

THE ADAPTATION OF METHOD OF GENERATING MONOCYTE DERIVED HUMAN DENDRITIC CELLS FOR CLINICAL PRACTICE

Chkadua G.Z., Zabolina T. N., Burkova A.A., Tamaeva Z.E., Ogorodnikova E.V., Jordania K.I., Kadagidze Z.G., Baryshnikov A.Yu.
Russian N.N. Blokhin memorial cancer research center RAMS

ABSTRACT

Dendritic cells (DC) are the most potent antigen-presenting cells, so the great hopes of development of antitumor vaccines are being placed on them. There are several methods of generation human DC existing today. However their clinical application is restricted by the accomplishment of the set of conditions. For the usage of dendritic cells based antitumor vaccines in clinical practice it is necessary to develop simple and replicable method of generation DC and their maturation. In this work we have adapted methods of generation DC for clinical practice. We have shown that tumor necrosis factor- β (TNF- β) and prostaglandin E2 as maturation stimuli of dendritic cells are more effective and their usage allows to get replicable results comparing with usage of monocyte conditioned medium. We have also determined that replacement of human plasma to human umbilical cord blood serum in culture medium significantly increase the amount of mature forms of DC. In our method the number of operations has been decreased, so the work became easier and waste of cultured cells can be minimized. This adapted method of generating dendritic cells can be used in clinical practice.

АДАПТИРОВАНИЕ МЕТОДИКИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ИЗ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ.

Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Буркова А.А., Тамаева З.Э., Огородникова Е.В., Жордания К.И., Кадагидзе З.Г., Барышников А.Ю.
Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина РАМН

Резюме

Дендритные клетки (ДК) являются наиболее мощными антиген-презентирующими клетками, в связи с этим на них возлагают большие надежды в плане создания противоопухолевых вакцин. На сегодняшний день существуют различные методики культивирования ДК человека, однако, для их клинического применения необходимо соблюдение ряда условий. Для применения вакцин на основе дендритных клеток в клинической практике необходимо, чтобы методика получения ДК была, по возможности, простой и воспроизводимой, а дендритные клетки были зрелыми. В данной работе мы адаптируем методику культивирования ДК для клинического применения. Нами показано, что использование фактора некроза опухоли- β и простаглан-

дина E2 в качестве агентов вызывающих созревание ДК, было более эффективно и позволило получить воспроизводимые результаты, по сравнению с использованием кондиционированной среды моноцитов. Также нами установлено, что замена человеческой плазмы в культуральной среде на сыворотку пуповинной крови человека, повысила выход зрелых форм дендритных клеток. В описанной методике уменьшено количество манипуляций, что облегчает работу, с одной стороны, и позволяет уменьшить потери клеток, с другой стороны. Адаптированная методика культивирования дендритных клеток может быть использована в клинической практике.

Введение

Дендритные клетки (ДК) представляют собой антиген-презентирующие клетки (АПК), контролирующие иммунитет посредством взаимодействия с лимфоцитами [1]. Незрелые ДК (нДК) расположенные в периферических тканях, захватывают и процессируют антигены, после чего, в ответ на воспалительные сигналы (хемокины и цитокины), они мигрируют в периферические лимфатические узлы. Во время миграции происходит созревание ДК, что выражается в усилении экспрессии главного как комплекса гистосовместимости (ГКГ) I и II классов, так и костимулирующих молекул (CD80 и CD86), молекул адгезии (CD54). В лимфатическом узле зрелые ДК (зДК) способны активировать антиген-специфические Т-хелперы и Т-киллеры [2]. Высокая экспрессия ГКГ и костимулирующих молекул на поверхности дендритных клеток, позволяет активировать «наивные» CD8⁺ Т-лимфоциты с последующей дифференцировкой в цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) без помощи Т-хелперов. Учитывая вышесказанное, в настоящее время *in vitro* ДК используют как иммунологический инструмент для генерации ЦТЛ против исследуемых антигенов.

Ранее было показано, что функциональная активность ДК у онкологических больных значительно снижена [3, 4, 5], и одной из причин этого является неспособность дифференцировки ДК в зрелые формы. Это может быть обусловлено как факторами секретируемыми самой опухолью (интерлейкин-10, трансформирующий фактор роста- α , васкулярный эндотелиальный фактор роста) [6, 7, 8], так и вырабатываемыми самим организмом (глюкокортикоиды) [9, 10] в ответ на присутствие опухоли, которая является хроническим стрессорным фактором. В последнее время сообщалось о противоопухолевых вакцинах на основе дендритных клеток. Общая схема заключается в следующем: культивирование ДК больного и «нагрузка» опухолевыми антигенами происходит вне организма (*in vitro*), что позволяет получить зрелые ДК, нагруженные антигенами, которые, с одной стороны, способны активировать иммунный ответ, а с другой стороны, устойчивы к супрессорному влиянию агентов указанных выше. В ряде клинических работ была продемонстрирована перспективность применения противоопухолевых вакцин на основе дендритных клеток [11, 12, 13, 14].

Обязательные требования, предъявляемые к культивируемым дендритным клеткам, которые планируют использовать в противоопухолевых вакцинах, сводятся к следующим пунктам:

1. Дендритные клетки должны быть зрелыми (введение нагруженных незрелых ДК больному приводит к ингибированию антиген-специфических эффекторных Т-лимфоцитов [15]).

2. Недопустимость присутствия ксеногенных белков во время культивирования ДК. Было показано, что у онкологических больных, которым вводили ДК культивируемые в присутствии эмбриональной телячьей сыворотки, происходила выработка антител на компоненты сыворотки, а в некоторых случаях наблюдали анафилактикую реакцию после введения ДК [16].

Целью данной работы явилось адаптивное методики культивирования дендритных клеток для клинического применения.

Материалы и методы

Культивирование дендритных клеток

Дендритные клетки культивировали из моноцитов периферической крови человека при 37°C и 5% CO₂ в RPMI-1640 (ICN, США) с различным процентным содержанием человеческой плазмы (ЧП) группы АВ или сыворотки пуповинной крови человека (СПК). В среду также входили: L-глутамин, НЕPЕС, антибиотики, витамины, гепарин, в-меркаптоэтанол (далее полная среда (ПС)). Мононуклеары периферической крови (МПК) выделяли из лейкомаасы здоровых доноров, полученной в отделении переливания крови с банком костного мозга (РОНЦ РАМН) или цельной крови онкогинекологии РОНЦ РАМН). После центрифугирования лейкомаасы или крови в градиенте плотности Ficoll-Neraque (Pharmacia, Швеция) (с=1,077) собирали интерфазные кольца и тщательно освобождались от тромбоцитов. МПК ресуспендировали в ПС и наносили на чашки Петри d=90 мм (Linbro, Великобритания) в 50x10⁶ клеток в 10 мл и инкубировали в течение 2 часов при 37°C и 5% CO₂. Отбрасывали не прилипшие клетки, а к адгезированным на пластике моноцитам добавляли 10 мл ПС, содержащей 80 нг/мл гранулоцит-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) (Leucomax[®], Shering-Plough) и 10 нг/мл интерлейкина-4 (ИЛ-4) (R&D Systems, США). На 2ые, 4ые и 6ые сутки культивирования к клеткам добавляли по 1 мл соответствующей ПС, содержащей 800 нг ГМ-КСФ и 100 нг ИЛ-4. Для терминальной дифференцировки ДК на 7ые сутки к культуре клеток добавляли кондиционированную среду моноцитов (КСМ) (33 объемных %) или фактор некроза опухоли- β (ФНО β) (конечная концентрация 20 нг/мл) (ICN, США) и простагландин E₂ (ПГЕ₂) (конечная концентрация 250 нг/мл) (ICN, США) и культивировали в течение 48 часов.

Получение кондиционированной среды моноцитов

Для получения КСМ на покрытую раствором γ -глобулина (10 мг/мл) (ОСТАГАМ[®], ОСТАРНАМА А.Г.) чашку Петри наносили 50x10⁶ МПК. Через 2 часа удаляли не прилипшие клетки, а адгезированные моноциты культивировали в ПС. Через 24 часа собирали КСМ, стерильно фильтровали, разливали по аликвотам и хранили при -70°C.

Проточная цитометрия

На 7ые и 9ые сутки культивирования определяли иммунофенотип ДК с помощью прямой реакции иммунофлуоресценции. В работе использовали моноклональные антитела, конъюгированные с FITC, к антигенам CD80 (PharMingen, США), CD54, CD83, CD86 (Caltag, США), HLA-DR (Becton-Dickinson, США), HLA-ABC (НПЦ «МедБиоСпектр», Россия) и соответствующие изотипические контроли (Caltag, США). Иммунофенотип ДК определяли на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton-Dickinson, США).

Определение эндоцитоза дендритными клетками.

Способность к эндоцитозу нДК (7ые сутки культивирования) и зДК (9ые сутки культивирования) определяли по захвату *Candida albicans* меченой FITC (любезно предоставленной Д.В. Мазуровым). Опытные образцы инкубировали в течение 30 мин при 37°C, а контрольные образцы при 4°C. Соотношение *Candida*:ДК составляло 2:1. Эндоцитоз определяли на

проточном цитофлуориметре FACSCalibur.

Результаты и обсуждение

Для получения нДК моноциты культивируют в присутствии двух цитокинов - ГМ-КСФ и ИЛ-4 в течение 7и суток. В процессе культивирования клетки открепляются от пластика, увеличиваются в размере, приобретают отростчатую форму. По светорассеянию при анализе на проточном цитофлуориметре ДК выглядят как крупные гранулированные клетки. Дендритные клетки на 7ые сутки культивирования представляют собой HLA-DR⁺⁺, CD14⁻, CD83⁻ клетки. Незрелые ДК обладают высокой эндоцитозной активностью. Факторами, вызывающими дифференцировку дендритных клеток, могут служить: КСМ, CD40-лиганд, набор цитокинов (ИЛ-1, ФНО-б, ПГЕ₂), липополисахарид и др. После воздействия на нДК указанных выше агентов, происходит дифференцировка или созревание дендритных клеток, что выражается в неэкспрессии на поверхности клетки таких антигенов как: CD83 (маркер зрелых ДК), CD80. Наблюдается увеличение экспрессии комплексов гистосовместимости I и II классов, параллельно происходит снижение способности к эндоцитозу [17].

Методика культивирования дендритных клеток для клинического применения должна отвечать ряду требований:

1. Воспроизводимость метода. Вне зависимости от донора (большого) разработанная методика должна обеспечивать получение зрелых ДК.

2. Количество манипуляций в методике должно быть сведено к разумному минимуму. Метод, состоящий из большого числа стадий и включающий много манипуляций, трудно воспроизводим и трудоемок, что, безусловно, ограничит его возможное клиническое применение.

3. Методика должна быть относительно недорогой. Это зависит от используемых реагентов и тех методических подходов, которые позволяют избежать приме-

нения дополнительных реактивов, коммерческих наборов и т.д.

Влияние условий культивирования на процентное содержание зрелых форм дендритных клеток.

На 7^{ые} сутки культивирования иммунофенотип клеток соответствовал незрелым дендритным клеткам. Отсутствовала экспрессия CD80 и CD83, наблюдали низкий уровень экспрессии CD86 и CD54. Вместе с тем ДК экспрессировали ГКГ I и II классов (рис. 1).

После добавления КСМ происходила дифференцировка дендритных клеток, что сопровождалось появлением CD80 и CD83 антигенов на поверхности клеток и повышением экспрессии CD86, CD54 и ГКГ I и II классов (Рис. 2).

Следует отметить, что процент CD83⁺ дендритных клеток от эксперимента к эксперименту колебался от 10 до 60% (среднее значение составило 29,372% ± 4,811). Увеличение объема добавляемой КСМ, изменение плотности нанесения моноцитов на покрытую г-глобулином чашку Петри, внесение аутологичной или аллогенной КСМ - не приводило к существенному изменению процента зрелых CD83 положительных дендритных клеток (данные не приводятся).

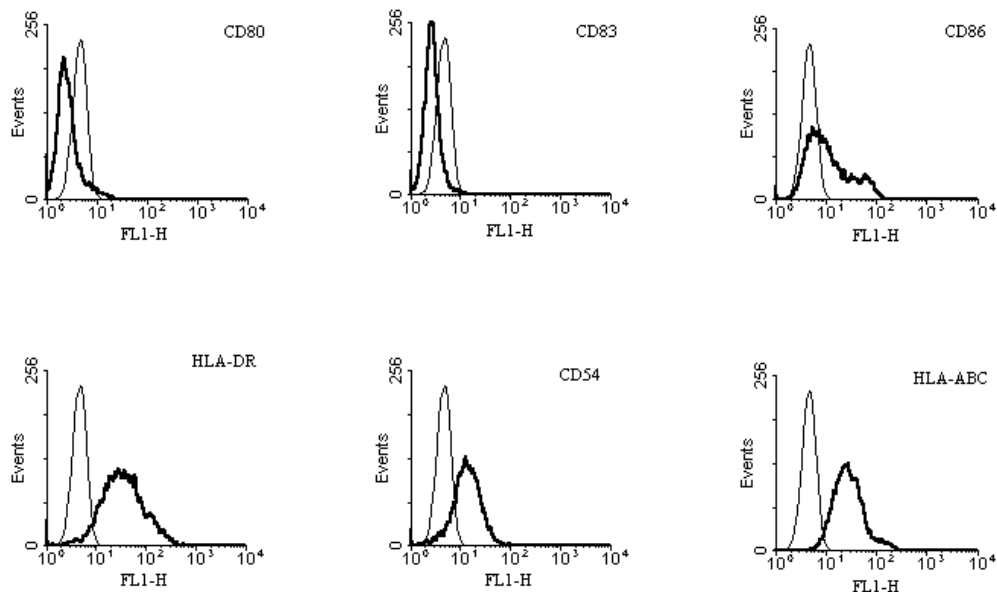
В другой серии экспериментов, для того чтобы повысить выход зрелых форм ДК в качестве агентов, вызывающих дифференцировку, использовали ФНО-б и ПГЕ₂ [18]. После ряда проведенных экспериментов мы остановились на следующих концентрациях компонентов: ФНО-б - 20 нг/мл, ПГЕ₂ - 250 нг/мл. Так, после индукции дифференцировки кондиционированной средой моноцитов количество зрелых ДК составляло около 30%, тогда как, используя ФНО- и ПГЕ₂, выход CD83⁺ дендритных клеток увеличивался до 50% (54,036 ± 4,204). Кроме того, при этой схеме происходило усиление экспрессии CD80 антигена (Рис. 3).

Во многих экспериментальных работах *in vitro* ден-

Рис. 1. Иммунофенотип ДК на 7ые сутки культивирования.

Клетки культивировали в ПС, содержащей 2% ЧП в присутствии ГМ-КСФ и ИЛ-4 (см. Материалы и методы).

Гистограммы с тонкой линией - изотипические контроли; гистограммы с толстой линией - исследуемые антигены.



дритные клетки культивировали в среде, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) [19, 20], однако, в ряде работ было показано, что человеческая плазма является адекватной заменой ЭТС [21, 22, 23, 24]. В некоторых клинических работах ДК, которые вводили больным, также культивировали в присутствии ЭТС [25]. По видимому, выбор в пользу ЭТС связан с тем, что эмбриональная сыворотка более богата ростовыми факторами по сравнению с человеческой плазмой и, соответственно, используя ее в культуральной среде, при прочих равных условиях, можно получить

более высокий и воспроизводимый результат. Сравнивая стандартные условия культивирования (2% ЧП, КСМ - 33 объемных %) с культивированием клеток в среде с 2% ЭТС, при одном и том же количестве ДК на выходе, процент зрелых форм был в 1,5 раза выше в среде, содержащей эмбриональную телячью сыворотку (данные не приводятся). Однако, использование ЭТС для культивирования дендритных клеток, которые планируют использовать в клинике, недопустимо, о чем говорилось выше, в связи с этим мы попытались найти замену эмбриональной телячьей сыворотки.

Рис. 2. Иммунофенотип ДК на 9ые сутки культивирования

Клетки культивировали в ПС, содержащей 2% ЧП в присутствии ГМ-КСФ и ИЛ-4. На 7ые сутки добавили КСМ (33 объемных %) и культивировали в течение 48 часов (см. Материалы и методы). Гистограммы с тонкой линией - изотипические контроли; гистограммы с толстой линией - исследуемые антигены.

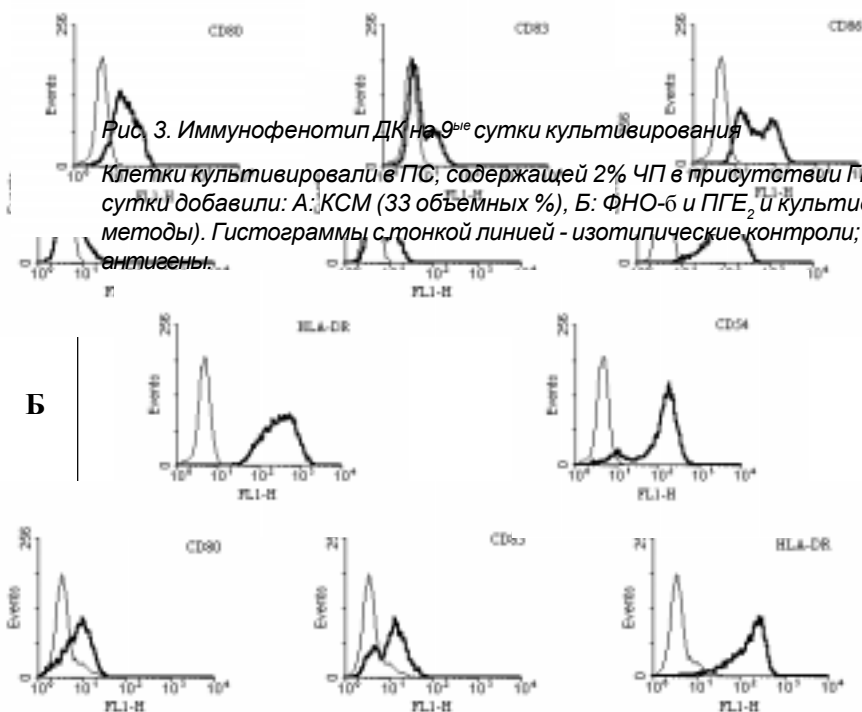


Рис. 3. Иммунофенотип ДК на 9ые сутки культивирования

Клетки культивировали в ПС, содержащей 2% ЧП в присутствии ГМ-КСФ и ИЛ-4. Для дифференцировки ДК на 7ые сутки добавили: А: КСМ (33 объемных %), Б: ФНО-6 и ПГЕ₂ и культивировали в течение 48 часов (см. Материалы и методы). Гистограммы с тонкой линией - изотипические контроли; гистограммы с толстой линией - исследуемые антигены.

Б

Аналогом ЭТС, может служить сыворотка пуповинной крови человека (СПК), которую, в определенной степени, тоже можно считать эмбриональной сывороткой. В связи с этим, в последующих экспериментах, мы исследовали, как влияет присутствие СПК в культуральной среде на процентное содержание зрелых дендритных клеток. Проведя серию экспериментов, с разным процентом СПК в культуральной среде, мы установили, что наиболее оптимальным является культивирование ДК в среде, содержащей 2% сыворотки пуповинной крови. Повышение процента СПК в культуральной среде не влияло на соотношение зрелых ДК, тогда как абсолютное число дендритных клеток на выходе даже снижалось (данные не приводятся). При культивировании дендритных клеток в среде содержащей 2% СПК, наблюдали более высокий процент зрелых ДК (Рис. 4). В данном случае экспрессию CD83 антигена наблюдали у 70% ($69,938 \pm 1,793$) ДК.

На основании данных, представленных в таблице № 1 можно сделать следующие выводы: использование ФНО-б и ПГЕ₂ предпочтительнее для индукции дифференцировки дендритных клеток, чем кондиционированная среда моноцитов. Культивирование ДК в среде, содержащей сыворотку пуповинной крови, позволяет получить большее количество зрелых дендритных клеток, чем в среде, в состав которой входит человеческая плазма.

Исследование эндоцитоза дендритными клетками

Как упоминалось выше, зрелые ДК отличаются от незрелых форм не только по характеру ряда антигенов, но также изменением их функциональной активности. В частности, происходит снижение эндоцитоза [17, 18, 26]. В наших опытах эндоцитоз дендритными клетками

исследовали по поглощению дрожжей (*Candida albicans*), конъюгированных с FITC.

На 7^{ые} сутки культивирования у всех ДК отмечалась сильная экспрессия МР (данные не приводятся) и это сочеталось с высокой эндоцитозной активностью (Рис. 5). В процессе дифференцировки ДК, процент клеток, несущих маннозный рецептор, оставался прежним, тогда как его экспрессия значительно снижалась (данные не приводятся). На 9^{ые} сутки культивирования эндоцитозная активность зрелых ДК существенно падала (Рис. 5).

Культивирование дендритных клеток из крови онкологических больных.

Так как все выше описанные эксперименты проводили на лейкомассе здоровых доноров, то необходимо было выяснить подходит ли данная методика для культивирования дендритных клеток из крови онкологических больных. В эксперименте использовали кровь больной с дисгерминомой яичника. ДК культивировали в среде, содержащей 2% СПК, на 7^{ые} сутки культивирования к культуре клеток добавили ФНО-б и ПГЕ₂. Анализируя иммунофенотип дендритных клеток через 48 часов после внесения ФНО-б и ПГЕ₂, выявили 40% зрелых CD83⁺ ДК (Рис. 6).

Заключение

В методиках, описывающих культивирования дендритных клеток для клинического применения, перед внесением агентов, вызывающих их дифференцировку, дендритные клетки ресуспендируют в свежей среде, и переносят в би-луночный планшет из расчета 5×10^5 ДК на одну лунку [22, 23, 28]. Это, с нашей точки зрения, усложняет метод, поэтому мы отказались от пере-

Рис. 4. Экспрессия CD83 антигена дендритными клетками на 9^{ые} сутки культивирования. Клетки культивировали в ПС, содержащей 2% СПК в присутствии ГМ-КСФ и ИЛ-4. Для дифференцировки ДК на 7^{ые} сутки добавили ФНО-б и ПГЕ₂ и культивировали в течение 48 часов (см. Материалы и методы). Гистограммы с тонкой линией - изотипические контроли; гистограммы с толстой линией - исследуемые антигены. На рисунке представлены гистограммы четырех независимых экспериментов.

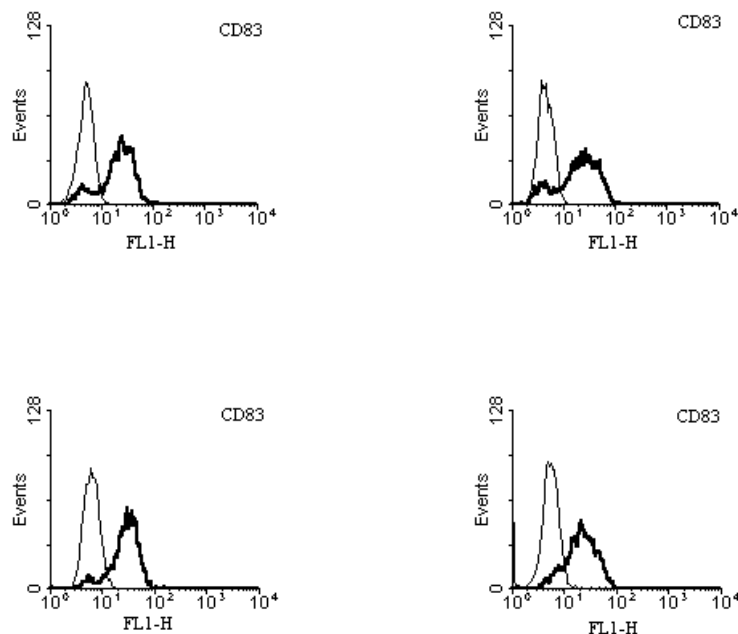


Таблица 1. Зависимость процентного содержания зрелых CD83⁺ ДК от условий культивирования (9ые сутки культивирования).

носа ДК. От момента нанесения МПК на культуральную чашку и до момента получения зрелых ДК весь процесс культивирования происходит в одной и той же чашке Петри, мы только добавляем небольшое количество полной среды, содержащей необходимые цитокины. Такой подход, безусловно, с одной стороны упрощает получение ДК, а с другой стороны уменьшает их потери, которые происходят при центрифугировании и переносе клеток в новый культуральный планшет.

В ряде экспериментальных работ было показано, что дендритные клетки можно культивировать в безсывороточной среде, и при этом результаты были сопоставимы с теми, которые были получены при культивировании ДК в стандартных условиях [23, 24]. Однако, в клинических работах дендритные клетки культивируют в среде с человеческой плазмой (иногда используют ЭТС) [14, 28, 29, 25].

Нами было показано, что культивирование дендритных клеток в среде, содержащей сыворотку пуповинной крови, более эффективно для получения зрелых ДК, чем в среде, содержащей человеческую плазму. Описанный методика может быть использована при культивировании дендритных клеток для их клинического применения.

Список литературы

1. Derek N.J., Hart. 1997. Dendritic Cells: Unique Leukocyte Populations Which Control the Primary Immune Response. Blood 90: 3245-3287
 2. Banchereau J., Steinman R.M., 1998. Dendritic cells

and the control of immunity. Nature 392: 245.

3. Gabilovich D.I., Corak J, Ciernik I.F., Kavanaugh D, and Carbone D.P., 1997. Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. Clin Cancer Res 3: 483 - 490.

4. Bond Almand, John R. Resser, Brian Lindman, Sorena Nadaf, Joseph I. Clark, Eugene D. Kwon, David P. Carbone, and Dmitry I. Gabilovich. 2000. Clinical Significance of Defective Dendritic Cell Differentiation in Cancer. Clin Cancer Res 6: 1755-1766.

5. Bond Almand, Joseph I. Clark, Ekaterina Nikitina, James van Beynen, Nicholas R. English, Stella C. Knight, David P. Carbone, and Dmitry I. Gabilovich. 2001. Increased Production of Immature Myeloid Cells in Cancer Patients: A Mechanism of Immunosuppression in Cancer J. Immunol 166: 678 - 689.

6. Kerstin Steinbrink, Helmut Jonuleit, Gabriele Muller, Gerold Schuler, Jurgen Knop, and Alexander H. Enk. 1999. Interleukin-10-Treated Human Dendritic Cells Induce a Melanoma-Antigen-Specific Anergy in CD8⁺ T Cells Resulting in a Failure to Lyse Tumor Cells. Blood 93: 1634 - 1642.

7. Dmitry Gabilovich, Tadao Ishida, Tsunehiro Oyama, Sophia Ran, Vladimir Kravtsov, Sorena Nadaf, and David P. Carbone. 1998. Vascular Endothelial Growth Factor Inhibits the Development of Dendritic Cells and Dramatically Affects the Differentiation of Multiple Hematopoietic Lineages In Vivo. Blood 92: 4150 - 4166.

8. Dmitry I. Gabilovich, Tadao Ishida, Sorena Nadaf, Joyce E. Ohm, and David P. Carbone. 1999. Antibodies to Vascular Endothelial Growth Factor

Рис. 5. Эндоцитоз дрожжей дендритными клетками на 7ые и 9ые сутки культивирования. Клетки культивировали в среде с 2% ЧП или 2% СПК (см. Материалы и методы), для дифференцировки использовали ФНО-б и ПГЕ₂. Представлены данные 2х независимых экспериментов, разброс данных не превышал 10%.

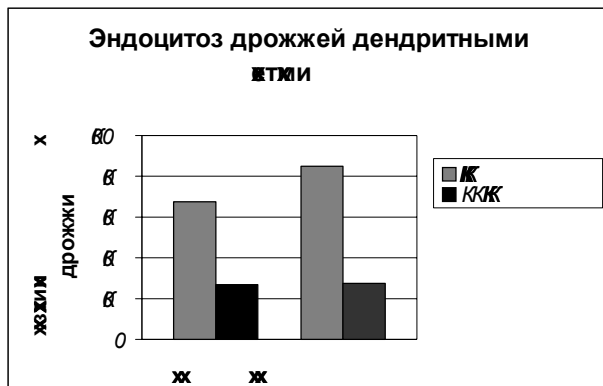
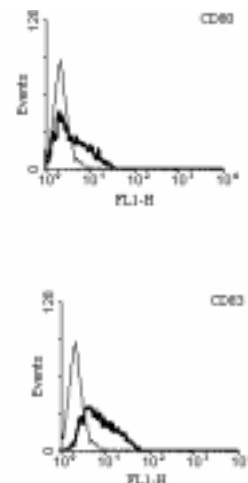


Рис. 6. Иммунофенотип ДК больной с дисгерминомой яичника на 9ые сутки культивирования. Клетки культивировали в ПС, содержащей 2% СПК в присутствии ГМ-КСФ и ИЛ-4. Для дифференцировки ДК на 7^{ые} сутки добавили ФНО-б и ПГЕ₂ и культивировали в течение 48 часов (см. Материалы и методы). Гистограммы с тонкой линией - изотипические контроли; гистограммы с толстой линией - исследуемые антигены.



Enhance the Efficacy of Cancer Immunotherapy by Improving Endogenous Dendritic Cell Function. *Clin Cancer Res* 5: 2963 - 2970.

9. Toshiyuki Kitajima, Kiyoshi Ariizumi, Paul R. Bergstresser, and Akira Takashima. 1996. A Novel Mechanism of Glucocorticoid-induced Immune Suppression: The Inhibition of T Cell-mediated Terminal Maturation of a Murine Dendritic Cell Line. *J. Clin. Invest.* 98: 142-147

10. Delphine Rea, Cees van Kooten, Krista E. van Meijgaarden, Tom H. M. Ottenhoff, Cornelis J. M. Melief, and Rienk Offringa. 2000. Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen-presenting cells that secrete IL-10. *Blood* 95: 3162-3167

11. Patricia A. Lodge, Lori A. Jones, Robert A. Bader, Gerald P. Murphy, and Michael L. Salgaller. 2000. Dendritic Cell-based Immunotherapy of Prostate Cancer: Immune Monitoring of a Phase II Clinical Trial. *Cancer Research* 60: 829-833

12. Peter Brossart, Stefan Wirths, Gernot Stuhler, Volker L. Reichardt, Lothar Kanz, and Wolfram Brugger. 2000. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* 96: 3102-3108

13. Beatrice Schuler-Thurner, Detlef Dieckmann, Petra Keikavoussi, Armin Bender, Christian Maczek, Helmut Jonuleit, Claudia Roder, Ina Haendle, Waltraud Leisgang, Rod Dunbar, Vincenzo Cerundolo, Peter von den Driesch, Jorgen Knop, Eva B. Brocker, Alexander Enk, Eckhart Kampgen, and Gerold Schuler. 2000. Mage-3 and Influenza-Matrix Peptide-Specific Cytotoxic T Cells Are Inducible in Terminal Stage HLA-A2.1+ Melanoma Patients by Mature Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J Immunol* 165: 3492-3496.

14. Beatrice Schuler-Thurner, Erwin S. Schultz, Thomas G. Berger, Georg Weinlich, Susanne Ebner, Petra Woerl, Armin Bender, Bernadette Feuerstein, Peter O. Fritsch, Nikolaus Romani, and Gerold Schuler. 2002. Rapid Induction of Tumor-specific Type 1 T Helper Cells in Metastatic Melanoma Patients by Vaccination with Mature, Cryopreserved, Peptide-loaded Monocyte-derived Dendritic Cells *J. Exp. Med.* 195: 1279-1288

15. Madhav V. Dhodapkar, Ralph M. Steinman, Joseph Krasovsky, Christian Munz, and Nina Bhardwaj. 2001. Antigen-specific Inhibition of Effector T Cell Function in Humans after Injection of Immature Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* 193: 233-238.

16. Andreas Mackensen a Ruth DraEger a Michael Schlesier Roland Mertelsmann a Albrecht Lindemann. 2000. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 49:152-156

17. F Sallusto, M Cella, C Danieli, and A Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182: 389-400.

18. Claudia Rieser, Gunther Bock, Helmut Klocker, Georg Bartsch, and Martin Thurnher. 1997. Prostaglandin E2 and Tumor Necrosis Factor (Cooperate to Activate Human Dendritic Cells: Synergistic Activation of

Interleukin 12 Production.

J. Exp. Med. 186: 1603-1608.

19. Pawel Kalinski, Hermelijn H. Smits, Joost H. N. Schuitemaker, Pedro L. Vieira, Marco van Eijk, Esther C. de Jong, Eddy A. Wierenga, and Martien L. Kapsenberg. 2000. IL-4 Is a Mediator of IL-12p70 Induction by Human Th2 Cells: Reversal of Polarized Th2 Phenotype by Dendritic Cells. *J Immunol* 165: 1877-1881.

20. Pedro L. Vieira, Esther C. de Jong, Eddy A. Wierenga, Martien L. Kapsenberg, and Pawel Kalinski. 2000. Development of Th1-Inducing Capacity in Myeloid Dendritic Cells Requires Environmental Instruction. *J Immunol* 164: 4507-4512.

21. Bender, A., Sapp, M., Schuler, G., Steinman, R.M., Bhardwaj, N. 1996. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J. Immunol.Methods* 196, 121-135.

22. Romani, N., Reider, D., Heuer, M., Ebner, S., Kampgen, E., Eibl, B., Niederwieser, D., Schuler, G. 1996. Generation of mature dendritic cells from human blood-an improved method with special regard to clinical applicability. *J. Immunol. Methods* 196, 137-151.

23. Thurner, B., C. Roeder, D. Dieckmann, M. Heuer, M. Kruse, A. Glaser, P. Keikavoussi, E. Kampgen, A. Bender, and G. Schuler. 1999. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J. Immunol. Methods.* 223:1-15.

24. Karine Duperrier, Assia Eljaafari, Colette Dezutter-Dambuyant, Christine Bardin, Christelle Jacquet, Koyo Yoneda, Daniel Schmitt, Lucette Gebuhrer, Dominique Rigal. 2000. Distinct subsets of dendritic cells resembling dermal DCs can be generated in vitro from monocytes, in the presence of different serum supplements *J. Immunol. Methods* 238: 119-131

25. FO Nestle, S Alijagic, M Gilliet, Y Sun, S Grabbe, R Dummer, G Burg, and D Schadendorf. 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate- pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4(3): 328-32.

26. D Longoni, L Piemonti, S Bernasconi, A Mantovani, and P Allavena. 1998. Interleukin-10 increases mannose receptor expression and endocytic activity in monocyte-derived dendritic cells. *Int J Clin Lab Res* 28(3): 162-9.

27. Xin Dong, Walter J. Storkus, and Russell D. Salter. 1999. Binding and Uptake of Agalactosyl IgG by Mannose Receptor on Macrophages and Dendritic Cells. *J Immunol* 163: 5427-5434.

28. Marion Subklewe, Ann Chahroudi, Alan Schmaljohn, Michael G. Kurilla, Nina Bhardwaj, and Ralph M. Steinman. 1999. 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* 94: 1372-1381.

29. Beatrice Thurner, Ina Haendle, Claudia Roder, Detlef Dieckmann, Petra Keikavoussi, Helmut Jonuleit, Armin Bender, Christian Maczek, Doris Schreiner, Peter von den Driesch, Eva B. Brocker, Ralph M. Steinman, Alexander Enk, Eckhart K?mpgen, and Gerold Schuler. 2000. Vaccination with Mage-3A1 Peptide-pulsed Mature, Monocyte-derived Dendritic Cells Expands Specific Cytotoxic T Cells and Induces Regression of Some Metastases in Advanced Stage IV Melanoma. *J. Exp. Med.* 190: 1669-1678.