

Immunoterapia activa específica con una variante mutada del factor de crecimiento del endotelio vascular humano: una estrategia novedosa para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad

Autores Principales: Yanelys Morera¹, Rafael González², Humberto Lamdan¹, Lincidio Pérez¹, Marta Ayala¹ y Jorge V. Gavilondo¹

Otros Autores: Yorlandis González², Judith Agüero², Jorge Castro¹, Juan Romero¹, Mónica Bequet¹, Ana Yansy Etchegoyen¹

Colaboradores: 15

Filiaciones:

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

² Instituto cubano de Oftalmología "Ramón Pando Ferrer"

Autor para la correspondencia

Dra Yanelys Morera Díaz

Investigaciones Biomédicas, CIGB

Ave 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, La Habana 10600, POB 6162

Fax: 271 4764 Correo electrónico : yanelys.morera@cigb.edu.cu

1. Resumen

La degeneración macular asociada a la edad en su variante húmeda (DMAEvh), es una enfermedad del ojo ocasionada por daños o deterioro de la mácula, en la cual los capilares ocupan el humor vítreo. Esta enfermedad afecta a personas mayores de 50 años y representa la primera causa de ceguera a partir de los 65 años. Con la llegada de los fármacos anti-angiogénicos comienza el interés por el uso de estas moléculas para el tratamiento de la DMAEvh. Nuestro grupo ha desarrollado una estrategia de inmunoterapia activa específica basada en una molécula recombinante mutada del VEGF humano. Este candidato vacunal pasó por rigurosos ensayos experimentales y de prueba de concepto en diferentes especies animales. Además se demostró en un ensayo clínico fase I en pacientes de cáncer la inmunogenicidad del preparado vacunal en humanos y un excelente perfil de seguridad. La capacidad de esta vacuna de inducir una respuesta humoral que neutraliza los efectos pro-angiogénicos del VEGF, indica su aplicación promisorio en otras condiciones asociadas a una angiogénesis excesiva como las retinopatías neovasculares. Aunque la comunidad científica ha avanzado en el desarrollo de moléculas basadas en el VEGF para el tratamiento la DMAEvh, actualmente todos estos fármacos son administrados por vía intravítrea. Los estudios que se han realizado con algunas de estas moléculas han mostrado múltiples complicaciones asociadas con la vía de administración. Las manifestaciones más serias incluyen la endoftalmitis y el desprendimiento de la retina. El altísimo costo de estas terapias (2000 USD/dosis) dificultan la adhesión por largo tiempo de los pacientes al tratamiento. En la dirección de disminuir los riesgos de efectos adversos y el abandono del tratamiento, asociados a la administración intravítrea, es donde se inserta como una solución potencial nuestra propuesta de vacunación por vía subcutánea con una vacuna basada en el VEGF. El objetivo del presente trabajo estuvo dirigido a demostrar que los anticuerpos generados mediante la inmunización de conejos con esta vacuna pueden atravesar la barrera hemato-retiniana y neutralizar los efectos del VEGF en el humor vítreo. Este concepto es novedoso, pues no existen precedentes a nivel mundial que demuestren este efecto para una vacuna basada en el VEGF. Se realizó la evaluación de la vacuna en un modelo en conejo de neo-vascularización de la retina inducida por VEGF humano. Se demostró que los anticuerpos IgG anti-VEGF inducidos por la vacunación subcutánea, son capaces de llegar al ojo a través del suplemento sanguíneo de la retina y tienen actividad neutralizante del VEGF. Sobre la base de la evaluación de parámetros anatómicos,

la inmunización con el candidato vacunal probó ser efectiva en el control de la neovascularización retiniana inducida por VEGF. Los ojos de los conejos vacunados mostraron una reducida dilatación y tortuosidad vascular, con respecto a los animales controles. Se demostró que la administración por vía subcutánea en conejos chinchilla de una vacuna basada en una variante mutada del VEGF humano inhibe la neo-angiogénesis en la vasculatura de la retina provocada por la inyección intravítrea de este factor de crecimiento. Los resultados de este trabajo indican que los anticuerpos anti-VEGF presentes en los sueros de los animales, generados mediante la inmunización subcutánea con esta proteína, son capaces de llegar a la circulación ocular y de contrarrestar el efecto pro-angiogénico inducido por el VEGF inyectado desde el exterior en el humor vítreo. Estos resultados validan la hipótesis sobre la que se sustenta la aplicación de patente ya aceptada en varios países y forman parte de una publicación internacional en la revista especializada en oftalmología *Experimental Eye Research*. Los hallazgos obtenidos motivaron el diseño y presentación de un nuevo ensayo clínico Fase I/II (CELIMAR), que fue aprobado por la autoridad regulatoria cubana (CEMED) y que iniciará a finales del presente año.

2. Comunicación Corta

2.1. Introducción

En el presente acápite se escogieron los aspectos más relevantes relativos a la originalidad (primera vez que se prueba este concepto empleando inmunoterapia activa específica basada en el VEGF), impacto científico (los resultados sientan el precedente para desarrollar un plan clínico dirigido a las enfermedades oculares con esta preparación vacunal), y social (sienta las bases para la aplicación de un producto que beneficiará a un grupo importante de pacientes cuya única opción de tratamiento actual es medicamentos intravítreos), que justifican la aplicación a premio de la ACC 2015.

2.2. Descripción del resultado y aporte científico-técnico y social

En el proceso de angiogénesis el plexo vascular se expande de manera progresiva debido al nacimiento de los vasos. Cuando este crecimiento de los

vasos es descontrolado, favorece la progresión de enfermedades entre la que se destaca la degeneración macular asociada a la edad en su variante húmeda, una enfermedad del ojo ocasionada por degeneración, daños o deterioro de la mácula, en la cual los capilares ocupan el humor vítreo (DMAEvh). Esta enfermedad representa la primera causa de ceguera en personas mayores en países desarrollados¹. Con la llegada de los fármacos anti-angiogénicos a mediados de la década del 2000, y en especial del anticuerpo recombinante humanizado anti-VEGF Bevacizumab (Avastin®) comienza el interés del posible uso de estas moléculas en el tratamiento de la DMAEvh. El examen oftalmológico de algunos pacientes de cáncer con DMAEvh en los ensayos clínicos del Avastin® demostró una aparente mejoría de esa enfermedad, que se atribuyó a la disponibilidad del fármaco suministrado de forma endovenosa para el tratamiento de la enfermedad tumoral de base, en la circulación retiniana. Posteriormente, se desarrolló un fragmento de anticuerpo tipo Fab, Lucentis® administrado por la ruta intravítrea (directamente en el ojo). Este fármaco constituye hoy en día el estándar de tratamiento de la DMAEvh con un altísimo costo (2096 US la dosis). En la dirección de disminuir los riesgos de efectos adversos y abandono del tratamiento, asociados a la administración intravítrea repetida de los anticuerpos y otras moléculas para el tratamiento de la DMAEvh, se inserta como una solución potencial la vacunación subcutánea con CIGB-247. Esta vacuna combina un antígeno recombinante representativo del VEGF-A producido en Escherichia coli con el adyuvante VSSP (Very Small Sized Proteoliposomes, CIM). Este candidato vacunal CIGB-247 pasó por rigurosos ensayos experimentales y de prueba de concepto en diferentes especies animales, así como estudios toxicológicos preclínicos, que demostraron que era inmunogénica y segura en ratones, ratas, conejos y primates no humanos. Estos estudios demostraron que la vacuna produce anticuerpos de clase IgG que reconocen y bloquean (neutralizan) el efecto pro-angiogénico del VEGF. La vacuna también estimuló específicamente la inmunidad celular. Además, el ensayo CENTAURO en pacientes avanzados de cáncer, realizado entre 2011 y 2012, demostró la inmunogenicidad del preparado vacunal y un excelente perfil de seguridad, con sólo efectos adversos locales en el sitio de la inyección. La racionalidad de la posible aplicación de la vacuna en el tratamiento de la DMAEvh parte de la consideración de que los anticuerpos neutralizantes del VEGF producidos por la inmunización estarán también presentes en la circulación ocular. Al estar afectada en la DMAEvh la integridad de las barreras naturales que normalmente limitan en el ojo la difusión de los anticuerpos desde la circulación coroidea, los anticuerpos anti-VEGF circulan-

tes podrían tener acceso al epitelio pigmentario retiniano (RPE) y otras células de la retina, y bloquear el VEGF producido localmente, que es el que actúa desencadenando y manteniendo la neovascularización (NVC). El objetivo del presente estudio dirigido a demostrar que, en el ambiente interior del ojo de los animales inmunizados con la vacuna, los anticuerpos circulantes que atraviesan la barrera hemato-retiniana pueden neutralizar el efecto del VEGF. La novedad del trabajo propuesto se centra en que sus resultados constituyen la primera demostración de que con una vacuna basada en el VEGF administrada por vía subcutánea se puede inhibir la neo-angiogénesis en la vasculatura de la retina ocular provocada mediante la inyección intravítrea de VEGF. Este resultado indica además que los anticuerpos anti-VEGF presentes en los sueros de los animales vacunados con el candidato vacunal, son capaces de llegar a la circulación ocular y de contrarrestar el efecto pro-angiogénico inducido por el VEGF inyectado desde el exterior, en el ambiente del ojo. Este resultado permite sugerir que mediante este procedimiento podríamos ser capaces de contribuir, de conjunto con otros tratamientos, a la terapia de enfermedades relacionadas con el exceso de vascularización ocular como es el caso, entre otras, de la DMAEvh. De hecho estos resultados avalaron la propuesta de un ensayo clínico al CEDMED con vistas a tratar esta enfermedad que fue aprobado por esta entidad y se comenzarán a incluir pacientes a finales del presente año. En concordancia con los elementos expuestos, los resultados presentados en este trabajo han sido recientemente publicados en un artículo de la revista "Experimental Eye Research" la cual figura entre las revistas de mayor impacto en el tema de la oftalmología experimental en la literatura internacional. Por otro lado, los resultados presentados validan las hipótesis sobre las que se sustenta una aplicación de patente ya aceptada en varios países. Además validaron la prueba de concepto con vistas a las primeras pruebas clínicas con esta vacuna para esta patología. El trabajo realizado consistió de las siguientes etapas:

- a)** Evaluación de la presencia en conejos inmunizados con la vacuna basada en el factor de crecimiento del endotelio vascular de anticuerpos anti-VEGF en el fluido vítreo, indicador de que estos circulan no sólo por la circulación periférica, sino también por la vasculatura de la retina.
- b)** Evaluación del efecto de la vacuna sobre la inhibición de la neovascularización inducida mediante la inyección intravítrea del VEGF en conejos Chinchilla.

Evaluación de la presencia en conejos vacunados con CIGB-247 de anticuerpos anti-VEGF en el fluido vítreo

En presencia de una barrera hemato-retiniana intacta, el epitelio altamente fenestrado de la retina debe impedir que los anticuerpos que viajan por la membrana corioidea penetren al vítreo. Pero conociendo que esta barrera en diversos animales de experimentación puede afectarse de forma reversible, por ejemplo, debido a la inflamación, o por diversas enfermedades oculares, hipotetizamos que era posible encontrar animales inmunizados con la vacuna, que tuvieran evidencias de anticuerpos específicos en este fluido. Debemos tener en cuenta que los anticuerpos circulan no sólo por la membrana corioidea, sino también por el plexo arterial y venoso superior de la retina. La integridad de estos otros capilares y vasos puede también estar comprometida en algunos animales, dando la posibilidad de que se produzca un escape de anticuerpos hacia el vítreo. Para el experimento se emplearon un total de 10 conejas New Zeland adultas que se inmunizaron semanalmente por dos meses con la vacuna o placebo (controles). Todos los grupos se re-inmunizaron una vez, un mes después de finalizar la fase de inducción. Una semana después de la última inmunización se realizó una extracción de humor vítreo por un especialista en retina y se ejecutaron con estas muestras dos sistemas ELISA. En la figura 1A se muestran los resultados que indican que la administración de la vacuna (denominada CIGB-247) indujo anticuerpos IgG que pueden ser detectados en el humor vítreo. Además en todos los casos estos anticuerpos detectados en el humor vítreo fueron capaces de bloquear la interacción del VEGF con su receptor 2 (figura 1B).

Evaluación del efecto de la vacuna sobre la inhibición de la neovascularización inducida mediante la inyección intravítrea del VEGF en conejos chinchilla

El segundo bloque de experimentos en conejos estuvo dirigido a demostrar que los anticuerpos anti-VEGF circulantes en la vasculatura de la retina luego de la vacunación pueden neutralizar el efecto de inyecciones intravítreas de VEGF. Para ello se montó un modelo en conejo descrito en la literatura para la inducción de neo-angiogénesis en la vasculatura de la retina mediante inyección intravítrea de VEGF 5. Este modelo ha sido utilizado para el estudio in vivo del efecto bloqueador de anticuerpos monoclonales anti-VEGF que se inyectan por esta misma vía. En estos estudios se usan conejos Chinchilla, debido a que poseen, a diferencia de los New Zealand White, un RPE normal, pigmentado. A estos se les inyecta VEGF humano por vía intravítrea,

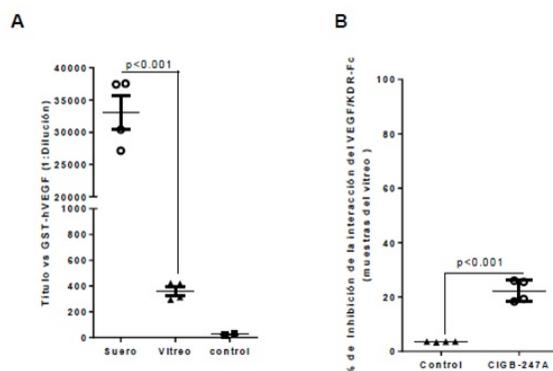


Figura 1: **A.** Evaluación de la presencia anticuerpos específicos contra el VEGF humano en el humor vítreo de conejos inmunizados con CIGB-247. **B.** Evaluación de su capacidad de bloqueo de la interacción del VEGF con su receptor.

que causa a partir del día siguiente y por al menos hasta una semana después, una fuerte vascularización detectable mediante técnicas de fondo de ojo y angiografía fluorescente. La neo-vascularización y los derrames sanguíneos asociados son reversibles y comienzan a desaparecer a partir de la segunda semana. Se realizaron dos experimentos en los que se inyectó VEGF humano en el ojo de conejos, inmunizados o no con CIGB-247. Para los estudios se emplearon conejos Chinchilla, debido a que poseen un RPE normal, pigmentado, que favorece un mejor análisis de los resultados. Se inmunizaron los conejos durante ocho semanas con el CIGB-247 o placebo. Una semana después de la última inmunización, se les realizó a una inyección del VEGF humano por vía intravítrea. Las siguientes imágenes son representativas de uno de estos dos experimentos. En la figura 2A, se observa el efecto que causa la inyección intravítrea en el animal placebo (conejo A5). Las imágenes en la primera columna muestran la angiografía fluorescente antes de la inyección y las imágenes en la segunda columna muestran el resultado a los siete días de la inyección. Como era esperado el VEGF produjo a los 7 días una severa neo-angiogénesis en la vasculatura superior retiniana, con engrosamiento de vasos, aumento de la red capilar y con derrames fácilmente observables en la angiografía fluorescente. En la figura 2B, se observa la imagen del efecto bloqueador de la neo-angiogénesis visto en conejos inmunizados con CIGB-

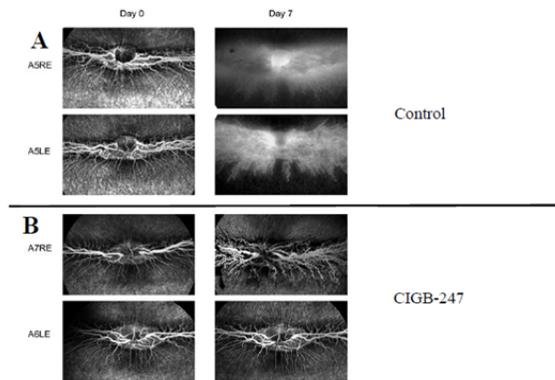


Figura 2: Angiografía fluorescente antes y una semana después de la inyección intravítrea del VEGF humano. **A.** Conejos tratados con placebo. **B.** conejos vacunados con CIGB-247.

247 (conejo A6 y conejo A7). En comparación con el placebo, se observa un menor engrosamiento de los vasos y no se observan derrames, solo un ligero aumento en la red capilar lo que indica que los anticuerpos producidos por la vacunación inhibieron la neoangiogénesis. Adicionalmente, se comprobó la presencia de anticuerpos específicos para el VEGF en el humor vítreo de los animales inmunizados con el CIGB-247, que fueron producidos mediante la inmunización con esta proteína y son capaces de llegar a la circulación ocular. El segundo experimento confirmó estos resultados aún en un escenario donde se incrementó la cantidad de VEGF.

2.3. Aporte científico-técnico y social

Este trabajo demuestra por primera vez a nivel mundial que una vacuna basada en VEGF es capaz de inducir anticuerpos capaces de neutralizar el exceso de VEGF en el interior del ojo, lo cual sienta las bases para la aplicación clínica del CIGB-247 en el exceso de vascularización ocular. De este modo esta vacuna podría ser una solución para la terapia crónica requerida por estos pacientes.

Referencias

- [1] Bhisitkul, R. B. Vascular Endothelial Growth Factor Biology: Clinical Implications for Ocular Treatments. *Br. J. Ophthalmol.* 2006, 90, 1542-1547.
- [2] Fong, A. H.; Lai, T. Y. Long-Term Effectiveness of Ranibizumab for Age-Related Macular Degeneration and Diabetic Macular Edema. *Clin. Interv. Aging.* 2013, 8:467-83. doi: 10.2147/CIA.S36811. Epub@2013 Apr 29., 467-483.
- [3] Morera, Y.; Bequet-Romero, M.; Ayala, M.; Velazco, J. C.; Perez, P. P.; Alba, J. S.; Ancizar, J.; Rodriguez, M.; Cosme, K.; Gavilondo, J. V. Immunogenicity and Some Safety Features of a VEGF-Based Cancer Therapeutic Vaccine in Rats, Rabbits and Non-Human Primates. *Vaccine.* 2010, 28, 3453-3461.
- [4] Gavilondo, J.; Hernández-Bernal, F.; Ayala Ávila, M.; de la Torre, A.; Morera-Díaz, Y.; Bequet-Romero, M.; Sánchez, J.; Valenzuela, C.; Martín, Y.; Selman-Housein, K.-H.; Garabito, A.; Lazo, O. Specific Active Immunotherapy With a VEGF Vaccine in Patients With Advanced Solid Tumors. Results of the CENTAURO Antigen Dose Escalation Phase I Clinical Trial. *Vaccine* 2013, (in press) <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.102>.
- [5] Alikacem, N.; Yoshizawa, T.; Nelson, K. D.; Wilson, C. A. Quantitative MR Imaging Study of Intravitreal Sustained Release of VEGF in Rabbits. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000, 41, 1561-1569.
- [6] Ameri, H.; Chader, G. J.; Kim, J. G.; Sadda, S. R.; Rao, N. A.; Humayun, M. S. The Effects of Intravitreal Bevacizumab on Retinal Neovascular Membrane and Normal Capillaries in Rabbits. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007, 48, 5708-5715.