL), **células dendríticas circulantes** en sangre, **células dendríticas interdigitadas** (CDi) en las áreas de células T de ganglios linfáticos y bazo, **células dendríticas de centros germinales** CD33-CD13- (CDcg) y **células dendríticas de timo** CD8+ (CDt). Si bien resta establecer la relación entre todas estas poblaciones celulares, se ha demostrado que las CL maduran a CDi luego de la captura del antígeno durante su migración por los vasos linfáticos a los ganglios³. De acuerdo a su ubicación tisular, el fenotipo de superficie y a su función pueden distinguirse dos estadios celulares: inmaduro y maduro o activado.

Las CD presentes en la mayoría de los tejidos son inmaduras. En este estadio las células se caracterizan por tener reducida al mínimo su capacidad estimuladora de proliferación de linfocitos T. Están especializadas en la captura de antígenos por

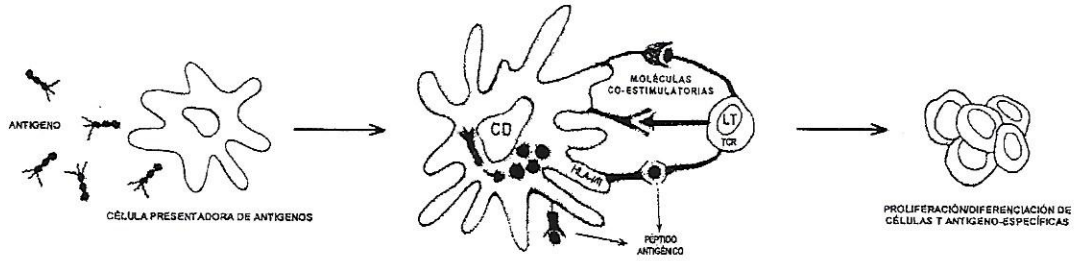


Figura 1: Presentación antigénica y activación de linfocitos T.

fagocitosis, micropinocitosis y endocitosis mediada por receptores y en el posterior procesamiento de los mismos. En su superficie expresan abundantes receptores Fcg y Fce, que favorecen la captura de antígenos complejados con anticuerpos, y otros del tipo de las lectinas como el receptor de manosa y el DEC-205. Presentan niveles relativamente bajos de moléculas del CMH clase II en su superficie, sin embargo estas moléculas se acumulan en grandes cantidades en vacuolas intracelulares. Estos compartimientos contienen además glicoproteínas liposomales y catepsinas que participan en la degradación proteica y obtención de los péptidos que se unirán a las moléculas del CMH clase II.

Luego del contacto con el antígeno, las CD se activan durante el curso de una reacción inflamatoria local y migran por el sistema linfático o sanguíneo a los órganos linfáticos secundarios en donde completan su maduración. Este proceso es acompañado por la pérdida de la capacidad de capturar antígenos y la adquisición de la capacidad de activación de los linfocitos T⁴. Las bacterias, los lipopolisacáridos de las paredes bacterianas y moléculas como IL-1 y TNF- α pueden actuar como señales estimuladoras de la maduración de las CD.

La relocalización de las células en los nódulos linfáticos y el bazo facilita el contacto del antígeno con los linfocitos T que circulan por los órganos linfáticos periféricos como linfocitos quiescentes.

Después de su activación por las CD, las células T proliferan y cambian su conducta migratoria para poder cumplir su función como células efectoras en el sitio de infección (Fig. 1).

Como linfocitos T citotóxicos destruyen las propias células infectadas del cuerpo y las células tumorales. Como linfocitos T-helper de la clase Th-1 estimulan a los macrófagos mediante la liberación de mediadores de inflamación intensificando en consecuencia la actividad de estos mediadores en el proceso de fagocitosis para eliminar patógenos intracelulares. Como células de la clase Th-2, apoyan la respuesta humoral activando las células B productoras de antígenos.

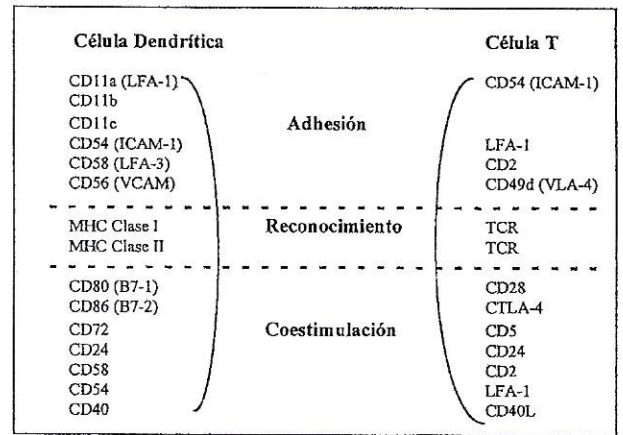


Figura 2: Moléculas de reconocimiento e interacción entre la célula dendrítica y el linfocito T.

Además de la señal antígeno específica dada por la unión de la molécula del CMH-péptido presente en la CD y el receptor antigénico (TCR) del linfocito T, para que ocurra la activación de los linfocitos es necesaria una señal co-estimuladora proporcionada por la interacción entre diversas moléculas presentes en la superficie de ambas células (Fig. 2). Como resultado de estas interacciones las CD secretan IL-12.

Es la particular capacidad de las CD de activar las linfocitos T la que las convierte en el blanco de numerosos estudios para su potencial aplicación en inmunoterapia. Las CD pueden ser obtenidas y manipuladas *in vitro* para presentar antígenos específicos de tumor o de patógenos. Una vez activadas pueden ser reinfundidas en el paciente y actuar como vacunas celulares cuyo objetivo es inducir al sistema inmune a eliminar dichos agentes extraños.

GENERACIÓN DE CD HUMANAS IN VITRO

Una de las limitaciones para el uso clínico de las CD radica en la obtención de cantidades suficientes de células debido a que en la sangre representan

solo el 0.1% de los leucocitos y a que en el estadio inmaduro las células no poseen la capacidad de multiplicarse.

Hasta el presente las dos fuentes celulares más usadas como población de partida para la generación de cantidades adecuadas de CD maduras *in vitro* son: células progenitoras CD34+ y monocitos^{5,6,7,8}.

Las células progenitoras CD34+ pueden ser inducidas a pasar de la médula ósea (MO) a circulación y recolectarse por procedimientos de leucaféresis. Estas células como así también los monocitos pueden diferenciarse a CD inmaduras por el agregado de la combinación de GM-CSF más IL-4 al medio de cultivo. La obtención de CD maduras se logra con la posterior adición de un estímulo como el TNF- α .

Recientemente se demostró que las CD pueden ser expandidas directamente *in vivo*. La administración de Flt3l durante 10 días produjo un incremento de 20 veces el número de CD circulantes en pacientes con cáncer de colon⁹. Esta estrategia podría constituirse en otra alternativa viable para la obtención de cantidades adecuadas de CD para la producción de vacunas autólogas.

Una vez obtenidas las CD se procede a "cargarlas" con el antígeno de interés. Los antígenos intracelulares originados por ejemplo de virus o microorganismos que viven intracelularmente son principalmente presentados por moléculas del CMH clase I. Estos son reconocidos por linfocitos CD8+ citotóxicos dando como resultado la activación de una respuesta inmune predominantemente mediada por células.

En el caso de antígenos que se originan de patógenos extracelulares y que penetran a la célula por fagocitosis o pinocitosis la situación es diferente. Estos antígenos son presentados por moléculas del CMH clase II que son reconocidas por linfocitos T CD4+, proceso que origina la activación de una respuesta predominantemente humoral. Dependiendo de la estructura del antígeno y del tipo de respuesta inmune deseada se emplean distintos estadios madurativos de las CD¹⁰.

Se han descrito tres estrategias de carga antigénica para su aplicación clínica:

Carga con ADN

Los antígenos pueden ser incorporados como ADN que luego es transcrito y traducido por la misma célula. La proteína producida es degradada durante el proceso de metabolismo normal celular. Los péptidos así generados pueden ser cargados en moléculas del CMH y presentados en la superficie celular.

Es posible transfectar a las CD en cualquier etapa de su maduración, sin embargo dado que la transfección de las CL y CDi no es muy eficiente, la estrategia de elección consistiría en transfectar las células en una etapa más temprana de la maduración (células progenitoras CD34+).

La ventaja de este método radica en que el antígeno es expuesto directamente en el citoplasma y en consecuencia presentado vía moléculas del CMH clase I, activándose a los linfocitos T CD8+ citotóxicos que son necesarios por ejemplo para erradicar las células tumorales.

Carga con antígenos específicos de patógenos o tumores

Las células de elección para esta estrategia en la que se emplean lisados de células tumorales o proteínas específicas de patógenos son las CLs, debido a que se requiere una activa internalización del antígeno.

Los péptidos obtenidos como producto de la degradación de las proteínas dentro de los endosomas son principalmente cargados en moléculas del CMH clase II.

La activación de células T CD4+ es particularmente deseable para intensificar las reacciones inmunes contra agentes infecciosos pero no sería la óptima para el tratamiento de tumores, en donde es importante estimular una respuesta inmune citotóxica. Si bien varios grupos han demostrado que los péptidos pueden ser guiados a la ruta del CMH tipo I, acoplándolos a partículas o a proteínas de heat-shock, estos resultados son muy preliminares y es necesario más investigación al respecto.

Carga con péptidos específicos del tumor

Una estrategia promisoría en la que se emplean CD maduras es el uso de péptidos específicos obtenidos por síntesis que son cargados directamente sobre las moléculas del CMH de superficie. La desventaja de este método consiste en la restricción del CMH por que no todos los péptidos conocidos se adecuan a los sitios de anclaje del CMH del paciente a tratar.

Antígenos tumorales para vacunas

La capacidad de las CD derivadas de la médula ósea de actuar como inmunógenos efectivos de linfocitos T citotóxicos CD8+ antitumorales luego de ser expuestas a péptidos derivados de tumores ha sido claramente demostrada en modelos animales^{11, 12, 13, 14, 15}.

Hasta el momento se han identificado varios antígenos asociados a tumores que pueden emplearse como potenciales inmunógenos en terapias de vacunación. Estos péptidos derivan de genes tales como ras¹⁶, Her/2-neu^{17, 18}, MART-1, Melan-A, gp100 tirosinasa^{19, 20, 21}, p53²², idiotipos de células B²³, MUC-1^{24, 25} y familias de genes como MAGE, BAGE, GAGE y RAGE^{26, 27}.

Una de las principales ventajas de la inmunización basada en la carga de las CD con péptidos es la especificidad contra el epitope tumoral de interés. Sin embargo, dada la heterogeneidad de las células tumorales, puede que no todas las células expresen ese epitope. Una alternativa que se está contemplando actualmente consiste en el empleo de cuerpos apoptóticos derivados del tumor o lisados tumorales^{28, 29}. De este modo no sería necesario identificar los antígenos relevantes del tumor para la inmunización.

Teóricamente, las secuencias peptídicas que abarcan los puntos de unión de las proteínas de fusión de oncogenes serían blancos ideales para inmunoterapia porque no están presentes en células normales. Algunos ejemplos de translocaciones que resultan en proteínas de fusión incluyen la t(15; 17) en LMA M3, t(8; 21) en LMA M2, inv 16 en LMA M4 y t(9; 22) en LMC. En ensayos pre-clínicos Nieda y col.³⁰ obtuvieron actividad citotóxica contra células de pacientes con LMC empleando linfocitos T luego de su estimulación con CD "cargadas" con un péptido cuya secuencia correspondía a la región de fusión de la quimera BCR/ABL. De manera análoga, Osman y col.³¹ obtuvieron respuestas citotóxicas específicas al "cargar" CD con un péptido de 12 mer derivado de la proteína de fusión PML/RAR- α .

Se ha descrito que la proteína WT1 (producto del gen "Wilms Tumor") se expresa preferencialmente en células leucémicas y no en las células normales^{32, 33}. En un trabajo reciente, Ohminami y col. han propuesto que la inmunoterapia con linfocitos T citotóxicos activados con CD "cargadas" con un péptido derivado de la proteína WT1 podría ser eficaz para el tratamiento de las leucemias³⁴.

Por otra parte, es posible generar CD "leucémicas" a partir de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con distintos tipos de leucemia mieloide aguda. Se ha demostrado que estas células tienen la capacidad de inducir una actividad citotóxica antileucémica específica autóloga, por lo que las CD "leucémicas" podrían potencialmente ser empleadas como vacunas antileucémicas *in vivo* o para generar linfocitos T antileucémicos *in vitro* en protocolos de inmunoterapia adoptiva³⁵.

Cuando se trata de decidir una estrategia de vacunación otros factores importantes a tener en cuenta se relacionan con la carga óptima de las CD con los antígenos específicos de la entidad contra la que se desea obtener una respuesta inmune y las características del antígeno, ya que afecta considerablemente la naturaleza y calidad de la respuesta inmune inducida.

APLICACIONES CLÍNICAS

Aplicaciones en Oncología

Los alentadores resultados obtenidos en ensayos pre clínicos *in vitro* y en modelos animales impulsaron el desarrollo de protocolos de inmunoterapia a nivel clínico.

En 1996 el grupo de Levy²³ fue el primero en publicar los resultados obtenidos en 4 pacientes con linfomas no-Hodgkin B de bajo grado (folicular) previamente tratados con quimioterapia. Las CD fueron obtenidas *in vitro* a partir de células mononucleares recolectadas por leucoaféresis. Una vez "cargadas" con la inmunoglobulina monoclonal expresada por estos linfomas, las células fueron inyectadas en los pacientes por vía subcutánea. En todos los casos se observó una respuesta anti-tumoral y 3 mostraron regresión parcial o total de los linfomas.

En 1998, Nestle y col.²⁹ demostraron que 5 de 16 pacientes vacunados con péptidos o lisados de tumor de melanoma tuvieron respuestas parciales y completas con regresión de las metástasis en varios órganos (piel, páncreas, pulmón y tejidos blandos).

A partir de estos estudios pioneros que demostraron la factibilidad y la baja toxicidad de la administración de células dendríticas, varios grupos han reportado resultados preliminares de ensayos clínicos, algunos de los cuales se resumen en la tabla I.

Aplicaciones en Infectología

Los linfocitos T CD8+ antígeno específicos podrían proveer resistencia a algunas enfermedades infecciosas. La infección con citomegalovirus (CMV) constituye una seria complicación en trasplantes alogénicos de médula ósea. Se ha demostrado la generación de respuestas citotóxicas específicas *in vitro* contra epitopes de CMV presentados por CD^{45, 46, 47}. Resultados análogos se obtuvieron empleando el péptido EBNA-3A del virus Epstein-Barr⁴⁸ y un péptido derivado del gen gp160 del virus HIV-1⁴⁹. En 1998 Kundu y col.⁵⁰ llevaron a cabo un estudio piloto en 6 pacientes infectados con HIV-1 empleando vacunas con CD cargadas con péptidos derivados de proteínas virales.

TABLA I
ENSAYOS CLÍNICOS QUE UTILIZARON CÉLULAS DENDRÍTICAS EN DIVERSOS TUMORES

CITA	PACIENTES (Número)	DIAGNOSTICO	FUENTE DE CD	ANTIGENO EMPLEADO PARA PULSAR CD	RESPUESTA
Tjoa <i>et al.</i> (36)	33	Cancer de próstata	No detallada	PSM-P1 y PSM-P2	Disminución de PSA en 50% 9 remisiones parciales (4 por 370 días y 5 por 196 días)
Faid <i>et al.</i> (37)	22	Tumores que expresan MAGE 1 y MAGE 3	Células mononucleares de sangre periférica	MAGE 1 MAGE 3	Inducción de respuesta T específica en el 50 % de los pacientes
Brossart <i>et al.</i> (38)	10	Tumor metastásico de mama y ovario	Monocitos	E75 GP2 MUC-1	Inducción de respuesta T específica en todos los pacientes tratados con MUC-1
Mackensen <i>et al.</i> (39)	14	Melanoma	Progenitores hematopoyéticos CD34+	MAGE-1 MAGE-3 Melan A gp-100 Tirosinasa	Inducción de respuesta T específica en todos los pacientes 2 pacientes demostraron respuestas clínicas antitumorales
Timmerman <i>et al.</i> (40)	26	Linfoma B folicular	Células mononucleares de sangre periférica	Idiotipo de inmunoglobulina	3 remisiones clínicas 2 remisiones parciales 1 remisión molecular 14 sin progresión de enfermedad 6 recaídas
Liso <i>et al.</i> (41)	27	Mieloma múltiple	No detallada	Idiotipo acoplado a keyhole limpet hemocyanin (Id-KLH)	25 respuestas celulares específicas anti - KLH 4 respuestas T específicas anti-idiotipo (3 en remisión clínica) 9 demostraron disminución del nivel de proteína del mieloma
Kugler <i>et al.</i> (42)	17	Carcinoma renal con metástasis	Monocitos	Híbrido de células tumorales autólogas con células dendríticas alogénicas	4 remisiones de lesiones metastásicas 2 reducciones > 50 % de la masa tumoral 1 respuesta mixta
Cajal <i>et al.</i> (43)	14	Cancer avanzado: Melanoma (10) Riñón (1) Pulmón (1) Sarcoma (1) Mama (1)	Células mononucleares de sangre periférica	Lisados de tumor autólogo	1 respuesta parcial (melanoma) 6 con enfermedad estable > 6 meses 7 demostraron progresión de tumor
Titzer <i>et al.</i> (44)	11	Mieloma múltiple	Células CD34+	Idiotipo de paraproteína	3 respuestas tumorales específicas 4 respuestas celulares específicas 1 disminución de infiltración de células plasmáticas en médula ósea

Si bien el número de linfocitos T CD4+ y el nivel de carga viral permanecieron estables durante el tratamiento, las infusiones fueron bien toleradas por los pacientes y se observaron aumentos en la producción de IFN- γ e IL-2 y proliferación de linfocitos citotóxicos específicos antiproteínas de envoltura.

Recientemente se identificó una lectina específica de CD denominada DC-SIGN (por dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin)^{51, 52}. Esta molécula media una adhesión débil entre las CD y los linfocitos T, lo que permitiría que las moléculas de TCR presentes en la superficie de los linfocitos T escaneen la superficie de las CD, en donde sus

ligandos (CMH-péptido) están presentes en un número relativamente bajo (10-1000 moléculas/célula), con la subsecuente activación de las células T. Por otra parte, DC-SIGN actúa como ligando para el virus HIV-1. La molécula presente en las CD de las mucosas une el virus, permitiendo el transporte del mismo a los órganos linfáticos secundarios y su transmisión a las células blanco. Este hallazgo señala a DC-SIGN como un potencial sitio sobre las CD para manipular la respuesta inmune y la infección por HIV-1. Además ilustra la importancia de no restringir el análisis a antígenos y linfocitos cuando se desea manipular la respuesta inmune⁵³.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Si bien la mayoría de las experiencias clínicas se han reportado en pacientes con patologías tumorales, la potencial aplicación de las CD como modalidad de inmunoterapia aparenta ser más amplia. Numerosos estudios en animales y en humanos *in vitro* muestran que estas células pueden ser empleadas para inducir respuestas inmunes específicas contra antígenos bacterianos y virales. Su aplicación clínica podría ser útil en pacientes con hepatitis crónica o en aquellos con una respuesta inmune deficiente.

Otro aspecto a tener en cuenta es el fenómeno de tolerancia a antígenos, debido a que las CD también intervienen en el proceso de presentación de antígenos propios a la población de linfocitos T que finalmente conduce a la eliminación de aquellas células T autorreactivas⁵⁴. Esto es particularmente importante a considerar para pacientes que padecen alergias, asma y otras enfermedades autoinmunes.

La investigación en el área de las CD está expandiéndose aceleradamente. A nivel molecular se trabaja en la identificación de genes expresados específicamente por las CD y en la caracterización de sus productos. Se espera la identificación de nuevas moléculas que intervengan en el procesamiento y unión de antígenos, productos de secreción y factores de transcripción que puedan explicar las características características de las CD.

Las propiedades migratorias y sus mecanismos de señalización, los factores de diferenciación y maduración celular así como también el rol de las distintas subpoblaciones de las CD representan áreas adicionales de estudio. Además, se busca identificar nuevos antígenos asociados a tumor y se ensayan diferentes vehículos de "entrega" de estos antígenos a las CD: vectores virales, liposomas, ácidos nucleicos o proteínas, lisados de tumor, cuerpos apoptóticos y péptidos sintéticos. A nivel clínico se está trabajando intensamente en la optimización de los protocolos de vacunación, representando una nueva y prometedora modalidad terapéutica efectiva y no tóxica para el tratamiento del cancer.

SUMMARY

Dendritic cells (DC) are considered the most effective antigen-presenting cells. DC are derived from bone marrow progenitors and circulate as immature precursors. Upon appropriate stimulation, DC undergo maturation and migrate to secondary lymphoid tissues where they present antigens to T lymphocytes and induce an immune response. DC can be generated and manipulated *in vitro* to present tumor or pathogen-specific antigens. Once activated, they can be infused into patients acting as cellular

vaccines, representing the basis of many ongoing clinical trials of cancer immunotherapy.

Key words: Dendritic cells, tumor related antigens, immunotherapy

BIBLIOGRAFÍA

- Steinman R., Cohn Z. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 1973; 137: 1142-62.
- Lanzavecchia A. Mechanisms of antigen uptake presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 1996; 8: 348-54.
- Herbst B., Lindemann A. Dendritic cells for immunotherapy. *Biomedical Progress* 1998; 11: 1-6.
- Shortman K., Caux C. Dendritic cell development: multiple pathways to nature's adjuvants. *Stem Cells* 1997; 15: 409-19.
- Caux C., Dezutter-Dambuyant C., Schmitt D., Bancherreau J. GM-CSF and TNF- α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 1992; 360: 258-61.
- Strunk D., Rappersberger K., Egger C., Strobl H., Krömer E., Elbe A. Generation of human dendritic cells/Langerhans cells from circulating CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996; 87: 1292-302.
- Peters J., Xu H., Ruppert J., Ostermeier D., Friedrichs D., Gieseler R. Signals required for differentiating dendritic cells from human monocytes *in vitro*. *Advances in Exp. Med. and Biol.* 1993; 329: 275-80.
- Zhou L., Tedder T. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 2588-92.
- Fong L., Hou Y., Rivas A. *et al.* *In vivo* expansion of dendritic cells with Flt3L for human tumor immunotherapy. *Blood* 1999; 94 (10) Suppl. 1: 378a. Abst. # 1683.
- Herbst B., Kohler G., Mackensen A., Veelken H., Lindemann A. GM-CSF promotes differentiation of a precursor cell of monocytes and Langerhans-type dendritic cells from CD34+ haematopoietic progenitor cells. *Brit. J. Haematol.* 1998; 101: 231-41.
- Mayordomo J., Zorina T., Storkus W. *et al.* Bone marrow derived dendritic cells pulsed with synthetic tumor peptides elicit protective and therapeutic anti-tumor immunity. *Nature Genetics* 1995; 1: 1297-1302.
- Celluzi C., Mayordomo J., Storkus W., Lotze M., Falo L. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific, CTL-mediated protective tumor immunity. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 283-8.
- Flamand V., Sornasse T., Thielemans K., *et al.* Murine dendritic cells pulsed *in vitro* with tumor antigen induced tumor resistance *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* 1994; 23: 605-10.
- Zitvogel L., Mayordomo J., Tjardrawan T. *et al.* Therapy of murine tumors with murine peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell-associated cytokines. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 287-97.
- Ribas A., Butterfield L., McBride W. *et al.* Genetic immunization for the melanoma antigen MART-1/MELAN-A using recombinant adenovirus-transduced murine dendritic cells. *Cancer Res* 1997; 57: 2865-9.
- Peace D., Chen W., Nelson H. T cell recognition of transforming protein encoded by mutated ras proto-oncogenes. *J. Immunol.* 1991; 146: 2059-65.
- Fisk B., Bleviss T., Wharton J. Identification of an immunodominant peptide of HER2/*neu* protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J. Exp. Med* 1995; 181: 2109-2065.

18. Peoples G., Goedegebuure P., Smith R. Breast and ovarian cancer-specific cytotoxic T lymphocytes recognize the same HER2/*neu*-derived peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92: 432-6.
19. Kawakami Y., Eliyahu S., Sakaguchi K. Identification of the immunodominant peptides of MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 347-52.
20. Castelli C., Sotrkus W., Maeurer M. Mass spectrometric identification of a natural-processed melanoma peptide recognized by CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1995; 181: 363-8.
21. Bakker A., Schreurs N., de Boer A. Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma derived tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1994; 179: 1005-9.
22. DeLeo AB. p53-based immunotherapy of cancer. *Crit. Rev. Immunol.* 1998; 18: 29-35.
23. Hsu F., Benike C., Fagnoni F. *et al.* Vaccination of patients with B cell lymphoma using autologous antigen pulsed dendritic cells. *Nature Med.* 1996; 2: 52-8.
24. Kotera Y., Fontenot J., Pecher G., Metzgar R., Finn O. Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC-1 in sera from breast, pancreatic, and colon cancer patients. *Cancer Res* 1994; 54: 2856-60.
25. Finn O., Jerome K., Henderson R. MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines. *Immunol. Rev.* 1995; 145: 61-89.
26. Traversari C., Van der Bruggen P., Luescher Y., Lurquin C., Chomez P., Van Pel A. A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J. Exp. Med.* 1992; 176: 1453-8.
27. Boel P., Wildmann C., Sensi M. BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity* 1995; 2: 167-75.
28. Albert M., Sauter B., Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998; 392: 86-9.
29. Nestle F., Alijagic S., Gilliet M. Vaccination of melanoma patients with peptide-or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 1998; 4: 328-332.
30. Nieda M., Nicol A., Kikuchi A., *et al.* Dendritic cells stimulate the expansion of bcr-abl specific CD8+ T cells with cytotoxic activity against leukemic cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 1998; 91 (3): 977-83.
31. Osman Y., Takahashi M., Zheng Z., *et al.* Dendritic cells stimulate the expansion of PML-RAR alpha specific cytotoxic T-lymphocytes: its applicability for antileukemia immunotherapy. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 1999; 18 (4): 485-92.
32. Miwa H., Beran M., Saunders G. Expression of the Wilm's tumor gene (*wt1*) in human leukemias. *Leukemia.* 1992; 6: 405-9.
33. Menssen H., Renkl H., Rodeck U. *et al.* Presence of Wilm's tumor gene (*wt1*) transcripts and WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia.* 1995; 9: 1060-7.
34. Ohnishi H., Yasukawa M., Fujita S. HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8+ cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide. *Blood.* 2000; 95 (1): 286-93.
35. Choudhury A., Liang J., Thomas E., *et al.* Dendritic cells derived in vitro from acute myelogenous leukemia cells stimulate autologous, antileukemic T-cell responses. *Blood* 1999; 93 (3): 780-6.
36. Tjoa B., Simmons S., Bowes V., *et al.* Evaluation of phase I/II clinical trials in prostate cancer with dendritic cells and PSMA peptides. *Prostate* 1998; 36 (1): 39-44.
37. Faid L., Toungouz M., Libin M., *et al.* In patients with Mage-1, -3 positive tumors, the injection of autologous dendritic cells pulsed with Mage-1, -3 peptides induces a transient specific induction of blood anti-Mage-1, -3 T cells that is not improved by keyhole-limpet hemocyanin used as non-specific help. *Proceedings of ASCO 2000:* 454a. Abst. # 1779.
38. Brossart P., Stuhler G., Reichardt V. *et al.* Vaccination therapy of patients with metastatic breast and ovarian carcinoma using peptide pulsed dendritic cells. *Blood* 1999; 94 (10) Suppl. 1: 216a. Abst. # 949.
39. Mackensen A., Herbst B., Chen J. *et al.* Induction of antigen-specific immune responses in melanoma patients after vaccination with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* 1999; 94 (10) Suppl. 1: 216a. Abst. # 950.
40. Timmerman J., Davis T., Hsu, *et al.* Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immunological responses in 26 patients. *Blood* 1999; 94 (10) Suppl. 1: 385a. Abst. # 1712.
41. Liso A., Stockerl-Goldstein K., Aufferman S. Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation for multiple myeloma. *Blood* 1999; 94 (10) Suppl. 1: 715a. Abst. # 3156.
42. Kugler A., Stuhler G., Walden P., *et al.* Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nature* 2000; 6 (3): 332-6.
43. Cajal R., Mayordomo J., Yubero A. *et al.* Immunological and clinical effects of immunotherapy with dendritic cells pulsed with tumor lysates in patients with advanced cancer. A pilot trial. *Proceedings of ASCO 2000:* 454a. Abst. # 1780.
44. Titzer S., Christensen O., Mancke O. Vaccination of multiple myeloma patients with idiotype-pulsed dendritic cells: immunological and clinical aspects. *Br. J. Haematol.* 2000; 108 (4): 805-16.
45. Keever-Taylor C., Margolis D., Sandford G., Miller K., Fisher B., Burns W. Generation of cytomegalovirus-specific cytolytic T cell lines and clones using pp65 transfected dendritic cells. *Blood* 1999; 94 (10) Suppl. 1: 152a. Abst. # 667.
46. Glinz S., Linari S., Caporale R., Bosi A., Rossi Ferrini P. In vitro generation of CMV-specific cytotoxic T lymphocytes using CMV-peptide pulsed dendritic cells. *Bone Marrow Transpl.* 2000; 25, Suppl 1: S121, Abst. P347.
47. Diamond D., York J., Sun J., Wright C., Forman S. Development of candidate HLA A*0201 restricted peptide-based vaccine against human cytomegalovirus infection. *Blood* 1997; 90 (5): 1751-67.
48. Subklewe M., Chahroudi A., Schmaljohn A., Kurilla M., Bhardwaj N., Steinman R. Induction of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses using dendritic cells pulsed with EBNA-3A peptides or UV-inactivated, recombinant EBNA-3A vaccinia virus. *Blood* 1999; 94 (4): 1372-1381.
49. Takahashi H., Nakagawa Y., Yokomuro K., Berzofsky J. Induction of CD8+ cytotoxic T lymphocytes by immunization with syngeneic irradiated HIV-1 envelope derived peptide-pulsed dendritic cells. *Int. Immunol.* 1993; 5 (8): 849-857.
50. Kundu S., Engleman E., Benike C., *et al.* A pilot clinical trial of HIV antigen-pulsed allogeneic and autologous dendritic cell therapy in HIV-infected patients. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1998; 14 (7): 551-60.
51. Geijtenbeek T., Torensma R., van Vliet S., *et al.* Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 2000; 100: 575-85.
52. Teunis B., Geijtenbeek T., Kwon D. *et al.* DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 2000; 100: 587-97.
53. Steinman R. DC-SIGN: a guide to some mysteries of dendritic cells. *Cell* 2000; 100: 491-4.
54. Banchereau J., Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-52.