

Vacunación idiotípica en linfomas B de bajo grado: una nueva terapia antitumoral

José Rafael Cabrera^a, Yvelise Barrios^b, Rosa Yáñez^b, Manuel N. Fernández^a y Fernando Díaz de Espada^b

^aServicios de Hematología e ^bImmunología. Hospital Universitario Clínica Puerta de Hierro. Universidad Autónoma de Madrid.

El idiotipo de la inmunoglobulina (Ig) de superficie de los linfomas B puede ser reconocido como antigénico por el sistema inmune. Presentamos el resultado del primer ensayo de inmunización idiotípica en pacientes con linfoma folicular de bajo grado que se ha llevado a cabo en Europa.

Hemos vacunado a 7 pacientes, la mayoría tratados previamente con quimioterapia y trasplante autólogo. La vacunación ha consistido en la administración de Ig tumoral unida a KLH y a un adyuvante inmunológico, tras lo que se estudió la toxicidad del procedimiento, la respuesta inmune y el resultado clínico.

El seguimiento medio de la observación de los pacientes desde la vacunación ha sido de 23 meses (9-51). Uno de los 7 pacientes estaba en primera remisión antes del inicio de la vacunación; los otros 6 en remisiones sucesivas. Todos los pacientes generaron respuestas inmunes contra el idiotipo de la Ig tumoral. Dos pacientes que tenían enfermedad residual antes de la vacunación experimentaron regresión completa asociada al desarrollo de la respuesta inmune. Después de esto uno de ellos recayó.

En los pacientes con linfoma de células B puede inducirse una respuesta inmune específica contra la Ig que expresa su propio tumor. Una situación de respuesta completa antes de la vacunación y el hecho de que se desarrolle una buena respuesta inmune, son hechos que pudieran relacionarse con un resultado clínico más favorable. Es necesaria la aplicación de

esta técnica a un mayor número de pacientes y un período de seguimiento más prolongado para probar si existe una relación entre la inmunidad antiidiotípica y un mayor período libre de enfermedad, así como una mejor supervivencia.

Palabras clave: vacuna idiotípica, inmunización idiotípica, linfoma B de bajo grado, linfoma folicular.

Rev Oncología 2001; 4: 201-206.

Idiotypic vaccination in low grade B-cell lymphomas: a new antitumoral treatment

The immune system can be induced to mount a specific immune response against the individual idiotypic determinants expressed in the surface immunoglobulin of the B-cell lymphoma. Here we present the results of the first clinical trial of active idiotypic immunisation in patients with follicular low grade non-Hodgkin's B-cell lymphoma conducted in Europe.

Seven patients, most of them treated previously with chemotherapy and hemopoietic transplant, received the vaccine consisting of their individual tumour Ig protein coupled to keyhole limpet hemocyanine and emulsified in an immunologic adjuvant. Five patients were in complete remission and two had residual disease before vaccination. Subjects were observed for toxicity, anti-idiotypic immune response and clinical outcome.

The median duration of follow-up of all vaccinated patients since the initiation of immunotherapy is 23 (9-51) months. The 7 patients generated specific immune responses against the idiotypes of their tumour Ig. Two patients that had residual disease

Correspondencia: Dr. J. R. Cabrera Marín.
Servicio de Hematología.
Clínica Puerta de Hierro.
San Martín de Porres, 4.
28035 Madrid.
Correo electrónico: jcabrera@aeih.org

Recibido el 11-12-2000.

Aceptado para su publicación el 23-3-2001.

A este trabajo le ha sido concedido el Premio Rafael Hervada a la Investigación Biomédica 1999-2000. Ha sido realizado mediante el proyecto de Investigación FIS 97/0963.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los pacientes con linfomas foliculares de bajo grado recaen y no pueden ser curados con tratamiento estándar de quimioterapia

TABLA 1. Características generales de los pacientes inmunizados

Pacientes	Edad al diagnóstico	Sexo	Diagnóstico	Estadio clínico	Isotipo tumoral	Tratamiento previo a la vacunación
1	37	F	LF tipo II	IV	G, λ	QTs + TAMO
2	43	M	LF tipo II	IV	G, λ	QTs + TASP
3	43	M	LF	IV	G, λ	QTs + TASP
4	30	M	LF tipo II	IV	G, λ	QTs + TASP
5	29	M	LF tipo I	IV	Biclonal 2 × M, κ	QTs + TASP
6	36	F	LF tipo I	IV	M, κ	QTs + TASP
7	62	M	LF tipo II	IV	G, λ	CVP

CVP: ciclofosfamida, vincristina y prednisona; TAMO: trasplante autólogo de médula ósea; TASP: trasplante autólogo de sangre periférica.

y/o radioterapia. Una aproximación terapéutica diferente en estos linfomas B es la inducción de una respuesta inmune mediante la vacunación con antígenos tumorales específicos¹⁻³. La Ig de superficie sintetizada por las células B contiene determinantes idiotípicos que constituyen el lugar de reconocimiento de los epítomos antigénicos y que pueden ser reconocidos como antigénicos por otras células inmunes⁴⁻⁷. Dada la singularidad de la región idiotípica de una célula tumoral B, el ataque inmune dirigido contra sus determinantes idiotípicos causaría la destrucción de las células tumorales dejando intactas las células B normales⁸. Aunque se han obtenido resultados inicialmente prometedores tras la infusión de anticuerpos anti-idiotipo murinos a pacientes con linfomas de bajo grado^{9,10}, una proporción importante de ellos recayó porque desarrollaron variantes idiotipo-negativas del tumor^{11,12}. A la vista de estos problemas la alternativa de llevar a cabo una inmunización activa que produzca una respuesta humoral policlonal y celular T anti-idiotípica que pudiera reducir la posibilidad de escape mutacional se ha evaluado con la administración de una preparación inmunogénica del idiotipo tumoral del paciente^{1,13}. La publicación inicial del grupo de Levy et al fue seguida por un estudio más amplio de su grupo y por otros grupos relacionados, todos ellos en los EE. UU.¹⁴⁻¹⁶.

Presentamos los resultados del primer ensayo llevado a cabo en Europa con inmunización idiotípica de pacientes con linfoma folicular de bajo grado. Hemos seguido el protocolo general diseñado por el grupo de Levy R, et al¹⁴, que consiste en la administración de una serie de inyecciones de la proteína idiotípica autóloga conjugada con un transportador inmunogénico (KLH). Discutimos la metodología, el resultado clínico y las características particulares de nuestros hallazgos.

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes

Se obtuvo una biopsia ganglionar de cada paciente con el propósito de producir la vacuna idiotípica. Además se obtuvieron células linfomatosas circulantes de la sangre en 2 pacientes. Las biopsias ganglionares se diagnosticaron con arreglo a la clasificación REAL¹⁷, como linfoma folicular de bajo grado (tipo citológico I y II) y estadio clínico IV en todos los casos. Los pacientes firmaron consentimiento informado para el estudio y el método fue aprobado previamente por el Comité Ético del hospital y por las autoridades sanitarias. La tabla 1 muestra las características de los pacientes que entraron en el estudio.

Seis pacientes han sido tratados con varias líneas de quimioterapia (pacientes 1 a 6) debido a diferentes recaídas de su enfermedad. Además estos pacientes fueron tratados con trasplante hemopoyético autólogo. Tras el tratamiento fueron evaluados para determinar la presencia de remisión completa (RC) o buena respuesta parcial (RP) de su enfermedad y fueron inmunizados con la vacuna idiotípica (casos 1 a 6). Otro paciente (caso 7) se ha vacunado después de obtenerse la primera remisión completa con quimioterapia de primera línea (CVP). Ninguno de los 7 pacientes que recibieron la serie completa de inmunizaciones recibieron ninguna quimioterapia en los 6 meses previos a la vacunación y ninguno recibió otro tratamiento antitumoral durante el estudio (tabla 2).

Todos los pacientes se estadiaron con tomografía computarizada (TC) del tórax, abdomen y pelvis y con biopsia de

TABLA 2. Situación clínica, seguimiento y desarrollo de respuesta inmune en los pacientes inmunizados

Paciente	Situación clínica a la vacunación	Situación clínica en el momento actual	Seguimiento (meses)	Respuesta inmunológica (anti-Id)
1	RP	Muerta de causa no relacionada	14	(+)
2	RC	RC	51	(+)
3	RP	Recaído	41	(+)
4	RC	RC	19	(+)
5	RC	RC	23	(+) a ambos idiotipos
6	RC	RC	9	(+)
7	RC	RC	37	(±)

RP: respuesta parcial; RC: remisión completa.

médula ósea antes del tratamiento con la vacunación. Los pacientes fueron monitorizados para respuesta inmunológica, problemas autoinmunes y recidiva tumoral en un protocolo estandarizado. Se realizaron hemogramas, bioquímica sanguínea, radiografía de tórax y TC del tórax, abdomen y pelvis 3 veces al año.

Líneas celulares y reactivos

El heteromiéloma sensible a HAT K6H6/B6 (CRL 1823) y el híbrido DA4-4 (CRL) que produce un anticuerpo murino anticadena- μ antihumana se obtuvieron de la American Type Culture Collection. El anticuerpo anti adena- μ se obtuvo por cromatografía de afinidad en ProteinL-Sepharose (Actigen) y se unió a AffiGel (Pierce). ProteinA-Sepharose y HiTrapM se obtuvieron de Pharmacia. El Tween 20 y el esqualano se obtuvieron de Aldrich y el Pluronic L-121 de Basf. Las cadenas marcadas con fluorocromos antihumano μ , γ , κ , λ y los anticuerpos anti-CD19 se obtuvieron de Caltag.

Preparaciones celulares

Las células tumorales del ganglio linfático (GL) se obtuvieron al diagnóstico y se prepararon suspensiones celulares simples para análisis citofluorométrico y procedimientos de fusión somática. Las células se tiñeron por técnicas estándar de inmunofluorescencia directa y se analizaron usando un EPICS XL (Coulter Electronics, Hialeah, FL). Las células mononucleares de la sangre periférica se aislaron por centrifugación en gradiente de densidad (Lymphoprep, Nycomed).

Las células se fusionaron en polietilenglicol al 50% (Boehringer Mannheim) con el heterohíbrido K6H6/B5¹⁸ y se resuspendieron en HAT-RPMI1640 (Whitaker Bioproducts) suplementado con 10% FCS (Seralab) y HFCS Supplement (Boehringer Mannheim), L-glutamina y antibióticos. Se determinó la secreción de Ig humana por los híbridos obtenidos en un ensayo de ELISA convencional con anticuerpos específicos de isotipos humanos, seleccionándose aquellos híbridos que secretaban inmunoglobulinas con las cadenas ligera y pesada coincidentes con las correspondientes al inmunofenotipo tumoral. Se eligieron aquellos híbridos que secretaban inmunoglobulinas con idéntica movilidad electroforética tras un ensayo de electroforesis en agarosa, transferencia capilar a membranas de PVDF y revelado con reactivos anti-Ig marcados con HRP (Sigma) y quimioluminiscencia (Boehringer Mannheim).

Identificación del idiotipo tumoral

Se emplearon diversas estrategias para confirmar la identidad del idiotipo tumoral y los productos derivados de los híbridos preseleccionados según los criterios anteriores. Se sintetizó cADN a partir de muestras de ARN total (SNAP Kit, InVitrogen), empleándose un oligo(dT)primer y transcriptasa inversa (Promega). Las regiones variables de las cadenas pesadas se amplificaron usando un panel de cebadores V_H back/ J_H for específicos de la familias de genes V_H ¹⁹. Se realizó análisis de restricción de los frag-

mentos HaeIII de los productos de PCR purificados por cromatografía en gel de acrilamida, determinándose la identidad de los fragmentos provenientes de muestras tumorales e híbridos. En algunos casos en los que la información obtenida no fue concluyente se procedió al estudio de la secuencia de oligonucleótidos correspondiente. Para ello los productos de la PCR-RT anteriores se subclonaron en el vector pCRTM II (sistema TA, Invitrogen) y en E. coli competentes. El ADN plasmídico se extrajo de diferentes clones bacterianos y la secuencia de nucleótidos de los insertos se estudió con cebadores externos en un Pharmacia Biotech ALFexpressTM Automater DNA Sequencer, empleándose el Cy5TM AutoCycleTM Sequencing Kit (Pharmacia Biotech).

Preparación del inmunógeno

Los híbridos elegidos crecieron en cultivos de alta densidad en cámaras CL1000 (Integra). La purificación del material idiotípico se realizó por técnicas cromatográficas relacionadas con las propiedades individuales del idiotipo de cada paciente: ProteinA-Sepharose (IgG), ProteinL-Sepharose (cadenas ligeras kappa) o DA4-4(anti- μ)-Sepharose (IgM). En algunos casos la IgM se preparó en columnas de HiTrapM (Pharmacia Biotech). Todos los procedimientos se llevaron a cabo con estricta observancia de las reglas de seguridad biológica, determinándose la pureza de los productos finales PAGE-SDS y electroforesis en agarosa.

A fin de preparar el inmunógeno, los idiotipos purificados se mezclaron con una solución de hemocianina (KLH, Endotoxin-free, Calbiochem), a concentración final de ambos productos de 0,5 mg/ml en PBS, acoplándose covalentemente ambas moléculas en presencia de glutaraldehído 0,1%.

La reacción se finalizó por adición de glicocola 2M, y el preparado final se dializó frente a solución salina fisiológica en casetes estériles Pierce, determinándose los niveles de endotoxinas y la ausencia de contaminación bacteriana. El adyuvante usado en la inmunización (SAF) se preparó homogeneizando una mezcla en PBS de Pluronic L-121, Squalane y Tween20, en un homogeneizador Polytron^{14,20}. La emulsión resultante se filtró a través de un filtro Goring 0,22 μ y almacenó a 4°C. Los pacientes recibieron 5 inyecciones espaciadas durante un mes de una mezcla a partes iguales del inmunógeno (0,5 mg del idiotipo correspondiente) y del adyuvante SAF.

Estudio de la respuesta inmune antiidiotípica

Los anticuerpos circulantes antiidiotipo y anti-KLH se determinaron por ELISA. El suero pre y postinmunización se diluyó seriamente y se dispuso en pocillos de placas microtiter (Nunc) recubiertas con idiotipos purificados o KLH. La presencia de anticuerpos específicos se detectó tras tratamiento con anticuerpos marcados con HRP (Sigma) específicos de la cadena ligera ausente en el idiotipo estudiado y revelado con OPD. La densidad óptica a 490 nm se midió en un lector de placas de ELISA (Multiskan). Las muestras que presentaban un incremento de al menos 3 veces sobre el valor control (idiotipo no relacionado) se consideran positivas.

RESULTADOS

Producción de la vacuna

La vacuna fue elaborada con éxito en todos los casos en los que se intentó. En 2 casos la primera fusión no produjo el idiotipo tumoral y tuvo que ser llevada a cabo una segunda y definitiva fusión. Para poder establecer el origen tumoral de los idiotipos del hibridoma tan pronto como fue posible, primero elegimos aquellos híbridos que secretaban inmunoglobulinas con las cadenas ligera y pesada esperadas y con la misma movilidad electroforética, se expandieron las regiones VH por RT-PCR y se comparó el patrón de corte con Hae III con el obtenido usando material tumoral. En 3 casos la dificultad de interpretar los datos obtenidos, originados en ocasiones por patrones sugeridores de diclonalidad, fue preciso recurrir a la secuenciación de las regiones VH expresadas. En 1 caso la secuencia demostró sin ambigüedad la identidad de los idiotipos expresados por varios hibridomas y el del tumor original. En 1 caso bajo sospecha de diclonalidad, debido a la presencia de 2 poblaciones IgM e IgG (ambas kappa) en la muestra de tumor original, la secuenciación de las regiones VH expresadas por hibridomas secretores de ambas inmunoglobulinas mostraron una secuencia única, idéntica a la secuencia consenso expresada en el tumor original, lo que indica la presencia de un tumor clonalmente único, con una subpoblación derivada por cambio de clase. En el tercer caso, y a pesar de la existencia en el tumor original de una población homogénea IGM, kappa, los hibridomas obtenidos expresaban individualmente 2 secuencias diferentes, expresadas como consensos distintos en la muestra de tumor original. El estudio por idénticos métodos de la región V usada por las cadenas kappa confirmó la presencia de un tumor diclonal, lo que obligó a tratar separadamente los híbridos correspondientes y a obtener el inmunógeno con los 2 idiotipos existentes en el tumor.

Resultado clínico

Siete pacientes han completado el plan de vacunación diseñado, excepto uno que recibió una dosis adicional 5 meses después de la última dosis. La toxicidad del tratamiento consistió principalmente en reacciones locales ligeras en el lugar de la inyección (eritema e induración). Una observación frecuente fue el desarrollo de reacciones de enrojecimiento en los puntos de inyecciones anteriores con nuevas inmunizaciones. En casos aislados aparecieron síntomas generales que consistieron en febrícula y malestar general transitorios. No se observó toxicidad hepática, renal, pulmonar, cardíaca, hematológica, gastrointestinal o neurológica. Las de-

terminaciones de AAN fueron negativas. Ocasionalmente hubo elevaciones transitorias de los títulos de FR, pero no aparecieron signos de enfermedades relacionadas con esta alteración.

Cinco pacientes estaban en remisión completa y 2 tenían enfermedad residual tras el tratamiento administrado antes de la vacunación. La mediana de seguimiento de los pacientes es de 5,5 años (intervalo: 3,7 a 13 años) desde el diagnóstico inicial y 23 meses (intervalo: 9-51 meses) desde el inicio de la vacunación (tabla 2).

Los 5 pacientes que estaban en remisión antes de la vacunación desarrollaron respuestas inmunes específicas y permanecen en remisión en la actualidad. Dos pacientes tenían enfermedad residual antes de la vacunación. Uno de ellos (caso 1) desarrolló respuesta específica inmune y regresión tumoral completa, pero murió de causa no relacionada 14 meses después del inicio de la vacunación. El paciente 3 presentó una regresión tumoral transitoria 3 meses después del inicio de la vacunación cuando desarrolló anticuerpos antiidiotipo, pero recayó 7 meses después. La recaída fue tratada con éxito con quimioterapia.

El paciente 2 recayó, confirmándose la recaída por biopsia ganglionar entre la segunda y tercera dosis de vacuna. Recibió el resto del tratamiento inmunoterápico y, aunque la enfermedad estuvo estable durante un tiempo, fue disminuyendo de tamaño hasta desaparecer 18 meses después de la última inyección, no habiendo signos de nueva recaída hasta la actualidad, siendo el caso de seguimiento más largo.

Respuesta inmune

El suero colectado antes y en momentos diferentes durante el curso de la vacunación fue analizado para valorar la presencia de anticuerpos antiidiotipo o anti-KLH. Detectamos respuestas postvacunación específicas para el idiotipo autólogo en los 7 pacientes (aunque en uno de ellos de menor intensidad). Estas respuestas específicas se observaron en general, después de la segunda vacunación. Todos los pacientes desarrollaron anticuerpos anti-KLH. Las respuestas positivas observadas después de la segunda vacunación persistieron como mínimo 3 meses después de la última inyección.

Como el número de pacientes inmunizados es pequeño no es posible correlacionar la respuesta inmune antiidiotípica con una mayor duración de la respuesta.

DISCUSIÓN

Los linfomas de bajo grado continúan siendo en

muchos casos una enfermedad incurable. La moderada eficacia de la quimioterapia y radioterapia unida a sus efectos dañinos potenciales ha motivado la búsqueda de tratamientos antitumorales alternativos, como es el caso de la inmunoterapia. Además, los linfomas B son particularmente adecuados para este tipo de tratamientos dada la presencia de un bien definido antígeno tumoral específico (el idiotipo), la asociación estable de esta molécula a la célula y la ocurrencia normal de moléculas accesorias implicadas en la colaboración T-B. Una vacuna basada en la única proteína idiotípica expresada por el tumor de cada paciente debe producirse usando tecnología de hibridoma y elaborarse durante el tiempo de administración de la quimioterapia, lo que hace que sea un tratamiento difícil de aplicar a un amplio número de pacientes.

La identificación precoz del idiotipo tumoral entre los idiotipos del hibridoma y el uso de cultivos de alta densidad y métodos de afinidad de aislamiento de proteínas permite completar el proceso en un período de 6 meses, aunque en la mitad de los casos en los que hay fallo en la obtención de los híbridos en la fusión inicial, o confirmación de la identidad por secuenciación, puede extenderse el período hasta 1 año. El tema de la clonalidad debe ser tenido en cuenta a lo largo de todo el proceso como pone de relieve el caso del paciente 5, donde la diclonalidad sospechada en el análisis citofluorométrico no fue confirmado hasta análisis posteriores, y en el caso 3, donde la diclonalidad fue evidenciada sólo después de secuenciar las regiones Vh de las células tumorales. En el último paciente los idiotipos de ambas células clonales se aislaron de diferentes hibridomas, y la vacuna se elaboró con una mezcla de ambas proteínas conjugadas con KLH.

Los 7 pacientes desarrollaron respuestas antiidiotípicas positivas tras la vacunación. En los 2 pacientes con enfermedad residual antes del tratamiento ocurrió regresión completa del tumor en un caso (caso 1) y reducción transitoria del tamaño del tumor en el otro (caso 3), que recayó a pesar de la presencia de anticuerpos antiidiotipo. Es posible que en el último caso no se obtuviera inducción de inmunidad celular, aunque ha sido descrito previamente que la mayoría de los pacientes desarrollan ambos tipos de respuesta antitumor simultáneamente^{14,21,22}. Todos los pacientes demostraron ser inmunocompetentes como queda reflejado en su habilidad de producir una respuesta inmune a la molécula portadora KLH. En algunos casos apareció una reducción, o incluso desaparición de los ganglios linfáticos, tras la vacunación.

La evidencia de reducción de la masa tumoral y la presencia de inmunidad idiotípica específica antitumoral permite decir que el tratamiento pudiera ser beneficioso para estos pacientes.

La mediana del seguimiento desde el inicio de la vacunación es de 23 meses (9-51). El pequeño número de pacientes y el todavía corto período de seguimiento hace difícil que se pueda afirmar si el desarrollo de una respuesta inmune antiidiotípica puede hacer más largo el período libre de enfermedad y la supervivencia de estos pacientes. Desde nuestro punto de vista este tipo de tratamiento es beneficioso, especialmente para los pacientes que están en su primera remisión clínica. Hsu et al¹⁶ señalaron que la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes en los que se produjo una respuesta inmune es significativamente mayor comparada con la de los que no desarrollan una respuesta inmune. También señalan que ocurre lo mismo para los que su enfermedad está en remisión antes de la vacunación. En nuestros casos, uno de los 2 pacientes que no estaban en RC antes del tratamiento recayó a los 10 meses después del inicio de la vacunación a pesar de la presencia de inmunidad humoral antiidiotípica.

En resumen, pensamos que la vacunación idiotípica puede resultar de gran beneficio para la evolución de este tipo de pacientes. Debe considerarse que la mayoría de nuestros pacientes fueron sometidos previamente a la vacunación a tratamientos agresivos, a pesar de que hubo un mal resultado, ya que su enfermedad recayó. La posibilidad de una curación definitiva con este método es una sugerencia atractiva, sobre todo en aquellos pacientes en los que se demuestre negativización de la traslocación característica de los linfomas foliculares (bcl-2/IgH) después de la vacunación²³. El empleo de otros métodos de inducción de inmunidad antitumoral basados en tecnología de ADN o el desarrollo de adyuvantes más elaborados (GM-CSF, células dendríticas pulsadas) podrían eventualmente permitir la inclusión de más pacientes o producir una respuesta inmune antitumoral más intensa^{19,24,25}.

Una alternativa diferente, que recuerda antiguos intentos de inmunización pasiva, ha surgido con la elaboración de anticuerpos monoclonales humanizados dirigidos contra moléculas específicas de células B²⁶, que se están aplicando a un número creciente de pacientes. La vacunación idiotípica tiene la ventaja de no dañar las células B normales, y además su efecto debe ser más prolongado en el tiempo. Una posibilidad sería la utilización de ambos tratamientos para aumentar su potencial individual. En cualquier caso es necesario el em-

pleo de la vacunación idiotípica en un mayor número de pacientes para probar si existe relación entre inmunidad idiotípica y mejores resultados clínicos.

Bibliografía

1. Campbell MJ, Esserman L, Byars NE, Allison AC, Levy R. Idiotype vaccination against murine B cell lymphoma. Humoral and cellular requirements for the full expression of antitumor immunity. *J Immunol* 1990; 145: 1.029.
2. Tao MH, Levy R. Idiotype/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein as a vaccine for B-cell lymphoma. *Nature* 1993; 362: 755.
3. Chen TT, Tao MH, Levy R. Idiotype-cytokine fusion proteins as cancer vaccines. Relative efficacy of IL-2, IL-4 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 1994; 153: 4.775.
4. Stevenson GT, Stevenson FK. Antibody to molecularly defined antigen confined to tumor cell surface. *Nature* 1975; 254: 714-716.
5. Stevenson GT, Elliott EV, Stevenson FK. Idiotypic determinants on the surface immunoglobulin of neoplastic lymphocytes: a therapeutic target. *Fed Proc* 1977; 36: 2.268.
6. Lynch RG, Rohrer JW, Odermatt B, Gebel HM, Autry JR, Hoover RG. Immunoregulation of murine myeloma cell growth and differentiation: a monoclonal of B cell differentiation. *Immunol Rev* 1979; 48: 45.
7. Levy R, Hatzubia A, Brown S, Maloney D, Dille J. Immunoglobulin idiotype: a tumor-specific antigen for human B-cell lymphomas. En: Rosenberg SA, Kaplan HS, eds. *Malignant lymphomas: etiology, immunology, pathology, treatment*. New York, NY: Academic 1982; 5.
8. Miller RA, Maloney DG, Warnke R, Levy R. Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *N Engl J Med* 1982; 306: 517-522.
9. Meeker TC, Lowder J, Maloney DG, et al. A clinical trial of anti-idiotypic therapy for B-cell malignancy. *Blood* 1985; 65: 1.349.
10. Brown SL, Miller RA, Homings SJ, et al. Treatment of B-cell lymphomas with anti-idiotypic antibodies alone and in combination with alpha interferon. *Blood* 1989; 73: 651.
11. Meeker TC, Lowder J, Cleary ML, et al. Emergence of idiotype variants during treatment of B-cell lymphoma with anti-idiotypic antibodies. *N Engl J Med* 1985; 312: 1.658-1.665.
12. Levy R, Levy S, Cleary ML, et al. Somatic mutation in human B cell tumors. *Immunol Rev* 1987; 96: 43.
13. George AJT, Folkard SG, Hamblin TJ, Stevenson FK. Idiotypic vaccination as a treatment for a B-cell lymphoma. *J Immunol* 1988; 141: 2.168-2.174.
14. 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: 1.209-1.215.
15. Hsu FJ, Kwak LW, Campbell M, et al. Clinical trials of idiotype-specific vaccine in B-cell lymphoma. *Ann NY Acad Sci* 1993; 690: 385-387.
16. 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: 3.129-3.135.
17. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised european-american classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84: 1.361-1.392.

18. Carroll WL, Thielemans K, Dilley J, Levy R. Mouse × human heteroibridomas as fusion partners with human B-cell tumors. *Immunol Methods* 1986; 89: 61-72.
19. Hawkins RE, Zhu D, Ovecka M, et al. Idiotypic vaccination against human B-cell lymphoma. Rescue of variable region gene sequences from biopsy material for assembly as single-chain Fv personal vaccines. *Blood* 1994; 83: 3.279-3.283.
20. Livingstone FO, Adlvis RA, Ychandhuri S, Hughs MH, Calves MJ, Merrit JA. Phase I trial of immunological adjuvant SAFm in melanoma patients vaccinated with anti-idiotypic antibody MELIMUNE-1. *Vaccine Res* 1994; 3/2: 71-81.
21. Kwak LW. Vaccination strategies with tumor antigen in patients with lymphoma undergoing bone marrow transplantation. In: De Spitzer T, Mazumder A, eds. *Immunotherapy and bone marrow transplantation*. Armonk, NY: Futura Publishing Co, Inc, 1995: 137-151.
22. Nelson EL, Li XB, Hsu FJ, et al. Tumor-specific, cytotoxic T lymphocyte response after «idiotype» vaccination for B-cell, non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1996; 88: 580.
23. Bendandi M, Gocke CD, Kobrin CB, et al. Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma. *Nat Med* 1999; 5: 1.171-1.177.
24. Hawkins RE, Winter G, Hamblin TJ, Stevenson FK, Russell SJ. A genetic approach to idiotypic vaccination. *J Immunother* 1993; 14: 273-278.
25. 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: 52-58.
26. Davis TA, White CA, Grillo-López AJ, et al. Single-agent monoclonal antibody efficacy in bulky non-Hodgkin's lymphoma: results of a phase II trial of rituximab. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1.851-1.857.

before vaccination experienced tumour regression, and one of them subsequently relapsed.

We conclude that patients with low-grade B-cell lymphoma can be induced to mount a specific immune response against the Ig expressed by their own tumour, and that this kind of immunotherapy can be of benefit to patients affected by this disease. Facts that could correlate with a favourable clinical outcome are a complete clinical response before vaccination and the generation of a specific immune response.

Key words: Idiotypic vaccine, idiotypic immunization, low grade B-cell lymphoma, follicular lymphoma.