

## Vacuna idiotípica en el tratamiento del linfoma folicular: situación actual y perspectivas futuras

### *Idiotype vaccines in the treatment of follicular lymphoma: current status and future perspectives*

N. Zabalegui, A. López Díaz de Cerio, S. Inogés, E. Soría, H. Villanueva, P. Rivero, M. Bendandi

#### RESUMEN

El linfoma folicular (LF) está considerado como el segundo tipo de linfoma no-Hodgkin más común, representando más del 20% del total de los linfomas. Es una enfermedad de progresión lenta y curso indolente en la que, a pesar de la buena respuesta al tratamiento, las recaídas son muy frecuentes y cada vez es más difícil conseguir respuestas completas. Por ello, se puede considerar que hasta el momento, el LF es incurable. La búsqueda continua de nuevas estrategias terapéuticas en enfermedades neoplásicas, junto con un mejor conocimiento del sistema inmunitario, ha llevado a la aparición de una nueva disciplina, conocida con el nombre de inmunoterapia, que aprovecha la capacidad del sistema inmunitario de atacar lo extraño sin dañar lo propio. El LF es un tumor muy apropiado para este tipo de tratamiento por presentar un antígeno específico de tumor: el idiotipo de la inmunoglobulina monoclonal expresada en la membrana de todas las células tumorales. Se han realizado diversos estudios en los que se ha probado la inmunoterapia como tratamiento complementario al tratamiento convencional. Recientemente, nuestro grupo ha publicado un estudio en el que se observa claramente que los resultados que se obtienen tras la vacunación idiotípica, cuando se consigue la inmunización adecuada del paciente, son mejores que los obtenidos con quimioterapia sola. En este sentido, es necesario seguir investigando para aclarar si la vacunación idiotípica pudiera no sólo mantener remisiones completas duraderas en los pacientes vacunados, sino incluso conseguir la curación de los mismos. Por ello, resulta interesante abordar un mejor planteamiento de los ensayos clínicos, la mejora de la producción de la vacuna y el estudio de mecanismos de la célula tumoral capaces de modificar la inmunoglobulina específica del tumor.

**Palabras clave.** Linfoma folicular. Inmunoterapia. Vacuna idiotípica. Glicosilación. *Splicing* alternativo.

*An. Sist. Sanit. Navar.* 2009; 32 (1): 61-73

Laboratorio de Inmunoterapia. Centro de Investigación Médica Aplicada. Universidad de Navarra

Recepción el 2 de octubre de 2008  
Aceptación provisional el 11 de noviembre de 2008  
Aceptación definitiva el 12 de diciembre de 2008

#### ABSTRACT

Follicular lymphoma is the second most prevalent non-Hodgkin lymphoma, representing 20% of all lymphomas. Follicular lymphoma is an indolent disease with a slow progression in which, although exhibiting a good response to treatment, relapse is very frequent and complete remission is not easy to maintain. Therefore, the disease is regarded as incurable. The search for new therapeutic strategies, together with a better understanding of the immune system, has led to the emergence of a new treatment named immunotherapy. Follicular lymphoma is a malignancy suitable for this kind of treatment given the fact that it is characterized by presenting a unique tumour-specific antigen: the idiotype of the monoclonal immunoglobulin displayed on the membrane of tumour cells. Several studies have been conducted to test immunotherapy as complementary to conventional treatment. In a previous study by our group, a clear benefit was evident is obtained after idiotype vaccination, when an adequate immunization of the patient is obtained, in comparison to chemotherapy alone. In this sense, analysis is needed of whether idiotype vaccination can produce not only long-lasting and complete remission, but even cure. It would be of great interest to consider an optimisation of the experimental design of clinical trials, an improvement of vaccine production, and the study of the molecular mechanisms of the tumour cell which modify the target immunoglobulin.

**Key words.** Follicular lymphoma. Immunotherapy. Idiotype vaccine. Glycosylation. Alternative splicing.

#### Correspondencia:

Maurizio Bendandi  
Laboratorio de Inmunoterapia  
CIMA. Universidad de Navarra  
Avda. Pío XII, 55  
31008 Pamplona  
Tfno. 948194700 Ext. 1004  
Fax: 948194714  
Correo electrónico: mbendandi@unav.es

## INTRODUCCIÓN

Los linfomas son un grupo muy heterogéneo de neoplasias hematológicas con afectación de tejido linfático. En función del tipo de célula afectada, se pueden clasificar en linfomas tipo T (linfocito T) y tipo B (linfocito B). El tipo B es el más frecuente en los países occidentales, distinguiéndose dos grandes grupos: la enfermedad de Hodgkin (LH) y los linfomas no-Hodgkin (LNH).

El linfoma folicular (LF) es un tipo de linfoma no-Hodgkin derivado de linfocitos B (LB) maduros presentes en la zona centrofolicular del ganglio linfático. Las células que constituyen este centro folicular y que, por lo tanto, pueden estar afectadas, son centrocitos y centroblastos. El grado de infiltración de cada una de estas células se utiliza para definir el grado histológico de la enfermedad.

### Características clínicas

El LF está considerado como el segundo tipo de linfoma no-Hodgkin más común, representando más del 20% del total de los linfomas. Tiene una mayor incidencia en pacientes de edad media avanzada (60 años). Es una enfermedad de progresión lenta y curso indolente, por lo que se suele diagnosticar ya en estadios avanzados, siendo común la afectación de áreas extralinfáticas<sup>1</sup>. Esta enfermedad suele responder bien a los tratamientos convencionales de quimioterapia, consiguiéndose en la mayoría de los casos respuestas clínicas completas (RC). Sin embargo, es un tumor en el que, a pesar de la buena respuesta al tratamiento, las recaídas son muy frecuentes y cada vez es más difícil conseguir respuestas completas por lo que se puede considerar que hasta el momento, el LF es incurable<sup>2</sup>.

### Características morfológicas/ fenotípicas

El LF se caracteriza por un patrón de infiltración nodular del centro germinal (CG). El CG es la estructura que se forma en los órganos linfoides secundarios como consecuencia de una expansión clonal de un LB activado por un antígeno (Ag). Las células

B del CG (centroblastos y centrocitos), además de estar sometidas a una alta tasa de replicación, están sujetas a cambios de clase (isotipo) y a hipermutación somática en cuanto a su inmunoglobulina (Ig). Las células de LF tienen el fenotipo característico de una célula del CG, con una prevalencia variable de centrocitos o centroblastos dependiendo de tumor.

Una característica fenotípica del tumor es la sobre-expresión del oncogén Bcl-2, proteína que bloquea la entrada en apoptosis de la célula. La sobre-expresión de este gen viene dada por la translocación t(14:18) (q32;q21), que implica un reordenamiento entre los genes de los segmentos J<sub>H</sub> de la cadena pesada de la Ig (cromosoma 14) y el gen Bcl-2 (cromosoma 18)<sup>3,4</sup>. Como consecuencia de este reordenamiento, el oncogén queda sometido al control del potente promotor del *locus* de la Ig, causando la sobre-expresión constitutiva del Bcl-2. Por un lado, se cree que esta translocación tiene lugar durante el proceso del reordenamiento de los segmentos VDJ en las primeras fases de la ontogenia de la célula B<sup>5-7</sup>; por otro lado, trabajos recientes parecen apoyar la teoría de que esta translocación ocurre durante el proceso de hipermutación somática. En este proceso, se producen rupturas de la doble hélice de ADN a nivel de las regiones variables (V) de la Ig y, como consecuencia de estos cortes, la maquinaria de reparación de la célula puede unir por error dos segmentos de ADN equivocados<sup>8,9</sup>. Además, se ha descrito la posibilidad de que se produzca hipermutación somática en protoncogenes, con las consecuentes rupturas en el ADN, haciendo posible el reordenamiento Ig-oncogen<sup>10</sup>. Teniendo en cuenta que los linfocitos T no sufren hipermutación somática, esta teoría explicaría la razón por la que son menos frecuentes los linfomas T que los B, al menos en los países desarrollados. Hay evidencias que indican que es necesaria, pero no suficiente, la sobre-expresión de Bcl-2 para que se inicie el desarrollo del linfoma. El modelo animal transgénico con sobre-expresión de Bcl-2 presenta una hiperplasia monoclonal no maligna de células B de larga vida<sup>11</sup>.

En los pacientes con LF el tumor puede remitir completamente tras los tratamientos estándar, sin embargo la recaída es

frecuente. Esta recaída es debida a células cancerosas residuales que persisten en los pacientes y que no pueden ser detectadas por los métodos convencionales. Por ello, se está realizando un gran esfuerzo con el fin de desarrollar técnicas lo suficientemente sensibles como para detectar la presencia de estas células que dan lugar a la denominada enfermedad mínima residual (EMR)<sup>12</sup>. La presencia de la translocación t (14;18) no posee valor pronóstico por sí misma pero hay estudios que han demostrado que la localización del reordenamiento bcl-2-JH puede correlacionarse con el desarrollo de la enfermedad<sup>13,14</sup>. Estos reordenamientos pueden ser analizados mediante técnicas de biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para el diagnóstico de la EMR. Esta técnica es sumamente sensible y tiene la capacidad de detectar una célula tumoral entre un millón de células normales. Por lo tanto, la detección de EMR mediante métodos de PCR parece no sólo ser eficaz para proporcionar información sobre la evolución clínica del paciente sino también una herramienta útil para monitorizar la respuesta del paciente a la terapia aplicada. Si estas técnicas son capaces de identificar aquellos pacientes con riesgo de recaída, el objetivo de la terapia aplicada podría ser una "remisión molecular completa" de la enfermedad y el fin del tratamiento podría ser determinado por PCR. Además, si la detección de EMR se establece como marcador de recaída estos ensayos podrían ser utilizados para evaluar rápidamente el tratamiento más adecuado para el control del cáncer. Sin embargo, hay que tener en cuenta que existen pacientes que pueden presentar EMR detectable por PCR y no sufrir episodios de recaída. Por lo tanto, es importante desarrollar métodos que puedan determinar cuantitativamente los niveles de EMR más que, simplemente, su presencia o ausencia, para establecer rangos asociados a enfermedad. Para ello se está utilizando la técnica de PCR a tiempo real que es capaz de cuantificar con exactitud el número de copias de un marcador tumoral determinado a partir de una muestra sanguínea del paciente<sup>15</sup>.

Entre otros marcadores que definen el fenotipo del LF, hay que tener en cuenta la metaloendopeptidasa de membrana, ca-

racterística de las células de CG y conocida también como CD10 ó antígeno CALLA. Además, se expresan otras moléculas características de LB maduros, como CD20, CD22, e Ig de membrana (específica del clon) con alta intensidad.

### Tratamiento convencional

El tratamiento estándar para pacientes en estadio relativamente localizado (estadio I/II) puede ser la radioterapia; en estos casos se consigue una ratio de supervivencia global a los 10 años de 64-80%<sup>16</sup>. En estadios avanzados, es preferible utilizar distintas pautas de quimioterapia. Los tratamientos quimioterápicos más estandarizados son: la combinación de ciclofosfamida, vincristina y prednisona (CVP), y la misma combinación con doxorubicina (CHOP) o con mitoxantrone en lugar de doxorubicina (CNOP). Otra alternativa válida son los regímenes que contienen fludarabina. Generalmente, los linfomas indolentes son bastante sensibles a la quimioterapia, consiguiéndose RC en un 37-81%<sup>17-19</sup>. Sin embargo, la recaída es prácticamente inevitable y el periodo de tiempo esperado libre de enfermedad hasta la recaída va de 15 meses a 3,6 años<sup>20</sup>, con progresiva disminución en el tiempo de respuesta según aumenta el número de recidivas. En pacientes con recaídas prematuras, el trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos es, en muchos casos, el tratamiento de elección<sup>21</sup>.

El uso de anticuerpos (Acs) monoclonales dirigidos contra moléculas de membrana de las células tumorales (Rituximab, anti-CD20; Epratuzumab, anti-CD22; Alemtuzumab, anti-CD52; Galiximab, anti-CD80), y el uso combinado de la radioinmunoterapia con Acs, se han incorporado en la mayoría de los tratamientos del LF<sup>19,22-24</sup>. En efecto, hoy en día la combinación de Rituximab y poli-quimioterapia es el tratamiento estándar para los nuevos casos de LF que necesiten terapia<sup>1</sup>.

### Inmunoterapia

La búsqueda continua de nuevas estrategias terapéuticas en enfermedades neoplásicas, junto con un mejor conocimiento del sistema inmunitario y de su im-

plicación en el control de ciertos tumores ha llevado a la aparición de una nueva disciplina, conocida con el nombre de inmunoterapia. Se puede distinguir entre inmunoterapia pasiva, adoptiva y activa<sup>25</sup>.

La inmunoterapia pasiva consiste en la transferencia de efectores del sistema inmunológico. Hay dos tipos de inmunoterapia pasiva, según se transfieran Acs o células del sistema inmunológico activadas. La inmunoterapia pasiva con Acs monoclonales dirigidos contra Ags presentes en la célula tumoral es la variante más aceptada y empleada en muchos tratamientos oncológicos. De hecho, el Ac monoclonal rituximab (utilizando como diana la molécula de membrana CD20 de LB) es hoy en día un tratamiento de elección en pacientes con LF. Con el fin de potenciar este tipo de tratamiento, se han propuesto muchas variantes con Acs modificados (conjugándolos con moléculas tóxicas, radioisótopos y fármacos). El otro tipo de inmunoterapia pasiva es aquella en la que se transfieren células activadas (células TIL, células LAK, etc.) y también recibe el nombre de inmunoterapia adoptiva.

La inmunoterapia activa, sin embargo, pretende que sea el sistema inmune del paciente el que cree la respuesta inmune in vivo. A su vez la inmunoterapia activa puede ser específica (si va dirigida contra un antígeno concreto) o inespecífica si activa el sistema inmune de forma general (por ejemplo el uso de citoquinas).

En el tratamiento de las enfermedades neoplásicas, la inmunoterapia activa específica busca la activación del sistema inmunológico del paciente contra un Ag específico del tumor. En principio, el fundamento no difiere mucho de una vacuna convencional. En ambos casos, se busca activar el sistema inmunológico frente a un Ag presente en la célula diana que se quiere eliminar. El principal problema de la inmunoterapia activa contra el cáncer es la ausencia de Ags con gran potencial inmunogénico. La célula tumoral tiene un origen propio y el sistema inmunológico lo identificará como tal. Esto, unido al hecho de que el tumor desarrolla mecanismos para escapar de la acción del sistema inmune, hace que sea muy difícil que se consiga una respuesta inmunológica eficaz contra el tumor de forma natural. Los avances en la identificación de los Ags

expresados en las células tumorales, proyecto denominado *cancer immunome*, han hecho posible el desarrollo de inmunoterapias dirigidas específicamente contra dichos Ags<sup>26</sup>. En este sentido, es importante distinguir entre Ags asociados a tumores (AATs), que se localizan en células tumorales y también en algunas células normales, y Ags específicos de tumor (AETs), que están sólo en las células tumorales. Estos AETs son obviamente la diana de elección para las estrategias de inmunoterapia diseñadas para destruir las células tumorales sin dañar células normales.

Actualmente, podemos decir que la Ig sintetizada y expresada en células B tumorales es uno de los mejores AETs descritos. En el caso del LF, la célula maligna, como cualquier otra célula B del sistema inmunológico, ha sufrido reordenamientos a nivel de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras generándose un nuevo idiotipo (Id). Los determinantes antigénicos generados como consecuencia de estos reordenamientos hacen que cada Ig sea única y específica de cada clon B. Por lo tanto, el Id se puede considerar un Ag específico de tumor idóneo como diana para la inmunoterapia activa<sup>27</sup>.

## VACUNACIÓN IDIOTÍPICA

El LF es un tumor muy apropiado para este tipo de tratamiento por presentar un AET (Ig monoclonal) en la membrana de todas las células tumorales<sup>28</sup>. Este AET representa, a la vez, un antígeno que ha fallado en la estimulación del sistema inmunitario del paciente para activarlo contra el clon tumoral que lo lleva. Si se consigue aislar este Id y transformarlo en un inmunógeno potente, puede ser empleado para inducir una respuesta inmune específica que sea capaz de eliminar las células tumorales. Por tanto, la estrategia de inmunoterapia activa con vacunas idiotípicas tiene dos pasos: purificar el idiotipo tumoral y después transformarlo en un inmunógeno potente<sup>25</sup>.

Desde que comenzó la investigación sobre vacunas idiotípicas, el LF se ha mostrado como una patología idónea para estas estrategias de inmunoterapia activa. En el LF la Ig que contiene el Id debe ser aislada desde el clon tumoral.

Los primeros esfuerzos para explotar en una situación preclínica el Id tumor-específico como antígeno diana fueron llevados a cabo en 1975 en mieloma múltiple<sup>29</sup> y en 1982 en LF<sup>30</sup>. En 1992, Kwak y col fueron los primeros en demostrar que la vacuna idiotípica era capaz de inducir una respuesta inmune específica frente al Id en siete de nueve pacientes con LF en situación de RC, o con evidencia de enfermedad persistente después de quimioterapia<sup>31</sup>. En este trabajo, la eficacia de la vacuna idiotípica fue demostrada sólo en términos de respuesta humoral. En cualquier caso, proporcionó la primera prueba formal de que los pacientes podían ser inmunizados contra un antígeno derivado de su propio tumor. Unos años más tarde, el mismo grupo 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<sup>32</sup>. Los resultados sugirieron 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. Con el fin de determinar cuál era la mejor formulación del adyuvante a emplear, este grupo estableció tres grupos de pacientes: los 9 primeros, procedentes del estudio piloto previo, recibieron adyuvante incompleto (SAF-1 compuesto por plurónico L-121, squalano y tween 80 en PBS), otros 9 recibieron un adyuvante completo (SAF-1 y treonil-muramyl-dipéptido), y por último, los 23 pacientes restantes recibieron adyuvante completo a la máxima dosis tolerada. Finalmente, dado que no se demostraron diferencias en cuanto a respuesta inmune entre el grupo de adyuvante incompleto y el de adyuvante completo, los resultados fueron analizados de manera conjunta. Como se esperaba, en los 41 pacientes vacunados se indujo una respuesta inmune específica frente a KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*). Cabe destacar que 20 de ellos también mostraron una respuesta inmune humoral o celular en términos de proliferación específica frente al Id. Desde un punto de vista clínico, en la mayoría de los pacientes que habían sido inmunizados en RC y que desarrollaron una respuesta inmune tumor-específica, se obtuvieron largas supervivencias libres

de enfermedad. No fue así en la mayoría de los que fallaron en el desarrollo de una respuesta específica contra el idiotipo, aunque también hubieran sido vacunados en RC. Además, 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. En los pacientes vacunados en primera RC, la comparación de los resultados de los mismos que responden inmunológicamente con los que no responden demuestra diferencias estadísticamente significativas entre ambos en términos de supervivencia global y tiempo libre de progresión. En los pacientes vacunados con enfermedad evidente, también se demostraron diferencias significativas en cuanto al tiempo libre de progresión. Globalmente estos resultados sugieren que las estrategias de inmunoterapia basadas en la vacunación idiotípica para el LF pueden resultar más beneficiosas para los pacientes que la reciben en RC. Sin embargo, al no haberse podido descartar que los pacientes que no respondían a la vacuna fueran también los que presentaban mayor carga de enfermedad activa o residual, estos datos no sirvieron como prueba de eficacia clínica.

Aún más llamativos fueron los resultados de un estudio publicado por Bendandi y col en 25 pacientes afectos de LF y vacunados con idiotipo conjugado con KLH y GM-CSF (*granulocyte-monocyte colony-stimulating factor*) en primera RC<sup>13</sup>. Es notable que con un seguimiento de aproximadamente 3-6 años, 19 de 22 pacientes inmunizados mantenían su primera RC. Las respuestas inmune celular y humoral inducidas por la vacuna fueron documentadas *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 es la demostración formal, en 9 de 12 pacientes evaluables, de remisiones moleculares duraderas inducidas por la vacuna, determinadas por la monitorización de la t (14;18) y el reordenamiento bcl-2 mediante PCR. Lo que se traduce en que células tumorales que habían resistido a la quimioterapia fueron finalmente destruidas por el sistema inmune activado tras la vacunación idiotípica.

En nuestro país, el grupo de la Clínica Puerta de Hierro publicó hace unos años los resultados de 9 pacientes afectados de LF tratados con la vacuna idiotípica. 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 nuevamente en 3/5 llegaron a desaparecer las células portadoras del gen bcl-2 reordenado, determinado por PCR<sup>33</sup>.

El grupo de Levy en Stanford publicó un análisis retrospectivo de 136 pacientes vacunados, en los que se demuestra que aquellos pacientes en los que se inducen respuestas humorales Id-específicas presentan supervivencias libres de recaída más largas que aquellos que no responden inmunológicamente; sin embargo, también han observado supervivencia prolongada entre los que no responden inmunológicamente<sup>34</sup>, por lo que parecen necesarios más estudios para poder extraer conclusiones definitivas.

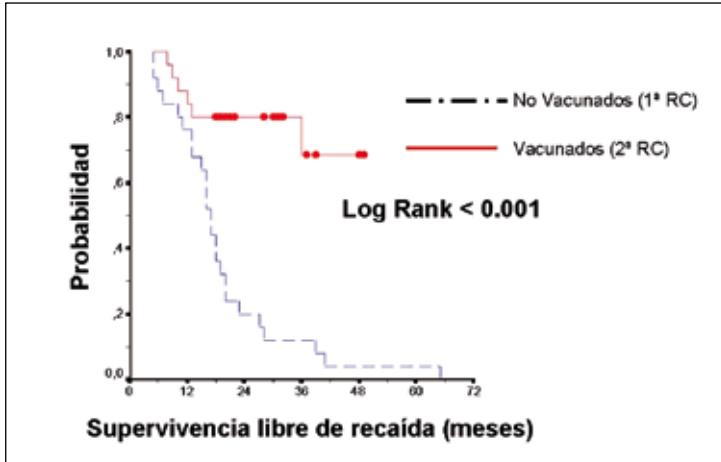
Actualmente, nuestro grupo es pionero en Europa en la aplicación de la vacunación idiotípica a pacientes con neoplasias hematológicas de estirpe B. En este sentido, se inició hace aproximadamente siete años un protocolo asistencial de vacunación idiotípica en pacientes con LF en primera recaída. El diseño del estudio estaba encaminado a intentar demostrar si la vacunación idiotípica cambiaba de alguna manera la historia natural del LF, y estaba basado en dos hechos ya conocidos:

1. La segunda respuesta completa tras quimioterapia tipo CHOP tiene una duración media de 13 meses<sup>35</sup>.
2. La segunda respuesta completa tras la quimioterapia tipo CHOP suele ser más breve que la primera respuesta completa. Así, con un calendario vacunal lo suficientemente prolongado (10 vacunas a lo largo de aproximadamente 24-30 meses), si la vacuna

no funciona, al menos un 50% de los pacientes deberían recaer a pesar de responder inmunológicamente, y se comprobaría si la vacuna es capaz o no de proporcionar beneficio clínico.

Los primeros resultados de este estudio se publicaron en 2006<sup>36</sup>. Se analizaron 25 pacientes procedentes de centros hospitalarios de toda España, y al observar los resultados clínicos y de respuesta inmune de los pacientes vacunados, se pudo afirmar que dicha metodología consigue beneficio clínico en una enfermedad de evolución lenta pero que, con los tratamientos habituales de quimioterapia, sigue siendo incurable. Es decir, la vacunación idiotípica de estos pacientes consiguió cambiar la historia natural del LF en aquellos pacientes que respondieron a la misma. En concreto, 25 pacientes incluidos ya finalizaron el calendario vacunal establecido, habiendo podido demostrar que todos aquellos pacientes que responden inmunológicamente a la vacuna (20/25) tienen una segunda remisión completa de duración superior a la esperable con quimioterapia sola. Además, en aquellos pacientes con suficiente seguimiento, la duración de esta segunda remisión completa supera ya a la de la primera remisión. En nuestra serie, únicamente cinco pacientes no desarrollaron respuesta inmune alguna frente a la vacuna, comportándose en su evolución clínica como un linfoma folicular "clásico" al que no se hubiera vacunado, ya que recayeron durante la vacunación, y la duración de esta segunda remisión fue, como se espera en un LF, inferior a la de su primera remisión. Se trata de la primera demostración a nivel mundial de beneficio clínico asociado al uso de una vacuna contra el cáncer en humanos<sup>36</sup>.

En la figura 1 se detalla la curva de supervivencia libre de recaída de todos los pacientes vacunados, comparándola con la curva que siguieron en su primera remisión completa. Se observa claramente que los resultados que se obtienen tras la vacunación idiotípica, cuando se consigue la efectiva inmunización del paciente, son mejores que los obtenidos con quimioterapia sola. Estos resultados animan a continuar por este camino, intentando llegar a la posible curación de una proporción importante de pacientes con LF.



**Figura 1.** Supervivencia libre de recaída de una serie de pacientes vacunados, comparándola con la curva que siguieron en su primera remisión completa.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Es necesario seguir investigando para aclarar si la vacunación idiotípica pudiera conseguir no solo remisiones completas duraderas de los pacientes vacunados, sino la curación de los mismos. En este sentido, nuestro grupo ha diseñado un nuevo ensayo clínico que permita analizar la supervivencia libre de recaída de pacientes con LF de peor pronóstico en primera recaída, que han recibido un esquema de tratamiento encaminado a lograr la mejor remisión posible (R-ICE+Zavalín+Transplante autólogo de progenitores hematopoyéticos), y que a continuación reciben de forma duradera múltiples vacunas idiotípicas para intentar mantener la remisión inducida, hasta llegar incluso a una posible curación.

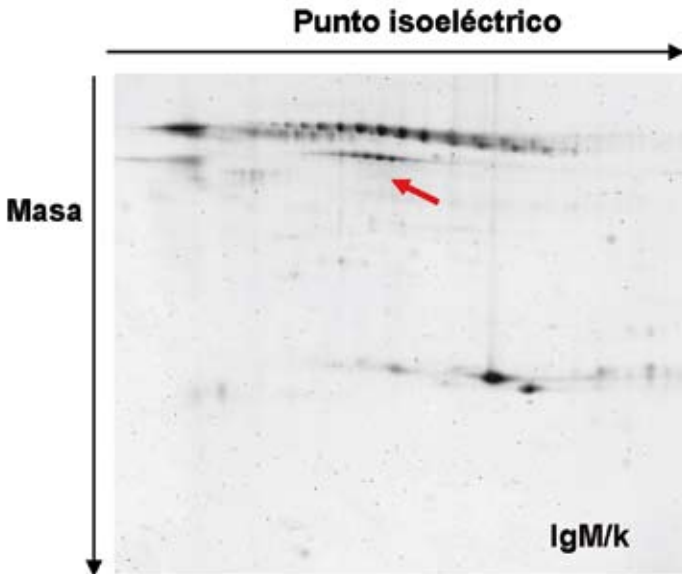
La producción de la proteína soluble para la vacuna idiotípica se ha basado durante mucho tiempo en técnicas de fusión celular y generación de hibridomas, que permite la generación *in vitro* de la inmunoglobulina que contiene el Id tumor específico. El Id purificado se transforma en algo más inmunogénico que lo que típicamente está en su forma natural, conjugándolo con KLH, un transportador altamente inmunogénico. La asociación de un adyuvante inmunológico con la vacuna idiotípica (Id-KLH) en forma de proteína soluble también ha mostrado ser potencialmente decisivo. Hasta la fecha, el factor estimulante de co-

lonias 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 células dendríticas al lugar de la inyección de la vacuna. También se están probando nuevos adyuvantes que podrían mejorar dicha formulación. No obstante, el intento de producción de vacunas idiotípicas mediante la técnica de fusión celular es difícil en otras neoplasias de estirpe B<sup>37</sup>. Por lo tanto, es necesario buscar nuevas estrategias de producción con la finalidad de que otras patologías puedan beneficiarse del tratamiento con la vacuna idiotípica. Una alternativa es la producción de Acs mediante técnicas de ingeniería genética. Así, con ayuda de las técnicas de ADN recombinante, podemos aislar un fragmento de ADN del genoma completo y mantenerlo en un sistema artificial (vector) con unas características concretas. Este vector se introduciría en una célula huésped, que presente la maquinaria enzimática necesaria para sintetizar correctamente la proteína recombinante con las modificaciones postraduccionales apropiadas. De este modo podríamos intentar conseguir la producción de idiotipos para aplicar la vacuna idiotípica en otras patologías en las que la técnica de fusión celular no logra tener éxito.

Por otra parte, es importante continuar profundizando en el conocimiento básico

de la proteína que se purifica para la vacunación. Ante una imagen de un gel bidimensional (Fig. 2) de la Ig producida mediante la técnica de hibridomas observamos muchos *spots* además de los dos esperados correspondientes a la cadena pesada y a la cadena ligera de la Ig. Los *spots* de igual masa y distinto punto isoeléctrico son justificados por las modificaciones postraduccionales debidas a la glicosilación de la proteína y los *spots* con pérdida de masa corresponden a la cadena pesada de la Ig que ha sufrido *spli-*

*cing* alternativo perdiendo diferentes dominios de su estructura (confirmado mediante análisis de proteómica (MALDI-TOF) de los *spots* diferenciales identificados en los geles bidimensionales y secuenciación del ARNm de los hibridomas productores de dichas proteínas). Por todo esto, consideramos de gran interés profundizar en el estudio sobre las modificaciones postraduccionales que sufre la inmunoglobulina como el *splicing* anómalo que pueda generar proteínas con ausencia de fragmentos estructurales.



**Figura 2.** Análisis proteómico de un gel bidimensional de la Ig purificada para la vacunación idiopática mediante la técnica de hibridomas. Con la flecha se señalan *spots* de menor peso molecular que corresponden a cadenas pesadas de la Ig que han perdido un dominio de la región constante tras sufrir *splicing* alternativo.

### Modificaciones post-traduccionales

Los Acs son glucoproteínas, sintetizadas por los LB, que tienen la propiedad de unirse de forma específica a otras moléculas que reciben el nombre Ags. Estos dominios muestran una amplia heterogeneidad, debida a la diversidad de las regiones V. Estas regiones forman el sitio de unión al Ag y determinan la especificidad antigénica de cada una de las Igs.

El repertorio de moléculas de Ac que puede presentar un individuo es del orden

de  $10^9$ - $10^{11}$ , todas ellas distintas y generadas como consecuencia de los reordenamientos de los segmentos génicos VDJ de la cadena pesada y VJ de la cadena ligera, y potenciado por el proceso de hipermutación somática que tiene lugar ya en LB activados. Los tramos de las regiones V que muestran una mayor diversidad (hipervariables) se denominan regiones determinantes de complementariedad (CDR 1, 2 y 3). Estas regiones se encuentran delimitadas por zonas más conservadas, regiones *framework* (FW 1, 2, 3 y 4), que favorecen el plegamiento correc-



to del dominio V. Debido a la gran variabilidad de las regiones CDR2 como CDR3, la secuencia de la inmunoglobulina tumoral es específica de tumor. Esta secuencia puede ser utilizada como "huella molecular" de las células tumorales de un paciente.

En una Ig intacta, las tres regiones más variables de la cadena ligera y de la cadena pesada se pliegan conjuntamente para dar lugar a la superficie de unión al Ag. Cada una de estas CDR forma un lazo, que sobresale por encima del dominio de Ig para favorecer la interacción con el Ag. Las regiones CDR son las zonas que participan más directamente en esta interacción, sin embargo, existen datos que sugieren que las regiones de los FWs contiguas a los CDRs también participan en la unión al Ag<sup>38,39</sup>.

Hay muchos factores que determinan la estructura terciaria de los idiotopos. En primer lugar, y como es obvio, una variación en la secuencia de aminoácidos (aa) de los CDRs puede repercutir profundamente en la afinidad y especificidad del Ac. El CDR3 de la región variable de la cadena pesada varía mucho en el tamaño y en la composición de su secuencia, siendo el elemento principal de identificación de un Ac. Los aa colindantes a los CDRs, como se ha comentado anteriormente, repercuten de forma direc-

ta e indirecta en la estructura de la región implicada en la unión al antígeno. También se ha descrito la influencia de modificaciones postraduccionales en la estructura de los lazos que conforman los CDR: se ha observado que glicosilaciones a nivel del V cambian la orientación del lazo, alterando drásticamente la afinidad del Ac<sup>40,41</sup>. Debido a las hipermutaciones somáticas sufridas en las células de LF se generan motivos susceptibles de ser glicosilados<sup>42</sup>. Estos motivos de N-glicosilación corresponden a los aminoácidos Asn-X-Ser/Thr, siendo X cualquier aminoácido excepto Pro, Asp o Glu. Pocas veces encontramos estos motivos generados de forma natural en la secuencia germinal. Tras la hipermutación somática sufrida por las células B es habitual observar en la secuencia de la inmunoglobulina sitios de potencial N-glicosilación principalmente localizados en los primeros aminoácidos de las regiones CDR2 y CDR3. Esto es una característica observada en los tumores de LF (Tabla 1)<sup>43</sup>. Nuestro grupo, en colaboración con el grupo de Stevenson en UK, ha realizado estudios en los que se valora la posibilidad de que la glicosilación de la inmunoglobulina pueda afectar, positiva o negativamente, a la inmunogenicidad de la inmunoglobulina<sup>44</sup>.

**Tabla 1.** Secuencias correspondientes a parte de las regiones variables de 24 pacientes de LF. Las secuencias han sido ordenadas por isotipos. Tras limitar los aminoácidos correspondientes a las regiones CDR2 y CDR3 se observan (en recuadros) los sitios de N-glicosilación generados por hipermutación somática. Estos motivos están localizados, generalmente, en el inicio de las dos regiones hipervariables.

UPN	Isotipo	FR2	CDR2	FR3	CDR3
		4	5 6	7 8 9	
		67890123456789	C12abc3456789012345	67890123456789012abc345678901234	
LF1	IgM	WVRQAPGKLEWIS	<b>NVS</b> ---STGRITVYFSLKS	RVYIYDTSRNHVELLITVTAADTAIYCAR	QINTGFDY
LF3	IgM	WVRQPPGKLEWIS	<b>NIS</b> ---SSNFIYQESLKG	RVYISV <b>NTF</b> NQFSLINSVITCAITAVYCAR	SSHRQVLLRHNFDL
LF5	IgM	FVLQAPGKLEWIS	<b>NIS</b> ---SSITNTYFVSKG	RFFVSRDNFQNTLQMQSLRVEDTAIYCAR	DLGDGHETDF
LF6	IgM	WVRQPPGKLEWIS	<b>NIS</b> ---SSGPTNY <b>NAS</b> LKG	RVYIISLQMSKQIISLQSLSVTAEDTAIYCAR	LQASVYHGRGLD
LF7	IgM	FVLQAPGKLEWIA	<b>EIS</b> ---YGRDITNYSFKS	RVYIISDTSNQFSELELRSVTAADTAIYCAR	GSYSSSSSVSRVWFDS
LF13	IgM	WVRQAPGKLEWVA	<b>VISG</b> ---GGGRKYADSVKQ	RFTIISDINAKNSLQMQNSLRVEDTAIYCAR	<b>NSST</b> VHKLDFM
LF15	IgM	WVRQAPGKLEWVS	<b>OISG</b> ---DGRITVYHDSVKQ	RFTIISDINFKNTLQMQNSLRVEDTAIYCAR	<b>NWS</b> LD
LF19	IgM	WVRQAPGKLEWIS	<b>NISG</b> ---SSSALMYALS VKQ	RFTIISDINAKNSLQMQNSLRVEDTAIYCAR	<b>NISG</b> SPFDL
LF23	IgM	WVRQAPGKLEWVS	<b>RISN</b> CTDGGTIDYAAVVKQ	RFTIISDIDSKDTLQMQNSLKTEDTAIYCTP	YSDVYGRHIS
LF22	IgA	WVRQPPGKLEWIG	<b>TLS</b> --- <b>NISG</b> ITVYFSLKRS	RASISFSLSRNEVSLKVTMTSADTVGYCAT	GGRESNRPEWGSFDA
LF2	IgG	WILQSPGKLEWVS	<b>NISGNTS</b> SYTHYAESVKQ	RFTIISDINAKNSLQMQNSLVEDTAIYCVR	<b>NCS</b> STSHRYSNHGNL
LF4	IgG	WVRQAPGKLEWAG	<b>DINT</b> ---NSGHTKYQKPCG	RVIMTDTISTITVYMEVRSLSDDTAIYCAR	<b>NISG</b> SPHYIYDMV
LF6	IgG	WVRQMPGKLEWAG	<b>IITR</b> ---DSDGTRYSPSPCG	QVTMTDQKIS <b>NTI</b> LQWSSLEASDTAIYCAS	<b>NISG</b> SRDCPEYVHH
LF9	IgG	WVRQAPGKLEWVS	<b>RIDS</b> ---DGSNTYAESVCG	RFTIISDINAKNTLYMQNSLRVEDTAIYCAR	<b>NISG</b> SRGTSNYIYDMV
LF10	IgG	FVLQAPGKLEWVA	<b>NISG</b> ---NSGNTIYVSVKQ	RFTIISDINAKNSLQMQNSLRVEDTAIYCAR	KGDFVSSYIPDS
LF11	IgG	WVLQAPGKLEWVG	<b>RIGDKGDSHITTEVSKFLKG</b>	APTIISDSDSKESLFLQMQNSLKIETDAIYCVR	<b>NCS</b> RSNCHFDHSGSLDV
LF12	IgG	WVRQAPGKLEWVA	<b>NISG</b> ---DGTQQYCVLSVKQ	RFTIISDINAKNSLQMQNSLRVEDTAIYCAR	DNGAGLDY
LF14	IgG	WVRQAPGKLEWVA	<b>SISD</b> ---SGRPTVYADSLKG	RFTIISDINAKNSLQMQNSLRVEDTAIYCVR	<b>NISG</b> SE
LF16	IgG	WVRQAPGKLEWIS	<b>OISG</b> ---SGHTVYVESVKG	RFTIISDINAKNSLQMQNSLRVEDTAIYCAR	<b>NISG</b> SPGYFDY
LF17	IgG	WVRQAPGKLEWIS	<b>NTI</b> ---SGSDIYVYVESVKG	RFTIISDINAKNTLYMQNSLRVEDTAIYCAT	CGZTTLTAAREBY
LF18	IgG	WVRQAPGKLEWVA	<b>NTHI</b> ---DGRKTYHDSVKQ	RFTIISDINAKNSLQMQNSLRVEDTAIYCAT	<b>NISG</b> LAGCMVY
LF20	IgG	WILQSPGKLEWIG	<b>EIS</b> ---PQGGTRYSPSLKS	RVYIISVSSSKNQFSLKYSVTAADTAIYCAR	<b>NISG</b> CLRHMFKSGSSYTRMDV
LF21	IgG	WVRQAPGKLEWVS	<b>SITG</b> ---SGDRAYVYHVSVKQ	RFTIISDINFKNTLQMQNSLRVEDTAIYCAR	<b>NISG</b> SDPRYSYIYAMD
LF24	IgG	WVRQAPGKLEWVA	<b>VISD</b> ---DGR <b>NISG</b> ESL VKQ	RLTVSRDNRVDTLQMQNSLRDDTGLYCAK	AKNQSEFFRNGSLDY

No obstante, la variación intraclonal de un tumor puede afectar al idiotipo en formas distintas a la glicosilación, siendo una de las principales variaciones la originada por la mutación somática de las regiones CDR<sup>45</sup>.

### **Splicing alternativo**

Se sabe que las células tumorales poseen una gran inestabilidad genómica, lo que les confiere la enorme plasticidad que les caracteriza<sup>46</sup> y que uno de los muchos factores que contribuye a esta inestabilidad genómica es la desregulación del proceso de *splicing* (corte y empalme)<sup>47,48</sup>.

La mutación en los puntos de *splicing* de los intrones es normalmente una causa de escape del exón durante el procesamiento del pre-ARNm, dando lugar a una proteína truncada que pierde su función original. No todas las alteraciones en el *splicing* son debidas a mutaciones. En los últimos años se han descrito alteraciones en *splicing* alternativo específicas de células tumorales, sin detectarse ninguna mutación en el gen afectado, que está asociado a una alteración en elementos trans (factores reguladores del *splicing* que pueden aumentar o disminuir en las células tumorales). También puede variar la localización y la actividad de estos factores, favoreciéndose ciertas isoformas producidas por *splicing* alternativo<sup>48</sup>.

De forma similar, muchos péptidos derivados de un *splicing* aberrante pueden utilizarse como potenciales Ags específicos de tumor. Estos péptidos se pueden producir por la activación de exones crípticos que no se expresan en células normales. Esto conlleva un cambio en la pauta de lectura de la proteína nativa, por adición o pérdida de algunos nucleótidos. La inclusión o el escape de un exón, aunque no produzca un cambio en la pauta de lectura, es capaz de generar un nuevo péptido en la región de fusión de los dos exones. Todas estas alteraciones darían lugar a un potencial Ag específico de tumor. De hecho, se han detectado respuestas inmunológicas específicas contra algunos determinantes antigénicos derivados de proteínas con *splicing* anómalo en pacientes con cáncer<sup>49-58</sup>.

Visto que el futuro de la vacuna idiotípica parece prometedor, y que la Ig tumoral pueda no ser tan similar entre las distintas células tumorales del paciente como en un

principio se pudiera pensar<sup>45</sup>, nos parece interesante el estudio a nivel molecular del *splicing* alternativo que pueda sufrir la misma. De este modo ampliaríamos nuestro conocimiento sobre posibles características que puedan repercutir en la antigenicidad de las Ig. Por otra parte, teniendo en cuenta que hay casos en los que la purificación del idiotipo producido por hibridomas resulta imposible, nos parece interesante valorar la posibilidad de que la Ig sufra *splicing* alternativo en la región constante. Esto podría justificar la imposibilidad de purificar ciertos idiotipos por la pérdida del fragmento de la región constante de la Ig en el que nos estamos apoyando para su purificación. En estos casos habría que probar otros métodos de purificación del idiotipo. De ser así, el estudio permitiría extender la vacuna idiotípica tanto a pacientes con LF que, hasta la fecha no han podido beneficiarse de la vacuna como a otras neoplasias B en las que hasta ahora no ha sido posible aplicar esta estrategia terapéutica.

### **CONCLUSIÓN**

La vacuna idiotípica supone un beneficio clínico para los pacientes que sufren LF. No obstante, la metodología tradicional de producción de idiotipo no consigue tener éxito en el 100% de los casos de LF y no logra su objetivo en otras patologías. En este sentido, resulta de gran interés continuar la investigación en este campo buscando la posibilidad de producir la proteína de forma recombinante así como profundizar en el conocimiento de mecanismos postraduccionales y moleculares que modifican la estructura del antígeno tumoral. También es importante la investigación para mejorar la formulación de la vacuna idiotípica. De este modo podríamos ampliar tanto el número de pacientes de LF como tipos de patologías que pudieran beneficiarse de este tratamiento de inmunoterapia.

---

### *Agradecimientos*

El trabajo llevado a cabo en el Laboratorio de Inmunoterapia del CIMA está financiado por la UTE-FIMA, el Departamento de Educación y Cultura y el Departamento de Salud del Gobierno de Navarra y por el Instituto de Salud Carlos III (RTIC cáncer C03/10).

## BIBLIOGRAFÍA

1. BENDANDI M. Aiming at a curative strategy for follicular lymphoma. *CA Cancer J Clin* 2008; 58: 305-317.
2. BUCKSTEIN R, PENNELL N, BERINSTEIN NL. What is remission in follicular lymphoma and what is its relevance? *Best Pract Res Clin Haematol* 2005; 18: 27-56.
3. BAKHSHI A, JENSEN JP, GOLDMAN P, WRIGHT JJ, MCBRIDE OW, EPSTEIN AL et al. Cloning the chromosomal breakpoint of t (14; 18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 1985; 41: 899-906.
4. MELERINK JP. t (14;18), a journey to eternity. *Leukemia* 1997; 11: 2175-2187.
5. TSUJIMOTO Y, GORHAM J, COSSMAN J, JAFFE E, CROCE CM. The t (14; 18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 1985; 229: 1390-1393.
6. JAGER U, BOCSKOR S, LE T, MITTERBAUER G, BOLZ I, CHOTT A et al. Follicular lymphomas' BCL-2/IgH junctions contain templated nucleotide insertions: novel insights into the mechanism of t (14; 18) translocation. *Blood* 2000; 95: 3520-3529.
7. TSUJIMOTO Y, LOUIE E, BASHIR MM, CROCE CM. The reciprocal partners of both the t (14; 18) and the t (11; 14) translocations involved in B-cell neoplasms are rearranged by the same mechanism. *Oncogene* 1988; 2: 347-351.
8. GOOSSENS T, KLEIN U, KUPPERS R. Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 2463-2468.
9. PAPAVALIOLU FN, SCHATZ DG. Cell-cycle-regulated DNA double-stranded breaks in somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Nature* 2000; 408: 216-221.
10. PASQUALUCCI L, NEUMEISTER P, GOOSSENS T, NANJANGUD G, CHAGANTI RS, KUPPERS R et al. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 2001; 412: 341-346.
11. MCDONNELL TJ, DEANE N, PLATT FM, NUNEZ G, JAEGER U, MCKEARN JP et al. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 1989; 57: 79-88.
12. HIRT C, SCHULER F, DOLKEN G. Minimal residual disease (MRD) in follicular lymphoma in the era of immunotherapy with rituximab. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 223-231.
13. BENDANDI M, GOCKE CD, KOBRIN CB, BENKO FA, STERNAS LA, PENNINGTON R et al. Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma. *Nat Med* 1999; 5: 1171-1177.
14. LADETTO M, CORRADINI P, VALLET S, BENEDETTI F, VITOLO U, MARTELLI M et al. High rate of clinical and molecular remissions in follicular lymphoma patients receiving high-dose sequential chemotherapy and autografting at diagnosis: a multicenter, prospective study by the Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). *Blood* 2002; 100: 1559-1565.
15. LADETTO M, SAMETTI S, DONOVAN JW, FERRERO D, ASTOLFI M, MITTERER M et al. A validated real-time quantitative PCR approach shows a correlation between tumor burden and successful ex vivo purging in follicular lymphoma patients. *Exp Hematol* 2001; 29: 183-193.
16. FUNG CY, TARBELL NJ, LUCARELLI MJ, GOLDBERG SI, LINGGOOD RM, HARRIS NL et al. Ocular adnexal lymphoma: clinical behavior of distinct World Health Organization classification subtypes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 57: 1382-1391.
17. MCLAUGHLIN P, CABANILLAS F, HAGEMEISTER FB, SWAN FJ, ROMAGUERA JE, TAYLOR S et al. CHOP-Bleo plus interferon for stage IV low-grade lymphoma. *Ann Oncol* 1993; 4: 205-211.
18. KIMBY E, BJORKHOLM M, GAHRTON G, GLIMELIUS B, HAGBERG H, JOHANSSON B et al. Chlorambucil/prednisone vs. CHOP in symptomatic low-grade non-Hodgkin's lymphomas: a randomized trial from the Lymphoma Group of Central Sweden. *Ann Oncol* 1994; 5 Suppl 2: 67-71.
19. EMMANOULIDES C. Current treatment options in follicular lymphoma: science and bias. *Leuk Lymphoma* 2007; 48: 2098-2109.
20. PETERSON BA, PETRONI GR, FRIZZERA G, BARCOS M, BLOOMFIELD CD, NISSEN NI et al. Prolonged single-agent versus combination chemotherapy in indolent follicular lymphomas: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol* 2003; 21: 5-15.
21. ANDREADIS C, SCHUSTER SJ, CHONG EA, SVOBODA J, LUGER SM, PORTER DL et al. Long-term event-free survivors after high-dose therapy and autologous stem-cell transplantation for low-grade follicular lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 2005; 36: 955-961.
22. AURORA V, WINTER JN. Follicular lymphoma: today's treatments and tomorrow's targets. *Expert Opin Pharmacother* 2006; 7: 1273-1290.
23. BUSKE C, WEIGERT O, DREYLING M, UNTERHALT M, HIDDEMANN W. Current status and perspective of antibody therapy in follicular lymphoma. *Haematologica* 2006; 91: 104-112.
24. CZUCZMAN MS, THALL A, WITZIG TE, VOSE JM, YOUNES A, EMMANOULIDES C et al. Phase I/II study of galiximab, an anti-CD80 antibody,

- for relapsed or refractory follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4390-4398.
25. INOGES S, RODRIGUEZ CALVILLO M, LÓPEZ DÍAZ DE CERIO A, ZABALEGUI N, MELERO I, SÁNCHEZ IBARROLA A et al. Active immunotherapy in the treatment of haematological neoplasias. *An Sist Sanit Navar* 2004; 27: 45-62.
  26. JONGENEEL V. Towards a cancer immunome database. *Cancer Immun* 2001; 1: 3.
  27. KOBIRIN CB, KWAK LW. Development of vaccine strategies for the treatment of B-cell malignancies. *Cancer Invest* 1997; 15: 577-587.
  28. HORNING SJ. Natural history of and therapy for the indolent non-Hodgkin's lymphomas. *Semin Oncol* 1993; 20: 75-88.
  29. STEVENSON GT, STEVENSON FK. Antibody to a molecularly-defined antigen confined to a tumour cell surface. *Nature* 1975; 254: 714-716.
  30. MILLER RA, MALONEY DG, WARNE R, LEVY R. Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotype antibody. *N Engl J Med* 1982; 306: 517-522.
  31. 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: 1209-1215.
  32. HSU FJ, CASPAR CB, CZERWINSKI D, KWAK LW, LILES TM, SYRENGELAS A 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: 3129-3135.
  33. BARRIOS Y, CABRERA R, YAÑEZ R, BRIZ M, PLAZA A, FORES R et al. Anti-idiotypic vaccination in the treatment of low-grade B-cell lymphoma. *Haematologica* 2002; 87: 400-407.
  34. WENG WK, CZERWINSKI D, TIMMERMAN J, HSU FJ, LEVY R. Clinical outcome of lymphoma patients after idiotype vaccination is correlated with humoral immune response and immunoglobulin G Fc receptor genotype. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4717-4724.
  35. JOHNSON PW, ROHATINER AZ, WHELAN JS, PRICE CG, LOVE S, LIM J et al. Patterns of survival in patients with recurrent follicular lymphoma: a 20-year study from a single center. *J Clin Oncol* 1995; 13: 140-147.
  36. INOGES S, RODRIGUEZ-CALVILLO M, ZABALEGUI N, LOPEZ-DIAZ DE CERIO A, VILLANUEVA H, SORIA E et al. Clinical benefit associated with idiotype vaccination in patients with follicular lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 1292-1301.
  37. INOGES S, RODRIGUEZ-CALVILLO M, LÓPEZ-DÍAZ DE CERIO A, ZABALEGUI N, PEREZ-CALVO J, PANIZO C et al. Feasibility of idiotype vaccination in relapsed B-cell malignancies. *Haematologica* 2003; 88: 1438-1440.
  38. CHOTHIA C, LESK AM, TRAMONTANO A, LEVITT M, SMITH-GILL SJ, AIR G et al. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* 1989; 342: 877-883.
  39. DAVIES DR, PADLAN EA, SHERIFF S. Antibody-antigen complexes. *Annu Rev Biochem* 1990; 59: 439-473.
  40. MIDDLEDAUGH CR, LITMAN GW. Atypical glycosylation of an IgG monoclonal cryoimmunoglobulin. *J Biol Chem* 1987; 262: 3671-3673.
  41. WRIGHT A, TAO MH, KABAT EA, MORRISON SL. Antibody variable region glycosylation: position effects on antigen binding and carbohydrate structure. *EMBO J* 1991; 10: 2717-2723.
  42. ZHU D, MCCARTHY H, OTTENSMEIER CH, JOHNSON P, HAMBLIN TJ, STEVENSON FK. Acquisition of potential N-glycosylation sites in the immunoglobulin variable region by somatic mutation is a distinctive feature of follicular lymphoma. *Blood* 2002; 99: 2562-2568.
  43. ZABALEGUI N, DE CERIO AL, INOGES S, RODRIGUEZ-CALVILLO M, PEREZ-CALVO J, HERNÁNDEZ M et al. Acquired potential N-glycosylation sites within the tumor-specific immunoglobulin heavy chains of B-cell malignancies. *Haematologica* 2004; 89: 541-546.
  44. RADCLIFFE CM, ARNOLD JN, SUTER DM, WORMALD MR, HARVEY DJ, ROYLE L et al. Human follicular lymphoma cells contain oligomannose glycans in the antigen-binding site of the B-cell receptor. *J Biol Chem* 2007; 282: 7405-7415.
  45. YAÑEZ R, BARRIOS Y, CABRERA R, DÍAZ-ESPADA F. Intraclonal variability of VH genes in follicular lymphoma patients who have received anti-idiotypic immunotherapy. *J Immunother* 2006; 29: 61-66.
  46. HANAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
  47. KALNINA Z, ZAYAKIN P, SILINA K, LINE A. Alterations of pre-mRNA splicing in cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 42: 342-357.
  48. PAJARES MJ, EZPONDA T, CATENA R, CALVO A, PIO R, MONTUENGA LM. Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. *Lancet Oncol* 2007; 8: 349-357.
  49. WANG RF, APPELLA E, KAWAKAMI Y, KANG X, ROSENBERG SA. Identification of TRP-2 as a human tumor antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1996; 184: 2207-2216.
  50. GUILLOUX Y, LUCAS S, BRICHARD VG, VAN PEL A, VIRET C, DE PLAEN E et al. A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene. *J Exp Med* 1996; 183: 1173-1183.
  51. JAGER D, STOCKERT E, SCANLAN MJ, GURE AO, JAGER E, KNUTH A et al. Cancer-testis antigens and

- ING1 tumor suppressor gene product are breast cancer antigens: characterization of tissue-specific ING1 transcripts and a homologue gene. *Cancer Res* 1999; 59: 6197-6204.
52. WANG T, FAN L, WATANABE Y, MCNEILL P, FANGER GR, PERSING DH et al. L552S, an alternatively spliced isoform of XAGE-1, is over-expressed in lung adenocarcinoma. *Oncogene* 2001; 20: 7699-7709.
  53. LINE A, STENGREVIC A, SLUCKA Z, LI G, JANKEVIC E, REES RC. Serological identification and expression analysis of gastric cancer-associated genes. *Br J Cancer* 2002; 86: 1824-1830.
  54. KHONG HT, ROSENBERG SA. Pre-existing immunity to tyrosinase-related protein (TRP)-2, a new TRP-2 isoform, and the NY-ESO-1 melanoma antigen in a patient with a dramatic response to immunotherapy. *J Immunol* 2002; 168: 951-956.
  55. USENER D, SCHADENDORF D, KOCH J, DUBEL S, EICHMULLER S. Ctage: a cutaneous T cell lymphoma associated antigen family with tumor-specific splicing. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 198-206.
  56. HOGAN KT, COPPOLA MA, GATLIN CL, THOMPSON LW, SHABANOWITZ J, HUNT DF et al. Identification of novel and widely expressed cancer/testis gene isoforms that elicit spontaneous cytotoxic T-lymphocyte reactivity to melanoma. *Cancer Res* 2004; 64: 1157-1163.
  57. YAN Y, PHAN L, YANG F, TALPAZ M, YANG Y, XIONG Z et al. A novel mechanism of alternative promoter and splicing regulates the epitope generation of tumor antigen CML66-L. *J Immunol* 2004; 172: 651-660.
  58. ALI ELDIR AM, ONO T, SHIMONO M, KANEKO M, NAKAGAWA K, TANAKA R et al. Immunoscreening of a cDNA library from a lung cancer cell line using autologous patient serum: Identification of XAGE-1b as a dominant antigen and its immunogenicity in lung adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2004; 108: 558-563.

