

Primeras evidencias en humanos del beneficio clínico de la administración crónica de una vacuna basada en el VEGF en pacientes con tumores sólidos avanzados

Hernández Bernal, Francisco¹
Morera Díaz, Yanelys¹
Selman-Housein Bernal, Katty-Hind²
de la Torre Santos, Ana³
Martín Bauta, Yenima¹
Sánchez Ramírez, Javier¹
Bequet Romero, Mónica¹
Gavilondo Cowley, Jorge Victor¹
Ayala Ávila, Marta¹

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) / Dirección de Investigaciones Clínicas, La Habana, Cuba, E-mail: hernandez.bernal@cigb.edu.cu

²Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas, La Habana, Cuba, E-mail: khselman@cimeq.sld.cu

³Hospital Universitario "Celestino Hernández", Villa Clara, Cuba, E-mail: yenima@infomed.sld.cu

RESUMEN

Introducción: El cáncer constituye un problema de salud mundial. **Objetivo:** Evaluar en humanos un candidato vacunal de inmunoterapia activa específica con factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) como diana. **Materiales y Métodos:** Se realizó un ensayo clínico fase I, de escalado de dosis, que evaluó seguridad, tolerancia e inmunogenicidad en 30 pacientes con tumores sólidos en etapa clínica avanzada sin respuesta a las terapias oncológicas y una expectativa de vida de seis meses. Los pacientes recibieron inmunizaciones subcutáneas durante ocho semanas con el antígeno recombinante p64K-hVEGF_{KDR}- adyuvado en VSSP. Los sobrevivientes recibieron reinmunizaciones mensuales hasta la muerte. **Resultados:** La vacunación crónica con SaVax ha demostrado ser inmunogénica y segura: 191 eventos adversos, en su mayoría leves (ninguno grave), atribuibles a la vacuna. Todos los pacientes muestran evidencias de respuesta inmune; la seroconversión aumentó con la dosis del antígeno: 3/10-6/10-7/10 pacientes positivos en las dosis de 50-100-400µg respectivamente. Con la administración crónica los títulos disminuyen pero se mantienen superiores al pre-inmune y la capacidad neutralizante de esos anticuerpos se mantiene. Se observó beneficio clínico, con estabilización o mejoría de la respuesta tumoral y la reincorporación a la vida social de los sobrevivientes. Luego de 6 años, el 23,3% de los pacientes continúan vivos; dos tienen respuesta completa, uno respuesta parcial y tres en enfermedad progresiva. **Conclusiones:** Este es el primer estudio en humanos con una vacuna terapéutica contra el cáncer que se basa en una molécula relacionada al VEGF₁₂₁ utilizada como antígeno. La vacuna SaVax es segura e inmunogénica.

Palabras clave: Cáncer, inmunoterapia activa, VEGF, angiogénesis, ensayo clínico, vacuna.

I. INTRODUCCIÓN

El concepto presentado por Folkman (1) en el que la diana es la vasculatura del tumor en lugar de las células tumorales directamente, pudiera convertirse en una estrategia nueva y prometedora en el tratamiento del cáncer, lo cual ha evolucionado en la última década hacia una plataforma de desarrollo de medicamentos que crece rápidamente. Ya han sido aprobadas varias terapias antiangiogénicas para el cáncer, y se ha informado que hay muchas en estudios preclínicos y clínicos (2).

Entre estas nuevas estrategias de tratamiento, la inmunoterapia activa específica es una línea de trabajo que está bajo intensa investigación. Debido a que las vacunas antiangiogénicas se diseñan fundamentalmente con células endoteliales enteras, o con ADN, péptidos y proteínas representativas del VEGF, los receptores del VEGF y otras moléculas relacionadas con la angiogénesis (3-5), se espera que la intensidad y duración de las respuestas inmunes específicas producidas contra estos auto-antígenos estén fisiológicamente reguladas en sentido negativo. Como resultado de esto, se prevé que la toxicidad aguda y eventos adversos sean mucho menos que los producidos por medicamentos convencionales; así estas vacunas podrán ser utilizadas en combinación con radioterapia, quimioterapia y con anticuerpos antiangiogénicos y productos sintéticos, para poder evitar o retrasar la recurrencia y progresión del tumor.

Solo una pequeña cantidad de candidatos a vacunas antiangiogénicas que se basan en células epiteliales enteras y receptores de VEGF han alcanzado las fases iniciales de estudios clínicos (6,7). Se realizó un ensayo clínico fase I con el objetivo primario de evaluar la seguridad, la tolerabilidad y la inmunogenicidad del candidato vacunal SaVax en pacientes con tumores sólidos avanzados. Savax es una vacuna contra el cáncer que combina un antígeno de la isoforma 121 del VEGF-a humano recombinante (5), con un adyuvante derivado de bacterias. La vacuna ya había mostrado que inhibía el crecimiento tumoral y metástasis en ratones y que inducía anticuerpos bloqueadores del VEGF y respuestas de células T específicas en varias especies de animales; siempre ha mostrado un excelente perfil de seguridad (3-5).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Concepción General

Se ejecutó un ensayo clínico fase I (Estudio CENTAURO), multicéntrico, abierto, no controlado, de escalado de dosis. Se distribuyeron treinta pacientes en tres cohortes correspondientes a 50, 100 y 400 µg del antígeno. Inicialmente tres pacientes fueron incluidos en cada nivel de dosis (simulando el diseño de Fibonacci), y la decisión para el escalado, en orden ascendente, dependió de la ausencia de toxicidad (evento adverso grave) con relación de causalidad demostrada, después de la 8^{va} inmunización. Mientras no se decidió el escalado, se completó la inclusión de pacientes en los niveles de dosis inferiores (10 pacientes/dosis).

B. Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión de los pacientes fueron: tumores malignos sólidos o metástasis confirmadas histológicamente; lesión(es) medible(s); enfermedad avanzada que: (i) se había mostrado refractaria a las terapias oncoespecíficas disponibles, estaba en progresión o se preveía que progresaría rápidamente y/o (ii) no era susceptible a otro tratamiento oncoespecífico debido al estado general del paciente; sin terapia para el cáncer durante ≥ 4 semanas; de cualquier sexo y edades entre 18 y 65 años (ambos inclusive); y con estatus ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) de desempeño ≤ 2 .

Los criterios de exclusión comprendían: enfermedades crónicas no compensadas, enfermedades autoinmunes o supresoras de la inmunidad, o el uso de medicamentos inmunomoduladores, infecciones sistémicas moderadas o graves, individuos que reciben terapias biológicas, así como inmunoterapias activas o pasivas, alergias a los componentes de la vacuna, mujeres en gestación o lactación y personas con incapacidad mental para comprender la información del estudio, dar su consentimiento y actuar en consecuencia durante el estudio

C. Deontología Médica

Se obtuvo el dictamen del Comité de Ética para la Investigación Científica de cada sitio clínico participante, así como la aprobación de la agencia reguladora nacional de medicamentos (CECMED), quienes certificaron que el estudio se ajustó a la Declaración de Helsinki, así como a las normas y criterios éticos establecidos en los códigos nacionales e internacionales de ética y regulaciones legales vigentes en Cuba (Directrices de Buena Práctica Clínica, CECMED 2000, Cuba).

D. Producto de Investigación

SaVax es una combinación de una proteína recombinante de fusión representativa de la isoforma 121 del VEGF humano (20), y un adyuvante formado por partículas de muy pequeño tamaño (VSSP) obtenido de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*. El antígeno producido es liofilizado en bulbos de dosis únicas de 100 μg y 400 μg (CIGB; Habana, Cuba). Las VSSP provienen del Centro de Inmunología Molecular de la Habana, Cuba. Al momento de la vacunación el antígeno se disuelve en una cantidad precalculada de agua para inyección USP y se mezcla con las cantidades deseadas del VSSP (200 μg de proteína en todas las cohortes de dosis del antígeno) hasta un volumen final que nunca excedió 1 mL. Los individuos se inmunizaron por la vía subcutánea durante ocho semanas consecutivas con 50, 100 o 400 μg del antígeno, y fueron re-inmunizados en la semana doce. En la semana dieciséis se realizaron las evaluaciones de seguridad, tolerancia, estado clínico e inmunogenicidad (seroconversión para IgG anti VEGF, capacidad de bloqueo de VEGF/KDR-Fc en suero, y el ELISPOT de gamma IFN con células sanguíneas estimuladas in vitro con VEGF mutado). Los pacientes sobrevivientes eran elegibles para las re-inmunizaciones adicionales, fuera del estudio, cada cuatro semanas con 400 μg del antígeno, en quienes se estudió la inmunogenicidad y el estado clínico con una frecuencia anual según el sistema RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) de la OMS (8).

III. RESULTADOS

Veintisiete de los 30 individuos reclutados tenían una historia anterior de dos o más tratamientos contra el cáncer. El 70% de los pacientes estaban en franca progresión de la enfermedad y no tenían otra posibilidad de tratamiento cuando entraron en el estudio. Los individuos que se clasificaron (según RECIST) como estables o con una respuesta parcial; tenían asimismo evidencia clínica de que su enfermedad estaba activa, sin posibilidad de recibir otros ciclos de tratamiento específicos para el cáncer. Veintiséis pacientes completaron el ciclo de inducción y veinticinco estaban disponibles para la evaluación final del protocolo a la semana dieciséis. De los cinco pacientes no evaluados, uno abandonó voluntariamente el estudio y los otros cuatro murieron debido a la progresión de la enfermedad cuando estaban en el protocolo. Veinticuatro individuos fueron elegibles para las reinmunizaciones adicionales a partir de la semana dieciséis hasta la muerte, la intolerancia, la progresión de la enfermedad, o la revocación del consentimiento.

Tabla 1. Eventos adversos registrados que probablemente o seguramente estaban relacionados con la vacuna, hasta la semana dieciséis.

Dosis del antígeno	50 µg	100 µg		400 µg	Total
Evento / grado de intensidad	Grado 1	Grado 1	Grado 2	Grado 1	
Calor en el sitio de inyección		1			1
Edema en el sitio de inyección	1			4(3)	5
Dolor en el sitio de inyección	8 (3)	9 (3)		37 (6)	54
Eritema en el sitio de inyección	10 (3)	28		45 (7)	83
Prominencia en el sitio de inyección	11 (4)	2 (2)		2 (2)	15
Pápula en el sitio de inyección	5 (3)	1			6
Temblores		1		1	2
Fiebre		10	1		11
Malestar		2 (2)			1
Cefalea				2 (2)	6
Prurito	2 (1)			2 (2)	4
Diarrea				2 (2)	2
Sabor amargo al paladar	1				1
Totales	37	53	1	100	191

Nota: Entre paréntesis el número de pacientes con el evento adverso.

La Tabla 1 resume la relación probable o definitiva de los eventos adversos (EA) con la vacuna. Los más comunes fueron dolor grado 1 y eritema en el sitio de la inyección, que presentaron resolución espontánea. Se observaron 10 episodios de fiebre en dos pacientes, uno de los cuales clasificaba como grado 2. Todos fueron tratados farmacológicamente y controlados. Las mayores incidencias de EA grado 1 se encontraron en los grupos de dosis del antígeno de 100 y 400 µg, este último en solo 6 de los 10 pacientes de las cohortes. No hubo toxicidad que no permitiera la vacunación y no se encontraron EA grado 3 o mayor, relacionados con la vacuna. No se observó durante la vacunación ningún caso de hipertensión, sangrado, tromboembolismo y toxicidad hepática o renal. No se

detectaron EA funcionales o anatómicos en ningún paciente. Todos los pacientes comenzaron el estudio con reducciones significativas en el conteo de células sanguíneas CD3, CD4, y CD19 normales. Los valores de CD8 fueron normales. En la semana dieciséis todos los pacientes mostraron una tendencia hacia la recuperación de los valores de CD3 y CD19. No se observaron cambios para las células CD4 ni CD8.

Según se esperaba, la vacuna SaVax solo produjo dolor y eritema grado 1 en el lugar de la inyección, aún después de la extensión de su aplicación, cuyos efectos probablemente estén asociados al origen bacteriano del adyuvante VSSP (9). Ninguno de los principales EA que comúnmente se presentan con otros medicamentos antiangiogénicos (hipertensión, sangramiento, tromboembolismo y toxicidad hepática o renal) se observaron en estos pacientes. Se encontró un mayor número de EA relacionados con la vacuna en las dosis de antígeno de 100 y 400 µg, pero no se pudo demostrar una asociación estadística. Aunque no se ha visto que la toxicidad de las vacunas terapéuticas para el cáncer esté relacionada con los niveles de dosis, se seguirá este aspecto en los futuros estudios clínicos con SaVax.

Respecto a las pruebas de la respuesta inmune, 11 individuos de las cohortes de tres dosis del antígeno tuvieron títulos de anticuerpo anti-hVEGF IgG prevacunación que eran al menos cuatro veces mayores que los del suero control utilizados como referencia. La vacunación aumentó los títulos IgG específicos en al menos una muestra de suero en 19 de los 30 pacientes vacunados (valores en el rango de 1:400 a 1:52,000, datos no mostrados en detalle). Los individuos con al menos dos muestras consecutivas con seroconversión se consideraron positivos para esta prueba específica de anticuerpo, para un total de dieciséis pacientes de 30 reclutados. El número de pacientes positivos para seroconversión aumentó con la dosis del antígeno (3/10, 6/10, y 7/10 pacientes positivos en las cohortes de las dosis de 50, 100, y 400 µg respectivamente). No se encontró asociación entre la seroconversión y el título de anticuerpos pre-vacunación o entre los títulos después de la vacunación y la dosis del antígeno.

Las respuestas tempranas de seroconversión (muestras de la quinta semana) se encontraban sobre todo en pacientes dentro del grupo con la dosis de 400 µg del antígeno. Cuatro pacientes de esta cohorte se mantenían con seroconversión un mes después de la última inmunización del ciclo de inducción, frente a solo un individuo en el grupo de dosis del antígeno de 100 µg.

A la semana dieciséis, 14 de los 30 pacientes eran positivos en la prueba de capacidad de bloqueo del VEGF/KDR-Fc (al menos una muestra positiva de tres). La capacidad de bloqueo aumentó con la dosis del antígeno (2/10, 5/10, y 7/10 pacientes en las cohortes de dosis del antígeno de 50, 100, y 400 µg respectivamente). Trece de los dieciséis pacientes que mostraron seroconversión también tuvieron capacidad bloqueadora.

En el caso de la prueba gamma-IFN ELISPOT, dieciséis pacientes mostraron incrementos en el número de puntos al comparar con las muestras antes de la vacunación o los controles de la prueba en al menos una de las dos muestras tomadas en un momento determinado. La cantidad de pacientes con resultados positivos en el ELISPOT aumentó con la dosis del antígeno (4/10, 6/10, y 6/10 pacientes positivos en las cohortes de las dosis de 50, 100, y 400 µg, respectivamente). Los seis individuos positivos en el grupo de 400 µg del antígeno se clasificaron como altos respondedores, comparados con solo dos y tres en las cohortes de 50 y 100 µg del antígeno, respectivamente.

Un objetivo importante del estudio CENTAURO fue conocer si la vacuna producía una respuesta inmune específica contra hVEGF. Se utilizaron tres pruebas in vitro para evaluar la inmunogenicidad:

un ELISA para medir anticuerpos específicos IgG anti-VEGF en el suero (seroconversión), un ELISA de competencia para determinar la capacidad de los anticuerpos del suero de bloquear la interacción VEGF/KDR-Fc, y una prueba gamma-IFN ELISPOT con células mononucleares de sangre aisladas, preincubadas con una molécula mutada de VEGF. La vacunación se consideró como inmunogénica en un paciente si se observa un resultado positivo en una determinación en al menos una muestra de suero o de células (o dos muestras consecutivas en el caso de la prueba de seroconversión).

Se utilizaron las muestras prevacunación como referencia y para determinar la existencia de inmunización natural contra el antígeno en cuestión. Se detectaron anticuerpos IgG anti hVEGF en el suero de varios pacientes, y las células aisladas antes de la vacunación de otros individuos fueron positivas en el ELISPOT de gamma-IFN. También se ha observado respuesta inmune espontánea contra el antígeno en cuestión con otras vacunas terapéuticas y anticuerpos en pacientes con cáncer (10). Mientras algunos autores han sugerido que este fenómeno puede ser un factor de pronóstico o estratificación, no se encontró ninguna asociación entre la inmunidad prevacunación anti-hVEGF y la respuesta inmune específica producida después de la vacunación, ni con la evolución clínica.

En la semana dieciséis, aproximadamente la mitad de los pacientes fue positivo para seroconversión, capacidad bloqueadora, y/o ELISPOT de gamma-IFN. Hubo una mayor inmunogenicidad para SaVax en términos de número de pacientes positivos en una prueba dada y de individuos clasificados como positivos en las tres pruebas de respuesta inmune, en la que fue mejor la cohorte de 400 µg. Un hallazgo relevante fue la inducción de SaVax de respuestas células T específicas en pacientes con cáncer avanzado debido a la importancia terapéutica que se da a la inmunidad de células T en la inmunoterapia activa antitumoral. Esto coincide con los resultados preclínicos de la vacuna que había mostrado citotoxicidad celular antitumoral específica y células T después de inmunizaciones en ratones y primates no humanos (3-5). Como en el estudio las determinaciones se hicieron en muestras de sangre periférica (50) con una prueba que no discrimina entre células T auxiliares y T citotóxicas, los resultados deben tomarse solo como un indicador de la capacidad de la vacuna de desarrollar respuesta inmune celular específica que puede o no ser indicadora de inmunidad celular antitumoral.

Los anticuerpos anti-VEGF también son mediadores potenciales importantes del posible efecto antitumoral de la vacuna, como se ha destacado en estudios tumorales en ratones con SaVax. Las inmunoglobulinas policlonales contra VEGF pueden reducir la biodisponibilidad del factor de crecimiento libre y bloquear su interacción con receptores en células endoteliales activadas. El estudio demostró que a la semana dieciséis la inmunización ya había producido tanto seroconversión anti IgG VEGF específica como capacidad de bloqueo del VEGF/KDR-Fc del suero en la mayoría de los pacientes que respondieron a estas dos pruebas.

Sobre la base de los resultados que se comentan en los anteriores párrafos, y a pesar de los hechos de que es limitado el tamaño de nuestra muestra de pacientes y que fue heterogénea la histología tumoral, hay varias evidencias que fuertemente indican que hay un efecto de dosis del antígeno para la inmunogenicidad con nuestra preparación de vacuna. La dependencia de la dosis del antígeno en las vacunas terapéuticas para cáncer es un tema de mucho debate en la literatura, probablemente debido a las diferencias en cuanto al antígeno, formulación y el adyuvante de la vacuna, el esquema de vacunación y la población de pacientes.

De los 24 pacientes que comenzaron en la semana 16 las re-inmunizaciones fuera de protocolo cada cuatro semanas con 400 µg del antígeno, 15 individuos estaban disponibles un año después de su

entrada en el estudio. Actualmente (seis años después de iniciado el estudio), siete pacientes continúan vivos con supervivencia acumulada de 72-75 meses: dos tienen respuesta completa, uno respuesta parcial y tres en enfermedad progresiva. Se definió como beneficio clínico: (a) una mejora del estatus RECIST a la entrada en el estudio en cualquier momento del estudio, o (b) mantenimiento a largo plazo del estatus de enfermedad estable sin ningún otro medicamento específico aparte de la vacuna.

La inmunización crónica es una estrategia importante en la vacunación terapéutica contra el cáncer (11). Como la mayoría de los antígenos asociados a tumores que se usan en la inmunoterapia activa contra el cáncer son autoantígenos, y debido a que los tumores regulan negativamente la respuesta inmune, se piensa que la vacunación sostenida debe ser la forma de mantener un “nivel terapéutico” de mecanismos efectores inmunes y de alcanzar el control duradero del cáncer.

IV. CONCLUSIONES

La mayor novedad de la vacuna terapéutica SaVax es que es la primera en su clase diseñada con VEGF como antígeno que se estudia en el hombre. Actúa diferente a otras drogas anti-angiogénicas, cuyo modo de acción está limitado a afectar la interacción VEGF/receptor y donde se emplean en altas dosis farmacológicas, que producen frecuentemente eventos adversos graves y limitan su uso crónico. Los resultados mostrados constituyen las primeras evidencias en seres humanos del beneficio clínico de la administración crónica de una vacuna basada en el VEGF.

El estudio de seis años en pacientes con tumores sólidos avanzados permitió obtener evidencias de la seguridad de la administración crónica de la vacuna, así como informaciones valiosas referidas a la no inducción de tolerancia inmunológica aún ante la persistencia antigénica, lo que indica su factibilidad como terapia de mantenimiento en pacientes con tumores sólidos.

Los resultados obtenidos en el ensayo CENTAURO marcan una pauta especial en el desarrollo clínico acelerado de la vacuna SaVax, pues permitió el diseño e inicio de protocolos para estudios de efecto (Fase II).

REFERENCIAS

1. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6(4):273–86.
2. Pan J, Jin P, Yan J, Kabelitz D. Anti-angiogenic active immunotherapy: a new approach to cancer treatment. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57(8):1105–14.
3. Bequet-Romero M, Morera Y, Ayala-Avila M, Ancizar J, Soria Y, Blanco A, et al. CIGB-247: a VEGF-based therapeutic vaccine that reduces experimental and spontaneous lung metastasis of C57Bl/6 and BALB/c mouse tumors. *Vaccine* 2012;30(10):1790–9.
4. Morera Y, Bequet-Romero M, Ayala M, Velazco JC, Perez PP, Alba JS, et al. Immunogenicity and some safety features of a VEGF-based cancer therapeutic vaccine in rats, rabbits and non-human primates. *Vaccine* 2010;28(19):3453–61.
5. Morera Y, Bequet-Romero M, Ayala M, Castro J, Sanchez J. Antigen dose escalation study of a VEGF-based therapeutic cancer vaccine in non human primates. *Vaccine* 2012;30(2):368–77.

6. Yoshimura K. Phase I clinical trial of human vascular endothelial growth factor receptor 1 peptide vaccines for patients with metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2013;108(6):1260–6.
7. Miyazawa M, Ohsawa R, Tsunoda T, Hirono S, Kawai M, Tani M, et al. Phase I clinical trial using peptide vaccine for human vascular endothelial growth factor receptor 2 in combination with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer Sci* 2010;101(2):433–9.
8. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009;45(2):228–47.
9. Guthmann MD, Bitton RJ. Active specific immunotherapy of melanoma with a GM3 ganglioside-based vaccine: a report on safety and immunogenicity. *J Immunother* 2004;27(6):442–51.
10. Morse MA. Long term disease-free survival and T cell and antibody responses in women with high-risk Her2+ breast cancer following vaccination against Her2. *J Transl Med* 2007;5:42.
11. Schlom J. Therapeutic cancer vaccines: current status and moving forward. *J Natl Cancer Inst* 2012;104(8):599–613.