

Pasado, presente y futuro de la vacunación anti-idiotipo

M. Rodríguez Calvillo, S. Inogés, A. López Díaz de Cerio, N. Zabalegui, C. Panizo, M. Hernández, J. Pérez Calvo, F. Prósper, I. Melero, A. Sánchez-Ibarrola, E. Rocha, M. Bendandi

Área de Terapia Celular de la Clínica Universitaria, Centro de Investigación Médica Aplicada. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra

Correspondencia:
Mercedes Rodríguez Calvillo
Area de Terapia Celular
Clínica Universitaria
Avda. Pío XII, 36
31008 Pamplona
(mrodriguec@unav.es)

Resumen

En la actualidad las vacunas contra el cáncer se conciben como armas terapéuticas, en contraste con las preventivas que se administran frente a enfermedades infecciosas. Entre las más potentes vacunas terapéuticas se encuentra la vacunación anti-idiotipo, que emplea como diana la inmunoglobulina tumor-específica, el único antígeno completo tumor-específico conocido que se expone en la membrana de ciertas enfermedades hematológicas de extirpe B. La vacunación idiotípica ha demostrado ya beneficios clínicos y en la actualidad existen dos ensayos clínicos fase III que abordan esta opción terapéutica. Asimismo se van desarrollando otras estrategias que incluyen el empleo de células dendríticas o la producción de vacunas idiotípicas por mecanismos moleculares, que sin duda aportarán en los próximos años conclusiones beneficiosas para el tratamiento de los pacientes con cáncer.

Palabras clave: Inmunoterapia. Vacuna. Idiotipo. Linfoma. Mieloma múltiple.

Historia de la vacunación idiotípica

El tratado de Edward Jenner sobre vacunación (del latín *vaccinus*, de origen vacuno) publicado en 1798 constituyó un verdadero hito y marcó el inicio "oficial" de la inmunoterapia antiinfecciosa mediante vacunas. Tradicionalmente, el término "vacuna", hace referencia a las desarrolladas para prevenir enfermedades infecciosas y que emplean en su formulación patógenos, o antígenos de ellos derivados, atenuados o inactivados. Sin embargo, cuando aplicamos el término vacuna a enfermedades neoplásicas, hablamos del tratamiento del cáncer mediante componentes derivados de las propias células tumorales y frente a los que se intenta inducir una respuesta inmune. En los últimos años numerosos investigadores también han centrado sus esfuerzos en diseñar vacunas frente a ciertos tumores, aunque muchas de las tentativas han fracasado debido a la dificultad de encontrar un antígeno tumoral específico que permita al sistema inmune distinguir de una manera precisa una célula tumoral de una normal. Conceptualmente dicho antígeno podría ser utilizado como vacuna si fuera capaz de inducir en el paciente una respuesta inmune capaz de eliminar

Summary

Cancer vaccines are conceived as therapeutic tools, in contrast to the prophylactic vaccines used to fight against infectious diseases. Among the most potent therapeutic vaccines, anti-idiotypic vaccination is directed against the tumor idiotype, the only well-characterized tumor antigen displayed in neoplastic B-cells. Anti-idiotypic vaccines have demonstrated clinical benefit against follicular lymphoma and are currently being evaluated in two different phase III clinical trials. Additional emerging strategies, which include the use of dendritic cells and the production of vaccines via molecular means will surely allow us to draw important conclusions concerning the treatment of cancer patients.

Key words: Immunotherapy. Vaccine. Idiotype. Lymphoma. multiple myeloma.

todas las células que lo expresaran. Así, mientras los antígenos asociados a tumores (AATs) se localizan en células tumorales y al menos en algunas células normales de los pacientes, los antígenos específicos de tumores (AETs) sólo se expresan en las células tumorales. Este hecho hace que los AETs sean la diana de elección para las estrategias de inmunoterapia diseñadas para dañar la menor cantidad posible de células normales, y particularmente aquellas indispensables.

A pesar de que son numerosísimas las estrategias que se emplean en el desarrollo de vacunas terapéuticas frente al cáncer, la única que emplea como diana tumoral un AET completo es la denominada vacunación anti-idiotipo o vacunación idiotípica. La inmunoglobulina (Ig) es una molécula compuesta de cadenas pesadas y ligeras, cada una provista de regiones variables altamente específicas. Las regiones variables de la cadena pesada y ligera se combinan de tal manera que forman un único sitio para el reconocimiento antigénico propio de cada Ig. Estas regiones variables contienen determinantes antigénicos o idiotopos, acuñándose el término "idiotipo" (Id) para definir el conjunto de los determinantes antigénicos de cada Ig en cuestión (Figura 1). Así se comprende que la aplicación de la vacu-

nación idiotípica se centre principalmente en las neoplasias hematológicas de extirpe B cuyas células expresen una inmunoglobulina en su superficie. Sin embargo, de manera casi anecdótica, el concepto de vacunación idiotípica se ha empleado también en neoplasias de extirpe T, utilizando el idiotipo del TCR (receptor de célula T) tumor-específico. Entre las neoplasias de extirpe B en las que se aplica la vacunación anti-idiotipo se incluyen ciertos linfomas no Hodgkin como el linfoma folicular (LF) o el linfoma del manto, algunos tipos de leucemias linfoblásticas agudas, la leucemia linfocítica crónica y gammopatías monoclonales como el mieloma múltiple (MM) y la macroglobulinemia de Waldenström. De todas formas, hasta la fecha, el linfoma folicular y el mieloma múltiple se han mostrado como las dianas más claras para estas estrategias de inmunoterapia activa.

La Ig engloba el Id básicamente se comporta como un anticuerpo monoclonal que ha fallado en la estimulación del sistema inmune del paciente para activarlo contra el clon tumoral que lo expresa. Por tanto, los dos principales pasos en una estrategia de inmunoterapia activa que conduce a la producción de vacunas idiotípicas son en primer lugar purificar el Id y después transformarlo en un inmunógeno lo suficientemente potente como para lograr desencadenar una respuesta inmune frente a él. En el MM, un proceso linfoproliferativo B caracterizado por la producción de una Ig monoclonal específica del tumor que en más del 90% de los casos es una IgG o una IgA,

el antígeno circula en gran cantidad en el torrente sanguíneo y por tanto se puede obtener muy fácilmente. Sin embargo, la delicada situación clínica que frecuentemente presentan los pacientes y que hace necesario otros tratamientos, complica el

Figura 1. Esquema de la estructura de una inmunoglobulina G. H: cadena pesada. (L: cadena ligera. C: región constante. V: región variable. S-S: puentes disulfuro intra e intercatenarios)

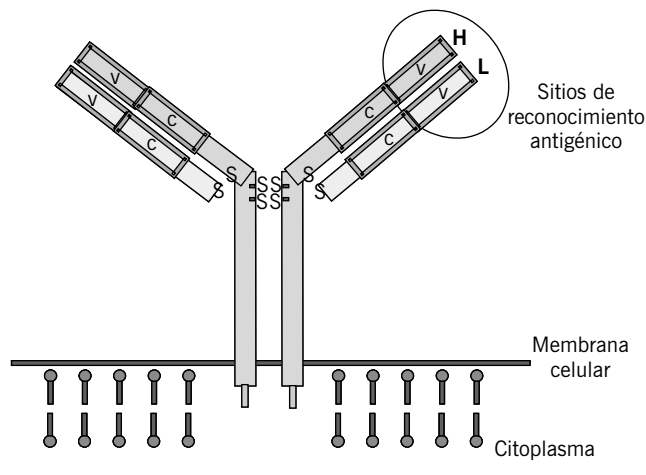
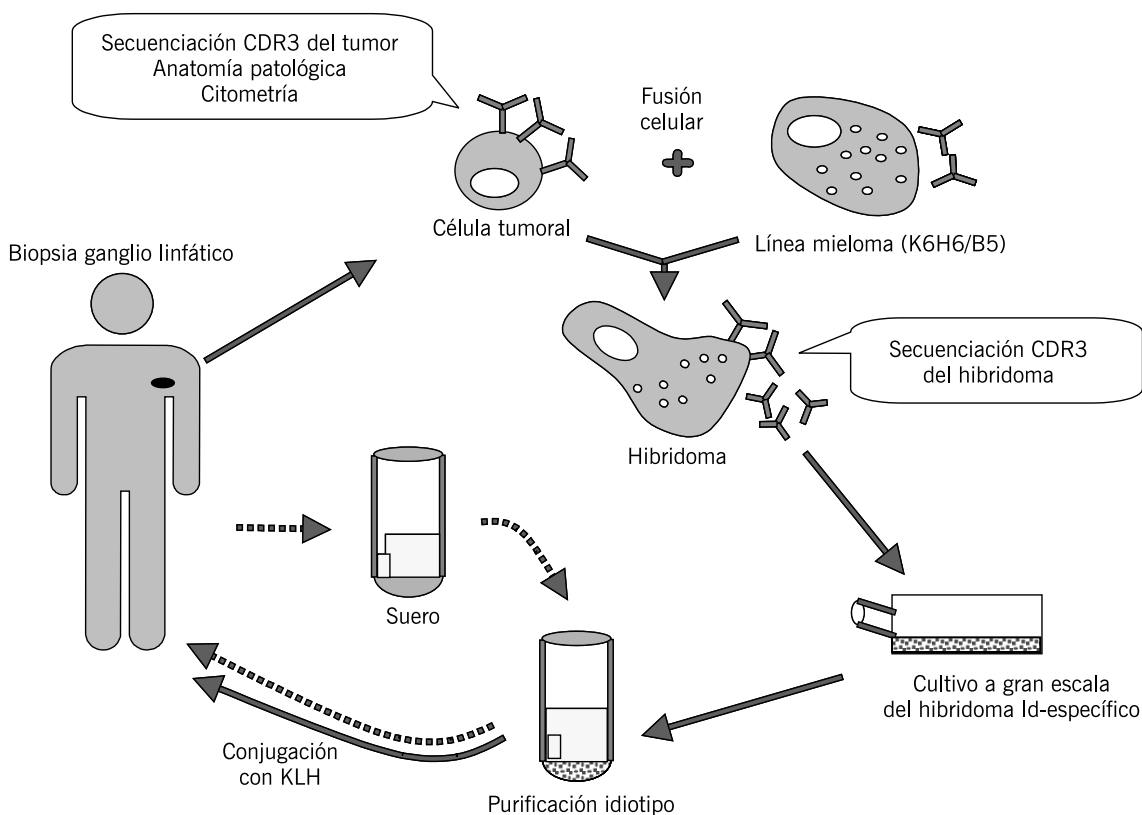


Figura 2. Diagrama esquemático del proceso de producción de la vacuna idiotípica. En líneas continuas se detalla el proceso a seguir en el caso de linfomas y en discontinuas en el caso de gammopatías monoclonales



estudio de esta aplicación terapéutica. En cambio, en los linfomas la Ig que contiene el Id no es secretada por las células tumorales y por tanto tiene que ser aislada desde el clon tumoral que constituye su limitada y única fuente original. A pesar de la relativa dificultad de obtener el AET de las células del linfoma, el buen estado clínico que frecuentemente caracteriza a estos pacientes hace de estas enfermedades el terreno más fácil para el desarrollo clínico de vacunas anti-Id. Además, comparado con las leucemias linfocíticas crónicas o linfoblásticas agudas de células B que generalmente presentan clones o subclones carentes de positividad para Ig en el inmunofenotipo, casi todos los LF presentan el AET en la superficie de sus células. Otro punto fuerte en favor del LF es que aunque sustancialmente incurable, esta enfermedad se caracteriza por su larga supervivencia media independientemente del tratamiento elegido. Desde un punto de vista meramente científico este hecho puede ser considerado como un arma de doble filo: por una parte nos permite tener mucho tiempo para la costosa labor de producir una vacuna específica del tumor y del paciente, pero por otra parte deben pasar años hasta que se puedan obtener conclusiones definitivas sobre su eficacia clínica.

La obtención de la proteína idiotípica para la vacuna se ha basado durante mucho tiempo en la técnica de fusión celular que permite la generación *in vitro* exactamente del mismo Id tumor específico que contiene la Ig que se expone en el clon de células de LF (Figura 2). La suspensión de células individuales que se obtiene de una muestra de ganglio linfático, por definición, contiene una población residual de linfocitos B normales que "contamina la pureza" del clon de células tumorales. Para tener la plena seguridad de que el Id del hibridoma seleccionado sea completamente idéntico al que se asocia al tumor, todos los hibridomas tienen que ser testados mediante identificación por PCR del CDR3 de la cadena pesada de la Ig para elegir aquel o aquellos clones "buenos" productores de Ig y cuyo Id sea a la vez idéntico al del clon tumoral. Una vez que el sobrenadante obtenido del cultivo del hibridoma ha producido la cantidad deseada del Id purificado, este AET tiene que ser transformado en algo más inmunogénico que lo que típicamente está en su forma natural, para lo cual se conjuga con "keyhole limpet hemocyanin" (KLH), una proteína obtenida a partir de un molusco (*megathura crenulata*), altamente inmunogénica y que puede ser empleada tanto como molécula transportadora (carrier), como para pulsar células dendríticas (CD).

La asociación de un adyuvante inmunológico a la vacuna idiotípica (Id-KLH) en forma de proteína soluble también ha mostrado ser potencialmente decisivo. Hasta la fecha, el factor estimulante de colonias granulomonocíticas (GM-CSF) parece ser posiblemente el mejor de los adyuvantes testados tanto en ensayos en animales como en humanos, probablemente debido a su capacidad *in vivo* para reclutar CD al lugar de la inyección de la vacuna. Así, tanto en los estudios que se llevan a cabo en linfomas como en MM, el GM-CSF ha demostrado ser el adyuvante de elección.

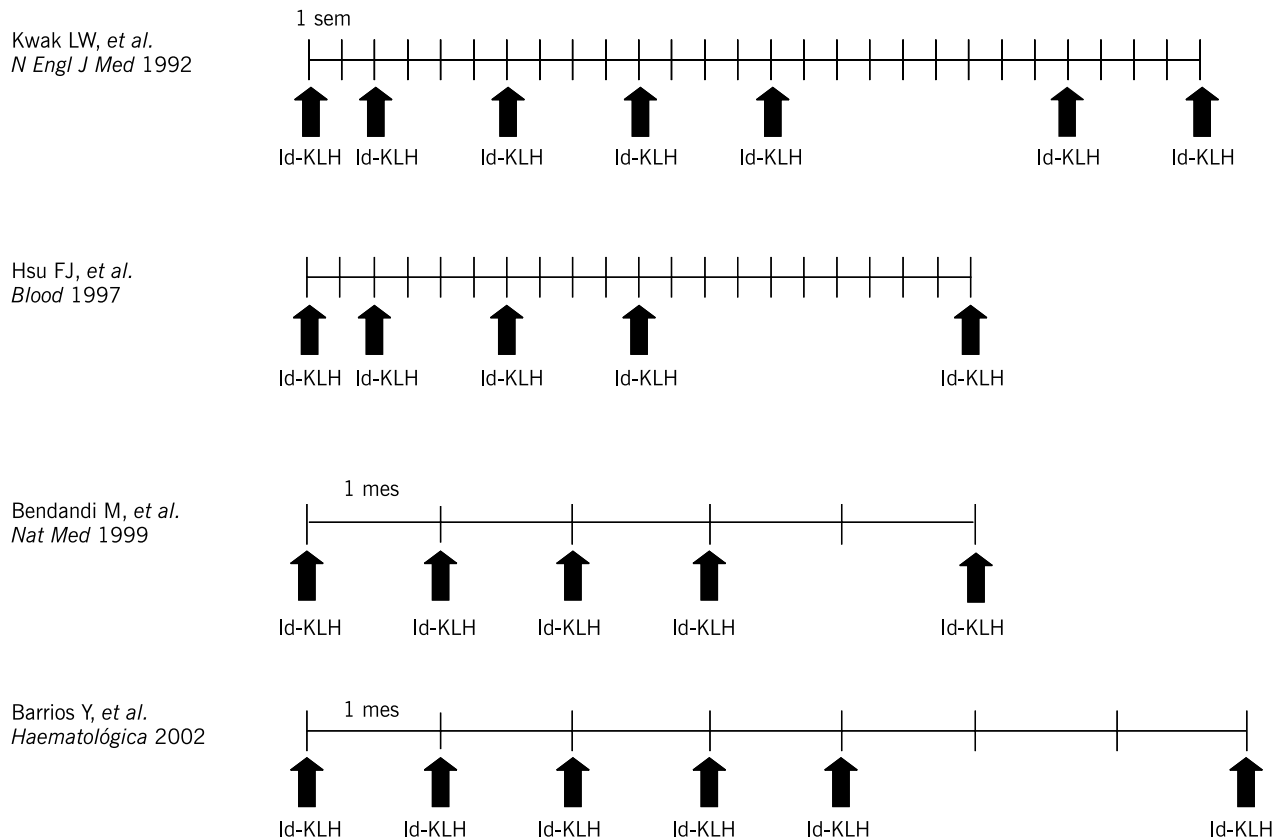
En la Figura 3 se detalla el esquema de tratamiento de todos los ensayos clínicos publicados hasta la fecha y que emplean la vacuna idiotípica en pacientes afectados de LF. En todos ellos, a pesar de que el esquema de tratamiento variaba significativamente, la formulación de la vacuna se mantuvo idéntica. Así, todos ellos emplearon la vacuna idiotípica en dosis de

0.5 mg de idiotipo conjugado a 0.5 mg de KLH a una concentración final de 1 mg/ml, de tal manera que los pacientes recibían finalmente 1 ml de conjugado.

En 1992, Kwak *et al.*¹ fueron los primeros en demostrar en siete de nueve pacientes con LF en situación de respuesta completa (RC) o con evidencia de enfermedad persistente después de la quimioterapia (QT), que la vacuna idiotípica era capaz de inducir una respuesta inmune específica frente al Id¹. En este trabajo, la eficacia de la vacuna idiotípica fue demostrada sólo en términos de respuesta humoral, ya que una evaluación completa de la respuesta celular estaba fuera de los objetivos del ensayo. En cualquier caso, proporcionó la primera prueba formal de que pacientes con cáncer podían ser inmunizados contra un antígeno derivado de su propio tumor.

Unos años más tarde, el mismo grupo de Stanford tras ampliar el número de pacientes incluidos en el estudio piloto mencionado, informó del seguimiento a largo plazo de 41 pacientes tratados con la misma formulación de vacuna idiotípica y en los que se empleó SAF-1 como adyuvante². Los resultados proporcionaron la primera evidencia provisional de que la vacuna idiotípica podría tener un impacto real en la evolución de la mayoría de los pacientes que experimentan algún tipo de respuesta inmune específica frente al Id tumoral inducida por la vacuna, a pesar de que se debe tener en cuenta de que se trata de un estudio no aleatorizado y que los grupos de pacientes son todos muy pequeños. No obstante, en los 41 pacientes vacunados con la vacuna formulada con su propio Id tumor-específico conjugado con KLH + SAF-1 se indujo una respuesta inmune específica frente a KLH. Mucho más destacable, 20 de ellos también mostraron una respuesta inmune humoral y/o celular frente al Id. El mayor problema no resuelto es que no se ha encontrado ningún procedimiento para predecir que candidatos desarrollarán con mayor probabilidad una respuesta inmune Id-específica. Por el contrario, desde un punto de vista clínico, en la mayoría de los pacientes que habían sido inmunizados en RC y que desarrollaron una respuesta inmune específica del tumor se obtuvieron largas supervivencias libres de enfermedad, mientras que en la mayoría de los que fallaron en el desarrollo de una respuesta específica contra el idiotipo, aunque también hubieran sido vacunados en RC, no. Asimismo, los pocos casos de regresiones tumorales registradas en pacientes que tenían evidencia de enfermedad en el momento de la inmunización parecían depender de la inducción por la vacuna de una respuesta inmune específica frente al Id. La comparación de los resultados de los pacientes que responden inmunológicamente con los que no responden demostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos en términos de supervivencia global y tiempo libre de progresión entre los pacientes vacunados en primera RC. Lo mismo pudo ser mostrado en cuanto al tiempo libre de progresión entre pacientes vacunados sin evidencia de enfermedad y aquellos que habían sido inmunizados con enfermedad evidente. Globalmente estos resultados sugieren que las estrategias de inmunoterapia basadas en la vacunación idiotípica para el LF humano pueden resultar beneficiosas sobretodo para los pacientes que las reciben en RC.

Estos datos se corroboraron en un estudio publicado por Bendandi *et al.*³ en 25 pacientes afectados de linfoma folicular y vacunados con Id-KLH + GM-CSF en primera RC³. Los datos clínicos todavía son preliminares pero ya es notable que con un

Figura 3. Representación de los ensayos clínicos realizados empleando la vacunación anti-idiotipo en linfomas no Hodgkin

seguimiento de aproximadamente 3-6 años, 19 de 22 pacientes inmunizados mantenían su primera RC. La respuesta inmune celular y humoral inducida por la vacuna ha sido documentada *in vitro* en 19/22 y en 16/22 pacientes respectivamente. Además, todas estas respuestas fueron específicas frente al tumor y al Id. Sin embargo, el hallazgo más notable de este estudio fue la demostración formal en 9 de 12 pacientes evaluables de remisiones moleculares duraderas inducidas por la vacuna, determinada por la monitorización de t(14;18) y reordenamiento bcl-2 mediante PCR.

Ya en nuestro país, el grupo de la Clínica Puerta de Hierro publicó recientemente los resultados de 9 pacientes afectados de LF tratados con la vacuna anti-Id⁴. Los seis primeros incluidos fueron tratados con SAF-1 como adyuvante, mientras que los tres posteriores recibieron GM-CSF. Todos los pacientes completaron el calendario vacunal y la toxicidad consistió fundamentalmente en reacciones localizadas en el sitio de inyección. Ninguno de los pacientes experimentó progresión de la enfermedad durante un periodo de seguimiento de 40 meses y en dos de ellos se llegaron a observar incluso regresiones tumorales. En 8/9 pacientes fue posible hallar una respuesta humoral Id-específica y en 3/5 llegaron a desaparecer las células portadoras del gen reordenado bcl-2 determinado por PCR.

Respecto a las aplicaciones de la vacunación anti-idiotipo en MM, el primer estudio publicado que empleaba dicha estrategia se realizó en 1995⁵. Nuevamente Kwak *et al.*⁵ describieron la posibilidad de transferir con éxito de manera pasiva la inmunidad idiotipo-específica, al vacunar a un donante sano con el idiotipo purificado de un paciente con MM de manera previa a la realización de un trasplante alogénico de médula ósea. El donante de este estudio recibió dos vacunaciones, con un intervalo de una semana, consistentes en 0.5 mg de idiotipo conjugado a KLH. Aproximadamente un mes después, el paciente fue sometido a un trasplante alogénico de médula ósea sin manipular de su donante compatible.

Hubieron de pasar varios años hasta que en 1999 se empezaron a publicar otros estudios de vacunación idiotípica en pacientes afectados de MM (Figura 4). Österborg *et al.*⁶ vacunaron a cinco pacientes con MM empleando Id-KLH + GM-CSF. La pauta de la vacunación consistía en seis inyecciones totales de 0.5 mg de Id conjugado a KLH. Todos los pacientes desarrollaron inmunidad celular Id-específica, así como respuesta humoral también Id-específica.

Casi al mismo tiempo, Massaia *et al.*⁷ publicaron los resultados del tratamiento mediante vacunación con Id-KLH en 12 pacientes afectados de MM en situación de remisión parcial

tras haber recibido un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos. Como en los casos anteriores, la vacuna consistió en 0,5 mg de Id conjugado con KLH. En dos pacientes se empleó como adyuvante IL-2 a dosis de 1,5 UI/m²/d, mientras que en los diez pacientes restantes se empleó GM-CSF a la dosis de 150 µg/m²/d. De los 11 pacientes que completaron el esquema terapéutico únicamente 2 desarrollaron respuestas celulares Id-específicas.

El grupo de la Clínica Puerta de Hierro⁸ también describió en 2000 el tratamiento de un paciente con MM en situación de recaída tras trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos a quien se le infundieron los linfocitos del donante previamente vacunado con el Id del propio paciente. El paciente alcanzó la respuesta completa y a continuación recibió una serie de vacunas de recuerdo. Como en el caso ya citado por Kwak *et al.*¹, el donante recibió dos dosis de vacuna (0.5 mg de idi tipo emulsionado en SAF-1) separadas tres semanas entre sí.

Así, mientras que en pacientes afectos de LF la vacunación anti-Id es capaz por sí misma de inducir remisiones clínicas y moleculares completas, en el MM los resultados hasta la fecha son mucho más reducidos. En particular, han podido evidenciarse respuestas T Id-específicas y ocasionalmente cierta reducción del componente monoclonal o estabilización de la enfermedad, pero no respuestas completas, por lo que parece

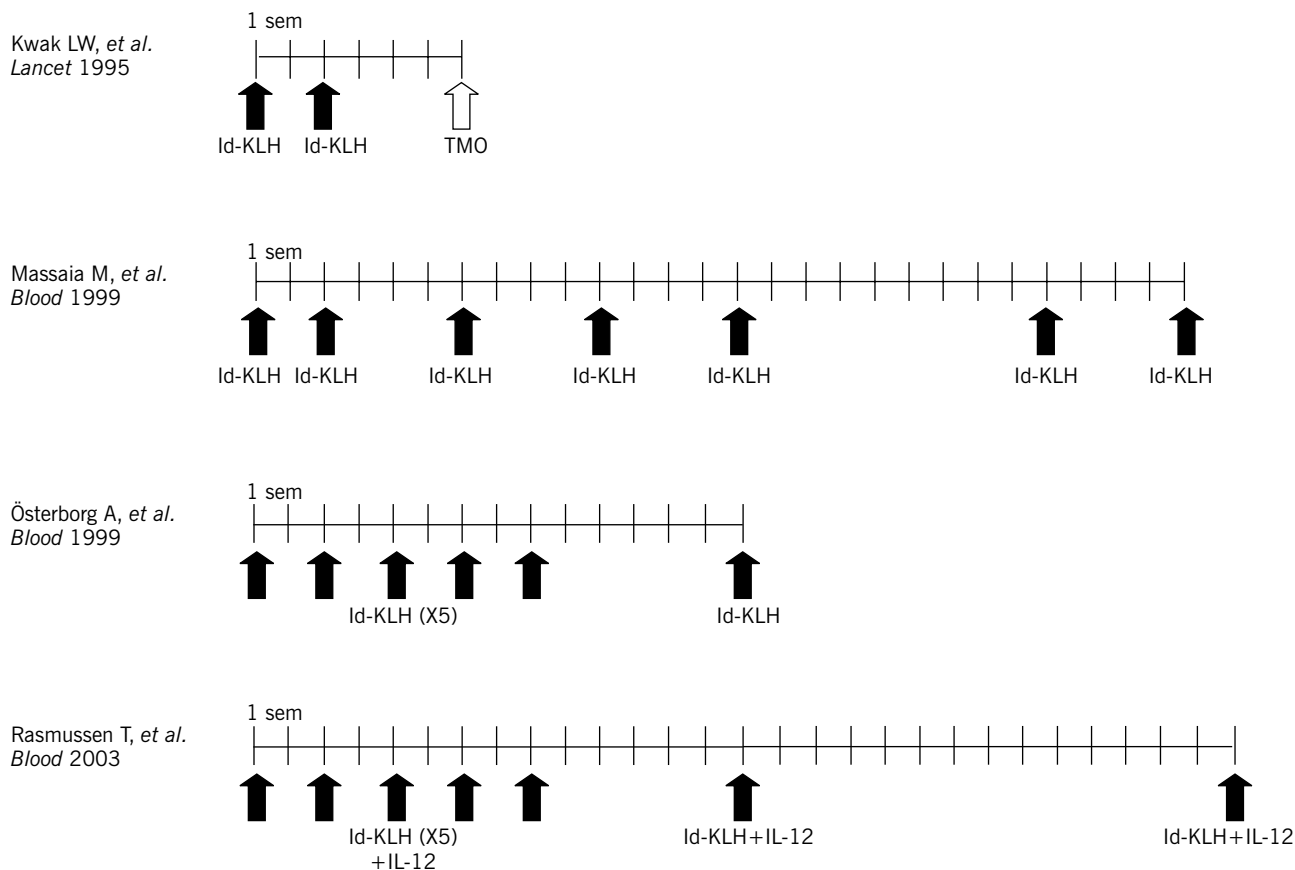
necesario plantear nuevas estrategias terapéuticas que logren controlar esta enfermedad. En este sentido hay algunos investigadores que están asociando otras armas inmunoterapéuticas a la vacunación idiotípica en pacientes con MM. Así, Mellstedt *et al.*⁹ han descrito recientemente que la combinación de IL-12 a la vacunación idiotípica en pacientes con MM es capaz de reducir el número de células B clonales circulantes, representando el primer estudio que demuestra la reducción a nivel molecular de la enfermedad de manera similar a lo acontecido en el LF.

Vacunas idiotípicas “alternativas”

Un importante avance en el campo de la inmunoterapia activa se produjo al descubrir la posibilidad de obtener gran cantidad de células dendríticas a partir de precursores monocitarios en presencia de GM-CSF e IL-4^{10,11}. Las CD son las encargadas de una correcta presentación de los antígenos tumorales a los linfocitos T, y la falta de las mismas o una deficiencia en sus funciones son algunos de los principales mecanismos que aprovechan las células tumorales para escapar de la respuesta inmune.

Las estrategias de inmunoterapia antitumoral empleadas en la actualidad tratan de inducir respuestas celulares antígeno-

Figura 4. Esquema representativo de los ensayos clínicos que han empleado la vacunación anti-idiotipo en Mieloma Múltiple



específicas capaces de erradicar los tumores mediante la administración de CD pulsadas, transfectadas o transducidas con epítomos antigénicos tumorales, si bien citoquinas como la IL-12 parecen necesarias para favorecer respuestas antitumorales óptimas¹². Dado que habitualmente las CD son "cargadas" con antígenos tumorales, no sorprende que el Id en forma de proteína soluble haya sido uno de los primeros antígenos empleados para pulsar estas células presentadoras de antígeno profesionales. Por otro lado, cabe también la posibilidad de que la vacuna idiopática estándar (Id-KLH) induzca un efecto sinérgico junto con las CD, al estimular ambos brazos de la respuesta inmune.

Han sido varios los ensayos clínicos que han empleado esta aproximación y sus esquemas terapéuticos se detallan en la Figura 5. El primer estudio basado en el uso de CD empleó células autólogas pulsadas con el Id en cuatro pacientes con LF y demostró tanto la inducción de linfocitos T reactivos frente al tumor como una cierta eficacia clínica del procedimiento¹³. Estos resultados preliminares se acaban de actualizar incluyendo 35 pacientes afectados de LF¹⁴. Los pacientes recibieron un total de cuatro inyecciones mensuales de CD pulsadas con el idiopato, seguidas de vacunación idiopática (Id-KLH + SAF-1) dos semanas después de cada vacunación con CD. Fue posible hallar una respuesta inmune humoral y/o celular anti-Id en 17 de los pacientes tratados, mientras que de los 18 pacientes que comenzaron el calendario vacunal con enfermedad residual, 4 presentaron regresiones tumorales y 14 permanecían sin progresión 43 meses después de recibir el último tratamiento quimioterápico. En 1999 el grupo de Stanford¹⁵ publicó los resultados obtenidos tras vacunar con CD autólogas pulsadas con el Id a 12 pacientes afectados de MM tratados con altas dosis de QT y trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de manera previa a la vacunación. El protocolo consistió en dos inyecciones intravenosas de CD seguidas de cinco vacunaciones subcutáneas mensuales de Id-KLH + SAF-1. 2/12 pacientes desarrollaron respuestas celulares Id-específicas. En otro estudio en 6 pacientes afectados de MM IgG, el protocolo de vacunación consistió únicamente en tres dosis de DC autólogas pulsadas con Id y administradas por vía intravenosa de manera quincenal¹⁶. En todos los pacientes se documentaron respuestas humorales y celulares Id-específicas, aunque no se llegaron a evidenciar remisiones clínicas. En 2000 se publicaron los resultados de otro estudio llevado a cabo en 11 pacientes con MM en estadio avanzado. En este estudio los pacientes fueron vacunados con una única inyección de CD autólogas pulsadas con el Id seguidas de dos inyecciones quincenales de Id-KLH + GM-CSF¹⁷. Aunque se documentaron muchas menos respuestas celulares (2/11), éstas se asociaron a respuestas clínicas completas. Otra serie analiza los resultados obtenidos en 5 pacientes también con MM en situación de remisión parcial. Cada paciente recibió un total de tres vacunaciones subcutáneas de CD pulsadas con Id en el plazo de un mes. Además, durante un periodo de 5 días tras cada vacunación, los pacientes recibieron IL-2 de manera subcutánea. Todos los pacientes tratados alcanzaron algún tipo de remisión clínica de la enfermedad y al estudiar la respuesta inmune en todos se hallaron respuestas humorales Id-específicas, siendo además posible detectar en 4/5 una respuesta celular frente al Id¹⁸. Más recientemente, se han informado un pequeño número de regresiones macroscópicas en algunos pacientes con LF en progresión que han sido inmuni-

zados con el Id en forma de proteína soluble conjugado con KLH + SAF-1. La característica más alentadora de la respuesta de estos pacientes es que se ha conseguido en individuos que previamente habían recaído, o nunca habían respondido, a CD pulsadas con el Id conjugado a KLH. Naturalmente, estos datos preliminares plantean algunas dudas acerca de la ventaja real de usar la vacuna idiopática en forma de proteína soluble para pulsar CD en lugar de sólo administrarla subcutáneamente al paciente¹⁹.

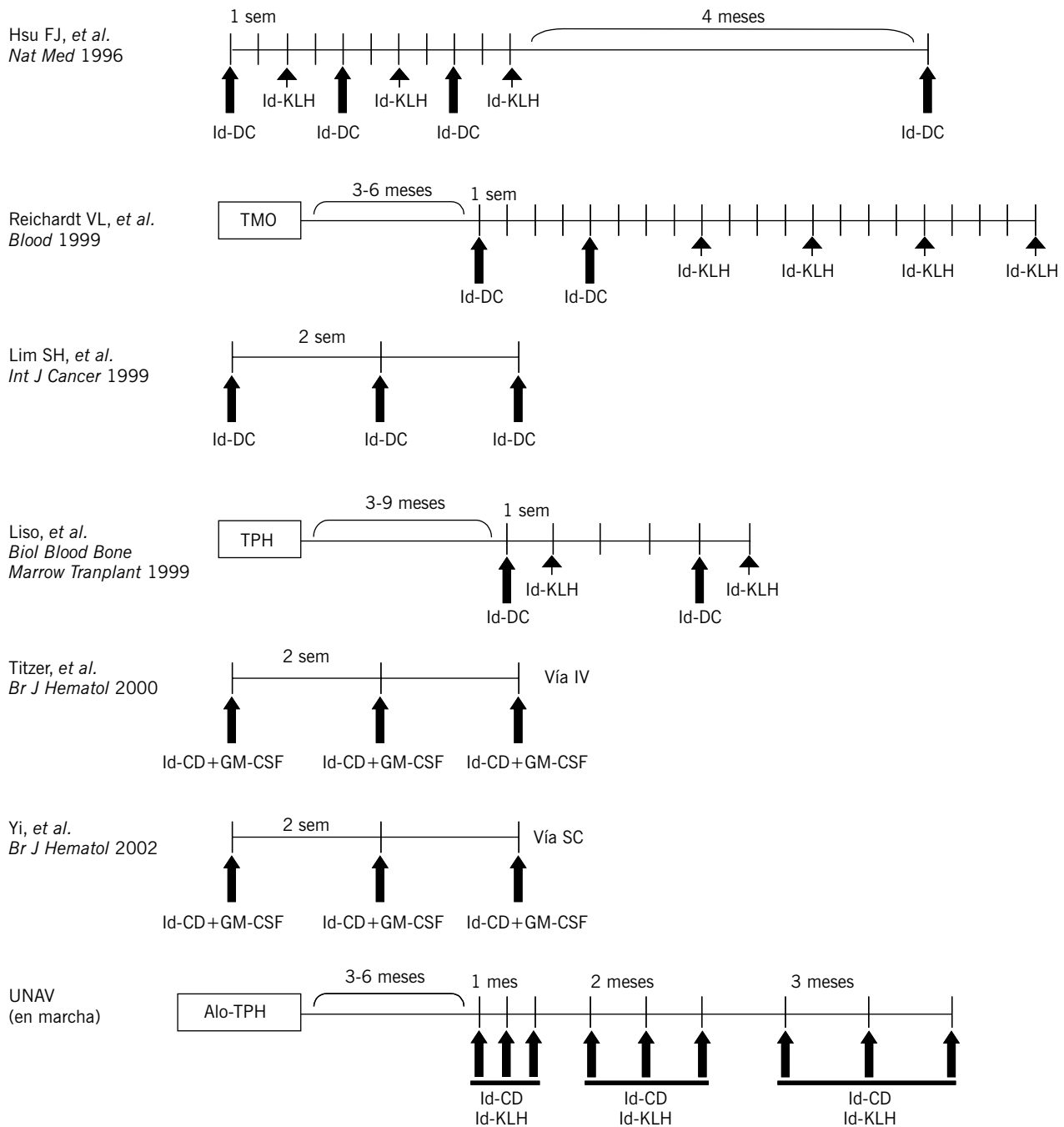
Tal y como hemos podido comprobar, las vacunas idiopáticas empleadas en la mayoría de los ensayos clínicos en linfomas son administradas en forma de proteína soluble, obligando a realizar en todos los pacientes una fusión celular y cultivos a gran escala de aquellos clones productores de la Ig Id-específica. Este sistema resulta muy costoso y poco práctico, ya que habitualmente son necesarios alrededor de seis meses para llegar a producir una vacuna. Con el objetivo de agilizar la producción y gracias al rápido desarrollo que la biología molecular ha experimentado en los últimos años, se ha hecho posible producir vacunas proteicas recombinantes mediante la amplificación por PCR, posterior clonaje de los genes que codifican la secuencia del idiopato de las células tumorales y su inserción en vectores que permitan una expresión de la proteína *in vitro* o bien, inyectarlos directamente en los pacientes en forma de DNA. En el momento actual ya existen en marcha en el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos un ensayo clínico fase II en linfomas de alto grado y otro fase III en LF. Este último pretende reclutar alrededor de 500 pacientes y emplea un total de cinco vacunaciones administradas a lo largo de un periodo de seis meses²⁰.

Sin embargo, la vacunación idiopática todavía puede simplificarse más si en lugar de la proteína recombinante llegara a emplearse una secuencia plasmídica de DNA codificante para el Id. Aunque las secuencias de DNA plasmídico han demostrado ser eficaces en modelos de linfoma murino²¹⁻²³, la experiencia clínica con un vector de primera generación ha resultado ser bastante desalentadora, ya que no han logrado el beneficio clínico esperable²⁴. A pesar de los pobres resultados iniciales, esta tecnología posibilita la inserción de secuencias adicionales con capacidad inmunostimuladora que aumenten la inmunogenicidad de la propia vacuna, como citoquinas, quemoquinas, motivos CpG o proteínas carrier como el toxoide tetánico²⁵. En este sentido, King *et al.*²² han desarrollado amplia experiencia en la producción de vacunas de DNA codificantes tanto para el Id como para el fragmento C de la toxina tetánica, habiendo demostrado la inducción de inmunidad protectora en modelos murinos tanto de linfoma como de mieloma, y conduciendo en la actualidad un ensayo clínico fase I/II en pacientes afectados de LF en primera recaída.

Estado actual

A pesar de las ventajas que potencialmente podrían ofrecer las vacunas de DNA, son las vacunas idiopáticas basadas en proteínas solubles las que han cruzado el umbral de los ensayos clínicos en fase I/II y ya hay dos ensayos clínicos multicéntricos independientes Fase III en marcha en Estados Unidos para pacientes con LF. Uno de éstos consiste en un estudio aleatorizado (2:1) para recibir Id-KLH + GM-CSF o

Figura 5. Representación de los ensayos clínicos realizados empleando de manera combinada la vacunación anti-idiotipo y la vacunación con células dendríticas



solo KLH + GM-CSF de manera mensual durante siete meses. A Final de 2003 finalizará la inclusión de pacientes, esperando reclutar alrededor de 600 en un periodo total de dos años y medio. A pesar de la rápida inclusión, en el transcurso del ensayo clínico se cambió la forma de producción de la vacuna, pasando de la vacuna protéica clásica a la recombinante, lo que se deberá tener en cuenta a la hora de

interpretar los resultados²⁵. El otro ensayo clínico conducido por Kwak⁵, a pesar de haber comenzado la inclusión con anterioridad, no ha logrado todavía reclutar un número de pacientes tan amplio. Sin embargo, este estudio posee la ventaja conceptual de que no se ha variado la forma de producción de la vacuna por lo que los resultados serán más fácilmente interpretables²⁶.

Fuera de los Estados Unidos, nuestro grupo lidera en Europa la aplicación de la vacunación idiotípica a pacientes con neoplasias hematológicas de extirpe B. En este sentido, iniciamos hace aproximadamente dos años un protocolo clínico en pacientes con LF en primera recaída. De manera previa a la vacunación los pacientes reciben tratamiento quimioterápico estándar (CHOP) debiendo esperar alrededor de tres meses desde que completan el tratamiento hasta el momento de la vacunación, con el fin de que el sistema inmune se recupere. Hasta la fecha se han incluido un total de 20 pacientes, de los cuales 5 ya han completado la vacunación y el resto la está recibiendo actualmente. Es de destacar que en ninguno de los pacientes vacunados se apreció efecto adverso alguno atribuible a la vacunación. En cuanto a la respuesta inmune analizada, en 4/4 pacientes se ha detectado una respuesta inmune frente a KLH, mientras que en 2/4 la respuesta humoral ha sido Id-específica y en uno de estos dos pacientes también se ha detectado una respuesta celular específica frente a Id. Es destacable que los primeros pacientes reclutados, hace ahora dos años, permanecen en remisión clínica de su enfermedad.

En este punto, debemos destacar que nuestro centro va a ser pionero a nivel mundial al iniciar en breve un ensayo clínico multicéntrico que propone una estrategia de vacunación novedosa en MM, como es la vacunación anti-idiotipo de donante y paciente asociada al trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos con acondicionamiento no mieloablativo. Es decir, el empleo de dos estrategias complementarias: la vacunación del donante de manera previa a la donación de progenitores hematopoyéticos para el trasplante seguida de la vacunación del paciente trasplantado. Dicho ensayo ha sido ya autorizado por la Agencia Española del Medicamento y se prevé que en breve comenzará la inclusión de pacientes.

Por último, nuestro grupo ha iniciado también un protocolo de vacuna combinada encaminado a inducir una respuesta inmune celular y humoral idiotipo-específica que logre frenar el curso natural de la enfermedad en pacientes con MM que ya han recibido un trasplante alogénico de hermano compatible. Para ello, se realizan vacunaciones mensuales, bimestrales y trimestrales (Figura 4) que combinan la vacunación idiotípica con la vacunación con CD alogénicas, procedentes del hermano compatible, y pulsadas con la proteína idiotípica. Además de este objetivo principal, el proyecto incluye la detallada monitorización tanto de las respuestas inmunes inducidas como de la eventual eficacia clínica del procedimiento, valorada en términos de reducción de la masa tumoral, reducción del componente monoclonal y posiblemente conversión de respuestas parciales en completas. Hasta la fecha se dispone de los datos de 4 pacientes que iniciaron el calendario vacunal: tres de ellos, tras haber recibido tres vacunaciones mensuales, estabilizaron su enfermedad, aunque recayeron poco tiempo después, mientras que uno continúa sin evidencia de enfermedad. Estos datos nos reafirman en la necesidad de buscar estrategias dirigidas a eliminar la enfermedad mínima residual tras la realización de un trasplante alogénico, objetivo hacia el que nuestro grupo va a orientar su investigación en los próximos años y que posiblemente aportará conclusiones beneficiosas para el tratamiento y curación de estos pacientes.

Problemas abiertos

Producir vacunas para linfomas de una manera más sencilla, rápida y barata

Hasta hace relativamente poco tiempo la única manera de producir una vacuna idiotípica para linfomas pasaba por realizar una fusión celular, seleccionar los hibridomas productores de Ig paciente y tumor-específica, cultivarlos a gran escala y purificar la proteína a partir del sobrenadante de cultivo. Este proceso es particularmente laborioso y caro, además de necesitar varios meses para llegar a obtener el producto final. Las técnicas de biología molecular permiten obtener la proteína idiotípica de una manera mucho más rápida, sencilla y barata, aunque para la completa estandarización de este tipo de producción todavía queda por demostrar que este tipo de vacunación logre inducir las mismas respuestas clínicas y moleculares que ha demostrado ya la vacunación proteica clásica.

Producir vacunas más eficaces para el MM

El MM se considera una enfermedad incurable en la que ninguno de los tratamientos aplicados hasta la fecha ha logrado la curación definitiva de los pacientes. Además, se trata de una enfermedad que incide en personas de edad avanzada y que conlleva afectación de órganos vitales, lo que complica la aplicación de la vacunación idiotípica. Por todo ello, se comprende que sea necesario plantear nuevas estrategias terapéuticas que logren controlar esta enfermedad. En este sentido, como ya hemos comentado, nuestro centro iniciará en breve un ensayo clínico multicéntrico en MM que empleará dos estrategias complementarias: la vacunación del donante de manera previa a la donación de progenitores hematopoyéticos para el trasplante alogénico seguida de la vacunación del paciente trasplantado. Los resultados que se obtendrán, tanto positivos como negativos, sin duda se traducirán en conclusiones posiblemente beneficiosas para el tratamiento de los pacientes con MM.

Mejorar las técnicas de monitorización de la respuesta inmune inducida en los pacientes tras la vacunación

La monitorización de la respuesta humoral se basa en la detección mediante técnicas de ELISA de anticuerpos anti-Id y anti-KLH en el suero de los pacientes mientras que la respuesta celular se mide empleando numerosos, tal vez demasiados, tests radiactivos (liberación de ^{51}Cr e incorporación de timidina tritiada), además de otros como ELISPOTs o ELISAS complicados de realizar y de reproducir, posiblemente debido a que las células del LF poseen escasa capacidad para funcionar como buenas células presentadoras de antígeno. Así resulta necesario incorporar y estandarizar otras técnicas más reproducibles que ya se realizan con éxito en algunos laboratorios como son la citometría de flujo para determinar secreción de citoquinas y respuesta celular y el empleo de tests de citotoxicidad no radiactivos.

Predecir los pacientes que responderán a la vacunación y el momento idóneo de la misma

Es conocido que no todos los pacientes que reciben la vacuna anti-idiotipo desarrollan una respuesta inmune frente al mismo y el porqué aún sigue desconocido, aunque pudiera estar relacionado con el número de linfocitos, de sus subpoblaciones

y con el estado de los mismos al momento de la vacunación. De esta manera podría ser beneficiosa la realización de tests de funcionalidad linfocitaria de manera previa a recibir la vacunación. En este mismo sentido tampoco está demostrado cual es el momento idóneo en el que los pacientes deben vacunarse. Los protocolos empleados hasta la fecha aconsejan un tiempo de descanso que oscila entre tres y seis meses desde el momento en que se finaliza la quimioterapia hasta el momento de iniciar la vacunación, aunque nos es desconocido si quizá esto no es adecuado y se debiera bien adelantar o bien retrasar el inicio de la misma.

¿Es aconsejable administrar dosis de recuerdo?

En la actualidad no existe consenso sobre la administración de dosis de recuerdo tras completar el calendario vacunal establecido. Nuestro grupo, en aquellos pacientes en los que se ha logrado producir suficiente cantidad de proteína idiotípica (no siempre fácilmente conseguible) es partidario de una vez completada la tanda de vacunaciones "estandar" continuar administrando una vacuna cada tres meses a modo de dosis de recuerdo. De hecho, en el protocolo que estamos llevando a cabo en LF ya existen tres pacientes en los que se está aplicando esta idea y en los próximos años lograremos averiguar si dicha estrategia mejora la eficacia de la vacunación "clásica".

¿Es posible la producción de vacunas idiotípicas en todas las neoplasias B que expresan Ig en la membrana de las células tumorales?

Recientemente el grupo de Kwak^{1,5} ha publicado los resultados obtenidos tras abordar esta aproximación en linfomas del manto en primera remisión despues de haber recibido tratamiento con CHOP-rituximab, logrando en la mayoría de ellos la producción de la vacuna²⁶. Nuestro grupo ha intentado producir vacunas anti-idiotipo en diversas neoplasias B en situación de segunda remisión y en ninguno de los diagnósticos, salvo lógicamente el LF ha logrado producirlas, básicamente por la corta supervivencia de los hibridomas productores del idiotipo o por la escasa producción de la proteína por los mismos²⁷, una vez más esperamos con optimismo la estandarización de la producción de vacunas mediante medios moleculares que sin duda podrían solventar este problema.

Financiación

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de: Instituto de Salud Carlos III (RTIC Cáncer C03/10), Departamento de Educación y Cultura del Gobierno de Navarra (Proyectos de Investigación de Interés para Navarra), PIUNA y Ruzic Research Foundation (Beverly Shores, Indiana, EEUU). Mercedes Rodríguez-Calvillo posee un contrato del Instituto de Salud Carlos III y Maurizio Bendandi es un "Leukemia and Lymphoma Society Scholar in Clinical Research".

Bibliografía

1. Kwak LW, Campbell MJ, Czerwinski DK, Hart S, Miller RA, Levy R. Induction of immune responses in patients with B-cell lymphoma against the surface-immunoglobulin idiotype expressed by their tumors. *N Engl J Med* 1992;327:1209-15.

2. Hsu FJ, Caspar CB, Czerwinski D, et al. Tumor-specific idiotype vaccines in the treatment of patients with B-cell lymphoma - long-term results of a clinical trial. *Blood* 1997;89:3129-35.
3. Bendandi M, Gocke CD, Kobrin CB, et al. Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor against lymphoma. *Nat Med* 1999;5:1171-7.
4. Barrios Y, Cabrera R, Yáñez R, et al. Anti-idiotypic vaccination in the treatment of low-grade B-cell lymphoma. *Haematologica* 2002;87:400-7.
5. Kwak LW, Taub DD, Duffey PL, et al. Transfer of myeloma idiotype-specific immunity from an actively immunised marrow donor. *Lancet* 1995;345:1016-20.
6. Österborg A, Yi Q, Henriksson L, et al. *Blood* 1998;91:2459-66.
7. Massaia M, Borrione P, Battaglio S, et al. Idiotype vaccination in human myeloma: generation of tumor-specific immune responses after high-dose chemotherapy. *Blood* 1999;94:673-83.
8. Cabrera R, Diaz-Espada F, Barrios Y, et al. Infusion of lymphocytes obtained from a donor immunised with the paraprotein idiotype as a treatment in a relapsed myeloma. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:1105-8.
9. Rasmussen T, Hansson L, Österborg A, Johnsen HE, Mellstedt H. Idiotype vaccination in multiple myeloma induced a reduction in circulating clonal tumor B cells. *Blood* 2003;101:4607-10.
10. Inaba K, Inaba N, Romani H, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992;176:1693-702.
11. 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 Exp Med* 1994; 179:1109-18.
12. Melero I, Duarte M, Ruiz J, et al. Intratumoral injection of bone-marrow derived dendritic cells engineered to produce interleukin-12 induces complete regression of established murine transplantable colon adenocarcinomas. *Gene Ther* 1999;6:1779-84.
13. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996;2:52-8.
14. Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis TA, et al. Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood* 2002;99:1517-26.
15. Reichardt VL, Okada CY, Liso A, et al. Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma - a feasibility study. *Blood* 1999;93:2411-9.
16. Lim SH, Bailey-Wood R. Idiotypic protein-pulsed dendritic cell vaccination in multiple myeloma. *Int J Cancer* 1999;83:215-22.
17. Liso A, Stockerl-Goldstein KE, Auffermann-Gretzinger S, et al. Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation for multiple myeloma. *Biol Blood Bone Marrow Transplant* 2000;6:621-7.
18. Yi Q, Desikan R, Barlogie B, Munshi N. Optimizing dendritic cell-based immunotherapy in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2002;117:297-305.
19. Timmerman JM, Hsu FJ, Davis TA, et al. Regressions of follicular lymphoma following vaccination with idiotype protein coupled to keyhole limpet hemocyanin (Id-KLH) and idiotype-pulsed dendritic cells. *Blood* 2000;96:2185a.
20. Timmerman JM, Czerwinski DK, Taid B, et al. A phase I/II trial to evaluate the immunogenicity of recombinant idiotype protein vaccines for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma (NHL). *Blood* 2000;96:578a.
21. Syrengelas AD, Chen TT, Levy R. DNA immunization induces protective immunity against B-cell lymphoma. *Nat Med* 1996; 2:1038-41.

22. King CA, Spelleberg MB, Zhu D, *et al.* DNA vaccines with single-chain Fv fused to fragment C of tetanus toxin induce protective immunity against lymphoma and myeloma. *Nat Med* 1998;4: 1281-6.
23. Biragyn A, Tani K, Grimm MC, Weeks S, Kwak LW. Genetic fusion of chemokines to a self tumor antigen induces protective T-cell dependent antitumor immunity. *Nat Biotechnol* 1999;17:253-8.
24. Timmerman JM, Singh G, Hermanson G, *et al.* Immunogenicity of a plasmid DNA vaccine encoding chimeric idiotype in patients with B-cell lymphoma. *Cancer Res* 2002;62:5845-52.
25. Zhu D, Rice J, Savalyeva N, Stevenson FK. DNA fusion vaccines against B-cell tumors. *Trend Mol Med* 2001;62:5845-52.
26. Neelapu SS, Wilson WH, Baskar S, *et al.* Induction of T-cell responses by tumor antigen vaccination in mantle cell lymphoma following rituximab-based treatment. *J Clin Oncol* 2003;22: 663a.
27. Inogés S, Rodríguez Calvillo M, López Díaz de Cerio A, *et al.* Idiotype vaccine feasibility in relapsed B-cell malignancies. *Haematologica* 2003;88:1439-1441.



Clínica Universitaria
Universidad de Navarra