

Vacunas terapéuticas: Utilidad en oncología

José Uberos Fernández
Departamento de Pediatría. Universidad de Granada

Artículo de revisión

La vacunación terapéutica fue ensayada en primer lugar por Louis Pasteur en 1885, en individuos infectados con rabia. Por fortuna, el lento crecimiento del virus permitía inducir inmunidad antes de que la enfermedad estuviese muy avanzada y por tanto fuese irreversible. Se establece, desde este momento, el principio de vacunación como opción terapéutica aplicable como luego veremos también al campo de la oncología.

La historia de la vacunación frente al cáncer es larga y controvertida, durante mucho tiempo ha estado marcada por la ausencia de bases científicas sólidas. Esta situación cambia drásticamente en la pasada década cuando se retoma el concepto de inmunovigilancia tumoral y se describen antígenos tumorales específicos para cada tipo de tumor. El concepto de inmunovigilancia tumoral ya había sido desarrollado en los años 50 por Lewis Thomas y Macfarlane Burnet, dicho concepto fue posteriormente desechado cuando no se pudo demostrar en ratones inmunodeficientes mayor facilidad para desarrollar tumores. Hace pocos años Bob Schreiber y cols., describen mayor incidencia de tumores en ratones con defectos aislados de inmunidad innata y adaptativa (15).

Sin duda, la piedra angular en el desarrollo de vacunas frente al cáncer es el descubrimiento en diversos tumores de antígenos sobreexpresados, este hallazgo

abre la posibilidad del reconocimiento del tumor por el sistema inmune y el desarrollo de una respuesta inmunológica específica. No es casualidad que la búsqueda de antígenos tumorales haya sido en los últimos años una de las líneas fundamentales de estudio en investigación sobre el cáncer. Por otro lado, la correcta valoración de la situación inmunitaria del huésped permite aproximar un pronóstico más exacto sobre el desarrollo del tumor; hoy sabemos que la infiltración por células T CD8+ en los cánceres de colon, vejiga y ovario tiene una repercusión favorable y que los niveles de interferón- γ pueden tener una fuerte relación inversa con la expresión de genes relacionados con la transformación neoplásica. Por último, destacar algunas observaciones como las referidas por William B. Coley sobre el efecto beneficioso de algunas infecciones bacterianas concomitantes sobre la reactivación del sistema inmune y el rechazo de algunos tipos de tumores. Pueden ser buenos ejemplos de ello, la respuesta observada en el cáncer de vejiga superficial al tratamiento repetido con BCG, o la observación de que la administración de anticuerpos frente al receptor de membrana CTLA-4 puede originar la regresión total de melanoma avanzado (15).

Si a priori, tuviésemos que resaltar algunas de las ventajas de la vacunación terapéutica en oncología diríamos que puede ser altamente específica para las células cancerosas y que se le supone baja toxicidad para las células sanas del huésped. Otra ventaja sería la posibilidad de reconocer y eliminar las células

cancerosas indiferentemente de la fase y ciclo celular en que se encuentren, lo que sugiere que la vacunación terapéutica podría ser un tratamiento complementario tanto de quimioterapia como de radioterapia. Además, al menos en el plano teórico, las vacunas, en virtud del desarrollo de memoria inmunológica, ejercen un efecto duradero anti-tumor, evitando la necesidad de repetidos ciclos de quimioterapia, y ofrecen la posibilidad de prevenir determinados tumores en sujetos de alto riesgo (11).

A pesar de todas estas teóricas ventajas hay que decir que la respuesta real a la vacunación terapéutica en sujetos con cáncer es, hasta el presente, menor a la teórica esperada. Existiendo una tendencia general a desarrollar tolerancia frente a los antígenos tumorales, siendo este efecto más marcado en los estadios tumorales más avanzados. Uno de los mayores problemas derivados de la utilización de antígenos tumorales como blanco para generar una respuesta antitumoral efectiva, radica en el hecho de que la gran mayoría de estos antígenos se han expresado durante el periodo fetal y han desencadenado tolerancia inmunológica en el huésped. Por tanto, a diferencia de los tratamientos tradicionales frente al cáncer, las vacunas terapéuticas son agentes biológicos que tienen por finalidad activar el sistema inmune frente a antígenos expresados por las células tumorales, con alta especificidad y habitualmente de forma segura y bien tolerada.

ENTENDIENDO LA PATOGENIA DEL CÁNCER

Hasta bien entrada la década de los 80, coexistían dos teorías que pretendían explicar la patogenia del cáncer: la teoría somática y la teoría viral. Ambas teorías fundamentadas en observaciones puntuales confluían en la existencia de alteraciones genéticas como mecanismo común a todas las células cancerosas (21).

Una serie de observaciones, darían respaldo a la teoría somática del cáncer, a saber:

- Existencia de mutaciones somáticas, que explicarían una mayor agregación neoplásica en animales de laboratorio expuestos a radiación ionizante, que se sabe altera la estructura del DNA. El desarrollo de cáncer se debe básicamente a errores en los procesos de copia y reparación del DNA celular. Dichos errores pueden resultar de la exposición de las células a la influencia de mutágenos como pueden ser las radiaciones ionizantes.

- Naturaleza clonal de los cánceres, que ratifica el hecho de que todas las células cancerosas proceden de una sola célula mutada. Esta observación tiene interés ya que en todas las células cancerosas de un mismo individuo algunos genes son deprimidos en dos vías: las células no responden a las señales inhibitorias de replicación celular, y todas las células expresan determinadas proteínas que normalmente sólo se expresaban durante la etapa fetal del desarrollo, lo que supone que determinados genes inactivos se ven activados al ponerse en marcha el desarrollo tumoral.

La observación de que determinados cánceres podían desencadenarse tras exposición a sustancias de forma crónica, sin que se pudiese demostrar la intervención de infección viral alguna, ponía en entredicho la validez de la teoría viral, a pesar de que en el laboratorio algunos virus eran claramente oncogénicos.

El programa de estudio que dio soporte a la teoría viral del cáncer data de 1964, fecha en que se aprobó destinar en el Congreso Norteamericano la suma de 549 millones de dólares al desarrollo de esta vía de estudio. Pronto se demostró que algunas citocinas en relación con las infecciones virales, como el interferón,

podían alterar el desarrollo de las células cancerosas, a la vez que comenzaron a describirse una serie de virus que de forma constante daban lugar al desarrollo de cáncer, los denominados virus oncogénicos. Al menos 4 grupos de virus se han relacionado con el desarrollo de cáncer, los dos primeros grupos están muy estrechamente relacionados: papovavirus, adenovirus, oncornavirus y herpesvirus. Sin embargo, hay un hecho que quedó patente desde el inicio de estas investigaciones: el periodo de latencia desde la infección viral hasta el desarrollo de la degeneración neoplásica dependían del huésped infectado, existían por tanto variantes individuales que modularían la respuesta tumoral. Tales diferencias se concretaron posteriormente en variaciones genéticas e inmunológicas individuales. El rasgo común de todos los virus oncogénicos es que son portadores de un oncogen que en determinadas circunstancias se tornaría activo en el huésped.

Tabla 1. Algunos tipos de oncogenos y los cánceres con que se relacionan.

Oncogen	Neoplasia
EGFR	Carcinoma espinocelular
H-RAS	Cáncer de colon, pulmón y páncreas
K-RAS	Leucemia mieloide aguda, cáncer de tiroides, melanoma
L-MYC	Cáncer de pulmón
NEU	Neuroblastoma, cáncer de mama
N-MYC	Neuroblastoma
RET	Cáncer de tiroides
SRC	Cáncer de colon
v-fos	Osteosarcoma
v-jun	Sarcoma

Si nos movemos en el terreno de la causalidad, la presencia de un oncogén es una condición necesaria para el desarrollo de cáncer, pero no suficiente. Se han descrito distintos oncogenes activos dependiendo del cáncer de que se trate.

Tiene también interés, de cara a futuros abordajes terapéuticos, el tipo de oncogen activado, ya que los marcadores tumorales expresados van a ser distintos y permiten un reconocimiento diferencial por parte del sistema inmunológico del huésped.

De igual forma que se conoce la existencia de virus oncogénicos desde la década de los 60; la descripción de efectos antitumorales por otros virus data también de esta fecha. Estos virus que se han denominado oncolíticos se replican de forma selectiva en las células cancerosas, por consiguiente su utilidad en el tratamiento del cáncer como vectores de otras terapias génicas podría resultar interesante. Las características de la transformación celular que acompaña a la degeneración neoplásica y las características del medio interno celular derivadas de un aumento de la actividad del ciclo celular constituyen un medio idóneo para la replicación de algunos virus (17). Los virus oncolíticos se consideran no patógenos o de baja patogenicidad para el hombre, se incluyen en este grupo los reovirus, virus de Newcastle y el virus de la estomatitis vesicular; en todos los casos son virus para los que el hombre no es el huésped habitual.

El propio proceso de carcinogenesis implica inestabilidad genética, las células cancerosas progresan gracias a la ventaja que les confiere un ciclo celular acelerado, pero esas mutaciones que permiten una proliferación celular acelerada resulta en muchas ocasiones en unos mecanismos de defensa antiviral alterados, expresión de receptores alterados, expresión de nuevos receptores y alteración de las vías de señalización intracelular. En vista de estos hechos, las vías que se han desarrollado para aumentar por ingeniería genética la especificidad antitumoral de los virus se han clasificado en 5 categorías:

- Defectos de la respuesta antiviral: Los mecanismos defensivos frente a las

infecciones virales se alteran en algunos tumores, es común observar un defecto en la producción de IFN- α e IFN- β que es aprovechado por algunos virus para su proliferación.

- Expresión selectiva de receptores por el tumor. La cepa Edmonton del sarampión utiliza el receptor CD46 que es sobreexpresada por algunos tumores para incorporarse a las células. En otros ensayos la hemaglutinina del sarampión ha sido alterada para actuar como ligando a algunas proteínas expresadas por la célula tumoral.

- Reconocimiento de receptores tumorales por el virus. Se han modificado adenovirus para reconocer de forma específica antígeno carcinoembrionario o alfafetoproteína y de esta forma actuar de forma lítica sobre estas células.

- Virus modificados genéticamente para replicarse en células tumorales. El ejemplo clásico lo constituye el adenovirus modificado ONYX-015; este virus ha sido diseñado para replicarse en células tumorales que no expresan la proteína p53, resultando en un aumento de la apoptosis.

- Procesado de los virus en un entorno tumoral. Por regla general, el entorno tumoral y el metabolismo celular acelerado origina un aumento de las proteasas, que aumenta la diseminación del virus.

La vía clásica de administración de los virus oncolíticos ha sido intratumoral; sin embargo, en otros estudios se han utilizado con éxito la administración intravenosa con buenos resultados. El efecto oncolítico en algunos casos ha sido la causa directa de la muerte, de forma similar a lo que acontece en los tratamientos tradicionales con quimioterapia, lo que pone en evidencia la necesidad de ajustar la dosis de virus administrada.

Además, del papel oncolítico obvio de estos virus, no debe perderse de vista que la lisis de las células tumorales origina

un entorno proinflamatorio con liberación de citokinas que favorece la respuesta inflamatoria frente al tumor.

Hasta un 10-20% de los cánceres tienen una etiología viral conocida, de forma que las medidas profilácticas encaminadas a evitar tales infecciones originarán también una disminución de la incidencia de cáncer. Son ejemplo de ello la disminución de la incidencia de carcinoma hepatocelular después de la vacunación frente a hepatitis B o la esperada disminución de la incidencia de cáncer de cérvix tras la vacunación frente al papilomavirus humano.

Los antígenos tumorales tienden a ser débilmente inmunogénicos, una vez que se ha iniciado la respuesta inmune rápidamente se induce tolerancia. La naturaleza de los antígenos tumorales determina la respuesta inmunitaria; así, las inmunoglobulinas pueden ser efectivas para eliminar células por el reconocimiento de las glicoproteínas de superficie. Este es el mecanismo utilizado por los anticuerpos monoclonales frente a CD-20 en el tratamiento de los linfomas no Hodgkin. El reconocimiento de antígenos intracelulares requiere del concurso de la inmunidad celular. El principal problema que plantea el desarrollo de estrategias inmunológicas de tratamiento frente al cáncer es el estrecho margen existente entre el ataque a las células tumorales y el desarrollo de autoinmunidad.

Otro elemento, al que hasta hace tan solo algunos años no se había prestado suficiente atención es la contribución del telómero a la carcinogénesis. Se trata de una estructura morfológica de los cromosomas de naturaleza nucleoproteica, que se corresponde con la región terminal de los cromosomas. Hace algunas décadas se definió como "material genético basura", por presuponérsele nula utilidad. El telómero ayuda a mantener la integridad estructural del cromosoma, evitando la fusión entre porciones terminales de

cromosomas contiguos, se previene de esta forma la degradación del ADN por las nucleasas; participa en el anclaje de los cromosomas a la matriz nuclear e interviene en la regulación del ciclo celular durante la meiosis y la recombinación homóloga (2).

Estructuralmente el telómero representa el final de la cadena de ADN, constituida por una repetición de nucleótidos donde predomina la guanina, en humanos el ADN telomérico está constituido por repeticiones hexaméricas de tipo TTAGGG que se repiten de 150 a 2000 veces. Esta cadena de ADN terminal se encuentra anclada a proteínas como la TRF1, TRF2 y telomerasa que le sirven a la vez de protección frente a la degradación enzimática por nucleosidasas e intervienen en la reparación del ADN.

Diversos estudios han demostrado que a lo largo de la vida celular se van perdiendo en el telómero de 10 a 200 bases por año, de forma que con el paso del tiempo los telómeros se van acortando (2). El acortamiento del telómero se ha relacionado con los procesos de envejecimiento celular, de forma que en cierta medida la longitud del telómero podría considerarse como un reloj biológico de la vida de la célula. Pero, con el acortamiento del telómero disminuye la superficie de anclaje de las proteínas estructurales que impiden la degradación del ADN, con lo que este se hace más susceptible a la degradación enzimática, favoreciéndose la aparición de fusiones entre cromosomas y mutaciones.

La telomerasa es una ribonucleoproteína que se ha involucrado en los procesos de replicación celular y elongación del telómero, de forma que las células con alta actividad celular (como las cancerosas) tienen una elevada actividad telomerasa y por el contrario durante la senescencia celular la actividad de la telomerasa se vuelve casi indetectable. Esta observación ha llevado a diseñar

estrategias para disminuir la actividad de la telomerasa y de esta forma frenar el crecimiento celular incontrolado de algunos tumores. Diversas señales intra y extracelulares como el interferón, citokinas, estrógenos, zinc o la radiación ultravioleta afectan a la actividad de la telomerasa. Otros factores transcripcionales, algunos de ellos relacionados con oncogenes como el gen *myc*, se han relacionado con aumento de la actividad telomerasa. En los seres humanos el gen hTERT encargado de la transcripción de la telomerasa se encuentra en el cromosoma 5p15.33 en una sola copia, ocupando 37kb con 16 hexones. Las enzimas de tipo proteína quinasa aumentan la actividad de la telomerasa mediante la fosforilación de la subunidad hTERT, de forma inversa la fosfatasa A2 inhibe la actividad de la telomerasa. Estas observaciones han dado pie a múltiples trabajos que plantean el control del cáncer a través de una regulación de la actividad de la telomerasa alterada. C. B. Harley (6) plantea la existencia de una longitud crítica de los telómeros a partir de la cual la célula en crecimiento y desarrollo normal llegaría a la senescencia, con una longitud crítica inferior se favorecería la aparición de mutaciones, de forma que la activación de la telomerasa llevaría a la célula a la degeneración neoplásica. Se ha propuesto el desarrollo de inhibición de la actividad telomerasa a través del desarrollo de inmunidad selectiva frente a la subunidad hTERT, para ello se han diseñado diversos vectores plasmídicos que integran esta cadena de ADN para inmunización terapéutica de sujetos con cáncer.

La actividad de la telomerasa se ha intentado controlar inhibiendo directamente la actividad enzimática, pertenecen a este grupo los análogos de los nucleósidos como la azidotimidina (AZT) con actividad sobre la transcriptasa inversa que la convierte útil en las infecciones por retrovirus. Otro grupo de sustancias, como los L-enantiómeros poseen potente actividad inhibidora de la telomerasa.

CÁNCER Y RESPUESTA INMUNE

Un aspecto desconocido hasta hace pocos años es por qué los intentos de inmunizar frente a antígenos tumorales a los pacientes con cáncer originaban respuestas de menor intensidad a la esperada, o no producían respuesta inmune alguna. La clave de este dilema parece estar en una célula conocida desde hace varias décadas, aunque hasta hace poco no se ha relacionado con los mecanismos de tolerancia inmunológica, estas células se denominan *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC).

Las vacunas terapéuticas frente al cáncer, utilizadas como monoterapia han mostrado tan sólo mínimos efectos clínicos, tal vez debido al hecho de que las células tumorales producen moléculas inmunoregulatoras capaces de anergizar los linfocitos T. Además, la expresión de los antígenos de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) puede reducirse, limitando el efecto de los linfocitos T citotóxicos frente a las células tumorales. Por otro lado, aspectos como la vasculatura, arquitectura y presión intersticial en la masa tumoral van a influir en la penetración de los linfocitos T en el tumor; por este motivo algunos autores sostienen que las vacunas terapéuticas tendrían sobre todo valor como adyuvantes de los tratamientos convencionales del cáncer.

En los pacientes con cáncer existe un número aumentado de las células MDSC y parecen estar relacionado con el crecimiento del tumor o con el fracaso de la inmunoterapia. Este tipo células, que se conocen desde la década de los 70, se encuentran también aumentadas en los pacientes con inflamación crónica, de forma que las células MDSC podrían convertirse en el nexo de unión entre los procesos inflamatorios crónicos y la carcinogénesis. J. Marx (13), revisa el estado actual del conocimiento de las células MDSC y sostiene que este tipo celular se podría relacionar con los fracasos

de sensibilización frente a antígenos tumorales en los ensayos vacunales y hasta cierto punto serían responsables de la tolerancia desarrollada frente a tales antígenos. Como opción terapéutica se ha sugerido la utilización de sustancias que promueven la maduración de las formas mieloides inmaduras hacia formas maduras. Esta estrategia ha sido utilizada con éxito en la leucemia mieloide promielocítica, el ácido transretinoico se utiliza con este fin. Otros investigadores han relacionado el papel regulador de los linfocitos T con la disponibilidad del aminoácido arginina en el plasma, de hecho en las situaciones de sepsis y estados postraumáticos donde se hace patente cierta inmunosupresión se detectan niveles bajos de arginina en sangre; se ha visto así, que las células MDSC contienen arginasa y óxido nítrico sintetasa, enzimas que como se sabe metabolizan la arginina. Ensayos realizados en el ratón demuestran que el tratamiento con inhibidores de la arginasa disminuyen el crecimiento de tumores de pulmón en el ratón. La utilización de sildenafil (Viagra®) disminuye la producción de arginasa y óxido nítrico sintetasa en las células MDSC y en consecuencia parece mejorar la respuesta de los linfocitos T. Las células MDSC promueven la actividad de los macrófagos tipo 2, responsables del mantenimiento de la respuesta inflamatoria a través de la secreción de IL-10; así como la actividad de los macrófagos tipo 1, responsables de promover la respuesta de los linfocitos T-Killer.

Una proteína liberada por las células MDSC denominada factor de crecimiento endotelial garantiza el crecimiento y vascularización del tumor, el factor de crecimiento endotelial se encuentra también aumentado en las situaciones de inflamación crónica. La secreción de factor de crecimiento vascular requiere la presencia del enzima 9-metaloproteinasa, estudios preliminares indican que la inhibición de esta enzima mejorara la respuesta de las vacunas frente al tumor.

Estos hallazgos implican a otras rutas metabólicas, de hecho un mediador inflamatorio como es la prostaglandina E2 estimula la producción de arginasa, lo que explicaría como los inhibidores de la COX2 y antiinflamatorios tienen efectos protectores en diversos tipos de cáncer, en especial en el carcinoma de colon.

La especificidad de la respuesta inmune a un antígeno está determinada por el reconocimiento del antígeno en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad en la membrana citoplasmática de las células presentadoras de antígeno. Sin embargo, la inducción de una completa respuesta de las células T requiere una segunda señal expresada por las células presentadoras de antígeno y mediada por las moléculas coestimuladoras. Las moléculas coestimuladoras mas frecuentemente expresadas son el CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2). Estas moléculas coestimuladoras tienen como ligandos las moléculas CD28 y CTLA-4, expresadas en la superficie de los linfocitos T CD4+ y CD8+. El reconocimiento conjunto del antígeno y de la molécula coestimuladora, son necesarias para que el linfocito T proliferare e inicie sus funciones efectoras como la producción de interleukinas. La caracterización de las relaciones entre CD80 y CD86 con CD28 y CTLA-4 han permitido definir el sentido de la respuesta efectora, en el sentido de que la unión de CD80 o CD86 con CD28 del linfocito, induce activación tanto de células CD4+ como CD8+. Por el contrario, su unión con CTLA-4 induce inhibición de la respuesta proliferativa de las células T e induce tolerancia. Este hecho explica la observación de que los ratones genéticamente deficientes en CTLA-4 muestran excesiva proliferación de células T y frecuentemente desarrollan una enfermedad linfoproliferativa a las pocas semanas de nacer (16).

La reedición en nuestros días del modelo de inmunovigilancia, unido a la observación de que algunos cánceres

humanos evolucionan mejor cuando se comprueba una histología tumoral compatible con infiltración linfocitaria, ha provocado que se depositen renovadas esperanzas de tratamiento del cáncer mediante la inmunoterapia. Uno de los mecanismos propuestos para aumentar la respuesta inmunitaria frente a los antígenos tumorales ha sido el bloqueo o inhibición de los mecanismos reguladores inhibitorios de tal respuesta. Dado que los receptores CTLA-4 originan inhibición de la respuesta inmune e inmunotolerancia se ha desarrollado la hipótesis de que la utilización de anticuerpos monoclonales frente a CTLA-4 puede inducir un aumento de la respuesta inmune y eliminación de la inmunotolerancia frente a los antígenos tumorales. Tanto los estudios preclínicos como los ensayos clínicos realizados en humanos han demostrado que la administración de anti-CTLA-4 es insuficiente utilizada como monoterapia; sin embargo, se han obtenido resultados esperanzadores en el tratamiento del melanoma avanzado utilizado anti-CTLA-4 en combinación con quimioterapia o en combinación con una vacuna con un lisado peptídico del melanoma. En el momento actual se han desarrollado 2 anticuerpos monoclonales frente a CTLA-4 y que se han denominado en los ensayos clínicos realizados hasta la fecha como MDX-010 y CP-675,206.

TIPOS DE VACUNAS FRENTE AL CÁNCER

Los estudios preclínicos que se han realizado tanto en modelos animales como en el hombre, pretenden evaluar la utilidad de las vacunas terapéuticas en el tratamiento del cáncer. Las diversas formulaciones incluyen la elaboración de **vacunas de células tumorales** con:

- Transfección de genes de IL-2, IL-7, IL-12, GM-CSF e INF- α .
- Transfección de genes del HMC clase I.

- Transfección de genes de moléculas coestimuladoras (B7.1 y B7.2) de la activación T.

- Oncolisados virales. Infección de células con virus de vaccinia modificado.

- Proteínas de shock térmico (HSP) extraídas de tumores autólogos.

- Células tumorales administradas conjuntamente con el bacilo de Calmet-Guerin.

De todos estos planteamientos emergen dos puntos fundamentales: la vacunación terapéutica origina un beneficio para el huésped, estimando tal beneficio como rechazo del tumor, estabilización del crecimiento del tumor y mejora del tiempo de supervivencia. En segundo lugar, la eficacia es mayor para la enfermedad poco evolucionada que para la enfermedad en estadios terminales.

Los estudios clínicos indican que las vacunas terapéuticas en oncología son habitualmente seguras y bien toleradas. J. Stebbing y cols. (19), revisan el estado actual de la evidencia sobre la utilidad de las vacunas terapéuticas en el cáncer. Varias décadas de investigación en este campo permiten en el momento actual disponer de algunas evidencias que merece la pena considerar.

Vacunas de Ag purificados no proteicos (vacunas de carbohidratos, mucinas, o gangliósidos). Son vacunas basadas en antígenos no proteicos, se han utilizado como antígeno el gangliósido GM2 purificado y administrándolo por la vía subcutánea, solo o combinado con diferentes adyuvantes, a pacientes con melanoma en estadio III ó IV. El gangliósido solo no resulta inmunogénico, unido covalentemente a KLH o asociado con BCG muestra una inmunogenicidad moderada y cuando se administra conjugado con KLH en compañía de la saponina QS-21 como adyuvante, resulta un inmunógeno potente (vacuna GM2-KLH-QS21 en melanoma + INF alfa) (19).

Vacunas de proteínas/péptidos específicos. El péptido o proteína puede administrarse purificado o sintetizado formando parte del preparado vacunal o puede inducirse la síntesis del péptido o antígeno tumoral dentro de la célula blanco (transfección). La mayoría de los antígenos tumorales sobre los que se ha desarrollado experimentación activa son el antígeno carcinoembrionario (CEA) y el antígeno prostático específico (PSA). El CEA es una glicoproteína de 180.000 d, de homoadhesión, implicada por tanto en los procesos metastásicos. El CEA se sobreexpresa en mas del 95% de los carcinomas pancreáticos, colorrectales y gástricos; en mas del 70% de los carcinomas de pulmón de células pequeñas y en el 50% de los carcinomas de mama. Esta diferente sobreexpresión en el tejido tumoral, puede constituir una ventaja terapéutica para el diseño de vacunas dirigidas frente al CEA.

Vacunas de vectores virales. Con esta estrategia se pueden liberar antígenos tumorales y activar el sistema inmune. El mayor inconveniente deriva de la existencia de inmunidad específica previa frente al virus vector, ya que se puede bloquear el proceso. Los virus vaccinia recombinante desencadenan respuestas inmunes hasta 2 veces más potentes que los virus de la viruela de las aves, que en consecuencia se han propuesto como vectores en las dosis *booster* (8).

La utilización de un vector viral u otro deriva de la cantidad de DNA extraño que admite cada virus; así un poxvirus, como puede ser el virus de la viruela de las aves, puede admitir hasta 30 kB de DNA extraño; otros virus que se han utilizado son los adenovirus que admiten cadenas de DNA de menor tamaño. Una vez preparados, los poxvirus recombinantes son estables a -20º-70º durante varios años. La utilización de diferentes vectores virales es una opción para desencadenar respuestas inmunitarias más intensas y duraderas frente a antígenos tumorales. La

figura reproduce la respuesta inmunitaria a una dosis *booster* de un antígeno utilizando el mismo vector viral y la respuesta cuando se utilizan vectores virales diferentes (1).

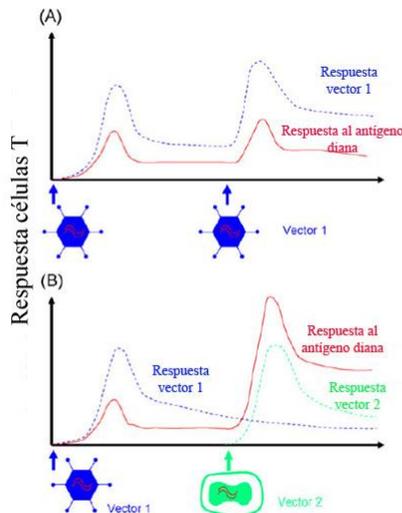


Figura 1. Los virus *vaccinia* recombinante desencadenan respuestas inmunes hasta 2 veces más potentes que los virus de la viruela de las aves, que en consecuencia se han propuesto como vectores en las dosis *booster* (1).

Vacunas de DNA. Constituidas por plásmidos en los que inserta la información genética relativa a la síntesis de Ag tumorales y moléculas coestimuladoras (vacunas de DNA de fusión). En la actualidad se desarrollan nuevas estrategias para este tipo de vacunas a través de la fusión de genes (8).

- Vacunas con plásmidos DNA. Tienen la ventaja de su seguridad, simplicidad y escasa manipulación. Estas vacunas contienen la secuencia de CpG en la cadena del plásmido que estimula la inmunidad innata.

- Vacunas DNA de fusión. El plásmido admite incorporar en su cadena genes de otras proteínas y amplificar la respuesta inmune. Se han obtenido buenas respuestas en el linfoma de células B, utilizando genes de la región variable de inmunoglobulinas del linfoma folicular unidas a secuencias derivadas de la toxina tetánica.

Vacuna de células. Estas vacunas parecen ser muy efectivas para la generación de una respuesta celular específica contra el tumor. Al incubar células dendríticas con el antígeno tumoral y posteriormente administrarlas en el huésped, los antígenos se incorporan a las moléculas del MHC o son sintetizados en el citoplasma entrando en la ruta de presentación antigénica de MHC clase I. Por tanto, el uso de células dendríticas en preparaciones vacunales constituye un arma importante en la inmunidad antitumoral.

Las células dendríticas son células especializadas en la captura y procesamiento de antígenos *in vivo*, convirtiendo péptidos y proteínas que son presentados conjuntamente con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y reconocidos por las células T. La importancia de estas células deriva de la prominente expresión de moléculas coestimuladoras y de adhesión necesarias para la activación de los linfocitos T. Varios aspectos deben tenerse en cuenta:

- Utilización de células dendríticas autólogas activadas con proteínas, aminoácidos o RNA del tumor, con efectos clínicos diferentes.

Las células dendríticas de individuos sanos pueden tener mayor actividad funcional que las células dendríticas de individuos con cáncer y reconocer de forma más eficaz los antígenos tumorales.

Las células dendríticas, originariamente ubicadas en dermis y submucosa, migran a las áreas de los ganglios linfáticos con mayor densidad de células T, de su interacción resulta selección clonal del linfocito T. Las células dendríticas reaccionan con un receptor específico del linfocito T, existen billones de linfocitos T con receptores antigénicos diferentes, resultado de la combinación aleatoria de sus moléculas. Mediante la

selección clonal las células dendríticas pueden modular muchas y diferentes respuestas en los linfocitos T. Una vez seleccionado el antígeno por las células T, tiene lugar una expansión clonal a un ritmo de 2-3 ciclos celulares por día.

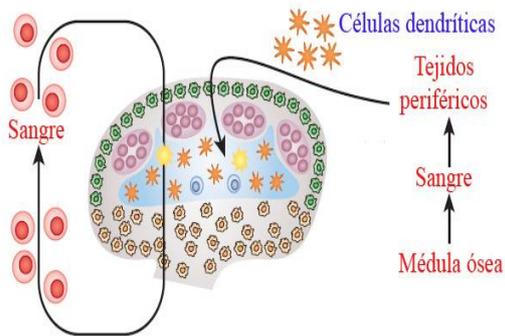


Figura 2. Esquema de la circulación de las células dendríticas.

Los clones de células T también son susceptibles de ser eliminados o bloqueados por acción de las células dendríticas tolerogénas (20). Algunos tumores a través de la producción de IL-6 like, factor de crecimiento endotelial vascular e IL-10, suprimen a las células dendríticas a través de la señal STAT3, de esta forma las células tumorales se libran de la respuesta inmunitaria que conduciría la erradicación del tumor. Aunque este campo de tratamiento esta poco desarrollado hasta el presente, las observaciones derivadas del terreno experimental demuestran que las células dendríticas pueden tener un papel destacado en la prevención y tratamiento del cáncer por varias razones:

- Los tumores tienen multitud de potenciales antígenos que podrían ser presentados por las células dendríticas y desencadenar una respuesta inmunitaria específica.

- Las células dendríticas pueden activar y potenciar las diferentes ramas de respuesta mediada por células como son las células natural killer, NKT, $\gamma\delta T$ y $\alpha\beta T$, cada una de ellas reconoce diferentes alteraciones en las células tumorales.

- Las células dendríticas generadas *in vitro* de progenitores sanguíneos, probablemente mantengan su capacidad inmunizante en los pacientes con cáncer.

En la actualidad existen dos tratamientos que utilizan células dendríticas en el tratamiento del cáncer:

1. Las células dendríticas generadas *in vitro* se mezclan con antígenos tumorales y se inyectan en el torrente sanguíneo, desde aquí las células dendríticas migran a los órganos linfoides del huésped donde desencadenan potentes reacciones inmunológicas frente a las células tumorales.

2. Otra posibilidad de tratamiento contempla la movilización de células dendríticas del paciente hacia el tumor y a los ganglios linfáticos. Algunos ensayos realizados en el ratón utilizan células tumorales irradiadas que se inyectan intravenosamente con el objeto de que las células dendríticas capten antígenos tumorales y estimulen la proliferación clonal de linfocitos frente a tales antígenos.

El desarrollo de tolerancia inmune es debido a que los antígenos tumorales son presentados al sistema inmune en ausencia de señales coestimuladoras adecuadas. Uno de los aspectos más novedosos del tratamiento del cáncer mediante inmunoterapia consisten revertir este proceso de anergia mediante la creación de hibridomas entre células tumorales y células dendríticas. Esta estrategia, es útil para crear linfocitos T policlonales que respondan a múltiples antígenos tumorales con lo que aumenta la posibilidad de eliminación del tumor. Por otro lado, la presentación de varios determinantes antigénicos a la vez disminuye el riesgo de aparición de variantes del tumor resistentes (8).

Un ensayo muy ilustrativo es el desarrollado por Kass E. y cols. (10); estos

autores utilizan ratones transgénicos capaces de producir antígeno carcinoembrionario (CEA). Los intentos de inmunización directa con CEA no originan ninguna respuesta de autoinmunidad frente al CEA; sin embargo, la utilización del virus vaccinia como vector viral y una vacuna DNA de fusión con moléculas coestimuladoras origina una respuesta inmunitaria frente a CEA.

Vacunas anti-idiotipo. Un idiotipo es el conjunto de determinantes antigénicos que expresa cada molécula de inmunoglobulina, determinado por la estructura de sus regiones variables. Estos anticuerpos pueden tener capacidad de mimetizar antígenos asociados al tumor.

VACUNAS TERAPÉUTICAS EN DESARROLLO

Enomoto Y y cols. (3), publican este trabajo que evalúan el efecto sobre el tamaño tumoral de las células dendríticas de fusión con expresión de antígenos tumorales. Para ello se induce un adenocarcinoma en ratones transgénicos MUC-1 inoculándolos con la línea células de adenocarcinoma MC38.

Se prepara un extracto de lisado tumoral purificado en una columna de agarosa, que se utiliza

a) Para inocular a los ratones afectados.

b) Se incuban con células dendríticas autólogas, obtenidas de la médula ósea de los ratones, observándose su maduración y se inoculan a los ratones.

Los autores determinan la disminución del tamaño tumoral que es significativamente mayor en los ratones inoculados con lisado purificado de células tumorales e incubado con células dendríticas.

Otra evidencia disponible la extraemos de E. J. Small y cols. (18) en ella

se hace referencia al tratamiento con células dendríticas sensibilizadas con PSA (Sipeleucel-T) del cáncer de próstata no andrógeno dependiente en 129 pacientes con metástasis, reclutados en 19 centros hospitalarios de USA. El tiempo medio de supervivencia fue de 25.9 meses para los pacientes que reciben Sipeleucel-T, frente a 21.4 meses de los que reciben placebo, lo que supone un tiempo medio de supervivencia significativamente mayor en los pacientes tratados con inmunoterapia.

Las células dendríticas de individuos sanos pueden tener mayor actividad funcional que las células dendríticas de individuos con cáncer y reconocer de forma más eficaz los antígenos tumorales. Diversos modelos de cáncer animal se utilizan como aproximación al comportamiento de algunos cánceres en humanos. Como ejemplo de ello H. Tamai y cols. (22); publican un estudio donde se inocula al ratón Balb/c con 0.05×10^7 células de una línea celular purificada de cáncer de mama (4T1) procedentes de este tipo de ratón, de esta forma los ratones desarrollan metástasis tumorales en pulmón, hígado o cerebro. Se seleccionan procedentes de punción de médula ósea del ratón células dendríticas que se extraen por selección negativa con anticuerpos monoclonales frente a linfocitos T y B, con cultivo celular en presencia de factor estimulantes de colonias de granulocito macrófagos (GM-CSF) e interleukina 4 (IL-4). Las células dendríticas se incuban además con la línea tumoral 4T1 y se procede a la fusión celular aplicando una corriente continua de 180 v/cm durante 10 sg. Los autores observan que el número de células de fusión inoculadas al ratón es proporcional a la respuesta clínica de eliminación de las metástasis experimentalmente inducida (22).

Otros estudios han evaluado la utilidad de la infusión de células tumorales autólogas en sujetos con cáncer renal no metastásico. En el ensayo publicado por D. Jocham y cols. (9) reclutan 558 pacientes

sometidos a nefrectomía radical tras carcinoma renal, que se aleatorizan antes de realizar cirugía para recibir inmunoterapia consistente en 6 inyecciones subdérmicas a intervalos de 4 semanas o no tratamiento. Los autores evalúan el riesgo de progresión del cáncer o el éxitus. Tras la cirugía se extrae de cada paciente una muestra de 10 g del tejido tumoral que se transporta al laboratorio de referencia en medio de cultivo celular. En el laboratorio las células se separan por gradiente de densidad y se incuban con interferon- γ para mejorar la expresión de MHC-II, finalmente se preparan alícuotas de 1 ml conteniendo una densidad celular de 5×10^6 células. El riesgo de progresión del tumor a los 5 años fue de 77.4% vs 67.8% respectivamente en los pacientes que no recibieron inmunoterapia y en los que la recibieron.

C. A. Uyl-de Groot y cols. (23) publican un ensayo multicéntrico realizado en pacientes con cáncer de colon en estadios II y III a los que se les administra inmunoterapia activa con células tumorales autólogas más el bacilo de Calmet-Guerin (BCG) como inmunomodulador (OncoVax). Hay que recordar que el cáncer de colon es la segunda causa de cáncer más frecuente en USA, aumentando su riesgo de forma significativa a partir de los 40 años y duplicándose a partir de los 55 años. Este ensayo clínico recluta a 254 pacientes con cáncer de colon en estadio II y III; a los pacientes después de realizarse cirugía electiva, se les asigna de forma aleatoria tratamiento con OncoVax o no tratamiento. El tratamiento con OncoVax se administra a los 25 días después de cirugía y otra dosis una semana más tarde, la dosis equivale a 10^7 células tumorales irradiadas y 10^7 células de BCG. A las 3 semanas y a los 6 meses los pacientes reciben una dosis por vía intradérmica de 10^7 células tumorales irradiadas sin BCG. Las dosis de vacuna se administran en cada una de las 4 dosis en puntos distantes. Los pacientes tratados con OncoVax en estadio II tienen un riesgo de recurrencia

significativamente menor 79% vs 62% (RR: 0.49; IC 95%: 0.27-0.89), los pacientes con cáncer de colon en estadio III presentan un riesgo de recurrencia tras tratamiento con OncoVax similar al grupo control (RR: 1.05; IC 95%: 0.55-2.07). La supervivencia a los 5 años es significativamente mayor en los pacientes tratados con OncoVax en estadio II; sin embargo, cuando ampliamos el periodo de seguimiento a 5-10 años estas diferencias no son estadísticamente significativas (RR: 0.54; IC 95%: 0.27-1.07).

El trabajo de JL Marshal y cols. (12), es un ejemplo de la utilización de todas las posibilidades en su conjunto en una sola terapia. Se incluyen pacientes con altos niveles de CEA en suero a consecuencia de tumores metastásicos de diferente origen, todos ellos con el rasgo común de producir CEA. En todos los casos los pacientes reciben 6 dosis de vacuna a intervalos de 1 mes. Se utilizan de forma varios vectores virales para reforzar la respuesta frente a los antígenos tumorales (CEA). Se asocia una dosis de Factor estimulante de colonias GM, observándose un aumento de la supervivencia.

El PSA es una proteína relacionada con las calicreinas, una serina proteasa que se sobreexpresa en las células de los acini y túbulos de la glándula prostática tumoral, circunstancia que lo convierte en blanco ideal para los intentos de inmunoterapia frente al tumor. En diversos estudios se ha observado que una disminución del PSA mayor del 50% de los valores previos a tratamiento se asocia con mejor pronóstico, lo que lo convierte en un buen marcador de la evolución del tumor. B. Hildenbrand, y Cols. (7), publican un ensayo clínico donde a 50 pacientes con cáncer de próstata refractario a tratamiento hormonal confirmado histológicamente se les administra tratamiento inmunoterápico con células dendríticas autólogas sensibilizadas con PSA-1, PSA-2 y PSA-3. Se administra una dosis de $50 \text{ mcg/m}^2 \text{ sc}$ de interferón- γ seguido por tres dosis administradas por

vía subdérmica de 2×10^6 células dendríticas en puntos anatómicos distintos a intervalos de 3 semanas. Los autores confirman que esta pauta es bien tolerada y se confirma la regresión y necrosis de los ganglios linfáticos metastásicos paraaórticos.

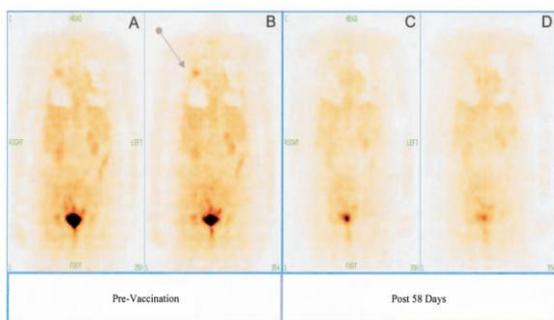


Figura 3. Se muestra un PET de un paciente antes de recibir la vacunación y 2 meses después, se aprecia una atenuación de la lesión metastásica pulmonar (12).

Mathevet P, y cols. (14) desarrollan una vacuna DNA que contiene codificación de los antígenos E6 y E7 del papilomavirus humano (HPV) tipo 16, que se sabe se relaciona con el desarrollo de cáncer de cuello uterino, junto los genes responsables de la codificación de IL-2, tal y como veíamos en las vacunas DNA de fusión y utilizan un virus aviar como vector viral. Se seleccionan 31 mujeres con lesiones CIN 2/3 (lesiones precancerosas de moderado, alto grado) que se aleatorizan en dos grupos para ensayar dos dosis diferentes de vacuna (5×10^6 y 5×10^7 pfu de MVA-E6/7-IL-2). Tras la vacunación se realiza conización como opción terapéutica a las 6 semanas y se evalúa el estado de las lesiones. En el 33.3% de las pacientes tratadas con bajas dosis y en un 43.7% de las mujeres tratadas con altas dosis se observa regresión de las lesiones CIN.

La resistencia a los citostáticos representa una de las principales causas del fallo de la quimioterapia en el tratamiento del cáncer. Dicha resistencia a

las líneas celulares tumorales puede ser intrínseca o adquirida en el transcurso de la quimioterapia; para evitarla, muchas pautas quimioterápicas han asociado además de nuevos quimioterápicos, la combinación de varios de ellos, mejorando espectacularmente los resultados. En otros casos se ha propuesto utilizar la inmunoterapia como mecanismo para regular la resistencia a la quimioterapia en el transcurso del tratamiento de muchos tumores (11). Las ventajas que a priori podrían destacarse de la utilización de vacunas terapéuticas en el cáncer son:

- Son altamente específicas para las células cancerosas por los que a priori puede suponerse baja toxicidad para las células no cancerosas.
- Reconocen y eliminan las células cancerosas indiferentemente de la fase y ciclo celular.
- Los tumores que desarrollan resistencia a la quimioterapia podrían ser convenientemente tratados con inmunoterapia.
- Las vacunas, en virtud del desarrollo de memoria inmunológica, ejercen un efecto duradero anti-tumor, evitando la necesidad de repetidos ciclos de quimioterapia.
- Ofrece la posibilidad de prevenir determinados tumores en sujetos de alto riesgo.

Vacunas y radioterapia. La radioterapia es el estándar para la mayoría de los cánceres, utilizada tanto como tratamiento como con fines paliativos. Debido a la propia toxicidad de la radiación algunos tumores no pueden recibir más que dosis subletales de radiación, sin embargo con esta dosis de radiación se modulan gran cantidad de genes resultando en alteraciones fenotípicas de las células tumorales que las hacen más fácilmente reconocibles y eliminables por los linfocitos T.

Uno de los mecanismos por los que el tumor puede escapar a la destrucción por las células del sistema inmune es la menor expresión de los antígenos del sistema mayor de histocompatibilidad. La administración de dosis subletales de radiación a un tumor puede modular la expresión de muchos genes, modificando sustancialmente la expresión antigénica del tumor, haciéndolo más fácilmente reconocible por las células del sistema inmune. El ensayo publicado por J. L. Gulley, y cols. (4), fue el primero que combinó el tratamiento con vacuna terapéutica frente al cáncer y radioterapia, comparando los resultados de respuesta de linfocitos T PSA específicos. En este ensayo los pacientes con carcinoma de próstata se agrupan en dos ramas de tratamiento, en una rama se administra radioterapia locoregional (n=11) y en otra rama radioterapia + Vacuna (n=90). La inmunización incluye una primovacuna que utiliza como vector virus recombinante de vaccinia que incorpora los genes de la molécula completa de PSA y virus de la vaccinia con los genes de la molécula coestimuladora B7.1; posteriormente se administran 6 dosis *booster* mensuales utilizando como vector el virus de la viruela del pollo (fowlpox) que incorpora por recombinación genética los genes de la molécula completa de PSA. Los autores observan que los pacientes que reciben el tratamiento combinado tienen respuestas de células T específicas para el PSA, evaluadas mediante prick test (test cutáneo) 3 veces mayores que los que reciben radioterapia sola.

Vacunas y quimioterapia. Algunos fármacos quimioterápicos pueden modular la expresión de los antígenos tumorales. El 5-fluoruracilo regula la expresión del antígeno carcinoembrionario y MHC-I. En un modelo experimental de melanoma, la inyección intratumoral de ciclofosfamida y células dendríticas (presentadoras de antígeno) consigue la erradicación del tumor y en modelos preclínicos experimentales los quimioterápicos

ciclofosfamida, doxorubicina, paclitaxel aumentan la respuesta inmune antitumoral. La quimioterapia parece tener un efecto depresor sobre los linfocitos T reguladores (CD4/CD25) que se han encontrado aumentados en los pacientes con cáncer. La depleción de los linfocitos T reguladores a través de la quimioterapia podría mejorar la actividad de las vacunas terapéuticas frente al cáncer. Sin embargo, la combinación de quimioterapia con vacunas terapéuticas tendría su mayor utilidad en las fases terminales de la enfermedad, en las fases más precoces del cáncer el sistema inmunológico es todavía altamente funcional y las vacunas pueden ser efectivas como monoterapia. Además, no todos los quimioterápicos pueden ser compatibles con la vacunación. Evidentemente son precisos estudios que aclaren estos puntos.

El glioblastoma multiforme es uno de los cánceres cerebrales más letales. A pesar de las mejoras en las técnicas de cirugía, radioterapia y quimioterapia, su pronóstico no ha mejorado sustancialmente en las últimas décadas. Diversos estudios sugieren que el glioblastoma es infiltrado por linfocitos T citotóxicos y macrófagos, que son ineficaces para eliminar el tumor. Estudios recientes demuestran que la inmunoterapia con células dendríticas del paciente sensibilizadas con péptidos del tumor pueden mejorar los resultados terapéuticos obtenidos con quimioterapia. Para mejorar los resultados obtenidos con la inmunoterapia es fundamental que las células tumorales aumenten la expresión de antígenos que las células del sistema inmune van a reconocer y utilizar para marcar y destruir las células del tumor. La mayoría de las células tumorales, también las del glioblastoma, no expresan los antígenos de histocompatibilidad de clase II, por ello la respuesta inmune antitumoral es desarrollada a través de los linfocitos T CD8, a través del HLA de tipo I. El interferón- γ puede regular la activación crecimiento y diferenciación de los

linfocitos B, linfocitos T, células NK, células endoteliales, macrófagos y fibroblastos. De igual forma, el interferón- γ que puede inducir un aumento de la expresión de HLA de tipo II en una variedad de células, incluyendo las células del glioblastoma; y dependiendo de la dosis podría inducir apoptosis en las células tumorales. Se sabe que los tumores malignos producen una variedad de citocinas como la IL-4, IL-10 y el factor de crecimiento tumoral que inhiben las respuestas inmunes antitumorales a través de la inhibición funcional de las células dendríticas, esta situación puede ser revertida en parte con la utilización de interferón- γ .

El ácido transretinoico es un modulador de algunos procesos biológicos, suprime la proliferación celular e induce la diferenciación y maduración celular; estas acciones han llevado a ensayarlo en el tratamiento de algunos tumores de células muy indiferenciadas como la leucemia promielocítica. En las células tumorales el ácido transretinoico origina un aumento de los niveles de proteínas p21, p27 y p53, deteniendo el ciclo celular en la fase G1. El tratamiento con ácido transretinoico origina un aumento de la sensibilidad de los tumores al efecto citotóxico mediado por linfocitos y células NK. En A. Haque y cols. (5), se exponen los beneficios de la utilización combinada de interferón- γ y ácido transretinoico en el tratamiento del glioblastoma.

REFERENCIAS

1. Anderson RJ and Schneider J: Plasmid DNA and viral vector-based vaccines for the treatment of cancer. *Vaccine* 2007, 25 Suppl 2: B24-B34.
2. Arvelo, F. and Morales, A. Telómero, telomerasa y cáncer. *Acta Cient Venez.* 55, 288-303. 2004.
3. Enomoto Y, Bharti A, Khaleque AA, Song B, Liu C, Apostolopoulos V, Xing PX, Calderwood SK, and Gong J: Enhanced immunogenicity of heat shock protein 70 peptide complexes from dendritic cell-tumor fusion cells. *J Immunol* 2006, 177: 5946-5955.
4. Gulley JL, Arlen PM, Bastian A, Morin S, Marte J, Beetham P, Tsang KY, Yokokawa J, Hodge JW, Menard C, Camphausen K, Coleman CN, Sullivan F, Steinberg SM, Schlom J, and Dahut W: Combining a recombinant cancer vaccine with standard definitive radiotherapy in patients with localized prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005, 11: 3353-3362.
5. Haque A, Banik NL, and Ray SK: Emerging role of combination of all-trans retinoic acid and interferon-gamma as chemoimmunotherapy in the management of human glioblastoma. *Neurochem Res* 2007, 32: 2203-2209.
6. Harley CB: Telomerase and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2008, 8: 167-179.
7. Hildenbrand B, Sauer B, Kalis O, Stoll C, Freudenberg MA, Niedermann G, Giesler JM, Juttner E, Peters JH, Haring B, Leo R, Unger C, and Azemar M: Immunotherapy of patients with hormone-refractory prostate carcinoma pre-treated with interferon-gamma and vaccinated with autologous PSA-peptide loaded dendritic cells--a pilot study. *Prostate* 2007, 67: 500-508.
8. Hodge JW, Greiner JW, Tsang KY, Sabzevari H, Kudo-Saito C, Grosenbach DW, Gulley JL, Arlen PM, Marshall JL, Panicali D, and Schlom J: Costimulatory molecules as adjuvants for immunotherapy. *Front Biosci* 2006, 11: 788-803.
9. Jocham D, Richter A, Hoffmann L, Iwig K, Fahlenkamp D, Zakrzewski G, Schmitt E, Dannenberg T, Lehmacher W,

von WJ, and Doehn C: Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomised controlled trial. *Lancet* 2004, 363: 594-599.

10. Kass, E., Schlom, J., Thompson, J., Guadagni, F., Graziano, P., and Greiner, J. W. Induction of protective host immunity to carcinoembryonic antigen (CEA), a selfantigen in CEA transgenic mice, by immunizing with a recombinant vaccinia-CEA virus. *Cancer Research* 59, 676-683. 1999.

11. Liu G and Yu JS: Cancer vaccines: a novel strategy to sensitize malignant glioma to chemotherapy. *Expert Rev Neurother* 2007, 7: 1235-1237.

12. Marshall JL, Gulley JL, Arlen PM, Beetham PK, Tsang KY, Slack R, Hodge JW, Doren S, Grosenbach DW, Hwang J, Fox E, Odogwu L, Park S, Panicali D, and Schlom J: Phase I study of sequential vaccinations with fowlpox-CEA(6D)-TRICOM alone and sequentially with vaccinia-CEA(6D)-TRICOM, with and without granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, in patients with carcinoembryonic antigen-expressing carcinomas. *J Clin Oncol* 2005, 23: 720-731.

13. Marx J: Cancer immunology. Cancer's bulwark against immune attack: MDS cells. *Science* 2008, 319: 154-156.

14. Mathevet, P., Bory, JP, Huynh, B., Bonnier, P., LÉcuru, F., and Riethmuller, D. Phase II study of MVA expressing E6 and E7 of HPV16 in patients with CIN2/3. 2004. 7th Annual Meeting, American Society of Gene Therapy.

15. Old LJ: Cancer vaccines: an overview. *Cancer Immun* 2008, 8 Suppl 1: 1.

16. Peggs KS, Quezada SA, Korman AJ, and Allison JP: Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2006, 18: 206-213.

17. Prestwich, Robin J., Errington, F., Harrington, Kevin J., Pandha, Hardev S., Selby, Peter, and Melcher, A. Oncolytic Viruses: Do They Have a Role in Anti-Cancer Therapy? *Clinical Medicine: Oncology* 2, 83-96. 2008.

18. Small EJ, Schellhammer PF, Higano CS, Redfern CH, Nemunaitis JJ, Valone FH, Verjee SS, Jones LA, and Hershberg RM: Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. *J Clin Oncol* 2006, 24: 3089-3094.

19. Stebbing J, Wood C, Atkins M, Bukowski R, Litwin S, Bower M, Parsa A, and Levitsky H: Cancer vaccines: Clinical development challenges and proposed regulatory approaches for patient access to promising treatments. *Cancer* 2008, 112: 955-961.

20. Steinman RM and Banchereau J: Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 2007, 449: 419-426.

21. T-W-Fiennes RN: Infectious cancers of animals and man. London Academic Press, 1982.

22. Tamai H, Watanabe S, Zheng R, Deguchi K, Cohen PA, Koski GK, and Shu S: Effective treatment of spontaneous metastases derived from a poorly immunogenic murine mammary carcinoma by combined dendritic-tumor hybrid vaccination and adoptive transfer of sensitized T cells. *Clin Immunol* 2008, in press.

23. Uyl-de Groot CA, Vermorken JB, Hanna MG, Jr., Verboom P, Groot MT,

Bonsel GJ, Meijer CJ, and Pinedo HM: Immunotherapy with autologous tumor cell-BCG vaccine in patients with colon cancer: a prospective study of medical and economic benefits. *Vaccine* 2005, 23: 2379-2387.