

## SVILUPPO DI VETTORI LENTIVIRALI NON INTEGRANTI PER LA TERAPIA CONTRO IL CANCRO

Donatella Rita Maria Negri (a), Felicia Grasso (a), Maria Blasi (b), Zuleika Michelini (c), Roberta Bona (c), Alessandra Rossi (a), Stefania Mochi (a), Pasqualina Leone (c), Colomba Giorgi (a), Andrea Cara (c)

(a) Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(c) Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

### Introduzione

I vettori lentivirali sono ampiamente utilizzati per ottenere un'efficace espressione dei geni di interesse nell'ambito di strategie vaccinali e di terapia genica in modelli preclinici e clinici (<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>). I vettori lentivirali derivano dalla controparte virale parentale replicante. Poiché esistono diversi tipi di lentivirus, sono stati sviluppati sistemi di vettori lentivirali differenti. Tuttavia, il vettore lentivirale ricombinante più comunemente impiegato si basa sul virus dell'immunodeficienza umana 1 (HIV-1), in seguito alla rimozione di tutte le porzioni del genoma che ne determinano la patogenicità (1).

I vettori lentivirali ricombinanti hanno una capacità di clonaggio relativamente alta e possono essere facilmente costruiti, in modo tale da trasdurre un'ampia gamma di tipi cellulari, *in vitro* e *in vivo*, in dipendenza della proteina dell'*envelope* virale che viene utilizzata per l'infezione, e indipendentemente dallo stato replicativo della cellula bersaglio; questo poiché i vettori lentivirali, come la loro controparte virale parentale replicante, trasducono sia cellule in attiva replicazione che cellule che non proliferano. Questa è una caratteristica particolarmente attraente per scopi vaccinali nell'uomo, dato che le cellule presentanti l'antigene (APC, *Antigen Presenting Cells*), quali macrofagi e cellule dendritiche (DC), principali mediatori della risposta immunitaria, sono tipi cellulari non proliferanti che vengono attivamente infettati dai vettori lentivirali.

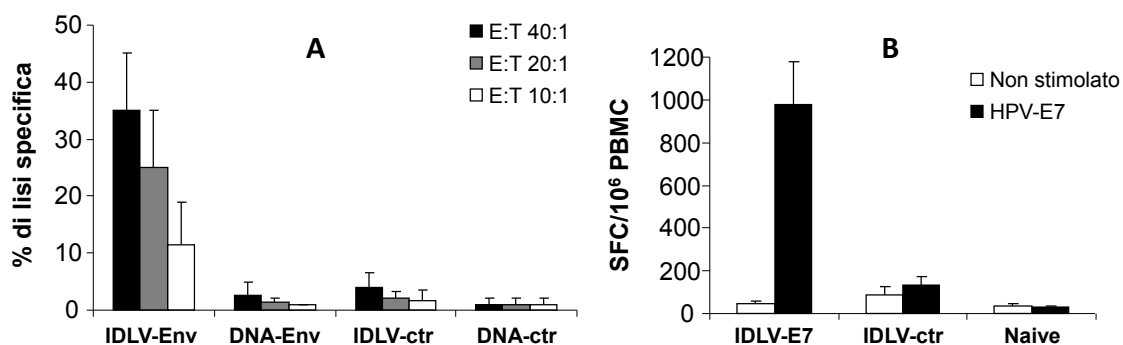
Nel corso degli anni progressive modifiche e miglioramenti hanno reso i vettori lentivirali sempre più sicuri, essendo costituiti, con i vettori di ultima generazione, da meno del 10% del genoma virale iniziale e del quale rimangono presenti solo le sequenze necessarie alla retrotrascrizione, al trasferimento e all'integrazione della cassetta di espressione nelle cellule bersaglio; al contrario, risultano completamente assenti i geni deputati all'espressione delle proteine virali patogene. La costruzione di questi vettori ha quindi raggiunto buoni livelli di bio-sicurezza, grazie anche all'inattivazione del promotore virale originale presente nelle regioni terminali lunghe o LTR (vettori lentivirali self-inattivanti) (1).

Tuttavia, come la loro controparte parentale, ad esempio il virus HIV-1, i vettori lentivirali integrano in maniera non specifica nel genoma della cellula bersaglio, sia *in vitro* che *in vivo* (2, 3). Di conseguenza, le preoccupazioni di bio-sicurezza rispetto all'uso di questi vettori per il trasferimento *in vivo* di geni terapeutici, includono l'integrazione del vettore con conseguente rischio di mutagenesi inserzionale (4). Per ridurre al minimo questo rischio il nostro e altri gruppi di ricerca hanno ideato e progettato vettori lentivirali difettivi nella proteina integrasi, al fine di impedire l'integrazione del vettore lentivirale nella cellula bersaglio. Questi vettori lentivirali integrasi-difettivi (IDLV, *Integrase Defective Lentiviral Vectors*), benché incapaci di integrarsi nel genoma, permettono, e anzi facilitano, la produzione di forme circolari non

integrate di DNA virale episomale (E-DNA) (5). L'E-DNA, derivante dalla circolarizzazione del DNA virale retroscritto e non integrato, è normalmente presente nelle cellule trasdotte dai vettori lentivirali in due diverse forme, contenenti o un singolo LTR (forma 1-LTR) o due LTR in tandem (forma 2-LTR) (6, 7). Le forme circolari 1-LTR sono prodotte (i) da una reazione di autointegrazione, che porta a forme circolari riarrangiate, (ii) dalla ricombinazione omologa tra i due LTR, oppure (iii) da prodotti intermedi di trascrizione inversa, non riuscendo a completarne il processo; le forme circolari 2-LTR derivano invece dalla ligazione intranucleare tra le due estremità LTR virali del DNA retroscritto (8-10). Nel corso degli anni il nostro e altri gruppi di ricerca hanno dimostrato che l'E-DNA non integrato è competente per la produzione di proteine espresse da queste forme circolari, e che persiste *in vitro* e *in vivo* in cellule non proliferanti (5).

## Stato di sviluppo

Dato che gli IDLV hanno un rischio di mutagenesi inserzionale molto basso, e quindi un alto profilo di bio-sicurezza, possono essere utilizzati in protocolli di vaccinazione, grazie anche alla loro abilità di mantenere l'espressione dell'antigene in maniera durevole in cellule non proliferanti. La funzionalità di lunga durata dell'E-DNA in cellule post-mitotiche non replicanti è stata sfruttata in diversi protocolli di immunizzazione nel modello del topo (11, 12) e in esperimenti di trasduzione di cellule umane presentanti l'antigene quali le DC e i macrofagi (13-15). Per quanto riguarda l'utilizzo degli IDLV in protocolli d'immunizzazione in modelli murini, il nostro gruppo ha recentemente dimostrato che una singola immunizzazione con una dose relativamente bassa di IDLV esprime la proteina *Envelope* gp120 di HIV-1 o la proteina GFP (*Green Fluorescent Protein*), come antigeni modello, induce una forte risposta immunologica antigene-specifica sostenuta nel tempo (11, 16). La risposta immunitaria indotta è stata sia di tipo cellulare, con l'induzione di cellule T CD8+ polifunzionali in grado di secernere diverse citochine e con attività citotossica (Figura 1A), che umorale, con produzione a lungo termine di anticorpi specifici contro l'antigene. Questi dati sono stati successivamente confermati da altri gruppi di ricerca.



**Figura 1. Risposta cellulare CD8+ antigene-specifica misurata mediante (A) saggio di citotossicità con rilascio di <sup>51</sup>Cr a 90 giorni dall'immunizzazione di topi Balb/c con IDLV-Env, DNA-Env, IDLV-ctr e DNA-ctr (quattro topi per gruppo) o (B) saggio ELISPOT per IFN $\gamma$  a 30 giorni dall'immunizzazione di topi C57/BI con IDLV-E7, IDLV-ctr o non trattati (Naive) (quattro topi per gruppo) utilizzando il peptide immunodominante. E:T equivale a diversi rapporti tra cellule effettrici T (*Effector*) e cellule bersaglio (*Target*). SCF, *Spot Forming Cells***

Nella Tabella 1 viene fornito un elenco dei protocolli di immunizzazione effettuati con IDLV nel modello murino.

**Tabella 1. Protocolli d'immunizzazione *in vivo* utilizzando vettori IDLV esprimenti antigeni tumorali e virali**

Modello	Antigene	Ceppo murino	Via d'immunizzazione	Challenge	Protezione	Ref.
Tumore	Ovalbumina Antigene del melanoma umano gp100	C57BL/6	Sottocutanea	Sì	Sì	(26, 27, 29)
		C57BL/6	Sottocutanea	NO	-	(29)
Malattia virale	Virus dell'Epatite B	BALB/c	Intramuscolare	NO	-	(26)
	HBsAg	BALB/c	Intramuscolare	NO	-	(11, 16)
	HIV-Env	BALB/c	Sottocutanea	NO	-	(29)
	HIV-Gag	BALB/c	Sottocutanea	NO	-	(29)
	West Nile Virus- Env	C57BL/6	Intraperitoneale	Sì	Sì	(12)
Altri antigeni	GFP ( <i>Green fluorescent protein</i> )	BALB/c	Intramuscolare	NO	-	(28)*

\*Vettore lentivirale non integrante basato su SIV

Per quanto riguarda l'immunizzazione nei confronti di antigeni tumorali specifici (TSA, *tumour specific antigen*), abbiamo recentemente costruito, ai fini della sua validazione a scopo terapeutico, un vettore IDLV esprimente la proteina E7<sup>GGG</sup> (un allele non-tumorigenico della proteina E7 mutata nel sito di legame con la proteina pRb) del virus del papilloma umano (HPV, *Human Papilloma Virus*), che rappresenta il più importante fattore di rischio per lo sviluppo di displasie cervicali e di tumori alla cervice uterina ed è stato associato ad altri tumori ano-genitali e oro-faringei (17). In particolare la proteina E7, insieme alla proteina E6 di HPV, interferisce con le funzioni delle proteine p53 e Retinoblastoma (Rb), coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare, ed è quindi considerata responsabile della trasformazione delle cellule epiteliali cervicali in pazienti infettati da HPV (18-21). Il modello animale più utilizzato, come sostituto per i tumori indotti da HPV nell'uomo, è basato sull'inoculo di cellule di linea tumorali murine singeniche TC-1 esprimenti E7 di HPV in topi di ceppo C57BL/6 che, iniettate a livello sottocutaneo, causano la crescita di tumori palpabili dopo 2 settimane dall'inoculo (22). Esperimenti preliminari indicano che un singolo inoculo di IDLV esprimente la proteina E7<sup>GGG</sup> di HPV in topi di ceppo C57BL/6, inoculati preventivamente con le cellule tumorali, elicitava una forte risposta immunitaria contro l'antigene tumorale E7 (Figura 1B) che è efficace sia nel proteggere i topi dalla crescita del tumore che nel favorire la regressione completa del tumore indotto dalle cellule TC-1 (nostri dati preliminari non pubblicati).

Questi risultati, benché ottenuti solo nel modello murino, sono comunque molto promettenti in quanto validano l'utilizzo di IDLV per scopi terapeutici.

Per dimostrare l'efficacia di questi vettori e per la loro validazione nell'uomo, cellule APC derivate da donatori sani, quali macrofagi e DC, sono state trasdotte *in vitro* con IDLV esprimente GFP (13). Sebbene il livello di espressione della GFP sia risultato inferiore rispetto a quello evidenziato nelle cellule trasdotte con il vettore parentale competente per l'integrazione, IDLV-GFP si è dimostrato in grado di trasdurre efficacemente le APC. Successivamente, per valutare l'attività funzionale delle cellule trasdotte con IDLV, DC e macrofagi sono stati isolati da donatori sani che presentavano una risposta T memoria specifica contro la proteina M1 del virus dell'Influenza (utilizzata come antigene modello), in seguito all'incontro con il virus

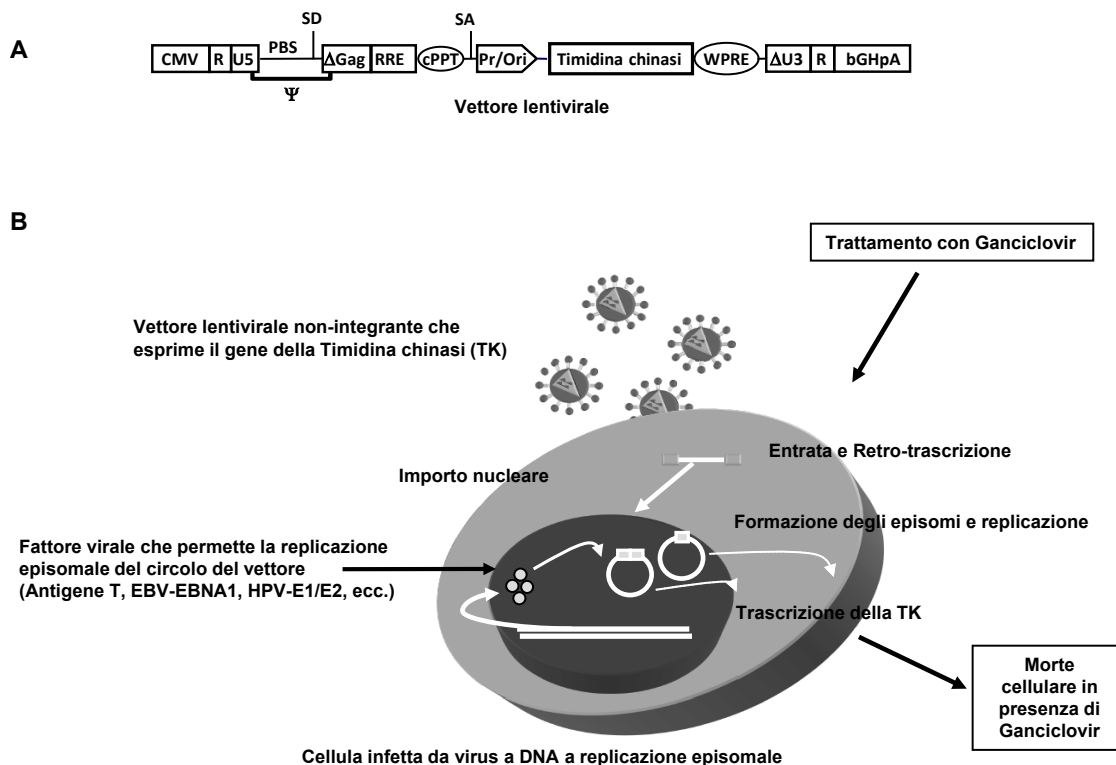
influenzale stagionale. Abbiamo quindi dimostrato che tali APC, trasdotte con IDLV esprimente l'antigene M1 e coltivate *in vitro* con PBMC autologhi per due settimane, sono state in grado di espandere efficacemente i linfociti T CD8+ autologhi M1-specifici, indicando che IDLV è un buon sistema per l'induzione di una risposta immunitaria e per il trasferimento di antigeni anche nel contesto umano (13).

Un problema che ostacola l'utilizzo clinico degli IDLV riguarda il basso livello di espressione da parte delle forme episomali E-DNA rispetto alla controparte integrata dei vettori lentivirali parentali integranti. Questo problema è di particolare importanza durante l'immunizzazione. Infatti, abbiamo dimostrato che è necessaria una quantità dieci volte maggiore di IDLV, rispetto alla controparte parentale integrante, per suscitare una comparabile risposta immunitaria umorale e cellulare specifica nel modello del topo (11). Ciò significa che, anche se IDLV possiede un profilo di bio-sicurezza molto maggiore rispetto alla controparte integrante, ciò è parzialmente perso, a causa della dose più alta di IDLV necessaria per indurre una risposta immunitaria sostenuta nel tempo. Stiamo quindi lavorando per migliorare i livelli d'espressione da parte dell'E-DNA di IDLV. Esperimenti recenti indicano che l'inclusione della proteina Vpx del virus dell'immunodeficienza della scimmia (SIV, *Simian Immunodeficiency Virus*) nel contesto delle particelle virali di IDLV aumenta l'espressione dell'E-DNA di IDLV portandola ai livelli della controparte integrata dei vettori lentivirali parentali integranti (25 e nostri dati preliminari non pubblicati). Questi IDLV/Vpx esprimono un antigene modello quale la proteina M1 del virus dell'influenza sono in grado di infettare le DC umane e di indurre l'espansione di cellule CD8+ antigene-specifiche a livelli comparabili, se non superiori, a quelli ottenuti utilizzando il vettore lentivirale integrante, utilizzato come controllo (nostri dati preliminari non pubblicati).

Tuttavia, l'utilizzo degli IDLV ha alcune limitazioni. Infatti, mentre l'E-DNA degli IDLV persiste a lungo in cellule non proliferanti, quali DC, macrofagi e cellule muscolari, favorendone l'utilizzo per valutare e caratterizzare l'attività trascrizionale dell'E-DNA nel contesto di protocolli vaccinali, queste forme episomali hanno invece una breve emivita in cellule in attiva replicazione come le cellule tumorali; questo, poiché l'E-DNA non contiene origini di replicazione del DNA, rendendo quindi impossibile il suo mantenimento nelle cellule in divisione (5, 14). Il mantenimento dell'E-DNA in cellule tumorali potrebbe essere sfruttato in protocolli di terapia genica per l'eliminazione selettiva delle cellule tumorali.

Per risolvere questo problema, il nostro gruppo ha dimostrato che è possibile stabilizzare l'E-DNA in cellule replicanti mediante l'inclusione di origini di replicazione del DNA eucariotico, consentendone il mantenimento in cellule tumorali per la loro successiva eliminazione mediante l'espressione cellulo-specifica di geni "suicidi" quali la Timidina chinasi (TK) del virus *Herpes simplex* (Figura 2) (23, 24).

In questi lavori abbiamo inizialmente dimostrato che l'E-DNA degli IDLV può essere convertito in un episoma a stabile replicazione incorporando l'origine di replicazione del virus SV40 (SV40-*ori*) nel contesto del vettore lentivirale e fornendo in *trans* l'antigene T del virus SV40 nella cellula bersaglio (23). Successivamente abbiamo dimostrato che la trasduzione delle cellule 293T, esprimenti l'antigene T di SV40, con il vettore IDLV contenente SV40-*ori* ed esprimente la TK ha reso le cellule altamente sensibili al trattamento farmacologico con ganciclovir (GCV), a differenza delle cellule infettate con il vettore di controllo o in cellule negative per l'antigene T (24). Con le modifiche appropriate, questo approccio terapeutico potrebbe essere utilizzato in cellule esprimenti altri antigeni virali. Queste modifiche potrebbero essere effettuate includendo repliconi di virus a replicazione episomale, quali i poliomavirus BK e JC, il virus HPV e il virus di Epstein-Barr (EBV) (Figura 2).



**Figura 2. Vettori lentivirali non-integranti esprimenti il gene della Timidina chinasi inducono morte cellulare in presenza di Ganciclovir. (A) Rappresentazione schematica del vettore nonintegrante lentivirale esprimente la Timidina chinasi. (B) L'E-DNA replica solo in cellule infettate da virus a replicazione episomale. In presenza di Ganciclovir la Timidina chinasi, induce morte cellulare solo nelle cellule contenenti E-DNA**

Benchè l'uso del sistema Tag/SV40-ori per sé non possa essere applicato nell'uomo, lo sviluppo di un IDLV a replicazione episomale in cellule mitoticamente attive rimane di grande interesse clinico per ragioni di bio-sicurezza ed efficacia. Nel nostro laboratorio stiamo quindi studiando la possibilità di includere nel contesto degli IDLV regioni di DNA che possano facilitare il mantenimento dell'E-DNA quali le regioni contenenti sequenze S/MAR (*scaffold/matrix attachment regions*) e IR (*initiator regions*).

## Conclusioni e prospettive future

I vettori lentivirali non integranti, benché mantengano le caratteristiche basilari dei loro parentali integranti, mostrano delle differenze importanti, inclusa (i) l'instabilità delle forme episomali di IDLV in cellule proliferanti, (ii) la capacità di perdurare in forma episomale in cellule differenziate, quali le DC e i macrofagi, essenziali per lo sviluppo e il controllo della risposta immunitaria, e (iii) l'espressione inferiore alla controparte integrata. Per quanto riguarda l'ultimo punto, dati recenti che abbiamo sviluppato nel nostro laboratorio indicano che è possibile potenziare la funzionalità di IDLV, mantenendo un alto livello di bio-sicurezza, utilizzando la proteina Vpx di SIV che aumenta la capacità di trasduzione di DC e macrofagi portandola ai livelli ottenuti utilizzando la controparte parentale integrante.

Nel campo dei tumori associati alle infezioni virali, abbiamo dimostrato che con un unico inoculo di IDLV, è possibile controllare e fare regredire completamente tumori associati all'espressione di proteine virali, quali la E7 di HPV in modelli preclinici murini. Studi più approfonditi in primati non umani, ed eventualmente in protocolli clinici che coinvolgono pazienti, sono certamente necessari per valutare la reale potenzialità di un approccio immunoterapeutico basato sull'utilizzo di IDLV esprimenti antigeni tumorali.

Sempre nel campo dei tumori, è possibile sfruttare gli IDLV per eliminare cellule infettate da virus a DNA a replicazione episomale che causano tumori, quali EBV, HPV e SV40, sfruttando la capacità delle forme episomali di IDLV di mantenersi stabilmente solo nelle cellule infettate dal virus, rendendo quindi questa modalità di terapia genica unica ed particolarmente attraente.

L'utilizzo di vettori lentivirali non integranti in protocolli vaccinali, profilattici o terapeutici, mostra grandi potenzialità. Peraltro, la comunità scientifica continua la ricerca di metodi sempre più sicuri per l'induzione di un'efficace immunizzazione, incluso lo sviluppo di nuovi e più attivi IDLV. Vettori di altro tipo, inclusi quelli basati su adenovirus, virus adeno-associati (AAV) e poxvirus, sono stati valutati e utilizzati in diversi protocolli d'immunizzazione, ed è verso questi vettori che IDLV deve dimostrare un particolare vantaggio che lo renda più appetibile. In questo senso sono auspicabili protocolli sperimentali che permettano la valutazione comparativa delle risposte immunitarie indotte dalla veicolazione di antigeni tumorali da parte di diversi vettori virali e la loro capacità di controllare la crescita tumorale. Sempre in modelli preclinici, sarà possibile esplorare immunoterapie basate sull'uso combinato di IDLV esprimente l'antigene tumorale e chemioterapici che favoriscono la risposta immunitaria contro il tumore. In questo contesto, diversi studi preclinici hanno dimostrato che chemioterapici, quale la ciclofosfamide (CTX), hanno un'attività immunostimolante in combinazione con vaccini antitumorali (30, 31), stimolando l'espansione delle cellule T e DC, l'induzione di fattori di crescita e citochine (32, 33) e riducendo, al contempo, le cellule soppressorie indotte dal tumore.

Inoltre, visto il suo alto profilo di bio-sicurezza e la sua efficienza di trasduzione, IDLV può essere utilizzato come sistema di veicolazione di antigeni tumorali *ex vivo*. Infatti, cellule DC isolate da pazienti oncologici possono essere trasdotte con IDLV esprimente l'antigene tumorale e re-inoculate nel paziente in modo da espandere *in vivo* la popolazione di linfociti T diretti contro il tumore.

Infine, per quanto riguarda la bio-sicurezza degli IDLV, saranno valutate ulteriori modifiche atte a garantire la totale assenza di integranti in seguito all'inoculo diretto del vettore *in vivo*.

## Bibliografia

1. Wiznerowicz M, Trono D. Harnessing HIV for therapy, basic research and biotechnology. *Trends Biotechnol* 2005;23:42-7.
2. Hematti P, Hong BK, Ferguson C, Adler R, Hanawa H, Sellers S, Holt I E, Eckfeldt C, Sharma Y, Schmidt M, von Kalle C, Persons DA, Billings EM, Verfaillie CM, Nienhuis AW, Wolfsberg TG, Dunbar CE, Calmels B. Distinct genomic integration of MLV and SIV vectors in primate hematopoietic stem and progenitor cells. *PLoS Biol* 2004;2:e423.
3. Mitchell RS, Beitzel BF, Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry CC, Ecker JR, Bushman FD. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol* 2004;2:e234.
4. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval JL, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M, Fischer A. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2003; 348:255-6.

5. Cara A, Klotman M E. Retroviral E-DNA: persistence and gene expression in nondividing immune cells. *J Leukoc Biol* 2006;80:1013-17.
6. Cara A, Vargas J Jr, Keller M, Jones S, Mosoian A, Gurtman A, Cohen A, Parkas V, Wallach F, Chusid E, Gelman IH, Klotman ME. Circular viral DNA and anomalous junction sequence in PBMC of HIV-infected individuals with no detectable plasma HIV RNA. *Virology* 2002;292:1-5.
7. Cara A, Reitz MS Jr. New insight on the role of extrachromosomal retroviral DNA. *Leukemia* 1997;11:1395-99.
8. Shoemaker C, Goff S, Gilboa E, Paskind M, Mitra SW, Baltimore D. Structure of a cloned circular Moloney murine leukemia virus DNA molecule containing an inverted segment: implications for retrovirus integration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:3932-36.
9. Farnet CM, Haseltine WA. Circularization of human immunodeficiency virus type 1 DNA *in vitro*. *J Virol* 1991;65:6942-52.
10. Miller MD, Wang B, Bushman FD. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes containing discontinuous plus strands are competent to integrate *in vitro*. *J Virol* 1995;69:3938-44.
11. Negri DR, Michelini Z, Baroncelli S, Spada M, Vendetti S, Buffà V, Bona R, Leone P, Klotman ME, Cara A. Successful immunization with a single injection of non-integrating lentiviral vector. *Mol Ther* 2007;15:1716-23.
12. Coutant F, Frenkiel MP, Despres P, Charneau P. Protective antiviral immunity conferred by a nonintegrative lentiviral vector-based vaccine. *PLoS ONE* 2008;3:e3973.
13. Negri DR, Bona R, Michelini Z, Leone P, Macchia I, Klotman ME, Salvatore M, Cara A. Transduction of human antigen-presenting cells with integrase-defective lentiviral vector enables functional expansion of primed antigen-specific CD8(+) T cells. *Hum Gene Ther* 2010;21:1029-35.
14. Negri DR, Michelini Z, Bona R, Blasi M, Filati P, Leone P, Rossi A, Franco M, Cara A. Integrase-defective lentiviral-vector-based vaccine: a new vector for induction of T cell immunity. *Expert Opin Biol Ther* 2011;11:739-50.
15. Gillim-Ross L, Cara A, Klotman ME. HIV-1 extrachromosomal 2-LTR circular DNA is long-lived in human macrophages. *Viral Immunol* 2005;18:190-6.
16. Negri DR, Michelini Z, Baroncelli S, Spada M, Vendetti S, Bona R, Leone P, Klotman ME, Cara A. Nonintegrating Lentiviral Vector-Based Vaccine Efficiently Induces Functional and Persistent CD8+ T Cell Responses in Mice. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:534501.
17. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:244-65.
18. Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989;243:934-7.
19. Münger K. The role of human papillomaviruses in human cancers. *Front Biosci* 2002;7:d641-9.
20. Münger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *Virol* 1989;63:4417-21.
21. Bischof O, Nacerddine K, Dejean A. Human papillomavirus oncoprotein E7 targets the promyelocytic leukemia protein and circumvents cellular senescence via the Rb and p53 tumor suppressor pathways. *Mol Cell Biol* 2005;25:1013-24.
22. Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, Levitsky HI, August JT, Pardoll DM, Wu TC. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res* 1996;56:21-6.

23. Vargas J Jr, Gusella GL, Najfeld V, Klotman ME, Cara A. Novel integrase-defective lentiviral episomal vectors for gene transfer. *Hum Gene Ther* 2004;15:361-72.
24. Vargas J Jr, Klotman ME, Cara A. Conditionally replicating lentiviral-hybrid episomal vectors for suicide gene therapy. *Antiviral Res* 2008;80:288-94.
25. Berger G, Goujon C, Darlix JL, Cimorelli A. SIVMAC Vpx improves the transduction of dendritic cells with nonintegrative HIV-1-derived vectors. *Gene Ther* 2009;16:159-63.
26. Karwacz K, Mukherjee S, Apolonia L, Blundell MP, Bouma G, Escors D, Collins MK, Thrasher AJ. Nonintegrating lentivector vaccines stimulate prolonged T-cell and antibody responses and are effective in tumor therapy. *J Virol* 2009;83:3094-103.
27. Hu B, Yang H, Dai B, Tai A, Wang P. Nonintegrating lentiviral vectors can effectively deliver ovalbumin antigen for induction of antitumor immunity. *Hum Gene Ther* 2009;20:1652-64.
28. Michelini Z, Negri DR, Baroncelli S, Spada M, Leone P, Bona R, Klotman ME, Cara A. Development and use of SIV-based Integrase defective lentiviral vector for immunization. *Vaccine* 2009;27:4622-29.
29. Hu B, Dai B, Wang P. Vaccines delivered by integration-deficient lentiviral vectors *targeting* dendritic cells induces strong antigen-specific immunity. *Vaccine* 2010;28:6675-83.
30. Machiels JP, Reilly RT, Emens LA, Ercolini AM, Lei RY, Weintraub D, Okoye FI, Jaffee EM. Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice. *Cancer Res* 2001;61:3689-97.
31. Di Paolo NC, Tuve S, Ni S, Hellström KE, Hellström I, Lieber A. Effect of adenovirus-mediated heat shock protein expression and oncolysis in combination with low-dose cyclophosphamide treatment on antitumor immune responses. *Cancer Res* 2006;66:960-9.
32. Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, Parcellier A, Cathelin D, Garrido C, Chauffert B, Solary E, Bonnotte B, Martin F. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol* 2004;34:336-44.
33. Bracci L, Moschella F, Sestili P, La Sorsa V, Valentini M, Canini I, Baccarini S, Maccari S, Ramoni C, Belardelli F, Proietti E. Cyclophosphamide enhances the antitumor efficacy of adoptively transferred immune cells through the induction of cytokine expression, B-cell and T-cell homeostatic proliferation, and specific tumor infiltration. *Clin Cancer Res* 2007;13:644-53.