

mRNA 致敏的树突状细胞用于肿瘤免疫治疗的研究进展

赵 星^{1,2}, 顾杨卓¹, 宋相容^{1*}

(1. 四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室, 四川 成都 610041; 2. 贵州医科大学, 组织工程与干细胞实验中心/中国医学科学院成体干细胞转化研究重点实验室, 免疫学教研室, 贵州 贵阳 550004)

摘要: 肿瘤免疫治疗旨在恢复或增强机体的免疫监视功能来对抗肿瘤, 与传统的抗肿瘤治疗直接聚焦于肿瘤病灶局部不同, 其具有不良反应小、作用持久、特异性强及适于个体化治疗等优势。树突状细胞 (DCs) 作为功能最强的抗原递呈细胞, 能够在体内诱导强烈的特异性免疫应答。目前基于 DCs 的肿瘤免疫治疗, 是将肿瘤抗原通过一定方法负载于 DCs, 从而激发特异性抗肿瘤免疫应答。用编码肿瘤抗原的 mRNA 致敏 DCs 是目前研究较为广泛的一种肿瘤抗原负载方式, 对应的免疫治疗策略已在临床试验中显示出较好的抗肿瘤疗效。因此, mRNA 致敏的 DCs 是一种极具潜力的肿瘤免疫治疗新模式。

关键词: 树突状细胞; 信使 RNA; 疫苗; 肿瘤免疫治疗

中图分类号: R945 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)10-1818-06

Research progress of dendritic cells anti-tumor vaccine stimulated by mRNA

ZHAO Xing^{1,2}, GU Yang-zhuo¹, SONG Xiang-rong^{1*}

(1. State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China;

2. Stem Cell and Tissue Engineering Research Center/Key Laboratory of Adult Stem Cell Transformation Research, Chinese Academy of Medical Sciences, Department of Immunology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

Abstract: Distinct from conventional cancer therapies focusing directly on local tumors, cancer immunotherapy aims to restore or enhance immune surveillance to fight against cancer, which bears the advantages of less side effects, lasting efficacy, substantial specificity and suitability for individualized treatment. As the most powerful antigen-presenting cell type, dendritic cells (DCs) can induce potent antigen-specific immune responses *in vivo*. DCs-based immunotherapy acts by loading DCs with cancer antigens in various ways to elicit specific anti-tumor immune responses. Currently, pulsing DCs with cancer antigen encoding mRNAs is an antigen loading approach under extensive study, registering encouraging results in relevant immunotherapeutic clinical trials. Thus, pulsing DCs with mRNAs is a new and highly promising modality in cancer immunotherapy.

Key words: dendritic cell; mRNA; vaccine; tumor immunotherapy

肿瘤免疫治疗系通过恢复或增强机体免疫系统的免疫监视功能来对抗肿瘤, 具有不良反应小、作用持久、特异性强及个体化治疗等优点, 且可通过诱导免疫

记忆细胞起到防止肿瘤复发的作用, 因而目前已成为继手术、放疗及化疗后的第 4 类抗肿瘤治疗手段, 给很多晚期肿瘤患者带来了希望。树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 具有强大的抗原摄取和处理能力, 通过向初始 T 细胞递呈抗原来启动适应性免疫应答, 因而在诱导机体产生特异性抗肿瘤免疫中发挥着核心作用。2010 年美国 FDA 批准了全球首个肿瘤治疗性 DCs 疫

收稿日期: 2019-08-13; 修回日期: 2019-09-17.

基金项目: 国家科技重大专项重大新药创制计划 (2018ZX09201018-024); 贵州省科技厅社会发展攻关项目 [SY (2013) 3010].

*通讯作者 Tel: 86-28-85503817, E-mail: songxr@scu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0648

苗 Sipuleucel-T 用于治疗晚期激素难治性前列腺癌, 开启了抗肿瘤 DCs 疫苗的新纪元; 我国自主研发的首个抗原致敏的 DCs 治疗转移性结直肠癌疫苗也已进入了 III 期临床试验。尽管近年来已有大量基于 DCs 的抗肿瘤疫苗进入了临床试验阶段, 并显示出一定的疗效, 但仍有许多问题亟待解决, 如 DCs 的来源及肿瘤抗原负载 DCs 的方式等, 其中如何将肿瘤抗原高效负载到 DCs 是制备抗肿瘤 DCs 疫苗的关键问题之一。用编码肿瘤抗原的 mRNA 致敏 DCs 是目前研究较为广泛的一种肿瘤抗原负载方式, 已展示出巨大的应用前景^[1-3]。本文将综述 mRNA 致敏 DCs 制备抗肿瘤疫苗的研究进展, 并探讨该策略用于肿瘤免疫治疗的未来方向和所面临的挑战。

1 基于 DCs 的肿瘤免疫治疗

Steinman 及 Cohn^[4]在 1973 年发现在小鼠外周淋巴器官中有一群细胞呈树枝状突起, 因而以希腊语 dendreon (树) 来命名这群新发现的细胞。在经过数十年对这群异质细胞的深入研究后, 终于证实这群细胞是机体内功能最强的专职抗原递呈细胞, 是连接固有免疫与适应性免疫间的桥梁, 在适应性免疫应答的诱导中发挥着关键作用。Steinman 也因这一极其重要的发现而于 2011 年被授予了诺贝尔医学生理学奖。

1.1 DCs 的生物学功能 DCs 的分化发育经历未成熟和成熟两个阶段。体内绝大多数 DCs 处于未成熟阶段, 该阶段的 DCs 分布在外周非淋巴组织中, 主要功能是识别并摄取抗原, 这个阶段的 DCs 高表达与吞噬相关的受体, 低表达 CD80、CD86 等共刺激分子及黏附分子等, 抗原递呈能力较弱, 因而不能有效刺激 T 细胞的活化^[5]。未成熟的 DCs 一旦摄取抗原或在炎症因子的作用下, 将向外周淋巴器官迁移。迁移过程中的 DCs 逐渐分化成熟, 高表达主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 分子及 T 细胞共刺激分子 (如 CD40、CD80、CD70 及 CD86 等), 同时大量分泌白细胞介素 (interleukin, IL)-12 p70、IL-6、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α 和干扰素诱导蛋白-10。此外, 与 DCs 归巢密切相关的趋化因子受体 CCR7 的表达也增高, 这些分子对于有效激活 T 细胞至关重要^[6]。成熟的 DCs 在淋巴结内通过递呈抗原而激活 T 淋巴细胞, 初始 T 细胞的充分激活依赖于 3 个信号的共同作用, 第一信号由 DCs 将抗原肽结合的主要组织相容性复合物 (peptide bound major histocompatibility complex, pMHC) 递呈给 T 细胞识别受体 (T cell receptor, TCR) 识别, TCR 特异性识别抗原肽与自身 MHC 分子, CD3 将抗原识别信号 (即第一活化信号) 传递入 T 细胞内; 第二信号即共刺激信号, 由 DCs (CD80、CD86、

PD-L1/2、CD40、CD70、OX40L 及 4-1BBL 等) 及 T 细胞 (CD28、CTLA-4、PD-1、CD40L、CD27、OX40 及 4-1BB 等) 上的共刺激及共抑制性分子间的平衡来决定; 第三信号是多种细胞因子的共同作用, 可刺激 T 细胞增殖、调控 T 细胞的分化并产生免疫记忆。如 DCs 分泌 IL-12 p70 可促进 Th1 应答, IL-23、IL-6 及 IL-1 β 可促进 Th17 应答^[7-9]。激活后的 T 细胞, 如肿瘤特异性 CTL 将离开外周免疫器官并迁移至肿瘤部位以发挥特异性抗肿瘤作用。此外, DCs 还可通过与自然杀伤细胞 (natural killer, NK) 间的相互作用而进一步增强抗肿瘤效应。新近研究发现, 成熟的 DCs 可通过其表达的 CXC3CL1 与 NK 细胞上 CXC3CR1 间的相互作用, 以及分泌的 IL-12、IL-15 及 IL-18 等细胞因子来促进 NK 细胞的增殖、活化及细胞毒功能^[10]。

1.2 DCs 的制备 尽管 DCs 存在于机体的大多数组织中, 但其中的绝对数量很少, 如成熟的 DCs 仅占外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 的 1% 左右。随着 DCs 体外制备技术的不断完善, 目前多种髓样前体细胞已被用做诱导髓样 DCs, 如外周血中的非增殖性 CD14⁺前体细胞、骨髓及脐带血中的增殖性 CD34⁺前体细胞等^[11,12]。外周血中的 CD14⁺单核细胞含量高达 10% 左右, 因而目前外周血单核细胞来源 DCs (monocyte-derived dendritic cell, moDC) 已被广泛研究及应用。早在 1994 年, Romani 及 Sallusto 等^[13,14]就建立了在体外用粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) 和 IL-4 联合诱导单核细胞获得 DCs 的方案, 该方案中所用 GM-CSF 是维持 DCs 发育分化最重要的细胞因子, 而 IL-4 的作用是抑制巨噬细胞和粒细胞的增殖, 阻止单核细胞向巨噬细胞分化。1996 年, Romani 及 Zhou 等^[15,16]进一步优化了培养方案, 先使用 GM-CSF 与 IL-4 联合诱导 6~7 天获得不成熟 DC, 再用 TNF- α 等活化因子刺激 3 天以获得成熟的 DC 细胞, 该方案首次在培养体系中使用了人血浆来替代牛血清, 这为体外培养 DCs 用于临床治疗奠定了基础。目前, 人 DCs 的体外培养方案已有了更多的探索, 如用 IL-15 替代 IL-4 以增加 DCs 的刺激能力^[17,18]; 除了经典的 1 周培养方案外, 研究人员还研发了 2~3 天就可以培养出 DCs 的快速方案^[19]。

由于 moDCs 不能在体外大量增殖而使得其应用受到一定限制, 研究报道可将 CD34⁺造血干/祖细胞 (hematopoietic stem progenitor cell, HSPCs) 用于体外大量制备 DCs, 这类 DCs 与 moDCs 相比可诱导更强的 T 细胞抗肿瘤应答, 促进 NK 细胞上调肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor-related apoptosis-

inducing ligand, TRAIL) 的表达并增强细胞毒性。已报道从多发性骨髓瘤及黑色素瘤患者来源的 CD34⁺ 细胞成功制备 DCs, 并在黑色素瘤的治疗中观察到肿瘤特异性应答^[20,21]。

1.3 DCs 的临床应用 已证实 DCs 疫苗具有与其他常规抗肿瘤治疗手段类似的临床客观反应率。如 DCs 治疗恶性黑色素瘤后患者的客观反应率为 8.5%, 与一线药物达卡巴嗪 (dacarbazine) 类似。同样, 在 DCs 治疗前列腺癌、恶性胶质瘤和肾细胞癌患者后的客观反应率分别为 7.1%、15.6% 和 11.5%, 与常规化疗药物治疗结果相似^[22]。2018 年 Liao 等^[23]报道了一项 DCs 疫苗治疗胶质母细胞瘤的 III 期临床试验, 该研究的所有入组患者均在手术及化疗后随机分组, 治疗组为自体 DCs 疫苗 (DCVax-L) 联合替莫唑胺组, 对照组为替莫唑胺及安慰剂组。DCVax-L 是由手术切除的肿瘤组织裂解物活化自体 DCs 制备而来, 结果显示: 与既往单独手术治疗后仅 15~17 个月的中位总生存时间 (median overall survival, mOS) 相比, 治疗组的 mOS 达到 23.1 个月。此外, 67 例 (30%) 患者存活期超过 30 个月, 44 例 (24.2%) 超过 36 个月, 患者对该治疗方案耐受性好, 仅有 2.1% (7/331) 的患者出现了 3 及 4 级的不良反应。

以上研究表明, 将 DCs 疫苗用于抗肿瘤治疗疗效确切且不良反应小。若能进一步优化 DCs 疫苗的制备方法, 如肿瘤抗原负载到 DCs 的方式、体外培养 DCs 的方法以及 DCs 给药途径等, 有望进一步增强 DCs 疫苗的抗肿瘤疗效。

2 mRNA 致敏的抗肿瘤 DCs 疫苗

2.1 肿瘤抗原负载到 DCs 的方式 如何将肿瘤抗原负载到 DCs 是制备 DCs 疫苗的关键之处, 目前常用超声破碎或反复冻融等方法制备的肿瘤全细胞抗原、人工合成肿瘤抗原多肽、肿瘤细胞 DNA 或 RNA, 以及肿瘤细胞来源的外泌体等来致敏 DCs^[24-27]。肿瘤抗原多肽是按照肿瘤抗原中已证实或预测得到的多肽表位的氨基酸序列人工合成而来, 因其所诱导的免疫反应具有肿瘤抗原特异性且安全性好, 因而已有大量的临床试验使用肿瘤抗原多肽来致敏 DCs, 但该方案存在较多的缺陷, 如可供选择的多肽受限于患者的 HLA 型别, 必须清楚肿瘤的抗原表位 (但绝大多数肿瘤抗原未知的) 以及针对 CD8⁺ T 细胞识别表位的抗原多肽不能诱导 CD4⁺ T 细胞的特异性活化等^[28]。此外, HLA-抗原肽复合物的半衰期较短, 因此也限制了抗原递呈的时间^[29]。研究发现, 肿瘤细胞来源的外泌体含有大量的肿瘤抗原, 因而也被用于致敏 DCs^[24], 并发现与肿瘤裂解物相比, 肿瘤细胞来源外泌体致敏的 DCs

具有更好的疗效, 推测是其中的 DNA 分子激活了 DCs 的 cGAS/STING 通路而促进了 DCs 的成熟并增强了肿瘤抗原的递呈, 从而诱导了更强的抗肿瘤免疫应答^[30,31], 但如何获得大量高纯度的外泌体是目前急需解决的难题。

相比前述的肿瘤抗原负载到 DCs 的方式, 使用编码肿瘤抗原的 mRNA 体外转染 DCs 制备抗肿瘤疫苗具有其他方案无法比拟的优势, 如 mRNA 不会整合到基因组而避免了可能出现的治疗性突变, 可体外大量制备。编码肿瘤抗原的 mRNA 转染 DCs 后, 能诱导针对多个抗原表位的特异性 T 细胞应答, 可有效防止抗原变异而引起的免疫逃逸, 并能靶向 MHC-II 类分子的递呈途径, 从而进一步扩大所诱导的 T 细胞反应^[32]。此外, 随着 mRNA 体外合成技术的进展, 使得其稳定性显著提高, 还可通过修饰技术降低其免疫原性。因而 mRNA 被认为是制备抗肿瘤 DCs 疫苗的理想工具, 已受到了广泛关注^[33,34]。

2.2 用于致敏 DCs 的 mRNA 目前用于致敏 DCs 的 mRNA 包括肿瘤来源或体外合成的 mRNA。使用肿瘤来源的 mRNA 可确保递呈肿瘤表达的完整表位库, 从而扩大免疫反应, 避免因肿瘤抗原表达下调或丢失而发生逃逸。然而, 制备肿瘤来源的 mRNA 需要获取大量的肿瘤细胞, 即使可从肿瘤组织中分离出肿瘤 mRNA 并进行扩增, 但这一过程费时费力而不利于在临床应用。编码肿瘤抗原的 mRNA 可通过含有靶蛋白开放阅读框的质粒 DNA 或者其他 DNA 片段作为模板, 通过体外转录技术合成。目前, 随着人们对 mRNA 结构的深入了解, 使研究者能够对其进行调节以增强 mRNA 编码抗原的表达。在 mRNA 的体外合成中可通过对 5'帽、非翻译区、poly(A)-尾、抗原序列本身以及选择表达载体以提高翻译效率和降低降解率等多个方面来进行优化^[35-38]。近年来, 人们已经越来越清楚地认识到除了 CD8⁺ CTL 细胞外, CD4⁺ T 细胞, 尤其是 Th1 细胞是机体发挥抗肿瘤免疫的重要组成部分^[39]。由于 mRNA 所编码的蛋白质是在 DCs 的胞质内合成, 抗原肽与 MHC-I 类分子结合后通过递呈仅可活化 CD8⁺ T 细胞, 而 CD4⁺ T 细胞需要依赖 MHC-II 分子的递呈来活化。目前已经报道了几种将 mRNA 编码抗原靶向到 MHC-II 类分子递呈途径的方法, 其中常用的方法是将抗原靶向到溶酶体相关膜蛋白-1、DC-溶酶体相关膜蛋白-1 以及恒定链的分选信号上。这些靶向溶酶体的融合蛋白能通过 MHC-I 和 MHC-II 类分子同时递呈, 从而可同时活化 CD8⁺ T 细胞和 CD4⁺ T 细胞, 以增强抗肿瘤免疫应答^[40,41]。

上述策略大多数只关注了 DCs 功能的一方面, 然

而, DCs的功能是由多种因素来共同决定的,如细胞表面的共刺激分子、共抑制分子以及激活性与抑制性细胞因子间的平衡。因而,针对可促进DCs功能的多个方面来设计的DCs疫苗才有可能达到最优的疗效。如将编码Toll样受体(Toll-like receptors, TLR)-4、CD40L和CD70的3种mRNA的混合物(TriMix)来共同活化DCs就是很好的尝试^[42,43]。目前TriMix已开展了大量临床前及临床试验研究,证实其可诱导DCs发挥更强的免疫刺激能力。更重要的是,还发现TriMix-DC可将Treg调节成类似Th1细胞来发挥作用。在使用TriMix-DCs治疗III/IV期黑色素瘤的临床试验中就观察到,患者在治疗后出现了前所未有的27%的客观反应率(NCT01066390)^[44]。

2.3 将mRNA导入DCs 在20世纪90年代末,杜克大学的Gilboa课题组等^[45]最先使用编码肿瘤抗原的mRNA来致敏DCs,其中mRNA进入DCs的方式是通过细胞的巨胞饮来摄入,但该方式存在较大的缺陷,因为mRNA本身可以通过TLR-3和TLR-7等模式识别受体来激活DCs,但激活后的DCs其摄取mRNA的能力迅速下降^[46]。此外,mRNA必须通过胞内体传递使得只有一小部分mRNA能到达细胞质而被翻译为蛋白质。此后对mRNA导入DCs的方式不断进行优化,目前多采用电穿孔、脂质体和超声处理等方法。其中电穿孔是将mRNA导入DCs较为有效的方法,由于mRNA不需进入细胞核,因而仅需较弱的电脉冲就可导入胞质中,极大降低了对细胞的损伤,另外电穿孔导入的mRNA无需与模式识别受体结合而降低了不必要的免疫反应。与以上物理方法不同,脂质体转染是通过脂质体-mRNA复合物来将mRNA导入细胞,在胞内体中,脂质体与内体膜融合,从而介导其运输的mRNA在胞浆的释放。除此之外,超声处理也可将mRNA直接传递入胞浆中,带有mRNA的脂质超声微泡在超声波的作用下,微泡空化和破裂,导致周围细胞的质膜上形成暂时的孔,从而允许破裂时释放的mRNA进入细胞^[47]。

3 mRNA致敏的抗肿瘤DCs疫苗临床试验研究

大量研究已证实,将编码肿瘤抗原的mRNA体外致敏患者自体DCs制备抗肿瘤疫苗,再将DCs疫苗回输到肿瘤患者体内以诱导特异性抗肿瘤应答是一种安全可行的肿瘤免疫治疗策略(图1)。近20年来,利用mRNA致敏DCs制备的抗肿瘤疫苗所开展的临床试验已达47项(clinicaltrials.gov检索数据),主要分布在美国、比利时、荷兰及挪威等国家,我国有4项基于mRNA的抗肿瘤DCs疫苗也进入了临床试验阶段。在这些试验中,体外转录的mRNA、自体肿瘤或肿瘤干细

胞来源的mRNA被用于向DCs负载肿瘤抗原。除了mRNA抗原来源的差异外,这些研究中还采用了不同的DCs活化策略,从使用促炎性细胞因子激活到通过传递TriMix mRNA来活化DCs。这些DCs被用于包括卵巢癌、乳腺癌、晚期黑色素瘤、白血病、恶性胶质瘤、间皮瘤、胰腺癌、食道癌、骨髓瘤及肺癌等多种类型肿瘤的治疗。在这些研究中应用最多的DCs给药途径是皮内和静脉注射,偶有结内及瘤内给药的报道。从近年报道的临床试验数据中可反映出mRNA致敏的抗肿瘤DCs疫苗的疗效,如使用了编码MAGE-A3、MAGE-C2、酪氨酸酶及gp100抗原的mRNA及TriMixDC(TriMixDC-MEL)治疗15例晚期黑色素瘤患者(NCT01066390),其中2例完全应答,2例部分应答。6/12患者检测到抗原特异性皮肤浸润淋巴细胞,4/5患者检测到抗原特异性CD8⁺T细胞^[44]。另外还值得关注的是,近年来多项开展中的临床试验都将抗肿瘤DCs疫苗联合化疗药物或靶向抗体以增强抗肿瘤疗效(NCT00626483、NCT02649829、NCT02366728、NCT02649582)。

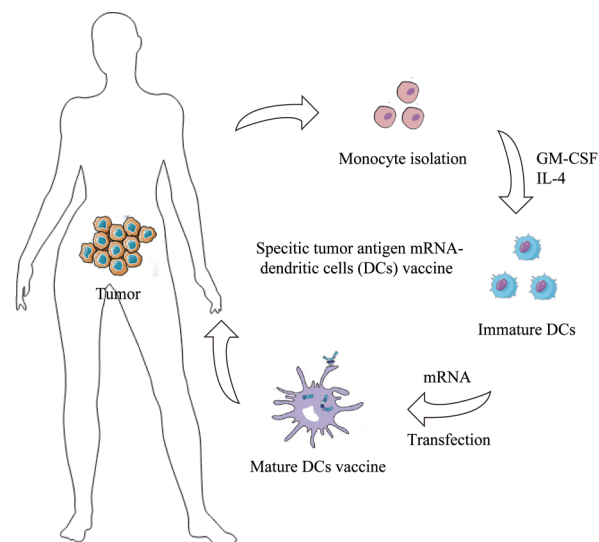


Figure 1 Specific tumor antigen mRNA-DCs vaccine. DCs are generated from CD14⁺ monocyte and differentiated by various stimuli, followed by mRNA loading and maturation. Mature dendritic cells are re-administered into the patient. DCs: Dendritic cells; GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IL-4: Interleukin 4

此外,将mRNA致敏的DCs疫苗与免疫检查点抑制剂的联合使用也显示出增强的抗肿瘤作用。2011年开展了一项使用TriMix-DCs联合抗CTLA-4单克隆抗体ipilimumab治疗无法切除的III期或IV期黑色素瘤患者的II期临床试验(NCT01302496),在经TriMix-DCs和ipilimumab治疗6个月后,患者的疾病控制率为

51%, 总体应答率为38% (8例完全应答, 7例部分应答), 在36个月的中位随访期 (从22~43个月) 内有7例完全应答, 1例部分应答^[48]。

4 展望

DCs在启动适应性免疫应答中发挥着极其重要的作用, 如何利用DCs来更好地诱导抗肿瘤免疫应答已成为研究的热点。近年来研究发现, 无论是用于抗原负载, 还是传递刺激或抑制的功能信息, mRNA都是用于体外修饰DCs的一种很好工具。目前该方案用于临床试验的挑战在于: 如何保证体外制备的DCs疫苗在过继回输后, 能有效将mRNA编码的肿瘤抗原信息传递给T淋巴细胞。因此, 研究人员正试图绕过体外制备DCs, 而将mRNA直接进行淋巴结内注射, 结内注射的mRNA能被体内的DCs直接摄取, 进而诱导免疫应答^[49]; 同时, 裸mRNA还能刺激如TLR3、TLR7和TLR8等, 从而介导DCs的活化。然而, 单独使用裸mRNA通常不足以充分激活DCs, 若同时使用诱导成熟的佐剂又会对DCs摄取mRNA的效率产生负面影响。有研究将肿瘤抗原和TriMix共传递, 在保证负载抗原的同时, 还可原位活化DCs^[50], 这为基于DCs的mRNA抗肿瘤疫苗的研究提供了新方向。

mRNA致敏的DCs疫苗已在肿瘤免疫治疗中取得了许多突破性的进展, 在临床试验研究中也已展示出显著的疗效, 同时还可与多种抗肿瘤免疫治疗制剂联合使用, 有望在未来的临床应用中取得更好的疗效, 使更多的肿瘤患者受益。

References

- [1] Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, et al. mRNA vaccines - a new era in vaccinology [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17: 261-279.
- [2] Lundstrom K. Latest development on RNA-based drugs and vaccines [J]. *Future Sci OA*, 2018, 4: FSO300.
- [3] Kranz LM, Diken M, Haas H, et al. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy [J]. *Nature*, 2016, 534: 396-401.
- [4] Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution [J]. *J Exp Med*, 1973, 137: 1142-1162.
- [5] Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update [J]. *Immunology*, 2018, 154: 3-20.
- [6] Anguille S, Smits EL, Bryant C, et al. Dendritic cells as pharmacological tools for cancer immunotherapy [J]. *Pharmacol Rev*, 2015, 67: 731-753.
- [7] Terhune J, Berk E, Czerniecki BJ. Dendritic cell-induced Th1 and Th17 cell differentiation for cancer therapy [J]. *Vaccines*, 2013, 1: 527-549.
- [8] Leal Rojas IM, Mok WH, Pearson FE, et al. Human blood CD1c⁺ dendritic cells promote Th1 and Th17 effector function in memory CD4⁺ T cells [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 971.
- [9] Chow KV, Lew AM, Sutherland RM, et al. Monocyte-derived dendritic cells promote Th polarization, whereas conventional dendritic cells promote Th proliferation [J]. *J Immunol*, 2016, 196: 624-636.
- [10] Thomas R, Yang X. NK-DC crosstalk in immunity to microbial infection [J]. *J Immunol Res*, 2016, 2016: 6374379.
- [11] Unal A, Birekul A, Unal MC, et al. Dendritic cell production from allogeneic donor CD34⁺ stem cells and mononuclear cells; cancer vaccine [J]. *Blood*, 2016, 128: 5723.
- [12] Plantinga M, de Haar CG, Dünnebach E, et al. Cord-blood-stem-cell-derived conventional dendritic cells specifically originate from CD115-expressing precursors [J]. *Cancers*, 2019. DOI: 10.3390/cancers11020181.
- [13] Romani N, Gruner S, Brang D, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood [J]. *J Exp Med*, 1994, 180: 83-93.
- [14] 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 downregulated by tumor necrosis factor alpha [J]. *J Exp Med*, 1994, 179: 1109-1118.
- [15] Romani N, Reider D, Heuer M, et al. Generation of mature dendritic cells from human blood an improved method with special regard to clinical applicability [J]. *J Immunol Methods*, 1996, 196: 137-151.
- [16] Zhou LJ, Tedder TF. CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93: 2588-2592.
- [17] Van Acker HH, Anguille S, De Reu H, et al. Interleukin-15-cultured dendritic cells enhance anti-tumor gamma delta T cell functions through IL-15 secretion [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 658.
- [18] Versteven M, Damoiseaux D, Campillo-Davo D, et al. Preclinical evaluation of a Wilms' tumor protein 1-targeted interleukin-15 dendritic cell vaccine: T-cell activity and batch production [J]. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7: B137.
- [19] Brabants E, Heyns K, Smet SD, et al. An accelerated, clinical-grade protocol to generate high yields of type 1-polarizing messenger RNA-loaded dendritic cells for cancer vaccination [J]. *Cytotherapy*, 2018, 20: 1164-1181.
- [20] Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, et al. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34⁺ progenitor-derived dendritic cell vaccine [J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 6451-6458.
- [21] Shinde P, Melinkeri S, Santra MK, et al. Autologous hematopoietic stem cells are a preferred source to generate dendritic cells for immunotherapy in multiple myeloma patients [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1079.

- [22] Anguille S, Smits EL, Lion E, et al. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15: e257-e267.
- [23] Liao LM, Ashkan K, Tran DD, et al. First results on survival from a large phase 3 clinical trial of an autologous dendritic cell vaccine in newly diagnosed glioblastoma [J]. *J Transl Med*, 2018, 16: 142.
- [24] Leone DA, Rees AJ, Kain R. Dendritic cells and routing cargo into exosomes [J]. *Immunol Cell Biol*, 2018, 96: 683-693.
- [25] Saxena M, Bhardwaj N. Re-emergence of dendritic cell vaccines for cancer treatment [J]. *Trends Cancer*, 2018, 4: 119-137.
- [26] Bol KF, Schreibelt G, Rabold K, et al. The clinical application of cancer immunotherapy based on naturally circulating dendritic cells [J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7: 109.
- [27] Gross S, Erdmann M, Haendle I, et al. Twelve-year survival and immune correlates in dendritic cell-vaccinated melanoma patients [J]. *JCI Insight*, 2017, 2: e91438.
- [28] Mastelic-Gavillet B, Balint K, Boudousquie C, et al. Personalized dendritic cell vaccines-recent breakthroughs and encouraging clinical results [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 766.
- [29] Kukutsch NA, Roßner S, Austyn JM, et al. Formation and kinetics of MHC class I-ovalbumin peptide complexes on immature and mature murine dendritic cells [J]. *J Invest Dermatol*, 2000, 115: 449-453.
- [30] Zhang H, Tang K, Zhang Y, et al. Cell-free tumor microparticle vaccines stimulate dendritic cells *via* cGAS/STING signaling [J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3: 196-205.
- [31] Gu X, Erb U, Büchler MW, et al. Improved vaccine efficacy of tumor exosome compared to tumor lysate loaded dendritic cells in mice [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136: E74-E84.
- [32] Van Lint S, Heirman C, Thielemans K, et al. mRNA: from a chemical blueprint for protein production to an off-the-shelf therapeutic [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2013, 9: 265-274.
- [33] Rauch S, Lutz J, Kowalczyk A, et al. RNActive(R) technology: generation and testing of stable and immunogenic mRNA vaccines [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1499: 89-107.
- [34] Iavarone C, O'Hagan DT, Yu D, et al. Mechanism of action of mRNA-based vaccines [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2017, 16: 871-881.
- [35] Schlake T, Thess A, Fotin-Mleczek M, et al. Developing mRNA-vaccine technologies [J]. *RNA Biol*, 2012, 9: 1319-1330.
- [36] Asrani KH, Farelli JD, Stahley MR, et al. Optimization of mRNA untranslated regions for improved expression of therapeutic mRNA [J]. *RNA Biol*, 2018, 15: 756-762.
- [37] Zlotorynski E. The short tail that wags the mRNA [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19: 2-3.
- [38] Holtkamp S, Kreiter S, Selmi A, et al. Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells [J]. *Blood*, 2006, 108: 4009-4017.
- [39] Galaine J, Borg C, Godet Y, et al. Interest of tumor-specific CD4 T helper 1 cells for therapeutic anticancer vaccine [J]. *Vaccines*, 2015, 3: 490-502.
- [40] Bonehill A, Heirman C, Tuyaerts S, et al. Messenger RNA-electroporated dendritic cells presenting MAGE-A3 simultaneously in HLA class I and class II molecules [J]. *J Immunol*, 2004, 172: 6649-6657.
- [41] Aarntzen EH, Schreibelt G, Bol K, et al. Vaccination with mRNA-electroporated dendritic cells induces robust tumor antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells responses in stage III and IV melanoma patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18: 5460-5470.
- [42] Bonehill A, Tuyaerts S, Van Nuffel AMT, et al. Enhancing the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells by co-electroporation with CD40L, CD70 and constitutively active TLR4 encoding mRNA [J]. *Mol Ther*, 2008, 16: 1170-1180.
- [43] Neyns B, Wilgenhof S, Nuffel AMTV, et al. A phase I clinical trial on the combined intravenous (IV) and intradermal (ID) administration of autologous TriMix-DC cellular therapy in patients with pretreated melanoma (TriMixIDIV) [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29: 2519.
- [44] Wilgenhof S, Van Nuffel AM, Benteyn D, et al. A phase IB study on intravenous synthetic mRNA electroporated dendritic cell immunotherapy in pretreated advanced melanoma patients [J]. *Ann Oncol*, 2013, 24: 2686-2693.
- [45] Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, et al. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Exp Med*, 1996, 184: 465-472.
- [46] Diken M, Kreiter S, Selmi A, et al. Selective uptake of naked vaccine RNA by dendritic cells is driven by macropinocytosis and abrogated upon DC maturation [J]. *Gene Ther*, 2011, 18: 702-708.
- [47] Tu J, Zhang H, Yu J, et al. Ultrasound-mediated microbubble destruction: a new method in cancer immunotherapy [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 5763-5775.
- [48] Wilgenhof S, Corthals J, Heirman C, et al. Phase II study of autologous monocyte-derived mRNA electroporated dendritic cells (TriMixDC-MEL) plus ipilimumab in patients with pretreated advanced melanoma [J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34: 1330-1338.
- [49] Van Lint S, Goyvaerts C, Maenhout S, et al. Preclinical evaluation of TriMix and antigen mRNA-based antitumor therapy [J]. *Cancer Res*, 2012, 72: 1661-1671.
- [50] Coosemans A, Tuyaerts S, Morias K, et al. mRNA electroporation of dendritic cells with WT1, survivin, and TriMix (a Mixture of caTLR4, CD40L, and CD70) [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1428: 277-283.