

Actualización en el Desarrollo de una Vacuna Terapéutica Basada en el EGF para el Cáncer del Pulmón de Células No Pequeñas

Pedro Camilo Rodríguez¹, Beatriz García¹, Xitlaly Popa¹, Elia Neninger², Gisela González¹ y Tania Crombet¹

¹ Centro de Inmunología Molecular. Ciudad de La Habana, Cuba.

² Hospital Hermanos Ameijeiras, Centro Habana, Havana, Cuba.

Resumen

LA SOBREACTIVACIÓN DEL EGFR puede inducir la transformación de una célula normal a maligna. La privación de su ligando puede resultar en una eficiente interrupción de la transducción y señalización que repercute en el curso de las malignidades dependientes de este receptor, tumores como los de próstata y mama, son clasificados de acuerdo con la respuesta al bloqueo hormonal respectivo. La inmunodeprivación activa del EGF es un concepto emergente, en el que se postula manipular la respuesta inmune del individuo, para que dispare sus propios efectores contra el factor de crecimiento tumoral. CIMAvax EGF es el resultado de un proceso que a grandes rasgos, comprende desde la selección de la localización diana hasta la comprensión del mecanismo de acción. Esta vacuna terapéutica ha sido delineada en estudios preclínicos y clínicos que la optimizaron en carrier y adyuvante. La presente revisión se propone reseñar el tránsito, desde las ideas y los conceptos que sustentan a la vacuna, hasta las evidencias que soportan su registro sanitario para la indicación en pacientes adultos, portadores de cáncer del pulmón de células no pequeñas en estadios IIIb/IV y constituyen a su vez, la prueba de los propios conceptos enunciados.

Abstract

The EGFR over expression may induce the malignization process of normal cells. Its deprivation of the ligand EGF can result in the efficient disruption of the signalization and transduction which are dependent from this receptor. Tumor such as breast and prostate cancer are classified according their response to the specific hormone blockade, in this context, the active immune deprivation of the EGF is an emergent concept postulating the manipulation of the immune response of the patient, triggering their own antibodies against this tumor growth factor. The CIMAvax EGF therapeutic vaccine is the result a develop process witch include from the selection of the target localization of the tumor until the clarifying of its mechanism of action. The vaccine has been delineated in the preclinical and clinical setting and was optimized in immunomodulator and adjuvant. This review is devoted with the proposal of highlight the transit from the ideas to the clinical evidences supporting the sanitary license granted by the Cuban Regulatory Office, for the use of CIMAvax EGF in adult patients with Non Small Cell Lung Cancer in advance stages (IIIb/IV).

Key words: Non-Small Cell Lung Cancer, cancer vaccines, EGF.

Palabras Clave: Cáncer del pulmón, NSCLC, vacunas, EGF.

Correspondencia:

Dr. Pedro Camilo Rodríguez Rodríguez

Centro de Inmunología Molecular

P.O. Box 16040, La Habana 11600, Cuba.

Tel. 537-271-7933 · Fax: 537-272-0644 · e-Mail: camilo@cim.sld.cu

Introducción

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) pertenece a una familia de cuatro receptores que poseen actividad enzimática mediada por tirosinas quinasa (TKR), su sobre activación puede inducir la transformación de una célula normal en maligna, proveyendo señales para la proliferación celular, el bloqueo de la apoptosis, la angiogénesis y la metástasis. La privación del ligando, el bloqueo directo del receptor con anticuerpos monoclonales (mAbs) específicos o con moléculas de bajo peso molecular que compiten intracelularmente con el ATP por el sitio con actividad tirosina quinasa del receptor, resultan en una eficiente interrupción de la transducción y señalización que repercuten en el curso de la enfermedad (1, 2).

Tumores de gran incidencia como los de próstata y mama, son clasificados de acuerdo con la respuesta al bloqueo hormonal respectivo (3). La inmunodeprivación activa del EGF es un concepto emergente en el que se postula manipular la respuesta inmune del individuo, para que dispare sus propios efectores contra el este factor de crecimiento tumoral (4). El concepto tiene su origen en las primeras evidencias acerca del valor pronóstico de la expresión del EGFR en el cáncer de mama humano (5) y la posterior demostración de su sobre expresión asociada a una gran variedad de tumores de origen epitelial (6, 7, 8). La presente revisión se propone realizar una actualización acerca del estado de desarrollo actual de una vacuna terapéutica basada en el EGF para el cáncer del pulmón de células no pequeñas desarrollada en Cuba. Esta preparación vacunal denominada CIMAvax EGF está compuesta por el EGF humano recombinante, la proteína p64k de *Neisseria meningitidis* como inmunopotenciador y el Montanide ISA 51 VG como adyuvante oleoso (EGF/p64k/ Montanide ISA 51 VG) (9, 10).

Con la vacuna terapéutica CIMAVax EGF se han desarrollado cinco ensayos clínicos fase I/II y dos ensayos clínicos fase II y está en curso un ensayo clínico fase III. Dadas las evidencias acumuladas en más de 14 años de trabajo, acerca del perfil de seguridad y el beneficio clínico en supervivencia y calidad de vida, la autoridad reguladora de la calidad

de los medicamentos cubana (CECMED), le ha otorgado la licencia sanitaria para su indicación en pacientes adultos, portadores de cáncer del pulmón de células no pequeñas en estadios IIIB/IV.

Desarrollo

El EGF como blanco de la inmunoterapia activa.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) también denominado ErbB1 o HER1, pertenece a una familia de cuatro receptores que poseen actividad enzimática mediada por tirosinas quinasa (TKR). La sobre activación del EGFR puede inducir la transformación de una célula normal en maligna, al estar implicado el receptor en prácticamente todas las capacidades funcionales que distinguen a todas las malignidades. Las primeras evidencias acerca del valor pronóstico de la expresión del EGFR en el cáncer de mama humano (5) y la posterior demostración de su sobreexpresión asociada a una gran variedad de tumores de origen epitelial, como los del pulmón, colon, estómago y próstata (6, 7, 8).

Existe la posibilidad efectiva de impedir la cascada de señalizaciones del receptor del EGF y así contribuir a la reducción de la progresión tumoral dependiente de este factor de crecimiento, las dos vías más conocidas son el bloqueo directo del receptor con anticuerpos monoclonales (mAbs) específicos o la interrupción con moléculas de bajo peso molecular que compiten intracelularmente con el ATP por el sitio con actividad tirosina quinasa del receptor. Esta vacuna terapéutica CIMAvax EGF, apuesta a una variante novedosa que es privar al receptor de su ligando más importante. Con este objetivo se administra a los pacientes por vía intramuscular, el EGF humano recombinante en un contexto que lo torna inmunogénico. Con este propósito se introduce en la formulación vacunal la proteína p64k de la *Neisseria meningitidis* como inmunopotenciador y el Montanide ISA 51 VG como adyuvante oleoso (EGF/p64k/ Montanide ISA 51 VG), de esta forma el paciente dispara activamente sus propios anticuerpos contra el EGF e impide su unión al receptor (9,10). La inmunodeprivación activa del ligando repercute en la detención del ciclo celular en la fase G1 y en la inducción de apoptosis,

así como en la inhibición de la angiogénesis, de la invasión celular y de las metástasis (1, 2).

Las ideas originales que fueron tomadas para sustentar esta modalidad terapéutica provienen de la manipulación del entorno hormonal de tumores como los de próstata y mama, los que se clasifican y tratan en dependencia de la respuesta al bloqueo hormonal respectivo (3, 4).

La evaluación de los posibles componentes de la preparación vacunal se inició a partir de 1992, cuando se comenzaron los primeros estudios clínicos encaminados a probar el concepto de inmunodeprivación activa del EGF, lo que en el plano de desarrollo del producto se tradujo en la selección del inmunopotenciador óptimo y del adyuvante más apropiado (9, 10).

La factibilidad de inducir una respuesta inmune contra el EGF autólogo en el escenario clínico, en pacientes con diferentes contextos de tumores avanzados, fue el colofón de esta primera etapa del desarrollo de la vacuna terapéutica CIMAvax EGF. En el primer ensayo clínico fase I/II realizado se demostró que el factor de crecimiento tumoral EGF puede ser un blanco efectivo de la inmunoterapia y se observaron como principales eventos adversos asociados a esta modalidad terapéutica, el eritema local y el dolor en el sitio de la administración (11).

Selección de la localización diana.

La incidencia y la mortalidad de cáncer del pulmón en Cuba son altas, por lo que su prevención, diagnóstico y tratamiento, constituyen una prioridad del sistema de salud pública. Por otra parte, es bien conocido que durante el desarrollo y la progresión de las neoplasias del pulmón, el EGFR es sobreexpresado por los tejidos en proporciones que se comportan de la siguiente forma: el 62% de todos los tumores, el 89% de los tumores escamosos, el 41% de los adenocarcinomas y el 80% de los tumores broncoalveolares. Adicionalmente La magnitud de la expresión del receptor se reporta como un factor predictivo de la respuesta de la enfermedad las terapias biológicas (2, 12, 13). Con estas consideraciones previas fue que se seleccionó esta localización tumoral, como diana

inicial de la inmunización con CIMAvax EGF, para evaluar diferentes estrategias inmuno-farmacológicas de modular la respuesta inmune a la vacuna.

Los dos ensayos clínicos fase I/II realizados en pacientes portadores de NSCLC en estadios avanzados (IIIb/IV), mostraron la división de estos pacientes en dos subpoblaciones; aquellos con pobre respuesta de anticuerpos contra el EGF (Poor Antibodies responders- PAR) y aquellos cuya respuesta de anticuerpos (Acs) contra el EGF alcanzaba títulos iguales o superiores a 1:4000 y/o multiplicaban al menos 4 veces (4x) los valores de preinmunización, por lo que fueron clasificados como buenos respondedores (Good Antibodies responders- GAR), asociándose las mayores supervivencias totales a este último grupo GAR, con una mediana de 9.1 meses (media de 12.41 meses), comparados con una mediana de 4.5 meses (media de 5.47 meses) en los pacientes considerados PAR. Adicionalmente ambos estudios evidenciaron que los pacientes, cuya respuesta de anticuerpos (Acs) contra el EGF duró 60 días o más, presentaron mayor supervivencia que los pacientes cuya respuesta no alcanzó más de 60 días (14). En este estudio se reportaron casos con remisiones completas a los 12 meses de tratamiento. (*Figura 1*)

La prueba de concepto del impacto de la inmunodeprivación activa del EGF sobre la evolución de la enfermedad y la supervivencia de los pacientes con NSCLC, la aportó un cuarto ensayo clínico fase I/II realizado en 43 pacientes portadores de NSCLC en estadios IIIb y IV (22), en el que se evidenció que la supervivencia lograda por la vacuna en los pacientes tratados (media de 9.83 meses y mediana de 8 meses) superó significativamente ($p < 0.05$) al control histórico (media de 6.2 meses y mediana de 4.1 meses), a la vez que correlacionó positivamente con los títulos considerados GAR ($> 1/4000$) y se asoció con las menores concentraciones de EGF (< 168 pg/mL) en sangre (*Cuadro 1*).

Manipulación de variables inmunofarmacológicas en el escenario preclínico

Una vez probado el concepto del impacto en la supervivencia de los pacientes de la inmunodeprivación activa

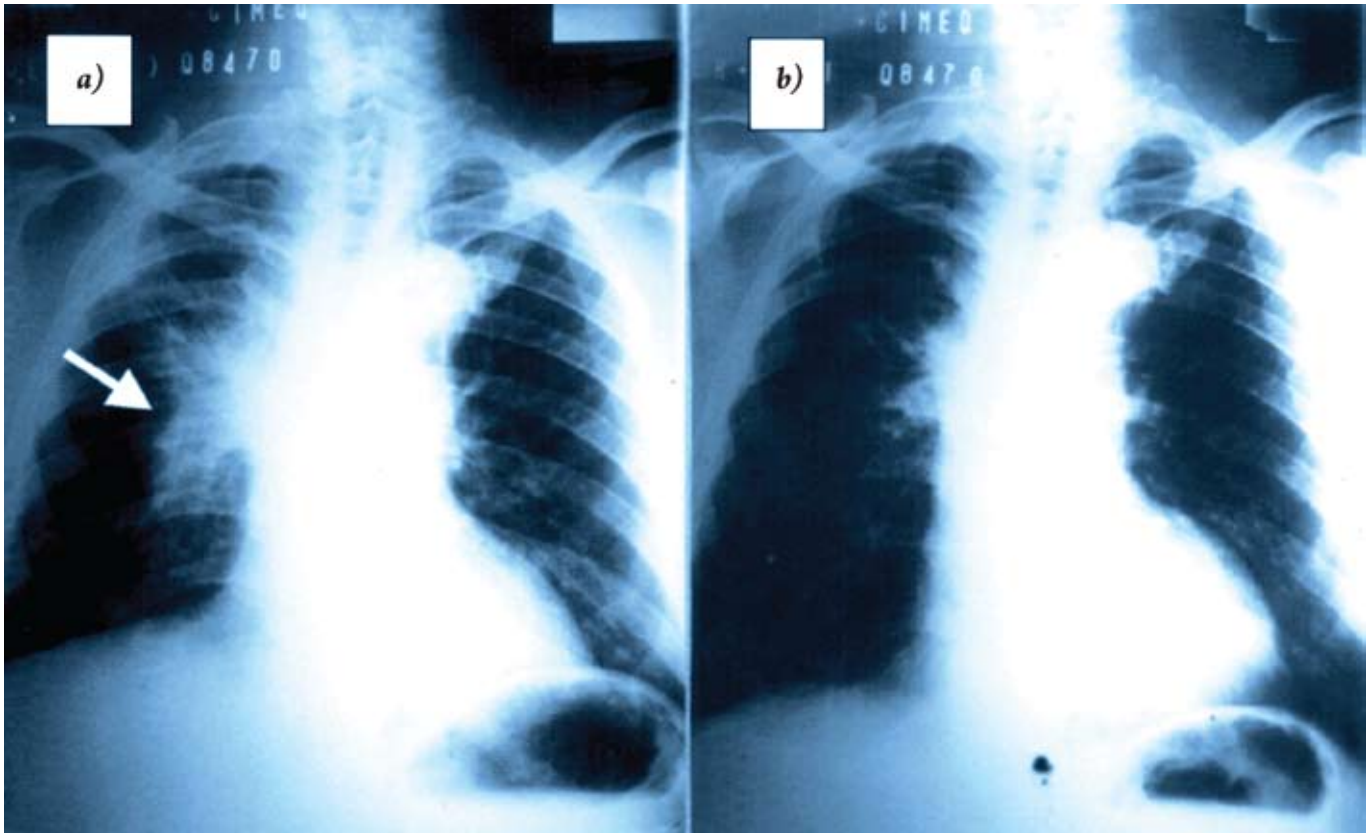


Figura 1 ■
Rayos X de torax de un paciente con NSCLC estadio IV. (A) Antes de la inmunización con CIMAvax EGF. (B) Luego de 12 meses de tratamiento con la vacuna terapéutica. González G. et al. *Annals of Oncology* 14: 461–466, 2003

Cuadro 1 ■
Efecto de la inmunización sobre las concentraciones de EGF. Ensayo clínico fase I/II en pacientes con diagnóstico histológico o citológico de CPCNP en estadio IIIB ó IV que completaron la primera línea de oncoterapia específica y fueron aleatorizados para recibir dos formulaciones de la vacuna EGF. Crombet T. et al. *Cancer Biology & Therapy* 2006 5:2, 145-149

	Dosis de EGF en cada formulación		
	Dosis simple (71 µg EGF) n= 10	Dosis doble (142 µg EGF) n= 10	Todos los Pacientes n= 20
Pacientes con < 168 pg/mL de EGF en suero (%)	3 (30%)	7 (70%)	10 (50%)
Mínima Concentración Alcanzada	222.86	254.80	238.83

del EGF y la seguridad de la manipulación terapéutica, con la experiencia y los datos obtenidos en el desarrollo previo de cuatro ensayos clínicos fase I/II, se consideró refinar los esquemas terapéuticos utilizados en la clínica en el escenario preclínico, con vistas a reducir el número de pacientes considerados PAR (<1/ 4000).

La comprensión de la inmunofarmacología de las vacunas del cáncer es aun un proceso incipiente (23, 24- 29). Variables como la dosis óptima, el esquema de administración, la ruta de administración y el intervalo entre las dosis que inician e inducen la respuesta y las dosis que refuerzan o sostienen la respuesta, deben ser testadas en el escenario preclínico y retadas en el desarrollo clínico (23, 30-32). Este proceso es más complejo cuando se pretende refinar el esquema terapéutico de una vacuna basada en una molécula propia circulante, para inducir una respuesta de anticuerpos que la supriman o depriven de la misma a su receptor. En este caso las evidencias previas tanto teóricas como experimentales, han sido interpretadas en el sentido de concebir a la respuesta inmune con una visión geográfica, donde aproximar el antígeno a la mayor cantidad de nódulos linfáticos posible puede ser un camino para implementar una respuesta inmune más robusta y duradera (33- 38).

Utilizando modelos murinos cuyo fondo genético y respuesta de anticuerpos al reto con la vacuna, los definió como GAR (ratones BALB/c) o como PAR (ratones C57BL6), se manipularon variables inmunofarmacológicas durante la inducción de la respuesta y durante su reforzamiento, para inducir títulos de anticuerpos inmediatos, altos y duraderos contra el EGF, privando así de forma activa al receptor de su ligando.

Se observó que el fraccionamiento en cuatro partes de una dosis aparentemente baja (4µg) de la vacuna y su administración una sola vez, en múltiples sitios anatómicos como priming, incrementa el título máximo de anticuerpos y prolonga el tiempo de la respuesta. Así mismo se evidenció que acortar el tiempo entre los boosting, influía reduciendo la persistencia de los títulos de anticuerpos contra el EGF, mientras que la repetición de los mismos logra revertir el estado de PAR hacia GAR, sin afectar el reconocimiento inmunodominante del lazo B de la molécula de EGF, asociado a su unión con el EGFR. De este estudio se concluyó que debía administrarse la vacuna en una dosis alta pero fraccionada en múltiples sitios anatómicos, para aproximar el EGF en el contexto del preparado vacunal, a los nodos linfáticos regionales y sinergizar así la respuesta inmune (39).

Combinaciones con la Quimioterapia.

La complejidad de los mecanismos involucrados en la malignización celular, la hace tributaria de un enfoque terapéutico basado en combinaciones, entre otras razones, para controlar simultáneamente dos fenómenos caracterizados como inmunoevasión y diseminación tumoral. Es en este contexto que las inmunoterapias han emergido como una aproximación terapéutica que asegura mayor especificidad contra las células y tejidos malignos, con una muy limitada toxicidad para el organismo que porta la enfermedad. Desde su surgimiento las inmunoterapias se han insertado en el espacio de los regímenes terapéuticos estándares, en particular la inmunoterapia pasiva con AcM ha confirmado la potencialidad de estas combinaciones (43- 46)

Tomando conceptos previos procedentes del manejo terapéutico de la autoinmunidad y de los trasplantes, la combinación de la vacuna CIMAvax EGF

con la quimioterapia, se implementó con el objetivo de utilizar a favor de la inmunización activa, la repoblación homeostática de las células T y B que sucede con posterioridad a la depleción linfocitaria, asociada a la inmunosupresión e inducida por los regímenes citotóxicos estándares (47- 50).

En un quinto ensayo clínico fase I/II realizado en 20 pacientes portadores de NSCLC en estadios IIIb y IV, donde se aplicó por primera vez el esquema vacuna, quimioterapia y posteriormente vacuna (VQV), se corroboró que el incremento en los títulos de Acs Anti-EGF correlaciona con la disminución de la concentración sérica de EGF, se evidenció correlación entre los títulos de anticuerpos y su capacidad para inhibir la unión del EGF a su receptor y se estableció que los sueros de los pacientes GAR reconocen preferencialmente el lazo B del EGFR (51).

Adicionalmente, en este ensayo clínico se diferenció una nueva subpoblación de pacientes con títulos de Acs Anti-EGF iguales o superiores a 1:64000, los que fueron definidos como súper buenos respondedores (Super Good Antibodies responders- SGAR), este hallazgo clínico tiende a confirmar la hipótesis de la re-

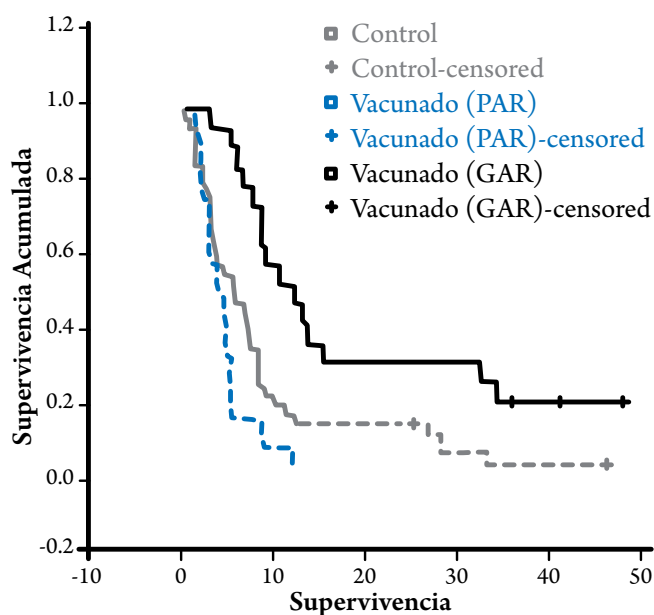


Figura 2 • Relación entre los títulos de anticuerpos y la supervivencia de los pacientes tratados con la vacuna terapéutica CIMAvax EGF. Pacientes GAR (n= 20), pacientes PAR (n= 18) y controles no vacunados (n= 37) (log-rank; P=0.0002). Neninger E, et al. *JCO* 2008 26(9):1452-1458

emergencia y amplificación de clones potencialmente autorreactivos que pueden favorecer a la inmunización activa con este esquema terapéutico VQV.

La relevancia de estos resultados han conducido a un nuevo espacio de estudios preclínicos, para evaluar la influencia específica de cada combinación de la inmunoterapia activa con los regímenes estándares de quimioterapia, definir las variables inmunofarmacológicas a tener en cuenta para el diseño racional de los esquemas terapéuticos combinados y establecer el impacto específico de las combinaciones sobre las poblaciones linfocitarias T y B (52).

Ensayo clínico fase II

En paralelo a la evaluación del esquema VQV en el estudio fase I/II referido, se inició un primer ensayo clínico fase II, controlado, donde se incluyeron 80 pacientes con una aleatorización 1:1 y se evaluó el efecto de la inmunización posterior a la primera línea de quimioterapia, en pacientes con NSCLC en estadios avanzados (IIIb-IV). En este ensayo se confirmaron las correlaciones observadas en los estudios fase I/II, entre el incremento de los títulos de Acs Anti-EGF con la reducción sérica del EGF y entre el incremento de los títulos de Acs Anti-EGF y la mayor supervivencia de los pacientes.

Para los GAR (n= 20) se observó una media de supervivencia de 19.47 meses (mediana de 11.7 meses), para los PAR (n= 18) la media de supervivencia fue de 4.97 meses (mediana de 3.6 meses) y en el grupo control (n= 37) se observó una media de supervivencia de 8.52 meses (mediana de 5.33 meses), con una $p < 0.05$. Significativamente (*Figura 2*) se observó que los pacientes con 60 años o menos (n= 22) que recibieron CIMAvax EGF, sobrevivieron significativamente ($p < 0.05$) más que los controles (n= 28) con una media de supervivencia de 18.53 meses (mediana de 11.47), frente a una media de 7.55 meses (mediana de 5.33 meses) (53).

Los resultados de laboratorio relacionados con el mecanismo de acción de CIMAvax EGF, fueron obtenidos en este primer ensayo fase II y se publicaron recientemente de forma independiente (54).

En las evaluaciones realizadas se confirmó la capacidad bloqueadora de la unión del EGF al EGFR de los sueros de pacientes inmunizados y se estableció por primera vez la capacidad de los sueros de los pacientes inmunizados de inhibir la fosforilación del EGFR, adicionalmente se evidenció una supervivencia mayor en los pacientes inmunizados cuyos sueros inhiben la fosforilación del receptor.

Las evidencias obtenidas hasta el momento y los datos clínicos aportados por este ensayo clínico, dieron lugar a que la autoridad regulatoria cubana otorgue el registro sanitario a CIMAvax EGF, como una vacuna terapéutica indicada en pacientes adultos portadores de cáncer del pulmón de células no pequeñas en estadios avanzados (IIIb/IV).

Ensayos clínicos en curso y estudios en nuevas localizaciones tumorales.

Se encuentra en estos momentos en curso, un ensayo clínico fase III abierto, controlado y aleatorizados, donde se utiliza el mismo esquema terapéutico del estudio fase II referido anteriormente (QVV), pero aplicando la vacuna en cuatro sitios de inmunización. Este estudio deberá incluir 579 pacientes con CPCNP en los mismos estadios (IIIb y IV), con una aleatorización de un paciente control por dos pacientes con tratamiento (1:2); los resultados serán evaluados en dos estratos de pacientes: mayores de 60 años (n= 381) y de 60 años o menos (n= 198).

En paralelo al estudio referido anteriormente, se explora el efecto de la inmunización con CIMAvax EGF sobre la evolución clínica de pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC). Con este objetivo se diseñó un ensayo clínico fase II/III que debe incluir 212 pacientes (106 pacientes por brazo), donde se utiliza el esquema terapéutico VQV. Existen numerosas evidencias clínicas que sustentan la relevancia del receptor del EGF en pacientes prostatectomizados y/o castrados con bloqueo hormonal ablativo. Los pacientes cuyos tejidos tumorales sobreexpresan este receptor, poseen peor evolución clínica y menor tiempo libre de progresión de la enfermedad.

En estos momentos se han incluido 129 pacientes en este estudio, de ellos para 99 se cuenta con los datos en las bases correspondientes. Los resultados de supervivencia analizados por intención de tratamiento muestran una tendencia, sin corroboración estadística, hacia el beneficio de los pacientes tratados con la formulación vacunal, con tasas de sobrevida a los 18 meses de 0.63 para los tratados vs. 0.32 para los controles, respectivamente. En esta nueva localización si bien son resultados incipientes, son también alentadores.

Referencias

1. Toffoli G. Pharmacology of Epidermal Growth Factor Inhibitors. *The Int. J. Biol. Markers*. 2007, 22 (1) S4, pp. S24-S39 ▪
2. Hirsch F, Varella-Garcia M, Bunn PA, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol*. 2003, 21:3798-3807 ▪
3. Cavalli, F.; Hansen, H. H.; Kaye, S. B. Textbook in Medical Oncology; Third edition. Taylor & Francis Ed., London and New York, 2004 ▪
4. González G, Lage A. Cancer Vaccines for Hormone / Growth Factor Immune Deprivation: A Feasible Approach for Cancer Treatment. *Current Cancer Drug Targets*. 2007 (7) 191-201 ▪
5. Macías, A.; Azavedo, E.; Hagerstrom, T.; Klintonberg, C.; Pérez, R.; Skoog, L. Prognostic significance of the receptor for epidermal growth factor in human mammary carcinoma. *Anticancer Res*. 1987, 7, 459-464 ▪
6. Arteaga, C.L. ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer. *Exp Cell Res*. 2003, 284:122-130 ▪
7. Lage, A., Crombet, T., and Gonzalez, G. Targeting epidermal growth factor receptor signaling: early results and future trends in oncology. *Ann Med*. 2003, 35:327-336. ▪
8. Perez, R., Pascual, M., Macias, A., and Lage, A. Epidermal growth factor receptors in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1984, 4:189-193 ▪
9. Gonzalez G, Sanchez B, Suarez E, Beausoleil I, Perez O, Lastre M, et al. Induction of immune recognition of self-epidermal growth factor (EGF): effect on EGF biodistribution and tumor growth. *Vac Res*. 1996, 5(4):233-44 ▪
10. Gonzalez G, Pardo OL, Sanchez B, Garcia JL, Beausoleil I, Marinello P, et al. Induction of immune recognition of self-epidermal growth factor II: characterization of the antibody immune response and the use of a fusion protein. *Vac Res*. 1997, 6(2): 91-100 ▪
11. Gonzalez G, Crombet T, Catala M, Mirabal V, Hernandez JC, Gonzalez Y, et al. A novel cancer vaccine composed of human-recombinant epidermal growth factor linked to a carrier protein: report of a pilot clinical trial. *Ann Oncol* 1998; 9(4): 431-435 ▪
12. Hirsch FR., Herbst RS, Olsen C, Chansky K, Crowley J, Kelly K, et al. Increased EGFR Gene Copy Number Detected by Fluorescent In Situ Hybridization Predicts Outcome in Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Treated With Cetuximab and Chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2008, 26: 3351-3357 ▪
13. Anuario Estadístico. MINSAP, Cuba. 2007 ▪
14. Gonzalez G, Crombet T, Torres F, Catala M, Alfonso L, Osorio M, et al. Epidermal growth factor-based cancer vaccine for non-small-cell lung cancer therapy. *Ann Oncol* 2003; 14(3):461-466 ▪
15. Gonzalez, G., Crombet, T., Neningen, E., Viada, C., and Lage, A. Therapeutic vaccination with epidermal growth factor (EGF) in advanced lung cancer: analysis of pooled data from three clinical trials. *Hum Vaccin*. 2007, 3: 8-13 ▪
16. Ghiringhelli, F., Larmonier, N., Schmitt, E., Parcellier, A., Cathelin, D., Garrido, C., Chauffert, B., Solary, E., Bonnotte, B., and Martin, F. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol* 2004, 34:336-344 ▪
17. Man, S., Bocci, G., Francia, G., Green, S.K., Jothy, S., Hanahan, D., Bohlen, P., Hicklin, D.J., Bergers, G., and Kerbel, R.S. Antitumor effects in mice of low-dose (metronomic) cyclophosphamide administered continuously through the drinking water. *Cancer Res* 2002, 62:2731-2735 ▪
18. Terando, A., and Mule, J.J. On combining antineoplastic drugs with tumor vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 2003, 52: 680-685 ▪
19. Ehrke, M.J. Immunomodulation in cancer therapeutics. *Int Immunopharmacol* 2003, 3:1105-1119 ▪
20. Cupps, T.R., Edgar, L.C., and Fauci, A.S. Suppression of human B lymphocyte function by cyclophosphamide. *J Immunol*. 1982, 128:2453-2457. 50 ▪
21. Sinkovics, J.G., and Horvath, J.C. Evidence accumulating in support of cancer vaccines combined with chemotherapy: a pragmatic review of past and present efforts. *Int J Oncol*. 2006, 29: 765-777 ▪
22. Crombet T, Neningen E, Catalá M, García B, Leonard I, Martínez L, González G, Pérez R, Lage A. Treatment of NSCLC Patients with an EGF-Based Cancer Vaccine. *Cancer Biology & Therapy* 2006, 5:2, 145-149 ▪
23. Berd D, Sato T, Maguire Jr HC, Kairys J, Mastrangelo MJ. Immunopharmacologic analysis of an autologous, hapten-modified human melanoma vaccine. *J Clin Oncol* 2004; 22(3):403-415 ▪
24. Gardiner DF, Huang Y, Basu S, Leung L, Song Y, Chen Z, et al. Multiple-site DNA vaccination enhances immune responses in mice. *Vaccine* 2006; 24(3):287-292. ▪
25. Nicholson KG, Prestage H, Cole PJ, Turner GS, Bauer SP. Multisite intradermal antirabies vaccination. Immune responses in man and protection of rabbits against death from street virus by postexposure administration of human diploid-cell-strain rabies vaccine. *Lancet* 1981; 2(8252):915-918 ▪
26. Khawplod P, Wilde H, Tepsumethanon S, Limusan-

- no S, Tantawichien T, Chomchey P, et al. Prospective immunogenicity study of multiple intradermal injections of rabies vaccine in an effort to obtain an early immune response without the use of immunoglobulin. *Clin Infect Dis* 2002;35(12):1562-1565 ■
27. Warrell MJ, Suntharasamai P, Nicholson KG, Warrell DA, Chanthavanich P, Viravan C, et al. Multi-site intradermal and multi-site subcutaneous rabies vaccination: improved economical regimens. *Lancet* 1984;1(8382):874-876 ■
28. Dennehy M, Williamson AL. Factors influencing the immune response to foreign antigen expressed in recombinant BCG vaccines. *Vaccine* 2005; 23 (10):1209-1224 ■
29. Jansen T, Hofmans MP, Theelen MJ, Manders FG, Schijns VE. Dose and timing requirements for immunogenicity of viral poultry vaccine antigen: investigations of emulsion-based depot function. *Avian Pathol* 2007;36(5): 361–365 ■
30. Aucouturier J, Ascarateil S, Dupuis L. The use of oil adjuvants in therapeutic vaccines. *Vaccine* 2006; 24 Suppl 2: 44-45 ■
31. Ahonen CL, Wasiuk A, Fuse S, Turk MJ, Ernstoff MS, Suriawinata AA, et al Enhanced efficacy and reduced toxicity of multifactorial adjuvants compared with unitary adjuvants as cancer vaccines. *Blood* 2008;111(6):3116-3125 ■
32. Lage A, Perez R, Fernandez LE. Therapeutic cancer vaccines: at midway between immunology and pharmacology. *Curr Cancer Drug Targets* 2005; 5(8):611-627 ■
33. Zinkernagel RM, Ehl S, Aichele P, Oehen S, Kundig T, Hengartner H. Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol Rev* 1997;156:199-209 ■
34. Friedman A, Cohen IR. T cell Ir phenotype modified by excising primary antigen deposit. *Immunogenetics* 1984;19(5):449-454 ■
35. Zinkernagel RM, Hengartner H. Regulation of the immune response by antigen. *Science* 2001; 293(5528): 251-253 ■
36. Starzl TE, Zinkernagel RM. Antigen localization and migration in immunity and tolerance. *N Engl J Med* 1998; 339(26):1905–1913 ■
37. Couch M, Saunders JK, O'Malley Jr BW, Pardoll D, Jaffee E. Spatial distribution of tumor vaccine improves efficacy. *Laryngoscope* 2003; 113 (8):1401–1405 ■
38. Atanackovic D, Altorki NK, Cao Y, Ritter E, Ferrara CA, Ritter G, et al. Booster vaccination of cancer patients with MAGE-A3 protein reveals long-term immunological memory or tolerance depending on priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(5):1650–1655 ■
39. Rodriguez PC, Gonzalez I, Gonzalez A, Avellanet J, Lopez A, Perez R, Lage A, and Montero E. Priming and boosting determinants on the antibody response to an Epidermal Growth Factor-based cancer vaccine. *Vaccine* 2008, 26: 4647-4654 ■
40. Hanahan D & Weinberg RA. The Hallmarks of cancer. *Cell* 2000 100. 57-70 ■
41. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* 2004, 22:329-360 ■
42. Guido Kroemer and Jacques Pouyssegur. Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell* 2008 (13) June. 472-481 ■
43. Hoos A, Giorgio Parmiani, Kristen Hege, Mario Sz-nol, Hans Loibner, Alexander Eggermont, Walter Urba, Brent Blumenstein, Natalie Sacks, Ulrich Keilholz, and Geoffrey Nichol. A Clinical Development Paradigm for Cancer Vaccines and Related Biologics. *J Immunother* 2007 30 (1), January, 1-15 ■
44. Finn, O.J. Cancer immunology. *N Engl J Med.* 2008, 358:2704-2715 ■
45. Slamon, DJ, Leyland-Jones, B, Shak, S, Fuchs, H, Paton, V, Bajamonde, A, Fleming, T, Eiermann, W, Wolter, J, Pegram, M, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001, 344:783-792 ■
46. Finn, O.J. Tumor immunology top 10 list. *Immunol Rev.* 2008, 222: 5-8 ■
47. Emens LA, Jaffee EM. Leveraging the activity of tumor vaccines with cytotoxic chemotherapy. *Cancer Res.* 2005, 65:8059- 8064 ■
48. Coles, A.J, Wing, M, Smith, S, Coraddu, F, Greer, S, Taylor, C, Weetman, A, Hale, G, Chatterjee, VK, Waldmann, H, et al. Pulsed monoclonal antibody treatment and autoimmune thyroid disease in multiple sclerosis. *Lancet* 1999, 354:1691-1695 ■
49. Dass, S, Vital, E.M., and Emery, P. Development of psoriasis after B cell depletion with rituximab. *Arthritis Rheum* 2007, 56:2715-2718 ■
50. Goetz, M, Atreya, R, Ghalibafian, M, Galle, PR., and Neurath, M.F. Exacerbation of ulcerative colitis after rituximab salvage therapy. *Inflamm Bowel Dis* 2007, 13:1365-1368 ■
51. Neningen E., García B., Crombet T., Viada C., Pereda S., Leonard I., Mazorra Z., Fleites G., González M., Wilkinson B., González G., Lage A. Combining an EGF-based cancer vaccine with chemotherapy In advanced non small cell lung cancer. *JIT* 2008 ■
52. Montero E., Gonzalez, Avellanet J, Valdes M., Lopez A, Perez R. and Lage A. Transient B-cell depletion boosts antibody-forming cells expansion driven by an Epidermal Growth Factor-based cancer vaccine. *Vaccine* 2008 (Submitted) ■
53. Neningen E., de la Torre A., Osorio M. Catalá M., Bravo I, Mendoza M., Abreu A., Acosta S., Rives R., del Castillo C., González M., Viada C., García B, Crombet T, González G., Lage A. Phase II Randomized Controlled Trial of an Epidermal Growth Factor Vaccine in Advanced NSCLC. *JCO* 2008 26(9) 1462-1468 ■
54. García B, Neningen E, de la Torre A, Leonard I, Martínez R, Viada C, González G, Mazorra Z, Lage A, Crombet T. Effective Inhibition of the Epidermal Growth Factor/Epidermal Growth Factor Receptor Binding by Anti-Epidermal Growth Factor Antibodies Is Related to Better Survival in Advanced Non Small-Cell Lung Cancer Patients Treated with the Epidermal Growth Factor Cancer Vaccine. *Clin Cancer Res* 2008; February 114 (3) ■