

## REVISIONES

## El potencial de la inmunomodulación con anticuerpos monoclonales anti-CD137 (4-1BB) para terapia de enfermedades malignas e infecciones virales crónicas

### *The immunotherapy potential of agonistic anti-CD137 (4-1BB) monoclonal antibodies for malignancies and chronic viral diseases*

C. Alfaro<sup>1</sup>, O. Murillo<sup>1</sup>, I. Tirapu<sup>1</sup>, A. Azpilicueta<sup>1</sup>, E. Huarte<sup>1</sup>, A. Arina<sup>1</sup>, L. Arribillaga<sup>1</sup>, J. L. Pérez-Gracia<sup>2</sup>, M. Bendandi<sup>1,2</sup>, J. Prieto<sup>1,2</sup>, J. J. Lasarte<sup>1</sup>, I. Melero<sup>1,2</sup>

#### RESUMEN

La manipulación farmacológica del sistema inmunitario para conseguir respuestas linfocitarias de mayor intensidad tiene aplicación potencial en inmunoterapia tumoral y en el tratamiento de enfermedades virales crónicas. Los anticuerpos monoclonales inmunoestimuladores se definen como una familia de fármacos que aumentan la respuesta inmunitaria al interactuar como ligandos artificiales con proteínas funcionales del sistema inmunitario, activando o inhibiendo su función. Hay anticuerpos monoclonales humanizados dirigidos frente al receptor inhibitorio linfocitario CD152 (CTLA-4) que se están probando en ensayos clínicos con evidencia de actividad antitumoral, aunque con la contrapartida de producir reacciones autoinmunitarias severas. Los anticuerpos anti-CD137 tienen la capacidad de inducir potentes respuestas inmunitarias, mediadas principalmente por linfocitos T citotóxicos, con el resultado de erradicar tumores transplantables de ratón de forma comparativamente superior a los anticuerpos frente a CD152. CD137 (4-1BB) es un antígeno de diferenciación expresado selectivamente en la superficie de linfocitos T y NK activados y sobre células dendríticas. Los anticuerpos monoclonales que actúan como ligandos artificiales estimuladores de este receptor (anticuerpos monoclonales agonistas anti-CD137) potencian la inmunidad celular antitumoral y antiviral en modelos experimentales murinos. Paradójicamente, estos mismos anticuerpos previenen o mejoran el curso de enfermedades autoinmunitarias establecidas en ratones como modelo. A la luz de estos datos experimentales, varios grupos de investigación han procedido a la humanización de anticuerpos dirigidos frente a CD137 humano y se plantea la inminente realización de los primeros ensayos clínicos.

**Palabras clave.** CD137 (4-1BB). CD152 (CTLA-4). Anticuerpo monoclonal. Inmunoterapia.

*An. Sist. Sanit. Navar.* 2006; 29 (1): 77-96.

1. Área de Terapia Génica y Hepatología. Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA). Pamplona.
2. Clínica Universitaria de Navarra. Universidad de Navarra. Pamplona.

Aceptado para su publicación el 3 de noviembre de 2005.

#### ABSTRACT

Pharmacological intervention on the immune system to achieve more intense lymphocyte responses has potential application in tumour immunology and in the treatment of chronic viral diseases. Immunostimulating monoclonal antibodies are defined as a new family of drugs that augment cellular immune responses. They interact as artificial ligands with functional proteins of the immune system, either activating or inhibiting their functions. There are humanized monoclonal antibodies directed to the inhibitory receptor CD152 (CTLA-4) that are being tested in clinical trials with evidence of antitumoural activity. As a drawback, anti-CTLA-4 monoclonal antibodies induce severe autoimmunity reactions in a fraction of the patients. Anti-CD137 monoclonal antibodies have the ability to induce potent immune responses mainly mediated by cytotoxic lymphocytes with the result of frequent complete tumour eradications in mice. Comparative studies in experimental models indicate that the antitumour activity of anti-CD137 monoclonal antibodies is superior to that of anti-CD152. CD137 (4-1BB) is a leukocyte differentiation antigen selectively expressed on the surface of activated T and NK lymphocytes, as well as on dendritic cells. Monoclonal antibodies acting as artificial stimulatory ligands of this receptor (anti-CD137 agonist antibodies) enhance cellular antitumoural and antiviral immunity in a variety of mouse models. Paradoxically, anti-CD137 monoclonal antibodies are therapeutic or preventive in the course of model autoimmune diseases in mice. In light of these experimental results, a number of research groups have humanized antibodies against human CD137 and early clinical trials are about to start.

**Key words** CD137 (4-1BB). CD152 (CTLA-4). Monoclonal antibody. Immunotherapy.

#### Correspondencia

Ignacio Melero Bermejo  
Área de Terapia Génica y Hepatología  
Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA)  
Avda. Pío XII, 55  
31008 Pamplona  
Fax: 948 19 47 17  
E-mail: imelero@unav.es

## INTRODUCCIÓN Y CONCEPTOS GENERALES

Los anticuerpos monoclonales son inmunoglobulinas de una única especificidad antigénica producidas por una línea de linfocitos B inmortalizada para su cultivo *in vitro*. Hace ahora 25 años que César Milstein y George Köehler idearon un método para conseguir estos anticuerpos, procediendo a la fusión celular entre líneas celulares inmortales de mielomas de ratón y los linfocitos B del bazo de ratones inmunizados frente a un antígeno de interés<sup>1</sup>.

Una de las primeras aplicaciones de los anticuerpos monoclonales fue la caracterización selectiva de las proteínas de superficie de las células del sistema inmunitario que se estudiaban utilizando anticuerpos monoclonales específicos como herramienta. El estudio sistemático, utilizando anticuerpos monoclonales de las proteínas funcionales del sistema inmunitario, ha sido crucial para entender sus mecanismos fisiológicos.

La disponibilidad de anticuerpos monoclonales con especificidad deseada hizo pensar una rápida aplicación en terapia clínica, que sin embargo ha necesitado de más de 20 años de desarrollo para obtener sus primeros frutos<sup>1</sup>. Las aplicaciones más establecidas se encuentran en el ámbito de la terapia del cáncer y en el bloqueo de citoquinas mediadoras de la inflamación para el tratamiento de enfermedades autoinmunes<sup>2</sup>.

En el caso del tratamiento de enfermedades malignas se han encontrado anticuerpos monoclonales con capacidad de destrucción directa de las células tumorales<sup>1,3</sup>, entre los que destacan los anticuerpos anti-CD20 en el tratamiento de linfomas<sup>4</sup>. Se desarrollan, cada vez más, anticuerpos monoclonales que tienen mecanismos indirectos de acción, ya que no destruyen las células tumorales directamente, sino que interfieren con factores tróficos necesarios para la supervivencia y la proliferación de las células tumorales<sup>5</sup>, o bien con la vascularización del tejido maligno<sup>6</sup>.

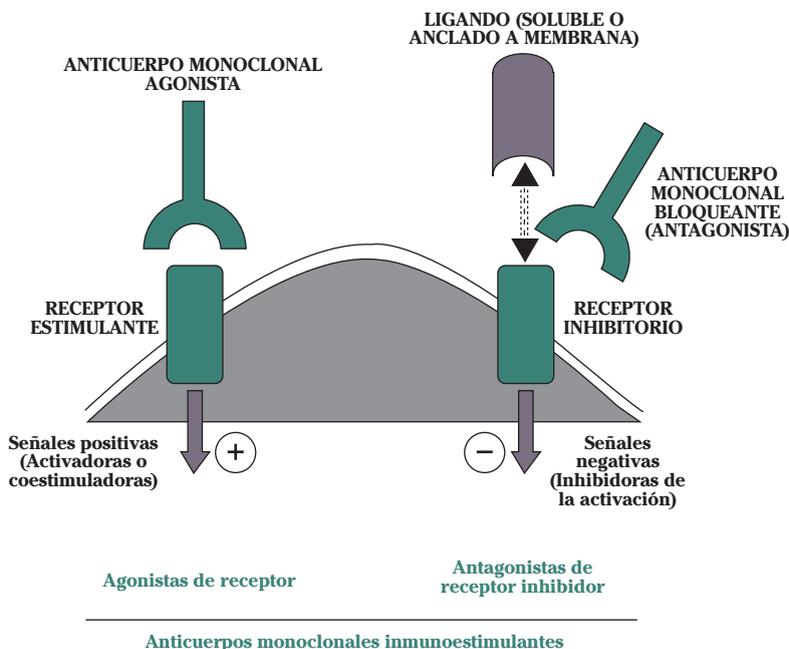
Entre estos anticuerpos con mecanismo indirecto de acción podemos encuadrar a los anticuerpos monoclonales inmunoes-

muladores<sup>7</sup>. Estos anticuerpos actúan actuando o inhibiendo la función de proteínas del sistema inmunitario. Su mecanismo de acción puede ser bien la interferencia de un mecanismo inhibitorio de la respuesta, o bien la potenciación farmacológica de un mecanismo estimulador (Fig. 1).

Para su utilización en humanos es necesario eliminar de los anticuerpos monoclonales aquellas secuencias de inmunoglobulina de ratón no implicadas en la interacción con el antígeno, que resultarían antigénicas para los seres humanos. Esto se consigue clásicamente mediante técnicas de ingeniería genética, sustituyendo secuencias de inmunoglobulina murina por inmunoglobulina humana, sin desvirtuar la afinidad del anticuerpo<sup>1</sup>. Alternativamente, en la actualidad existen ratones transgénicos cuyo genoma contiene los *loci* de las inmunoglobulinas humanas, de modo que al ser inmunizados, responden con anticuerpos humanos<sup>8</sup>.

El campo de los anticuerpos inmunopotenciadores se está desarrollando rápidamente debido a la llegada a la experimentación clínica avanzada (ensayos clínicos fase II y III) de los anticuerpos anti-CD152 (CTLA-4). Estos anticuerpos habían demostrado su actividad en modelos tumorales de ratón<sup>9,12</sup> que se potenciaba sinérgicamente con pautas de vacunación con diferentes formas de antígenos tumorales. Una tasa de respuesta clínica de alrededor del 20% correlaciona con reacciones autoinmunitarias severas<sup>13</sup>. El caso de los anticuerpos anti-CTLA-4 representa probablemente las primicias del desarrollo de una nueva familia farmacológica con múltiples miembros y variados mecanismos de acción. Entre ellos, destacan los anticuerpos anti-CD137, objeto del resto de este trabajo.

CD137 es una glicoproteína de la familia del receptor de TNF (Factor de necrosis tumoral). Se expresa en la membrana de linfocitos T y NK activados<sup>14</sup>, pero no en linfocitos en reposo. Se ha detectado también su expresión en células dendríticas y en granulocitos<sup>15</sup>. La función principal de esta proteína parece ser coestimular la proliferación y favorecer la supervivencia de linfocitos T activados por antígeno<sup>16</sup>.



**Figura 1.** Representación esquemática simplificada de los mecanismos de acción propuestos para los anticuerpos monoclonales inmuoestimuladores.

Tiene un único ligando denominado CD137-Ligando<sup>14</sup>, perteneciente a la familia del TNF que se expresa en la membrana de células presentadoras de antígeno activadas (células dendríticas, células B y macrófagos)<sup>17</sup>.

En esta revisión, nos centraremos en describir su potencial aplicación en el tratamiento de tumores e infecciones virales crónicas mediante un mecanismo inmuopotenciador. Teniendo en cuenta, que paradójicamente puede encontrar también utilidad en el tratamiento de la esclerosis múltiple<sup>18</sup>, la artritis reumatoide<sup>19</sup> y el lupus eritematoso sistémico<sup>20,21</sup>.

## EL ENCUENTRO DE CD137 (4-1BB) Y CD137-LIGANDO (4-1BB LIGANDO) CON LA INMUNOLOGÍA DE TUMORES

### La llegada de los anticuerpos monoclonales agonistas anti-CD137

La inmunoterapia antitumoral actual incluye una serie de aproximaciones que

intentan destruir el tejido maligno por medio del armamento de destrucción celular con el que está dotado el sistema inmunitario. Inducir y aumentar la respuesta inmunitaria celular frente a las células cancerosas o frente a componentes críticos del estroma tumoral es una empresa difícil. Sin embargo, algunos avances recientes han conseguido regresiones completas de tumores de roedores. Entre estas estrategias experimentales que han tenido éxito, podemos destacar:

1. Vacunaciones con células dendríticas cargadas con antígenos tumorales u otras formulaciones de vacunas<sup>22</sup>.
2. Transferencia adoptiva de linfocitos preactivados *in vitro* a sujetos portadores de tumor, en quienes se ha inducido linfopenia<sup>23</sup>.
3. Tratamiento local o sistémico con citoquinas, incluyendo estrategias de terapia génica, que aumentan la respuesta inmunitaria celular<sup>24,25</sup>.

4. Transfección a las células tumorales con moléculas coestimuladoras para células T.
5. Interferencia molecular con los mecanismos fisiológicos que regulan negativamente la respuesta inmunitaria. Este último es un campo especialmente fértil de investigación e incluye:
  - Interferencia con moléculas coinhibitorias de células T, como PD-1<sup>26,27</sup> y CTLA-4<sup>28</sup>.
  - La depleción o inactivación de células T reguladoras<sup>29</sup>.
  - La inhibición de enzimas cuya actividad interfiere localmente con la activación de células T (por ejemplo, la indoleamina dioxigenasa, IDO)<sup>30</sup>.

La translación hacia la terapia humana progresa despacio, aunque en general, los resultados obtenidos en ratones tienden a ser más eficaces que las observaciones que se están realizando en los ensayos clínicos. No obstante, hay una gran esperanza en que la combinación de varias de estas aproximaciones terapéuticas en un régimen adecuado puedan optimizar los resultados y llegar a formar parte de la práctica clínica habitual<sup>31</sup>.

En 1995, el campo de la coestimulación en la respuesta inmunitaria frente a tumores, era un tema caliente. Había sobre el tapete experimentos interesantes que demostraban que la transfección de células tumorales con ligandos coestimuladores como B7-1 (CD80) incrementaba la inmunogenicidad de las células malignas, de forma que eran rechazadas y eran capaces de controlar el crecimiento de células tumorales no transfectadas inyectadas en otro lugar del mismo ratón<sup>32,33</sup>. Una característica de gran importancia en estos sistemas es que las células tumorales tienen que presentar antígenos de rechazo tumoral para que este rechazo pueda ser incrementado por la coestimulación artificial<sup>34</sup>.

Los anticuerpos monoclonales dirigidos frente a proteínas de la membrana linfocitaria pueden actuar como ligandos agonistas artificiales para dichos receptores (Fig. 1), proporcionando señales que imitan a aquellas recibidas por los ligandos coestimuladores naturales<sup>7</sup>. Siguiendo este razona-

miento sencillo se buscaron anticuerpos monoclonales con efecto antitumoral que actuaran a través de estos mecanismos de coestimulación. Este *screening* se realizó mediante la administración de este tipo de agentes a una serie de ratones portadores de mastocitomas establecidos en la cavidad peritoneal. Uno de estos anticuerpos, que era capaz de evitar la progresión tumoral, se identificó que iba dirigido frente a CD137 (4-1BB)<sup>35</sup>. Inmediatamente después, otros dos anticuerpos monoclonales de la misma especificidad<sup>16</sup> fueron probados en ratones portadores del mastocitoma P815, tanto intraperitonealmente como subcutáneamente. La rápida progresión de los tumores en los grupos control contrastaba en el rechazo prácticamente constante en los grupos tratados. Algunos de los tumores subcutáneos que perdían volumen fueron extirpados quirúrgicamente para demostrar un infiltrado linfocitario que entraba en los nódulos tumorales desde su periferia. Los infiltrados contenían principalmente células T (tanto CD8+ como CD4+, así como macrófagos). De acuerdo con esto, otra serie de experimentos demostró un incremento en la actividad citotóxica antitumoral específica en el bazo de los ratones tratados<sup>35</sup>. Fue sorprendente observar que esta actividad citotóxica se detectaba en los esplenocitos recién aislados sin necesidad de reestímulo en cultivo con células tumorales irradiadas. Se realizaron experimentos exitosos de tratamiento y observaciones mecanísticas similares con tumores establecidos derivados del sarcoma Ag104A. Este tumor es de origen espontáneo, sin uso de carcinógenos químicos, y se le considera de baja inmunogenicidad intrínseca<sup>35</sup>. En el modelo del mastocitoma P815, se verificó que la eliminación tanto de linfocitos T CD4 como CD8, daba lugar a la pérdida completa del efecto antitumoral<sup>35</sup>. Estudios posteriores han encontrado que el requerimiento de actividad cooperadora por células T CD4 es dependiente de cada modelo tumoral, existiendo tumores en que la actividad de linfocitos T CD4 no es necesaria para el rechazo inducido por anticuerpos anti-CD137<sup>36</sup>. Otros experimentos de depleción selectiva han demostrado que las células NK son también absolutamente necesarias para el efecto antitumoral de los

anticuerpos monoclonales agonistas frente a CD137<sup>37</sup>. La molécula CD137 no se detecta en la superficie de las células NK en reposo, pero se ha demostrado que se expresa intensamente en las células NK activadas con citoquinas, como la interleuquina-2 y la interleuquina-15<sup>37,38</sup>.

### Estudios comparativos con anticuerpos monoclonales anti-CD152 (CTLA-4)

En el momento en que se estaban realizando las primeras observaciones sobre el efecto antitumoral en el sistema de CD137, el grupo de J.P. Allison (Universidad de Berkeley, CA, USA) describió los efectos antitumorales de la administración por vía sistémica de anticuerpos que interferían con la función de CTLA-4 (CD152)<sup>9</sup>. Se realizó una comparación directa con los anticuerpos monoclonales anti-CD137 cuyos resultados indicaban que la actividad terapéutica frente a los modelos tumorales de ratón era comparable, pero con cierta superioridad para los anti-CD137, en algunos tumores<sup>35</sup>. Los intentos obvios de encontrar efectos aditivos o sinérgicos entre ambos tipos de anticuerpos monoclonales han fracasado, tanto para inducir respuestas inmunitarias más intensas, como para conseguir una actividad terapéutica más efectiva. En otras palabras, se observan un mismo número, o incluso un número menor de rechazos tumorales, en los grupos de tratamiento combinado cuando se comparan con cada anticuerpo administrado por separado (A. Arina y col, observaciones no publicadas). Las razones que subyacen a la falta de eficacia de la combinación son todavía desconocidas, pero pueden estar relacionadas con los efectos diferenciales *in vivo* sobre células T CD4 o CD8, que se han descrito para los anticuerpos anti-CD137. No obstante, es todavía posible que se puedan definir condiciones o modelos en que el efecto terapéutico de ambas especificidades de anticuerpos monoclonales pueda potenciarse mutuamente.

Con respecto a la toxicidad potencial ninguno de estos anticuerpos parecía dar lugar a efectos adversos serios en ratones. Sin embargo, el llamativo fenotipo autoin-

mune de los ratones CTLA-4<sup>7,39,40</sup>, avisaba de algún modo sobre la autoinmunidad severa que posteriormente se ha hecho pública con respecto a los ensayos clínicos con anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4<sup>41-43</sup>. Las observaciones toxicológicas tranquilizadoras con anticuerpos anti-CD137 han recibido un fuerte empuje, al ser documentado repetitivamente, que los anticuerpos monoclonales anti-CD137 no sólo no inducen autoinmunidad, sino que por el contrario, previenen o tratan satisfactoriamente enfermedades autoinmunes en ratones<sup>18-20,44</sup>. Este paradigma ha llegado a ser una paradoja difícil de interpretar, porque es complicado reconciliar rechazos inmunitarios de tumores con la prevención de fenómenos autoinmunitarios inducidos por el mismo agente terapéutico. Desde los primeros experimentos, se ha sugerido que, aunque los anticuerpos anti-CD137 coestimulan los linfocitos T CD4+ en cultivo, el tratamiento *in vivo* con estos anticuerpos daba lugar a una disminución de las funciones de las células *T helper*, al menos para la producción de anticuerpos frente a ciertos antígenos<sup>16</sup>.

Se han formulado varias hipótesis para explicar esta paradoja, que incluyen la actividad de los anticuerpos monoclonales agonistas anti-CD137 para estimular la proliferación de células T reguladoras<sup>45</sup>, así como la capacidad de los anticuerpos monoclonales anti-CD137 para inducir la expresión de la enzima indoleamina dioxygenasa (IDO)<sup>19</sup>, a través del mecanismo dependiente de una sobreproducción de interferón-g<sup>19</sup>. La existencia de estos mecanismos opuestos garantiza la seguridad en la investigación clínica translacional. Proporciona además el sustrato teórico para interferir temporalmente con los mecanismos inmunosupresores de los anticuerpos anti-CD137, con el fin de incrementar más aún la inmunidad antitumoral, incluso corriendo el riesgo de inducir cuadros autoinmunes.

Hay otras especificidades de anticuerpos monoclonales que incrementan la respuesta inmunitaria y que se describieron con posterioridad. Los anticuerpos monoclonales agonistas anti-CD40 son otro conjunto de agentes prometedores de este tipo<sup>46</sup>. Las comparaciones directas con

anti-CD137 son difíciles de realizar, ya que se observan grandes diferencias dependiendo del modelo tumoral elegido, aunque en general los anticuerpos monoclonales anti-CD137 parecen ser más potentes en la mayoría de los modelos experimentales (A. Arina y col, observaciones no publicadas). Desafortunadamente, los efectos antitumorales de los anticuerpos monoclonales anti-CD137 y anti-CD40 no se potencian mutuamente, como cabría suponer del mecanismo de acción postulado para los anticuerpos monoclonales anti-CD40, que actúan activando y “dando permiso” a las células dendríticas, para que puedan activar funcionalmente a linfocitos T citotóxicos<sup>46,47</sup>. De nuevo, entender con mayor profundidad el mecanismo de acción de los anticuerpos monoclonales anti-CD137, nos llevará a explotar mejor una posible combinación con agentes activadores de células dendríticas, empresa que por el momento está siendo infructuosa.

### **Transfección del ligando CD137 en células tumorales malignas**

La terapia génica del cáncer es un campo activo de investigación, que incluso suscitaba más esperanzas durante los últimos años de la década de los 90. A la vista de los primeros resultados con los anticuerpos monoclonales agonistas anti-CD137, se hacía razonable dotar a las células tumorales con la expresión del único ligando caracterizado para esta proteína de coestímulo<sup>48</sup>. Con el fin de probar esta idea, se generó un panel de retrovirus que codificaban para el cDNA de CD137-Ligando<sup>49</sup>.

Las células transfectadas eran capaces de unir una proteína quimérica con los dominios extracelulares de CD137. Se generaron transfectantes estables que expresaban cantidades altas de CD137-Ligando en el mastocitoma P815 y en el sarcoma Ag104A<sup>49</sup>. Las células P815 transfectadas se rechazaban después de un crecimiento transitorio en más del 90% de los casos, a la vez que se suscitaba un estado de inmunidad sistémica frente al inóculo posterior del tumor. Por el contrario, los transfectantes de Ag104A que expresaban CD137-Ligando, progresaban como tumores letales<sup>49</sup>. Este hallazgo era consecuente

con el hecho de que esta línea tumoral era capaz de injertar como un tumor letal, incluso si se transfectaba para expresar niveles altos de B7-1 (CD80) sobre su superficie<sup>34</sup>. Fue interesante la comprobación de que las células transfectadas para coexpresar tanto CD80 como CD137-Ligando, se rechazaban completamente en el 60% de los casos, debido a una respuesta de linfocitos T citotóxicos más intensa. Este hecho tuvo importantes implicaciones al sugerir que la vía CD80-CD28 y la vía CD137-CD137-Ligando podían comunicarse entre sí<sup>49</sup>. Esta comunicación intermolecular era posible a diferentes niveles, que incluían un efecto por el que la estimulación de CD28 incrementa la expresión de CD137 en la membrana de los linfocitos T, que han reconocido su antígeno<sup>49</sup>. Sin embargo, estudios previos habían puesto de manifiesto que CD137 y CD28 pueden operar de modo independiente<sup>49,50</sup>. Pero no podemos perder de vista, que el bloqueo *in vivo* de la vía de CD28, eliminaba la potenciación de la respuesta de linfocitos T citotóxicos, ejercida por la transfección del ligando de CD137<sup>49</sup>. Debemos destacar que en todos estos modelos, el rechazo era dependiente de linfocitos T CD8+, pero no de linfocitos T CD4+.

Desde el principio, se hizo patente que los intentos de tratamiento con estos transfectantes que expresaban CD137-Ligando, no tenían éxito para conseguir el control de tumores concomitantes no transfectados. Por tanto, quedaba claro que el efecto terapéutico de los anticuerpos monoclonales agonistas anti-CD137 era más potente que la transfección del ligando. Las razones biológicas todavía no se han esclarecido aunque se han propuesto dos explicaciones:

- La mayor afinidad de los anticuerpos que actúan como ligandos artificiales
- la disponibilidad de los anticuerpos para perseguir a las células T activadas por antígeno a cualquier lugar del organismo, sin necesidad de contacto célula a célula, para suministrar la señal de coestímulo<sup>7</sup>.

La duración de la interacción coestimuladora se considera que puede ser más larga con anticuerpos que con el ligando

natural anclado en la membrana. Este hecho puede ser también de gran importancia.

Un año después, estos resultados fueron confirmados utilizando transfectantes estables para CD137-Ligando, en la línea celular de linfoma A20<sup>51</sup>. Se encontró que el ligando de CD137 contribuía con CD80 y CD86 a la generación de linfocitos T citotóxicos antitumorales, como se dedujo de experimentos de bloqueo selectivo con proteínas de fusión. Estos hallazgos indicaban de nuevo un papel para la coexpresión de los ligandos de CD28 (CD80 y CD86), junto con el ligando de CD137, un concepto que se reforzó como consecuencia de estudios posteriores<sup>51</sup>. Los casos en que los tumores se escapaban al rechazo mostraron tendencia a haber perdido la expresión del ligando de CD137<sup>51</sup>, proporcionando evidencia evolutiva para una presión selectiva ejercida por el sistema inmunitario en contra de la expresión de esta molécula de coestimulo. A pesar de que en el linfoma A20 las células tumorales expresaban MHC de clase II, el papel *in vivo* de las células T CD4+ no se exploró en este sistema. Sin embargo, se publicaron experimentos indirectos que sugerían que la expresión del ligando de CD137 no era eficiente a la hora de coestimular el cultivo mixto linfocitario, una reacción que está mediada principalmente por linfocitos T CD4 alorreactivos<sup>51</sup>.

De forma sorprendente, un estudio posterior demostró que tanto algunas líneas celulares de carcinomas humanos como algunos carcinomas primarios, expresaban niveles bajos pero detectables de ligando de CD137 en estado funcional<sup>52</sup>. Estudios posteriores de este mismo grupo, concluyeron que la molécula CD137-Ligando puede solubilizarse de la membrana, y que se encuentran concentraciones incrementadas de CD137-Ligando soluble en el suero de pacientes con neoplasias<sup>53</sup>. El discernimiento de la función del ligando de CD137 soluble puede iluminar las razones que explican la expresión ectópica en tumores humanos. En este sentido la concentración sérica de CD137-Ligando soluble se encuentra también incrementada en situaciones de inflamación crónica. Considerando en su conjunto todas estas observaciones,

podemos concluir que es muy dudoso que la transfección de células tumorales con el ligando de CD137 tenga aplicabilidad para su translación a la clínica.

## **MEJORAS Y DESARROLLOS EN LAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS SOBRE CD137/CD137-LIGANDO**

### **Inmunización/vacunación: la estimulación de CD137 puede romper estados de ignorancia y tolerancia inmunológica**

Para ejercer su efecto antitumoral, los anticuerpos monoclonales anti-CD137 necesitan un cierto grado de inmunogenicidad en el tumor<sup>54</sup>. De hecho se puede clasificar a los tumores transplantables en respondedores y no respondedores a la terapia con anticuerpos monoclonales anti-CD137, de manera que este parámetro correlaciona con el grado intrínseco de inmunogenicidad de las células malignas. No conocemos todavía si este nivel basal de inmunización tiene lugar a través de la presentación antigénica por células dendríticas endógenas (crosspresentación)<sup>55,56</sup>, o bien por presentación antigénica directa de células tumorales que alcanzan ganglios linfáticos<sup>57</sup>. En cualquier caso, es razonable pensar que la vacunación artificial con antígenos tumorales puede ser capaz de comenzar una respuesta inmunitaria específica con la consiguiente expresión de CD137 en las células T y NK activadas. Existe un estudio demostrativo que analiza este concepto utilizando vacunaciones con péptido suministradas junto con anticuerpos agonistas<sup>54</sup>. Este estudio demostró el concepto en una serie de tumores pobremente inmunogénicos que eran refractarios al tratamiento con anticuerpos anti-CD137. La razón de la refractariedad era ignorancia inmunológica, en vez de anergia o eliminación clonal de los linfocitos T citotóxicos específicos de antígenos tumorales modelo. Por ignorancia inmunológica entendemos la coexistencia en el organismo del antígeno y de los elementos del sistema inmune que lo reconocen, sin que ocurra ni inducción de inmunidad ni tolerancia. La ruptura de la ignorancia inmunológica mediante la inmunización con péptidos antigénicos, aunque era insuficiente para estimular una respuesta inmu-

nitaria curativa, era necesaria para que los anticuerpos monoclonales agonistas anti-CD137 pudieran potenciar una respuesta capaz de inducir la regresión completa de tumores<sup>54</sup>. El antígeno tumoral utilizado como modelo era el oncogen E7 del papilomavirus 16 (HPV-16) para el que se había demostrado previamente una situación de ignorancia inmunológica<sup>58</sup>. Se postula que esta situación de ignorancia inmunológica es un tipo de interrelación frecuente entre los antígenos tumorales potenciales y el sistema inmunitario<sup>59</sup>.

No obstante, en ciertos ejemplos experimentales, los antígenos tumorales son capaces de eliminar del sistema inmunitario la capacidad de montar una respuesta inmunitaria adecuada. Esta situación puede ser resultado de la deleción (eliminación física) de los linfocitos con receptor de antígeno con suficiente avidez por éste, pero también como resultado de la inducción de un estado de parálisis en linfocitos todavía viables (anergia clonal). El escenario de la deleción de linfocitos es bastante poco halagüeño para la inmunoterapia, pero no tanto el caso de la anergia clonal. Un trabajo reciente ha demostrado que el tratamiento repetido con anticuerpos monoclonales agonistas anti-CD137 puede revertir un estado de anergia inducida frente a un antígeno tumoral. Este efecto extraordinario se ha demostrado para tres antígenos tumorales modelo, para los que se había inducido artificialmente anergia en los precursores de linfocitos T citotóxicos<sup>60</sup>.

La inmunoterapia activa, utilizando células dendríticas presentadoras de antígeno como adyuvantes, ha generado una cantidad impresionante de resultados preclínicos y clínicos en los últimos años<sup>22</sup>. En estos tratamientos se ha observado que los anticuerpos monoclonales agonistas anti-CD137 ejercen un efecto verdaderamente sinérgico<sup>61,62</sup>. En la actualidad, se están desarrollando proyectos de investigación que nos informarán sobre si los anticuerpos anti-CD137 pueden también potenciar la eficacia de tratamientos convencionales del cáncer que destruyan células malignas liberando antígeno, tal es el caso de la radioterapia local o de la quimioterapia sistémica.

La idea de utilizar un anticuerpo innoestimulante y un procedimiento de inmunización, no es única para el caso de CD137. En el desarrollo preclínico de los anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4, se descubrió que existe un efecto sinérgico entre la vacunación y dichos anticuerpos monoclonales<sup>10</sup>, que incluso conducía a reacciones autoinmunes por disrupción de la tolerancia (por ejemplo, vitiligo)<sup>41</sup>. Debido a esto, los ensayos clínicos con los anticuerpos monoclonales humanizados anti-CTLA-4, sólo se han llevado a cabo en combinación con estrategias de vacunación, tales como células tumorales transfectadas para expresar GM-CSF<sup>42</sup> y péptidos sintéticos<sup>41</sup>. Globalmente el concepto de vacunación combinada con un anticuerpo monoclonal innoestimulante puede llegar a ser muy importante para la translación clínica<sup>7</sup>.

### **Anticuerpos monoclonales anti-CD137 como adyuvantes para terapia celular adoptiva y transplante de médula ósea**

La transferencia adoptiva de linfocitos T específicos de antígeno es una estrategia prometedora para el tratamiento del cáncer<sup>63</sup>, así como para el tratamiento de infecciones virales crónicas y latentes<sup>64</sup>. Hay varias aproximaciones posibles que tienen en común la obtención de linfocitos autólogos, que son estimulados en cultivos y expandidos artificialmente para ser reinfundidos. Junto con estos tratamientos se coadministra interleuquina-2 para mantener a los linfocitos infundidos vivos y activados. Se dispone de evidencias experimentales sólidas que sugieren que la interleuquina-15 sustituirá con ventaja estos efectos de la interleuquina-2<sup>65</sup>. La depleción de linfocitos del receptor previa a la infusión del cultivo linfocitario, ayuda al efecto antitumoral, debido a una menor competición por factores de crecimiento de células T, así como a la eliminación de células T supresoras/reguladoras<sup>66</sup>. Los linfocitos T activados, tales como los que se usan en terapia celular adoptiva, expresan CD137, y pueden recibir coestimulación por los anticuerpos monoclonales agonistas<sup>67</sup>. La prueba de concepto experimental de los

efectos sinérgicos de la terapia celular adoptiva y el tratamiento sistémico con anticuerpos monoclonales agonistas anti-CD137 esta ya disponible<sup>68</sup>, aunque todavía está controvertido si el efecto es ejercido mediante promoción de la supervivencia linfocitaria y/o favoreciendo la activación y proliferación de los mismos<sup>68</sup>. El efecto de la terapia celular adoptiva se potencia con anticuerpos monoclonales anti-CD137, incluso en un modelo transgénico de cáncer de mama espontáneo en el que el tumor expresa mucina-1, lo que hace que el ratón sea tolerante para este antígeno<sup>69</sup>. CD137 puede tener importancia también en la fase de expansión en cultivo de las células T para terapia adoptiva. Un estudio muy interesante utilizando la línea celular K562, como células presentadoras de antígeno artificiales, ha demostrado que la activación óptima de linfocitos *in vitro* se consigue con la estimulación simultánea de los receptores de antígeno CD28 y CD137<sup>70</sup>.

El trasplante alogénico de médula ósea es un procedimiento terapéutico realizado con éxito frente a varias neoplasias hematológicas. Su potencial curativo depende de la utilización de quimioterapia a altas dosis pero también de la función de células inmunitarias del donante que atacan a las células malignas alogénicas (efecto injerto frente a leucemia). Sin embargo, este efecto frecuentemente paga el peaje del daño de ciertos órganos del receptor, dando lugar a lo que conocemos como enfermedad injerto frente a huésped aguda. Ésta es un área en que los anticuerpos monoclonales agonistas frente a CD137 pueden encontrar un importante nicho de aplicación. Como se ha comentado previamente los anticuerpos anti-CD137 pueden tratar síndromes autoinmunes que comparten la propiedad de un papel patogénico por parte de linfocitos T CD4 autorreactivos. En el trasplante alogénico de médula ósea, los anticuerpos anti-CD137, incrementan las reacciones injerto frente a huésped dependientes de linfocitos T CD8, mientras que inhiben las dependientes de linfocitos T CD4<sup>16</sup>. De hecho, en trabajos publicados posteriormente se ha sustentado la conclusión de que el tratamiento con anticuerpos anti-CD137 puede incrementar la enfermedad injerto frente a huésped

aguda, incluyendo el efecto injerto frente a leucemia<sup>71</sup>, mientras que mejora notablemente la enfermedad injerto frente a huésped crónica, inhibiendo a células T CD4+ patogénicas<sup>72</sup>.

La infusión de linfocitos T del donante es una práctica clínica establecida para el tratamiento de la recidiva de la neoplasia hematológica después del trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos, y hay indicaciones experimentales que sugieren que los anticuerpos agonistas anti-CD137 pueden incrementar la eficacia de esta forma de terapia celular adoptiva.

Con respecto a las células NK, se acumula evidencia en el sentido de que estas células pueden mediar reconocimiento alorreactivo de células diana, en ciertas discrepancias de alelos MHC de clase I entre el donante y el receptor, a través de lo que conocemos como reconocimiento por pérdida de lo propio ("missing self")<sup>73</sup>. Estos fenómenos mediados por células NK se han aprovechado con eficacia en el trasplante haploidéntico de médula ósea para prevenir la enfermedad injerto frente a huésped mediante la eliminación de las células dendríticas del receptor y para destruir los blastos leucémicos previniendo la recidiva<sup>74</sup>. A tenor de estos hallazgos se han generado expectativas interesantes, ya que se puedan explotar técnicas de terapia celular adoptiva con células NK semialogénicas<sup>75</sup>. El hecho de que las células NK expresen CD137 una vez activadas por citoquinas, no se ha explorado aún en el escenario alorreactivo del trasplante de médula ósea<sup>37,38</sup>. Estas investigaciones en curso pueden llegar a ser importantes para futuros protocolos de terapia celular adoptiva con células NK, que puedan ser potenciados con anticuerpos agonistas anti-CD137. El hecho de que la terapia celular adoptiva con células NK semialogénicas esté ya en ensayos clínicos hace plausible la realización de este tipo de tratamiento combinado<sup>75</sup>.

### **CD137 puede actuar sinérgicamente con citoquinas y otras moléculas de coestímulo**

La interleuquina-12 como proteína recombinante ha sido uno de los agentes

anticancerosos más prometedores derivados de la experimentación preclínica. Desafortunadamente, una dosis máxima tolerada infraestimada en ensayos clínicos fase I dio lugar a efectos adversos severos en un ensayo clínico fase II, que determinó una larga parada en su desarrollo. Sin embargo, la toxicidad sistémica junto con la eficacia local de la interleuquina-12, hicieron de esta sustancia un candidato excelente para terapia génica local<sup>75,76</sup>. La transferencia a las células tumorales de los genes de la interleuquina-12 tiene un efecto antitumoral intenso en modelos de ratón, que es dependiente de incrementos de linfocitos T citotóxicos antitumorales, células NK y de los efectos antiangiogénicos de esta citoquina. Una serie de experimentos de gran interés ha demostrado que la transferencia génica de interleuquina-12 mediante adenovirus recombinantes tiene un efecto sinérgico con los anticuerpos monoclonales agonistas frente a CD137<sup>77</sup>. Aunque la cotransferencia génica del ligando de CD137 con los genes de la interleuquina-12 tiene algo de efecto, no fue tan potente como el conseguido por el anticuerpo monoclonal anti-CD137 administrado por vía sistémica<sup>78,79</sup>. El efecto terapéutico en este caso se demostró que estaba mediado en gran parte por linfocitos NK. Estos efectos sinérgicos se han observado también tras la inyección en el tejido tumoral de células dendríticas que han sido transfectadas para producir interleuquina-12 mediante adenovirus recombinante<sup>61</sup>. La inyección intratumoral directa tanto del adenovirus recombinante productor de interleuquina-12 como de células dendríticas transfectadas para producir interleuquina-12, se ha puesto a prueba en ensayos clínicos que demuestran seguridad pero una repuesta clínica modesta<sup>80,81</sup>. Por consiguiente, el camino para testar la combinación de terapia génica basada en interleuquina-12 con anticuerpos monoclonales anti-CD137 todavía está abierto.

El efecto modesto de la transfección de CD137-Ligando, bien en células tumorales<sup>78,79</sup> o en células dendríticas<sup>82</sup>, ha contrastado con la destacada eficacia conseguida por la transfección a células tumorales de un gen que codifica para una versión anclada en membrana de un anti-

cuerpo agonista anti-CD137, que se construyó en forma de anticuerpo de cadena sencilla (ScFv)<sup>83</sup>. Este ligando artificial promueve el rechazo de tumores y genera inmunidad sistémica en la que, tanto las células NK como los linfocitos T CD4, tienen un papel principal<sup>83</sup>.

Los genes emparentados con CD137/CD137-Ligando, dentro de la familia del TNF/TNF-Receptor, tienen también propiedades antitumorales inmunoestimuladoras. Estos incluyen OX-40 (CD134)/OX-40-Ligando, CD40/CD40-Ligando, CD27/CD27-Ligando (CD70). Este asunto ha sido revisado recientemente<sup>14,17</sup> y excede el objetivo de esta revisión. Debemos subrayar, que entre los experimentos más interesantes en el campo de la inmunoterapia basada en CD137, incluyen la actividad sinérgica de OX-40 y CD137 para inducir respuestas inmunitarias celulares tras la estimulación combinada de ambas moléculas. La coestimulación dual a través de CD137 y OX-40 induce intensísimas expansiones clonales de linfocitos T CD8<sup>84,85</sup>. La respuesta sinérgica de los linfocitos T citotóxicos específicos persiste durante varias semanas con las células efectoras, residiendo tanto en tejido linfoide como no linfoide. Se ha demostrado que la expansión clonal y la función efectora no requiere actividad *T helper*, pero sí la acumulación de linfocitos T activados en el tejido no linfoide<sup>85</sup>. La coestimulación dual induce el rechazo de un sarcoma que es resistente al tratamiento con anticuerpos monoclonales agonistas de cada molécula por separado, siendo los efectos antitumorales dependientes de linfocitos T CD8+ e independientes de linfocitos T CD4+. Los datos disponibles parecen sugerir que OX-40 coestimula preferentemente células Th1, en una imagen especular de los efectos selectivos de la estimulación con anticuerpos anti-CD137 de linfocitos T citotóxicos<sup>85</sup>. Estas observaciones experimentales con anticuerpos monoclonales anti-OX-40 y con la transfección de OX-40-Ligando están posiblemente relacionados con el concepto general de los efectos de la cotransfección simultánea en células tumorales de dos moléculas de coestimulo<sup>49,51</sup>.

Además de las glicoproteínas de coestimulo, existen receptores llamados coinhibidores, que ejercen efectos opuestos a la coestimulación de células T. Por ejemplo, la proteína B7-H1 se une a PD-1 y a otro receptor no identificado de células T, de forma que inhibe la respuesta de estas células<sup>26</sup>. De hecho, se ha demostrado la expresión de B7-H1 en muchos tumores humanos y animales donde actúa como un mecanismo de escape<sup>26</sup>. En consonancia, se ha observado que el bloqueo de las interacciones B7-H1/PD-1 con anticuerpos tiene efectos terapéuticos antitumorales<sup>26</sup>, que son verdaderamente sinérgicos con la administración de anticuerpos anti-CD137<sup>27</sup>. El mecanismo de la sinergia incluye la disrupción de la resistencia de las células tumorales a la muerte por linfocitos que infiltran el tejido, que se ha establecido está mediada por B7-H1<sup>27</sup>.

Como se ha mencionado previamente, no se observa sinergia entre anticuerpos inhibidores de CTLA-4 y los anticuerpos agonistas anti-CD137. Esclarecer la razón puede ser informativo para el diseño de terapias basadas en CD137 y en el concepto de coestimulación múltiple.

La inmunoterapia combinatoria, es decir, la combinación secuencial o simultánea de varios mecanismos, puede ser el camino para alcanzar tratamientos curativos en humanos<sup>31</sup>. Nosotros hemos sugerido previamente que si la inmunoterapia fuera un coche, el motor debe ser arrancado (inmunización), hay que pisar el acelerador (coestimulación) y hay que soltar los frenos (desconectando receptores coinhibidores). Este coche puede llevarnos al éxito, pero probablemente nos tendremos que enfrentar a la autoinmunidad en nuestra carrera<sup>36</sup>. En la figura 2 se representan esquemáticamente las posibles combinaciones exploradas para sacar partido de la vía CD137/CD137-Ligando.

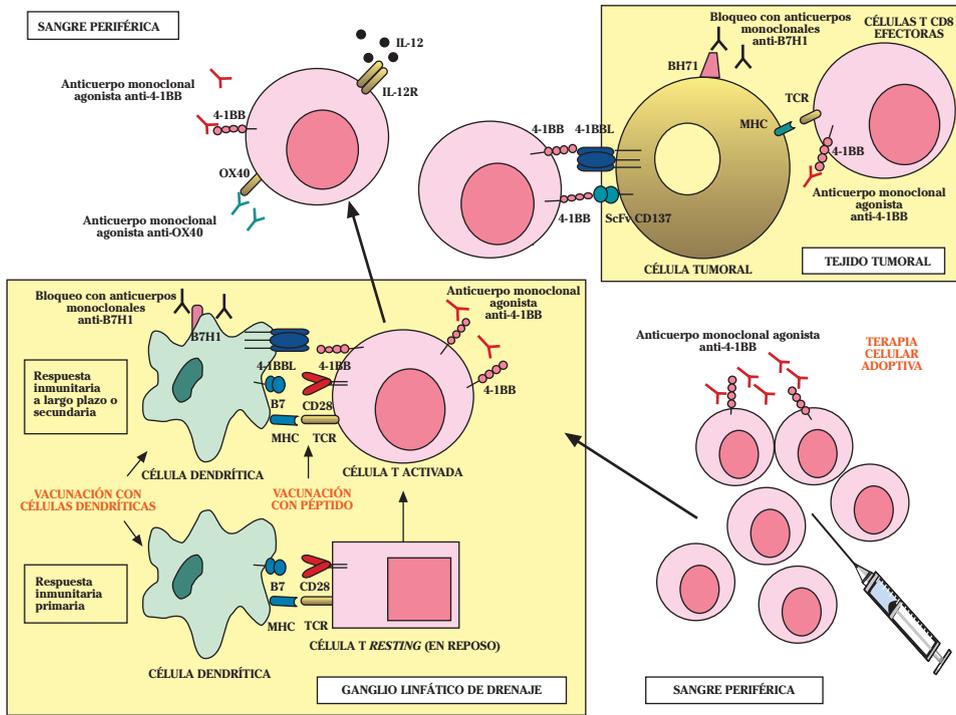
### **CD137/CD137-LIGANDO EN LA RESPUESTA INMUNE ANTIVIRAL Y EN LA VACUNACIÓN VIRAL**

La inmunoterapia tiene aplicación potencial en las infecciones virales crónicas y latentes. La vacunación terapéutica y la transferencia adoptiva de células T son

estrategias que se están explorando frente al VIH y las hepatitis crónicas virales. Los ratones que carecen de CD137 o del ligando de CD137 tienen defectos en las respuestas de células T CD8 frente al virus<sup>87,89</sup>, sin efectos en la respuesta de anticuerpos o de células T CD4 para varios virus<sup>88,89</sup>. Los estudios en los ratones CD137-Ligando<sup>-/-</sup> sugieren que esta molécula desempeña un papel centrado en la respuesta a largo plazo de linfocitos T citotóxicos, y en la inducción y mantenimiento de la memoria en el compartimento de células T CD8<sup>+</sup><sup>90</sup>. Estas características hacen que el par CD137/CD137-Ligando sea muy interesante para su manipulación en inmunoterapia antiviral. Hasta la fecha existen pocas publicaciones en las que se haya explorado esta posibilidad, pero sus datos son muy prometedores.

En un estudio pionero, Halstead y col<sup>91</sup>, demostraron incrementos en las respuestas de linfocitos T citotóxicos frente al virus de la gripe. La estimulación *in vivo* en ratones con un anticuerpo monoclonal agonista anti-CD137 incrementaba la respuesta primaria de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en respuesta al virus *influenza A*. La estimulación de CD137 incrementa el número absoluto de linfocitos T citotóxicos frente a epítopos del virus de la gripe en los pulmones de los ratones infectados. Este mismo estudio demostró la expansión selectiva de linfocitos T citotóxicos que reconocían epítopos no dominantes. Estos estudios confirmaron que la vía de coestimulación de CD137 podía funcionar en ratones *knock-out* para CD28, indicando la independencia de ambas vías de coestimulo<sup>91</sup>. Los efectos de incremento de la memoria frente a un espectro de epítopos aumentado ("epitope broadening") sugiere el potencial de los anticuerpos anti-CD137 para la mejora de las vacunas que dependen de la actividad de linfocitos T citotóxicos, bien para profilaxis o bien para terapia de la enfermedad ya establecida.

La inducción de inmunidad protectora o terapéutica frente al virus de la hepatitis C (HCV) es un objetivo muy difícil. La inmunización con un adenovirus recombinante que codifica para el antígeno NS3 del HCV (RADNS3) puede proteger a los ratones frente a un inóculo con un virus *vacci-*



**Figura 2.** Representación esquemática de los diferentes sitios y mecanismos de acción de los anticuerpos monoclonales agonistas anti-CD137, de la transferencia génica del ligando de CD137 y de las diferentes estrategias combinatorias.

nia recombinante que contiene artificialmente los antígenos del virus de la hepatitis C. Se observó que el tratamiento con anticuerpos monoclonales agonistas anti-CD137 después de administrar dosis subóptimas de RADNS3, incrementa las células T citotóxicas y *helper* frente al antígeno NS3<sup>92</sup>. Hay que considerar que la capacidad de RADNS3 para inducir inmunidad protectora frente al virus *vaccinia* recombinante aumentaba de modo intenso. Por tanto, la combinación de anticuerpos inmunostimuladores anti-CD137 con adenovirus recombinantes que expresan proteínas del HCV, puede ser una estrategia útil en la inmunización frente a HCV. En el estudio de Arrillaga y col, a diferencia de lo que ocurría en el estudio con el virus *influenza*, no se observó reactividad con epítopos peptídicos subdominantes del antígeno NS3, indicando con ello que este

efecto de “epitope broadening” puede no ser generalizable<sup>92</sup>.

En otro estudio, los anticuerpos agonistas anti-CD137 demostraron su capacidad para aumentar en tres veces la inmunidad T inducida mediante vacunación con *poxvirus*<sup>93</sup>. Estos autores estudiaron la respuesta murina de linfocitos T CD8+ tras una inmunización con DNA y una reinmunización con *poxvirus* recombinante. La estimulación de CD137 incrementó el número de células T CD8+ memoria de 2 a 3 veces. En este mismo trabajo se probó la combinación con anticuerpos anti-OX-40 que consiguió incrementar la respuesta de linfocitos T CD4+, con un efecto neto sinérgico<sup>93</sup>.

Los tres estudios considerados en este apartado sugieren un enorme potencial para los anticuerpos anti-CD137, en la vacunación frente a enfermedades virales en que la protección se consigue mediante

células T memoria. Por el contrario, teóricamente los anticuerpos anti-CD137 no deberían incrementar la eficacia de vacunas cuya eficacia dependa de la inducción de anticuerpos neutralizantes.

## REFLEXIONES SOBRE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN

En la actualidad, muchas características de los anticuerpos anti-CD137 sugieren fuertemente su potencial en terapia humana. El incremento de las respuestas de linfocitos T citotóxicos a la vez que se previene la autoinmunidad, parecen dar forma a un nuevo e inesperado paradigma en inmunoterapia. Debemos admitir que tenemos tan solo un conocimiento parcial de los mecanismos que operan tras esta paradoja. Un mejor entendimiento de ambas clases de efectos aparentemente contrapuestos nos conduciría a introducir mejoras en las estrategias clínicas futuras.

La señalización a través de CD137 es un área activa de estudio. La contribución de TRAF-1 y 2, MAP quinasas y NF-kB están bien establecidas<sup>14</sup>. Además, evidencias experimentales recientes demuestran que la estimulación de CD137 con anticuerpos agonistas amplifica muchos pasos de señalización activados a través del TCR (Receptor de antígeno de la célula T). Estos estudios sugieren una intercomunicación entre CD137 y el complejo CD3/TCR<sup>94</sup>. La estimulación del receptor CD137 con pequeñas moléculas es un área de investigación activa y atractiva, cuyo objetivo se centra en encender señales bioquímicas similares a las que inducen los anticuerpos. La señalización a través de las moléculas de la familia del receptor de TNF, como CD137, requieren multimerización inducida por ligando<sup>17</sup>, una actividad en que los anticuerpos agonistas bivalentes podrían ser mejorados con un entrecruzamiento molecular para formar multímeros.

Las moléculas de señalización estimuladas por otros miembros coestimuladores de la familia del receptor de TNF parecen ser muy similares y hay esperanza de que las vías de señalización se puedan activar artificial y transitoriamente con fármacos<sup>17</sup>.

Un punto crucial, que debe ser esclarecido en el futuro, es por qué los anticuer-

pos tienen un efecto diferencial en células T CD8+ cuando se compara con células T CD4+, y por qué estos efectos diferenciales no se observan con el ligando natural de CD137. Un estudio reciente en artritis inducida por colágeno desnaturalizado ha señalado una ruta que puede explicar los efectos beneficiosos en autoinmunidad<sup>19</sup>. Este trabajo documenta que una activación de gran intensidad de linfocitos T citotóxicos conlleva una inducción de indolemina dioxigenasa inducida por interferón-g, que a su vez inhibe la autoinmunidad mediada por linfocitos T CD4+. Este descubrimiento es posiblemente solo parte de la historia, porque tal mecanismo no bastaría para explicar los efectos diferenciales en células T CD4+ y CD8+<sup>44</sup>. Entre otras posibilidades, los efectos agonistas de los anticuerpos anti-CD137 sobre las células T reguladoras Foxp3+ será un área de investigación muy productiva<sup>95</sup>. Los anticuerpos agonistas anti-CD137 coestimulan la proliferación de estos linfocitos<sup>45</sup>.

En el caso de la inmunoterapia antitumoral y antiviral puede ser inteligente interferir estos mecanismos de regulación, incluso poniéndonos en riesgo de inducir reacciones autoinmunitarias o reacciones inflamatorias sistémicas.

## SACANDO PARTIDO DE LA INFORMACIÓN PRECLÍNICA PARA EL DESARROLLO DE INMUNOTERAPIAS BASADAS EN CD137: HOJA DE RUTA HACIA LA CLÍNICA

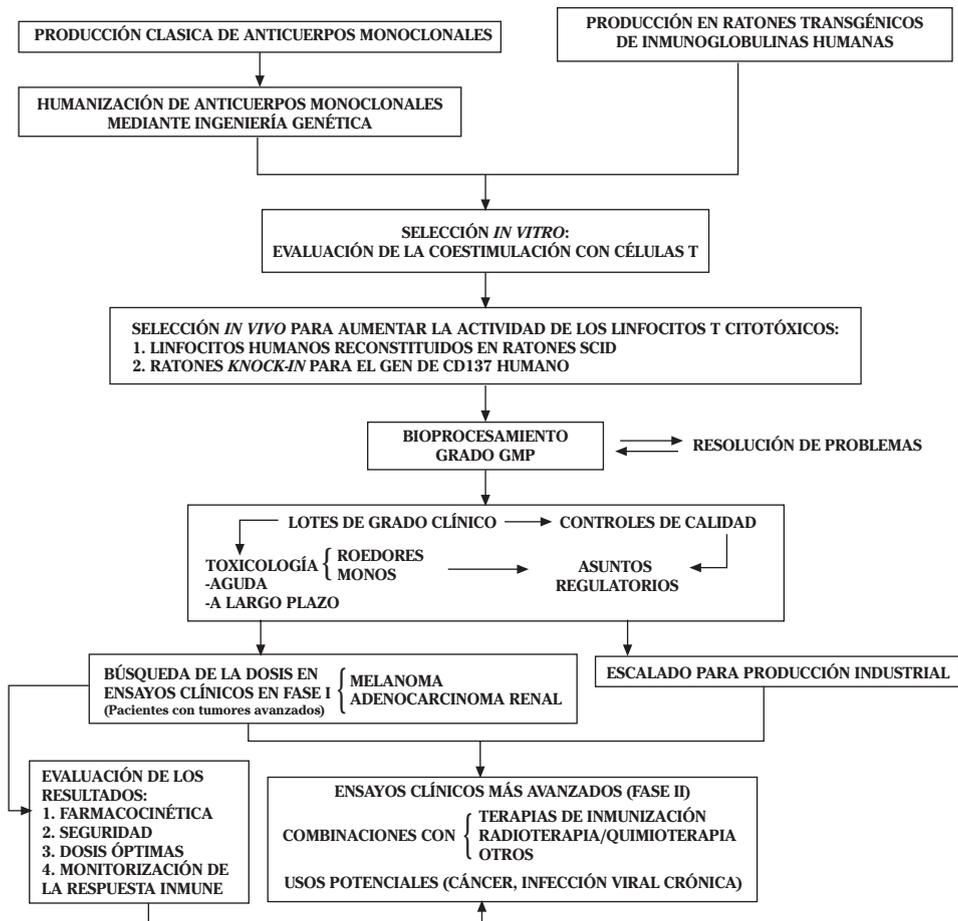
Llevar los anticuerpos monoclonales agonistas anti-CD137 a la clínica es una tarea difícil pero no imposible. Tal como se representa en la figura 3, en primer lugar comprende la producción de un panel de anticuerpos anti-CD137 humano a través de las técnicas clásicas de producción de hibridomas de ratón o en ratones transgénicos que producen anticuerpos completamente humanos. Si se elige la tecnología clásica, se necesita de técnicas de ingeniería genética para humanizar la secuencia. En ese momento los anticuerpos deben ser seleccionados por su capacidad de coestimular la proliferación de células T humanas *in vitro*. Sin embargo, este criterio por

sí mismo, no asegura su actividad terapéutica *in vivo*. Para predecir con mayor precisión esta característica hay dos experimentos factibles:

1. Experimentar el efecto del anticuerpo sobre la respuesta de linfocitos T citotóxicos en ratones SCID reconstituidos con linfocitos humanos.

2. Generar ratones *knock-in* en los cuales la secuencia de CD137 humano esté regulada por los mismos factores que inducen el CD137 de ratón. En este último caso, los efectos de los anticuerpos humanizados seleccionados deberían alcanzar la misma eficacia que la observada en tumores transplantables con anticuerpos anti-CD137 de ratón.

### DIAGRAMA PARA LA TRANSILACIÓN CLÍNICA DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-CD137 (ANTI-4-1BB)



**Figura 3.** Diagrama sobre la toma de decisiones, paso a paso, de anticuerpos agonistas anti-CD137 para su aplicación clínica.

La humanización de los anticuerpos monoclonales es obligatoria para su uso en la clínica, pero quizá no deberíamos olvidar que toda la eficacia preclínica publicada, en el fondo incluye inmunoglobulinas de rata inyectadas a ratones. Sin embargo, no existe "a priori" ninguna razón para predecir ninguna ventaja para los anticuerpos heterólogos.

Una vez que se haya seleccionado un anticuerpo en concreto, los expertos en bioprocesamiento industrial tienen que encontrar la manera de producir cantidades suficientes para toxicología, control de calidad y ensayos clínicos piloto. La producción de proteína por técnicas clásicas de cultivos celulares es la posibilidad más fácil, mientras que se pueden considerar otras aproximaciones que incluyen el uso de biotecnología más creativa. Tal es el caso de plantas transgénicas o mamíferos transgénicos que produzcan los anticuerpos en la leche.

Los profesionales clínicos que diseñan y dirigen el desarrollo clínico tendrán que llevar a cabo ensayos de búsqueda de dosis en pacientes con casos avanzados de melanoma o adenocarcinoma renal. Otra posibilidad sería incluir en estos ensayos clínicos piloto a pacientes con un amplio espectro de enfermedades malignas. Cada una de las alternativas tiene ventajas y desventajas potenciales. El melanoma y el adenocarcinoma renal son probablemente las enfermedades con una mayor probabilidad de demostrar eficacia clínica en el desarrollo temprano. Los datos sugestivos de eficacia son importantes para apoyar la inversión en ensayos clínicos avanzados en los que demostrar el beneficio clínico. La combinación del tratamiento con anticuerpos anti-CD137 y estrategias de inmunización, es una tentación y posiblemente una alternativa inteligente, ya que en principio hay sobradas razones para no esperar autoinmunidad. La introducción de antígenos artificiales para medir respuestas de linfocitos T y de anticuerpos puede servir para demostrar efectos biológicos y dar una idea de la intensidad de los mismos. Sin embargo, los antígenos artificiales pueden desequilibrar la inmunodominancia<sup>96</sup> y poner en riesgo la respuesta frente a los antígenos tumorales

más relevantes. Por tanto, es debatible si conviene la introducción de estos antígenos modelos en los ensayos clínicos tempranos, aún cuando somos partidarios de proceder de esta manera al menos en alguno de estos ensayos.

Debemos tener presente que la autoinmunidad con anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 no se pudo predecir antes de llegar a su uso clínico directamente, o en combinación con antígenos tumorales utilizados como vacunas. Sin embargo, en aquel caso, el fenotipo autoinmunitario severo que se observa en los ratones *knock-out* para el gen de CTLA-4<sup>39,40</sup>, debería haber aconsejado un desarrollo clínico más cuidadoso. En cualquier caso, un exhaustivo seguimiento de posibles reacciones autoinmunes es un deber inexcusable en el caso de las terapias basadas en CD137.

La búsqueda de dosis y la farmacocinética van a ser muy interesantes. Previsiblemente los anticuerpos anti-CD137 van a inhibir la respuesta humoral frente a sí mismos, prolongando su vida media, aún cuando no estén completamente humanizados. Un anticuerpo humanizado de estas características ha demostrado ya estas propiedades en monos<sup>97</sup>. En nuestra opinión habría que probar un rango de dosis de 0,1 mg/Kg de peso a 40 mg/kg, con un seguimiento concienzudo de la farmacocinética, que podemos anticipar será excelente, en comparación con otros anticuerpos monoclonales utilizados en clínica. La readministración de dosis se deberá de decidir a partir de los estudios farmacocinéticos en primates no humanos, pero probablemente consistirá en administraciones semanales o cada dos semanas. Son necesarios estudios concienzudos en monos que hayan probado la seguridad de la sobredosis con estos anticuerpos, así como la ausencia de efectos tóxicos a largo plazo.

Desafortunadamente, no disponemos de estudios de dosis en los modelos de ratón, por lo que no podemos anticipar un régimen óptimo preclínico de dosis para el tratamiento del cáncer. Si se elige una cola de IgG4 para el anticuerpo humanizado, no esperaríamos *a priori* efectos adversos

mas allá de los efectos biológicos sobre la respuesta inmune. En este sentido, tenemos confianza en que la prevención de la autoinmunidad que se observa en ratones estará conservada en los seres humanos. Si esto es así, cabe plantear ensayos clínicos en alguna de estas enfermedades, que por razones de riesgo/beneficio deberían posponerse a la demostración de seguridad en pacientes con cáncer avanzado.

Una vez finalizados y evaluados los ensayos clínicos piloto, el entusiasmo no debería desaparecer aun cuando no se observe eficacia clínica o ésta sea muy modesta. Ese sería el momento de probar las mejores estrategias sinérgicas definidas en los modelos preclínicos, extendiendo el tratamiento a otras enfermedades, que en algún momento deberán incluir infecciones virales crónicas resistentes al tratamiento convencional. En nuestra opinión esta hoja de ruta va a ser seguida en un futuro cercano por varios grupos con apoyo industrial competidores entre sí. Los datos preclínicos apoyan sin duda el desarrollo clínico de la inmunoterapia fundamentada en CD137.

## BIBLIOGRAFÍA

1. DILLMAN RO. Monoclonal antibodies in the treatment of malignancy: basic concepts and recent developments. *Cancer Invest* 2001; 19: 833-841.
2. FELDMAN M, TAYLOR P, PALEOLOG E, BRENNAN FM, MAINI RN. Anti-TNF alpha therapy is useful in rheumatoid arthritis and Crohn's disease: analysis of the mechanism of action predicts utility in other diseases. *Transplant Proc* 1998; 30: 4126-4127.
3. GREEN MC, MURRAY JL, HORTOBAGYI GN. Monoclonal antibody therapy for solid tumors. *Cancer Treat Rev* 2000; 26: 269-286
4. JOHNSON PW, GLENNIE MJ. Rituximab: mechanisms and applications. *Br J Cancer* 2001; 85: 1619-1623.
5. CIARDIELLO F, TORTORA G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2958-2970.
6. YANG JC, HAWORTH L, SHERRY RM, HWU P, SCHWARTZENTRUBER DJ, TOPALIAN SL et al. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 427-434.

7. MURILLO O, ARINA A, TIRAPU I, ALFARO C, MAZZOLINI G, PALENCIA B et al. Potentiation of therapeutic immune responses against malignancies with monoclonal antibodies. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5454-5464.
8. MENDEZ MJ, GREEN LL, CORVALAN JR, JIA XC, MAYNARD-CURRIE CE, YANG XD et al. Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nat Genet* 1997; 15: 146-156.
9. LEACH DR, KRUMMEL MF, ALLISON JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 1996; 271: 1734-1736.
10. HURWITZ AA, YU TF, LEACH DR, ALLISON JP. CTLA-4 blockade synergizes with tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of an experimental mammary carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 10067-10071.
11. VAN ELSAS A, HURWITZ AA, ALLISON JP. Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J Exp Med* 1999; 190: 355-366.
12. SUTMULLER RP, VAN DUIVENVOORDE LM, VAN ELSAS A, SCHUMACHER TN, WILDENBERG ME, ALLISON JP et al. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 2001; 194: 823-832.
13. ATTIA P, PHAN GQ, MAKER AV, ROBINSON MR, QUEZADO MM, YANG JC et al. Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6043-6053.
14. WATTS TH. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 23-68.
15. MYERS LM, VELLA AT. Interfacing T-cell effector and regulatory function through CD137 (4-1BB) co-stimulation. *Trends Immunol* 2005; 26: 440-446.
16. SHUFORD WW, KLUSSMAN K, TRITCHLER DD, LOO DT, CHALUPNY J, SIADAK AW et al. 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *J Exp Med* 1997; 186: 47-55.

17. CROFT M. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 609-620.
18. SUN Y, LIN X, CHEN HM, WU Q, SUBUDHI SK, CHEN L et al. Administration of agonistic anti-4-1BB monoclonal antibody leads to the amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2002; 168: 1457-1465.
19. SEO SK, CHOI JH, KIM YH, KANG WJ, PARK HY, SUH JH et al. 4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis. *Nat Med* 2004; 10: 1088-1094.
20. SUN Y, CHEN HM, SUBUDHI SK, CHEN J, KOKA R, CHEN L et al. Costimulatory molecule-targeted antibody therapy of a spontaneous autoimmune disease. *Nat Med* 2002; 8: 1405-1413.
21. FOELL J, STRAHOTIN S, O'NEIL SP, MCCAUSLAND MM, SUWYN C, HABER M et al. CD137 costimulatory T cell receptor engagement reverses acute disease in lupus-prone NZB x NZW F1 mice. *J Clin Invest* 2003; 111: 1505-1518.
22. BANCHEREAU J, PALUCKA AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 296-306.
23. DUDLEY ME, WUNDERLICH JR, ROBBINS PF, YANG JC, HWU P, SCHWARTZENTRUBER DJ et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 2002; 298: 850-854.
24. MURPHY WJ, TIAN ZG, ASAI O, FUNAKOSHI S, ROTTER P, HENRY M et al. Chemokines and T lymphocyte activation: II. Facilitation of human T cell trafficking in severe combined immunodeficiency mice. *J Immunol* 1996; 156: 2104-2111.
25. MURPHY A, WESTWOOD JA, TENG MW, MOELLER M, DARCY PK, KERSHAW MH. Gene modification strategies to induce tumor immunity. *Immunology* 2005; 22: 403-414.
26. DONG H, STROME SE, SALOMAO DR, TAMURA H, HIRANO F, FLIES DB et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002; 8: 793-800.
27. HIRANO F, KANEKO K, TAMURA H, DONG H, WANG S, ICHIKAWA M et al. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res* 2005; 65: 1089-1096.
28. EGEN JG, KUHN MS, ALLISON JP. CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat Immunol* 2002; 3: 611-618.
29. SAKAGUCHI S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6: 345-352.
30. MULLER AJ, DUHADAWAY JB, DONOVER PS, SUTANTO-WARD E, PRENDERGAST GC. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat Med* 2005; 11: 312-319.
31. PARDOLL D, ALLISON J. Cancer immunotherapy: breaking the barriers to harvest the crop. *Nat Med* 2004; 10: 887-892.
32. CHEN L, ASHE S, BRADY WA, HELLSTROM I, HELLSTROM KE, LEDBETTER JA et al. Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell* 1992; 71: 1093-1102.
33. TOWNSEND SE, ALLISON JP. Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells. *Science* 1993; 259: 368-370.
34. CHEN L, MCGOWAN P, ASHE S, JOHNSTON J, LI Y, HELLSTROM I et al. Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *J Exp Med* 1994; 179: 523-532.
35. MELERO I, SHUFORD WW, NEWBY SA, ARUFFO A, LEDBETTER JA, HELLSTROM KE et al. Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med* 1997; 3: 682-685.
36. MILLER RE, JONES J, LE T, WHITMORE J, BOIANI N, GLINIAK B et al. 4-1BB-specific monoclonal antibody promotes the generation of tumor-specific immune responses by direct activation of CD8 T cells in a CD40-dependent manner. *J Immunol* 2002; 169: 1792-1800.
37. MELERO I, JOHNSTON JV, SHUFFORD WW, MITTLER RS, CHEN L. NK1.1 cells express 4-1BB (CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1BB monoclonal antibodies. *Cell Immunol* 1998; 190: 167-172.
38. WILCOX RA, TAMADA K, STROME SE, CHEN L. Signaling through NK cell-associated CD137 promotes both helper function for CD8+ cytolytic T cells and responsiveness to IL-2 but not cytolytic activity. *J Immunol* 2002; 169: 4230-4236.
39. WATERHOUSE P, PENNINGER JM, TIMMS E, WAKEHAM A, SHAHINIAN A, LEE KP et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4. *Science* 1995; 270: 985-988.
40. TIVOL EA, BORRIELLO F, SCHWEITZER AN, LYNCH WP, BLUESTONE JA, SHARPE AH. Loss of CTLA-4

- leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995; 3: 541-547.
41. PHAN GQ, YANG JC, SHERRY RM, HWU P, TOPALIAN SL, SCHWARTZENTRUBER DJ et al. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 8372-8377.
  42. HODI FS, MIHM MC, SOIFFER RJ, HALUSKA FG, BUTLER M, SEIDEN MV et al. Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 4712-4717.
  43. SANDERSON K, SCOTLAND R, LEE P, LIU D, GROSHEN S, SNIVELY J et al. Autoimmunity in a phase I trial of a fully human anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 monoclonal antibody with multiple melanoma peptides and Montanide ISA 51 for patients with resected stages III and IV melanoma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 741-750.
  44. MITTLER RS. Suppressing the self in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 2004; 10: 1047-1049.
  45. ZHENG G, WANG B, CHEN A. The 4-1BB costimulation augments the proliferation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2004; 173: 2428-2434.
  46. FRENCH RR, CHAN HT, TUTT AL, GLENNIE MJ. CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. *Nat Med* 1999; 5: 548-553.
  47. LANZAVECCHIA A. Immunology. Licence to kill. *Nature* 1998; 393: 413-414.
  48. GOODWIN RG, DIN WS, DAVIS-SMITH T, ANDERSON DM, GIMPEL SD, SATO TA et al. Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Eur J Immunol* 1993; 23: 2631-2641.
  49. MELERO I, BACH N, HELLSTROM KE, ARUFFO A, MITTLER RS, CHEN L. Amplification of tumor immunity by gene transfer of the co-stimulatory 4-1BB ligand: synergy with the CD28 co-stimulatory pathway. *Eur J Immunol* 1998; 28: 1116-1121.
  50. CHU NR, DEBENEDETTE MA, STIERNHOLM BJ, BARBER BH, WATTS TH. Role of IL-12 and 4-1BB ligand in cytokine production by CD28+ and CD28- T cells. *J Immunol* 1997; 158: 3081-3089.
  51. GUINN BA, DEBENEDETTE MA, WATTS TH, BERINSTEIN NL. 4-1BBL cooperates with B7-1 and B7-2 in converting a B cell lymphoma cell line into a long-lasting antitumor vaccine. *J Immunol* 1999; 162: 5003-5010.
  52. SALIH HR, KOSOWSKI SG, HALUSKA VF, STARLING GC, LOO DT, LEE F et al. Constitutive expression of functional 4-1BB (CD137) ligand on carcinoma cells. *J Immunol* 2000; 165: 2903-2910.
  53. SALIH HR, SCHMETZER HM, BURKE C, STARLING GC, DUNN R, PELKA-FLEISCHER R et al. Soluble CD137 (4-1BB) ligand is released following leukocyte activation and is found in sera of patients with hematological malignancies. *J Immunol* 2001; 167: 4059-4066.
  54. WILCOX RA, FLIES DB, ZHU G, JOHNSON AJ, TAMADA K, CHAPOVAL AI et al. Provision of antigen and CD137 signaling breaks immunological ignorance, promoting regression of poorly immunogenic tumors. *J Clin Invest* 2002; 109: 651-659.
  55. CHEN W, MASTERMAN KA, BASTA S, HAERYFAR SM, DIMOPOULOS N, KNOWLES B et al. Cross-priming of CD8+ T cells by viral and tumor antigens is a robust phenomenon. *Eur J Immunol* 2004; 34: 194-199.
  56. VAN MIERLO GJ, BOONMAN ZF, DUMORTIER HM, DEN BOER AT, FRANSEN MF, NOUTA J et al. Activation of dendritic cells that cross-present tumor-derived antigen licenses CD8+ CTL to cause tumor eradication. *J Immunol* 2004; 173: 6753-6759.
  57. OCHSENBEIN AF, KLENERMAN P, KARRER U, LUDEWIG B, PERICIN M, HENGARTNER H et al. Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 2233-2238.
  58. MELERO I, SINGHAL MC, MCGOWAN P, HAUGEN HS, BLAKE J, HELLSTROM KE et al. Immunological ignorance of an E7-encoded cytolytic T-lymphocyte epitope in transgenic mice expressing the E7 and E6 oncogenes of human papillomavirus type 16. *J Virol* 1997; 71: 3998-4004.
  59. CHEN L. Immunological ignorance of silent antigens as an explanation of tumor evasion. *Immunol Today* 1998; 19: 27-30.
  60. WILCOX RA, TAMADA K, FLIES DB, ZHU G, CHAPOVAL AI, BLAZAR BR et al. Ligation of CD137 receptor prevents and reverses established anergy of CD8+ cytolytic T lymphocytes in vivo. *Blood* 2004; 103: 177-184.
  61. TIRAPU I, ARINA A, MAZZOLINI G, DUARTE M, ALFARO C, FEJOO E et al. Improving efficacy of interleukin-12-transfected dendritic cells injected into murine colon cancer with anti-CD137 monoclonal antibodies and alloantigens. *Int J Cancer* 2004; 110: 51-60.

62. ITO F, LI Q, SHREINER AB, OKUYAMA R, JUREKUNDEL MN, TEITZ-TENNENBAUM S et al. Anti-CD137 monoclonal antibody administration augments the antitumor efficacy of dendritic cell-based vaccines. *Cancer Res* 2004; 64: 8411-8419.
63. DUDLEY ME, ROSENBERG SA. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 666-675.
64. MOSS P, RICKINSON A. Cellular immunotherapy for viral infection after HSC transplantation. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 9-20.
65. WALDMANN TA, DUBOIS S, TAGAYA Y. Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy. *Immunity* 2001; 14: 105-110.
66. KLEBANOFF CA, KHONG HT, ANTONY PA, PALMER DC, RESTIFO NP. Sinks, suppressors and antigen presenters: how lymphodepletion enhances T cell-mediated tumor immunotherapy. *Trends Immunol* 2005; 26: 111-117.
67. KIM JA, AVERBOOK BJ, CHAMBERS K, ROTHCHILD K, KIAERGAARD J, PAPAY R et al. Divergent effects of 4-1BB antibodies on antitumor immunity and on tumor-reactive T-cell generation. *Cancer Res* 2001; 61: 2031-2037.
68. MAY KF, JR., CHEN L, ZHENG P, LIU Y. Anti-4-1BB monoclonal antibody enhances rejection of large tumor burden by promoting survival but not clonal expansion of tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Cancer Res* 2002; 62: 3459-3465.
69. MUKHERJEE P, TINDER TL, BASU GD, PATHANGEY LB, CHEN L, GENDLER SJ. Therapeutic efficacy of MUC1-specific cytotoxic T lymphocytes and CD137 co-stimulation in a spontaneous breast cancer model. *Breast Dis* 2004; 20: 53-63.
70. MAUS MV, THOMAS AK, LEONARD DG, ALLMAN D, ADDYA K, SCHLIENGER K et al. Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 143-148.
71. BLAZAR BR, KWON BS, PANOSKALTSIS-MORTARI A, KWAK KB, PESCHON JJ, TAYLOR PA. Ligation of 4-1BB (CDw137) regulates graft-versus-host disease, graft-versus-leukemia, and graft rejection in allogeneic bone marrow transplant recipients. *J Immunol* 2001; 166: 3174-3183.
72. KIM J, CHOI WS, LA S, SUH JH, KIM BS, CHO HR et al. Stimulation with 4-1BB (CD137) inhibits chronic graft-versus-host disease by inducing activation-induced cell death of donor CD4<sup>+</sup> T cells. *Blood* 2005; 105: 2206-2213.
73. RUGGERI L, CAPANNI M, MANCUSI A, PERRUCCIO K, BURCHIELLI E, MARTELLI MF et al. Natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol* 2005; 81: 13-17.
74. RUGGERI L, CAPANNI M, URBANI E, PERRUCCIO K, SHLOMCHIK WD, TOSTI A et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002; 295: 2097-2100.
75. MILLER JS, SOIGNIER Y, PANOSKALTSIS-MORTARI A, MCNEARNEY SA, YUN GH, FAUTSCH SK et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 2005; 105: 3051-3057.
76. COLOMBO MP, TRINCHIERI G. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13: 155-168.
77. CHEN SH, PHAM-NGUYEN KB, MARTINET O, HUANG Y, YANG W, THUNG SN et al. Rejection of disseminated metastases of colon carcinoma by synergism of IL-12 gene therapy and 4-1BB costimulation. *Mol Ther* 2000; 2: 39-46.
78. MARTINET O, ERMEKOVA V, QIAO JQ, SAUTER B, MANDELI J, CHEN L et al. Immunomodulatory gene therapy with interleukin 12 and 4-1BB ligand: long-term remission of liver metastases in a mouse model. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 931-936.
79. MARTINET O, DIVINO CM, ZANG Y, GAN Y, MANDELI J, THUNG S et al. T cell activation with systemic agonistic antibody versus local 4-1BB ligand gene delivery combined with interleukin-12 eradicate liver metastases of breast cancer. *Gene Ther* 2002; 9: 786-792.
80. SANGRO B, MAZZOLINI G, RUIZ J, HERRAIZ M, QUIROGA J, HERRERO I et al. Phase I trial of intratumoral injection of an adenovirus encoding interleukin-12 for advanced digestive tumors. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1389-1397.
81. MAZZOLINI G, ALFARO C, SANGRO B, FEJOO E, RUIZ J, BENITO A et al. Intratumoral injection of dendritic cells engineered to secrete interleukin-12 by recombinant adenovirus in patients with metastatic gastrointestinal carcinomas. *J Clin Oncol* 2005; 23: 999-1010.
82. WIETHE C, DITTMAR K, DOAN T, LINDENMAIER W, TINDLE R. Provision of 4-1BB ligand enhances effector and memory CTL responses generated by immunization with dendritic cells expressing a human tumor-associated antigen. *J Immunol* 2003; 170: 2912-2922.
83. YE Z, HELLSTROM I, HAYDEN-LEDBETTER M, DAHLIN A, LEDBETTER JA, HELLSTROM KE. Gene therapy

- for cancer using single-chain Fv fragments specific for 4-1BB. *Nat Med* 2002; 8: 343-348.
84. DAWICKI W, BERTRAM EM, SHARPE AH, WATTS TH. 4-1BB and OX40 act independently to facilitate robust CD8 and CD4 recall responses. *J Immunol* 2004; 173: 5944-5951.
85. LEE SJ, MYERS L, MURALIMOHAN G, DAI J, QIAO Y, LI Z et al. 4-1BB and OX40 dual costimulation synergistically stimulate primary specific CD8 T cells for robust effector function. *J Immunol* 2004; 173: 3002-3012.
86. TIRAPU I, MAZZOLINI G, RODRIGUEZ-CALVILLO M, ARINA A, PALENCIA B, GABARI I et al. Effective tumor immunotherapy: start the engine, release the brakes, step on the gas pedal....and get ready to face autoimmunity. *Arch Immunol Ther Exp* 2002; 50: 13-18.
87. DEBENEDETTE MA, WEN T, BACHMANN MF, OHASHI PS, BARBER BH, STOCKING KL et al. Analysis of 4-1BB ligand (4-1BBL)-deficient mice and of mice lacking both 4-1BBL and CD28 reveals a role for 4-1BBL in skin allograft rejection and in the cytotoxic T cell response to influenza virus. *J Immunol* 1999; 163: 4833-4841.
88. TAN JT, WHITMIRE JK, AHMED R, PEARSON TC, LARSEN CP. 4-1BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses. *J Immunol* 1999; 163: 4859-4868.
89. KWON BS, HURTADO JC, LEE ZH, KWACK KB, SEO SK, CHOI BK et al. Immune responses in 4-1BB (CD137)-deficient mice. *J Immunol* 2002; 168: 5483-5490.
90. BUKCZYNSKI J, WEN T, ELLEFSEN K, GAULDIE J, WATTS TH. Costimulatory ligand 4-1BBL (CD137L) as an efficient adjuvant for human antiviral cytotoxic T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 1291-1296.
91. HALSTEAD ES, MUELLER YM, ALTMAN JD, KATSIKIS PD. In vivo stimulation of CD137 broadens primary antiviral CD8+ T cell responses. *Nat Immunol* 2002; 3: 536-541.
92. ARRIBILLAGA L, SAROBE P, ARINA A, GORRAIZ M, BORRAS-CUESTA F, RUIZ J et al. Enhancement of CD4 and CD8 immunity by anti-CD137 (4-1BB) monoclonal antibodies during hepatitis C vaccination with recombinant adenovirus. *Vaccine* 2005; 23: 3493-3499
93. MUNKS MW, MOURICH DV, MITTLER RS, WEINBERG AD, HILL AB. 4-1BB and OX40 stimulation enhance CD8 and CD4 T-cell responses to a DNA prime, poxvirus boost vaccine. *Immunology* 2004; 112: 559-566.
94. NAM KO, KANG H, SHIN SM, CHO KH, KWON B, KWON BS et al. Cross-linking of 4-1BB activates TCR-signaling pathways in CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* 2005; 174: 1898-1905.
95. CHOI BK, BAE JS, CHOI EM, KANG WJ, SAKAGUCHI S, VINAY DS et al. 4-1BB-dependent inhibition of immunosuppression by activated CD4+CD25+ T cells. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 785-791.
96. YEWDELL JW, DEL VAL M. Immunodominance in TCD8+ responses to viruses: cell biology, cellular immunology, and mathematical models. *Immunity* 2004; 21: 149-153.
97. HONG HJ, LEE JW, PARK SS, KANG YJ, CHANG SY, KIM KM et al. A humanized anti-4-1BB monoclonal antibody suppresses antigen-induced humoral immune response in nonhuman primates. *J Immunother* 2000; 23: 613-621.