

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 490**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/20** (2006.01)

**A61P 27/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.10.2012 PCT/EP2012/069333**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013 WO13045694**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2012 E 12772743 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 2760465**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para el tratamiento de afecciones degenerativas de la retina**

30 Prioridad:

**29.09.2011 GB 201116815**  
**23.03.2012 GB 201205131**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.03.2021**

73 Titular/es:

**THE PROVOST, FELLOWS, FOUNDATION  
SCHOLARS, & THE OTHER MEMBERS OF  
BOARD, OF THE COLLEGE OF THE HOLY &  
UNDIV. TRINITY OF QUEEN (100.0%)  
College Green  
Dublin 2, IE**

72 Inventor/es:

**CAMPBELL, MATTHEW;  
HUMPHRIES, PETER;  
HUMPHRIES, MARIAN;  
KIANG, ANNA-SOPHIA;  
DOYLE, SARAH y  
O'NEILL, LUKE**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 809 490 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos para el tratamiento de afecciones degenerativas de la retina

- 5 La presente invención está dirigida a composiciones para su uso en el tratamiento de afecciones degenerativas de la retina.

Específicamente, la presente invención se dirige a composiciones para su uso en el tratamiento de la degeneración macular asociada con la edad que implica la neovascularización coroidea inducida por drusas y anafilatoxinas y al uso de vectores de administración de genes que dirigen la expresión de productos genéticos seleccionados, incluidos mediadores inflamatorios, componentes o sustratos del NLRP3-inflamasoma, adecuados para tratar o prevenir la degeneración macular asociada con la edad que involucra la neovascularización coroidea inducida por drusas y anafilatoxinas, incluida la NVC inducida patológicamente.

- 15 En el mundo desarrollado, la degeneración macular asociada con la edad (DMAE) es la causa más frecuente de ceguera legal en las personas mayores. La DMAE es una enfermedad progresiva, caracterizada por la acumulación de depósitos extracelulares focales en la membrana de Bruch debajo del epitelio pigmentario de la retina (EPR) en la mácula, que en un examen ocular se reconoce como drusa. La acumulación de drusas es la principal característica patológica común a la DMAE seca y húmeda. La presencia de drusas en la mácula, la densidad de los depósitos y el área cubierta por este material representan etapas tempranas en el proceso de la enfermedad de la DMAE. Las personas con drusas se consideran en riesgo de progresar a las formas de ceguera de la DMAE en etapa final. La atrofia geográfica (AG), la etapa final de la forma atrófica "seca" de la DMAE, culmina en la pérdida de visión luego de la degeneración focal del EPR debajo de la fóvea. Sin el EPR, los fotorreceptores cónicos foveales se degeneran, causando ceguera de la retina central. La neovascularización coroidea (NVC) caracteriza la etapa final de la forma exudativa "húmeda" de la DMAE, con nuevos vasos sanguíneos que se rompen a través de la membrana de Bruch /EPR que sangran, causando que se forme un coágulo de sangre entre el EPR y los fotorreceptores foveales que resultan en ceguera inmediata.

La enfermedad, DMAE, es clásicamente multifactorial, con factores ambientales y genéticos involucrados. Las variantes de secuencias asociadas con la susceptibilidad a la enfermedad ahora se han caracterizado en un número creciente de genes inmunorregulados. Se cree que la activación del complemento en las superficies oculares desempeña un papel importante en el proceso temprano de la enfermedad, lo que resulta en la deposición de drusas. Sin embargo, los mecanismos involucrados en el inicio de las respuestas inflamatorias observadas en los ojos de sujetos con DMAE aún no se han resuelto.

35 Los depósitos de drusas son agregados de proteínas particuladas, de naturaleza extracelular, características de activadores conocidos de la respuesta inflamatoria estéril mediada por la proteína 3 que contiene dominios NACHT, LRR y PYD (NLRP3). NLRP3 actúa como un receptor de señales de "peligro" como ATP, cristales de ácido úrico, estructuras de tipo amiloide y disfunción mitocondrial, que activan el inflamasoma que comprende NLRP3, dominio tipo Speck asociado a Apoptosis que contiene un dominio de reclutamiento de Caspasa (ASC) y pro-caspasa-1 y dando como resultado la escisión de pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18, en sus formas proinflamatorias maduras. Además, la acumulación excesiva de drusas puede alterar las células EPR adyacentes que posteriormente mueren por necrosis, un proceso celular que ahora se sabe que activa el inflamasoma NLRP3.

45 Las terapias actuales basadas en anticuerpos se dirigen a formas avanzadas de DMAE al inhibir la bioactividad del FCEV (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular). Sin embargo, la inyección intraocular directa y regular de estos anticuerpos monoclonales (Lucentis<sup>®</sup> y Avastin<sup>®</sup>) conlleva el riesgo de desprendimiento, hemorragia e infección de la retina. No hay tratamientos aprobados por la FDA disponibles para la degeneración macular seca, aunque algunos ahora están en ensayos clínicos. Por lo tanto, la generación de nuevas terapias para la DMAE es importante comercialmente.

Desde una perspectiva clínica, si bien los procesos inflamatorios se han asociado durante mucho tiempo con la patología y el desarrollo de la enfermedad DMAE, sugerimos que la inhibición global de la inflamación en la retina en el caso de DMAE húmeda no sería una buena terapia. Prestando fuerza a nuestras observaciones, los resultados de ensayos clínicos recientes de Infliximab (Remicade<sup>®</sup>) en individuos con DMAE húmeda mostraron que en más del 50 % de estos sujetos, los síntomas se exacerbaban enormemente.

IL-18 es una molécula con una amplia variedad de funciones, muchas de las cuales son opuestos dicotómicos entre sí, dependiendo del entorno en el que se libera IL-18. Este es el caso con respecto al papel de la IL-18 en la regulación de la angiogénesis o crecimiento de los vasos sanguíneos. Por ejemplo, se ha demostrado que la IL-18 tiene un efecto

pro-angiogénico en un modelo de artritis reumatoide (Park y col., 2001, Evidence of IL-18 as a novel angiogenic mediator. *Journal of Immunology* 167: 1644-1653) mientras que se ha demostrado que es antiangiogénico en la queratitis del estroma herpético (Kim B y col., 2006, Application of plasmid DNA encoding IL-18 diminishes development of herpetic stromal keratitis by antiangiogenic effects. *Journal of Immunology* 175:509-516). La razón de la discrepancia entre el papel de la IL-18 como agente angiogénico versus su papel como agente angiostático sigue sin estar clara, pero está determinada en parte por los lechos vasculares específicos involucrados.

Qiao y col. (Interleukin-18 Regulates Pathological Intraocular Neovascularization. *Journal of Leukocyte Biology*. Volumen 81, abril de 2007, 1012-1021) utiliza un modelo de retinopatía del prematuro inducido por oxígeno, que desencadena el desarrollo de la neovascularización intraocular. La neovascularización intraocular implica la neovascularización del vaso sanguíneo que recubre la retina interna. Qiao y col. administraron IL-18 recombinante a ratones C57BL/6 durante el desarrollo de la retinopatía inducida por oxígeno, y no encontraron inhibición de la neovascularización. Qiao y col. concluyeron que la IL-18 regula la neovascularización de la retina intraocular promoviendo su regresión en lugar de inhibir su desarrollo.

El documento WO2006119128 describe el tratamiento o la prevención de enfermedades oculares que implica administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de direccionamiento endotelial vascular y una secuencia de aminoácidos citotóxica. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de direccionamiento endotelial vascular puede ser una secuencia del FCEV, tal como una secuencia del FCEV121. Ejemplos de secuencias de aminoácidos citotóxicas incluyen secuencias de toxinas, tales como gelonina, secuencias pro-apoptóticas y secuencias antiangiogénicas.

La presente invención está dirigida a la IL-18 para su uso en el tratamiento de la degeneración macular asociada con la edad que implica la neovascularización coroidea inducida por drusas y anafilatoxinas y/o NVC inducida patológicamente, preferiblemente neovascularización coroidea asociada con DMAE, más preferiblemente DMAE húmeda.

La coroides es un lecho vascular que es extraocular y completamente separado de la retina. No actúa de la misma manera que la vasculatura intraocular de la retina. La neovascularización coroidea (NVC) es la creación de nuevos vasos sanguíneos en la capa coroidea del ojo. Este es un síntoma común de la DMAE húmeda de maculopatía degenerativa (degeneración macular asociada con la edad) y es diferente de la neovascularización de la retina (intraocular) de Qiao y col.

En esta especificación, el término neovascularización coroidea (NVC) idealmente no abarca la neovascularización de la retina (intraocular). La neovascularización intraocular implica la neovascularización del vaso sanguíneo que recubre la retina interna. Esto es distinto de la neovascularización coroidea que involucra las coroides, un lecho vascular que es extraocular y completamente separado de la retina. Idealmente, en esta especificación se excluye el uso de IL-18 para la neovascularización intraocular.

En esta especificación, se entenderá que el término "inflammasoma, componente o sustrato NLRP3" cubre NALP3, ASC y pro-caspasa-1 y pro-IL-18 e IL-18. Cuando NLRP3, ASC y pro-caspasa-1 se oligomerizan, producen caspasa-1 activa que a continuación escinde pro-IL18 para madurar IL-18. Por lo tanto, pro-IL18 es un componente del inflammasoma en virtud del hecho de que es un sustrato de caspasa-1. El precursor inactivo de 24KDa de IL-18 se denomina "pro-IL-18" y la IL-18 madura de 18KDa se denomina "IL-18" o IL-18 proinflamatoria. NLRP3 y NALP3 se usan indistintamente en esta especificación y se refieren al mismo componente de inflammasoma. En una realización preferida, el inflammasoma, componente o sustrato NLRP3 es IL-18 madura, denominado "IL-18". Se entenderá que la referencia a IL-18 también significa la secuencia de nucleótidos definida por NCBI N° de Acceso NM\_001562.3 y la secuencia de proteínas definida por NCBI N° de Acceso NP\_001553.1. También se entenderá que la referencia a la administración de IL-18 también cubre la administración de IL-18 recombinante (rIL-18), por ejemplo, localmente mediante inyección intraocular o sistémicamente mediante inyección intravenosa.

Hemos demostrado que las drusas aisladas de los ojos con DMAE del donante activan el NLRP3-inflammasoma, causando la secreción de IL-1 $\beta$  e IL-18. El componente C1Q de las drusas también activa el NLRP3-inflammasoma. Además, el carboxietil-pirrol (CEP) de modificación de proteínas relacionado con el estrés oxidativo, un biomarcador de la DMAE, prepara el inflammasoma. Hemos encontrado caspasa-1 y NLRP3 escindidos en macrófagos activados en la retina de ratones inmunizados con CEP-MSA, que modela una patología similar a la DMAE seca. Mostramos que la neovascularización coroidea (NVC) inducida por láser, un modelo animal aceptado de DMAE húmeda, se exagera en ratones *Nlrp3*<sup>-/-</sup> pero no en ratones *Il1r1*<sup>-/-</sup>, implicando directamente a IL-18 en la regulación del desarrollo de NVC. Estos resultados son indicativos de un papel protector para NLRP3 e IL-18 en la progresión de la DMAE.

Es nuestra opinión que NLRP3 y sus componentes están directamente implicados como un agente protector contra la principal patología de la enfermedad de la DMAE. Por lo tanto, las estrategias destinadas a producir o administrar IL-18 al ojo pueden resultar beneficiosas para prevenir la progresión de la NVC, especialmente en el contexto de la DMAE húmeda.

5 Según un primer aspecto general de la invención, se proporciona IL-18, preferiblemente IL-18 recombinante, para uso en el tratamiento de la degeneración macular asociada con la edad que implica la neovascularización coroidea inducida por drusas y anafilatoxinas.

10 La neovascularización de la retina (intraocular) y la neovascularización coroidea (extraocular) de la presente invención son afecciones distintas de la vasculatura. Hemos encontrado que IL-18 suprime la promoción de la neovascularización coroidea.

Los componentes o sustratos del NLRP3-inflamasoma es IL-18, incluida la IL-18 recombinante.

15 La afección de la retina incluye la NVC inducida patológicamente, como la neovascularización coroidea (NVC) asociada con DMAE, preferiblemente DMAE seca y/o húmeda, más preferiblemente DMAE húmeda.

Según este aspecto general de la invención, el uso implica controlar, mantener o estimular la expresión de Interleucina-18 (IL-18) en un sujeto en riesgo de desarrollar degeneración macular asociada con la edad y prevenir la progresión de la NVC, especialmente en el contexto de la DMAE húmeda.

20 Los componentes aguas arriba del inflamasoma incluyen NLRP3, ASC o pro-caspasa-1, pro-IL-18, etc. Sin embargo, se reivindica la administración de IL-18 o IL-18 recombinante.

25 Idealmente, la Interleucina-18 (IL-18) se administra antes del desarrollo de la enfermedad neovascular o en la enfermedad neovascular vascular en etapa temprana.

30 La activación del inflamasoma NLRP3 por drusas sugiere que puede existir un equilibrio, por lo que se tolera cierto nivel focal de drusas debido a su capacidad para inducir IL-18 que a su vez puede actuar como un efector antiangiogénico, manteniendo la homeostasis coroidea en un microambiente inflamatorio. Es probable que una vez que se acumula un nivel crítico de drusas, su papel protector es negado por el daño excesivo a los tejidos circundantes. Es importante destacar que hemos demostrado que los mediadores inflamatorios inducibles por drusas son protectores contra el desarrollo de NVC y que es la elevación resultante de IL-18 mediada por NLRP3 lo que impide la producción

35 aguas abajo de FCEV. Además, se ha demostrado que IL-18 no juega un papel en el desarrollo de la uveítis experimental, un modelo más convencional de inflamación.

La afección degenerativa de la retina es la degeneración macular asociada con la edad. Se entenderá que la degeneración macular asociada con la edad a la que se hace referencia en todas partes puede ser degeneración

40 macular húmeda asociada con la edad o degeneración macular seca asociada con la edad.

Según una realización preferida de la invención, se proporciona Interleucina-18 (IL-18) o IL-18 recombinante para su uso en el control de la neovascularización coroidea (NVC) en un paciente con riesgo de desarrollar la degeneración macular asociada con la edad (DMAE) húmeda. La elevación mediada por NLRP3 resultante de IL-18 impide la

45 producción aguas abajo de FCEV, que hemos encontrado que es protectora contra el desarrollo de NVC.

Debe entenderse que todas las referencias a IL-18 en esta invención también se refieren a IL-18 recombinante (rIL-18).

50 Según un aspecto general de la invención, se puede administrar IL-18 o IL-18 recombinante para dar como resultado y proporcionar un efecto local o un efecto sistémico.

IL-18 o proteína IL-18 recombinante pueden administrarse per se. IL-18 o IL-18 recombinante también se pueden administrar en forma de una composición farmacéutica. Opcionalmente, IL-18 puede administrarse con un adyuvante

55 farmacéuticamente aceptable. Tales adyuvantes pueden incluir vehículos, diluyentes y excipientes tales como agua y aceite estériles. Otros adyuvantes, excipientes y sustancias auxiliares se enumeran a continuación.

Se entenderá que la administración puede llevarse a cabo a través de una variedad de rutas. Estas rutas están diseñadas para proporcionar un efecto local o sistémico según sea necesario. Estas rutas incluyen, pero no se limitan

60 a, oral, tópica, pulmonar, rectal, inyección subcutánea, intradérmica, intranasal, intracraneal, intramuscular, intraocular

o intraarticular, y similares. La ruta de administración más típica es la intravenosa seguida de la subcutánea, aunque otras rutas pueden ser igualmente efectivas. La inyección intramuscular también se puede realizar en los músculos del brazo o la pierna.

- 5 En algunos usos, IL-18 puede inyectarse directamente en un tejido particular. En otras realizaciones, la administración puede ser como parte de una composición de liberación sostenida.

Para administración parenteral, IL-18 puede administrarse como dosis inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril como agua, aceites, solución salina, glicerol o etanol. Además, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias tamponantes de pH y similares pueden estar presentes en las composiciones. Otros componentes de las composiciones farmacéuticas son los de petróleo, origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de maní, aceite de soja y aceite mineral. En general, los glicoles como el propilenglicol o el polietilenglicol son vehículos líquidos adecuados, particularmente para soluciones inyectables.

15 IL-18 también se puede administrar en forma de inyección de depósito o preparación de implante que se puede formular de tal manera que permita una liberación sostenida de la proteína IL-18.

Típicamente, las composiciones se pueden preparar como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar o encapsular en liposomas o micropartículas tales como polilactida, poliglicólido o copolímero para una administración mejorada.

Estas composiciones adoptan la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos o formulaciones de liberación sostenida. La aplicación tópica puede resultar en administración transdérmica o intradérmica. Alternativamente, la administración transdérmica se puede lograr usando un parche para la piel.

Idealmente, los modos de administración anteriores dan como resultado la administración de IL-18 al ojo, preferiblemente a la retina, más preferiblemente a la capa corioidea.

30 Según una realización preferida de la invención, los medios de administración local incluyen inyección directa de IL-18, rIL-18 o composición farmacéutica que comprende IL-18/rIL-18, al ojo, tal como inyección intraocular. Las inyecciones pueden ser subretinianas, hechas en el vítreo del ojo (intravítrea), detrás del ojo (retrobulbar), debajo de la conjuntiva (subconjuntival) o debajo de la cápsula de Tenon (subtenones).

35 Según otra realización preferida, la Interleucina 18 proinflamatoria (IL-18), rIL-18 o composición farmacéutica que comprende IL-18/rIL-18, puede ser administrada al sujeto sistémicamente. Los medios de administración sistémicos pueden incluir medios parenterales o enterales y esencialmente abarcan todos los medios de administración no locales. Idealmente, los medios de administración sistémica incluyen inyección, inyección directa, y/o administración mediada por virus.

Según una realización preferida, las técnicas de inyección sistémica incluyen administración intravenosa por inyección intravenosa. La inyección intravenosa puede ser en una vena periférica del sujeto. Para esta ruta de administración, IL-18, rIL-18 o una composición farmacéutica que comprende IL-18/rIL-18 es administrada/inyectada directamente en el torrente sanguíneo del sujeto.

Preferiblemente, IL-18 se administra en la retina sistémicamente, por inyección directa, como inyección intravenosa y/o por administración mediada por virus.

50 Las técnicas de administración mediadas por virus incluyen virus adenoasociados (VAA), vectores de administración génica por adenovirus o lentivirus. Opcionalmente, las técnicas de administración mediadas por virus, incluida la terapia con VAA, pueden aplicarse aguas arriba de los componentes del inflammasoma mediante la introducción de NLRP3, ASC o pro-caspasa-1.

55 También se describe un vector de administración génica viral recombinante que dirige la expresión de pro-IL-18 o IL-18 en una forma adecuada para el tratamiento de la neovascularización corioidea.

El vector de administración génica viral recombinante puede estar en una forma para administración sistémica, por ejemplo, por administración intravenosa.

60

El vector de administración génica viral recombinante también puede estar en una forma para administración en el ojo de un sujeto en riesgo de desarrollar DMAE, preferiblemente DMAE húmeda.

Por ejemplo, el vector puede estar en una forma adecuada para administración en el ojo mediante inyección intraocular, que incluye inyección de la subretina o intravítrea.

El vector viral puede ser un virus adenoasociado (VAA), vector de administración génica por adenovirus o lentivirus. Idealmente, la administración del vector de administración génica es a través de una inyección de la subretina donde, por ejemplo, se inyecta una pequeña cantidad de fluido debajo de la retina. Esto tiene una ventaja en términos del manejo de la enfermedad a largo plazo luego de una sola administración. El vector también puede optimizarse para la administración intravítrea en sujetos.

Según una realización más preferida de la invención, se proporciona el uso de administración mediada por virus, preferiblemente VAA, de IL-18 a un sujeto para controlar, mantener o estimular la expresión de Interleucina-18 (IL-18) en un sujeto con riesgo de desarrollar degeneración macular asociada con la edad que involucra las drusas y la neovascularización coroidea inducida por anafilatoxina.

Según esta realización preferida, se proporciona el uso de un vector de administración génica de virus adenoasociados (VAA) recombinante que dirige la expresión de IL-18 adecuada para administración en el ojo de un sujeto con riesgo de desarrollar DMAE, preferiblemente DMAE húmeda.

El vector VAA comprende nucleótidos que codifican el gen IL-18. El VAA puede ser cualquiera de los serotipos 1 a 11 de VAA, preferiblemente los serotipos 2, 8 o 9. Idealmente, el gen IL-18 está flanqueado por repeticiones terminales invertidas (RTI) de VAA.

Se pueden usar muchos promotores diferentes. Estos son idealmente promotores específicos de células. Estos pueden incluir promotores específicos de células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) como CRALBP o RPE65, promotores específicos de células endoteliales como Tie-2 o claudin-5, o promotores específicos de fotorreceptores que incluyen rodopsina.

VAA es el principal vector viral utilizado para enfermedades oculares, ya que es muy eficiente en la transducción de células de la retina. También es no inmunogénico, lo cual es muy importante desde el punto de vista clínico. La tecnología VAA se ha convertido en un medio muy seguro para administrar genes al tejido del huésped, especialmente los tejidos del sistema nervioso central, como la retina. A diferencia de los adenovirus que pueden integrarse en el genoma del huésped, los VAA infectarán las células y posteriormente su material genético residirá en el núcleo como ADN episomal. Este factor es probablemente clave para su excelente perfil de seguridad y baja inmunogenicidad. En conjunto, la tecnología VAA ahora se está utilizando en una variedad de ensayos clínicos para la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la distrofia muscular y, en relación con esta propuesta, los VAA ahora están bien establecidos para su uso en la retina, con numerosos ensayos clínicos en curso para el tratamiento de la forma recesiva de la Retinitis pigmentosa denominada amaurosis congénita de Leber (ACL).

Hasta la fecha, se han descrito 11 serotipos de VAA en la bibliografía y las diferencias clave en estos serotipos se relacionan con las células diana que pueden infectar. Se ha encontrado que VAA-2, VAA-8 y VAA-9 transducen células del EPR de manera efectiva. Por lo tanto, la presente invención puede implicar preferiblemente el uso de VAA-2, VAA-8 y/o VAA-9.

Según una realización preferida, la invención implica construir un vector (por ejemplo, un vector VAA tal como los serotipos VAA -2, -8 y -9) clonando un gen que codifica IL18 que incluye UTR 5' y 3' e introduciendo este gen en un vector tal como para incorporar repeticiones de terminales invertidos VAA izquierdas y derechas (L-RTI y R-RTI).

También se describe un procedimiento para tratar afecciones degenerativas de la retina asociadas con drusas y neovascularización coroidea inducida por anafilatoxinas, que comprende administrar mediadores, componentes o sustratos inflamatorios del NLRP3-inflamasoma a un sujeto que necesita tratamiento.

También se describe un procedimiento para tratar la degeneración macular húmeda asociada con la edad (DMAE) que comprende administrar Interleucina-18 (IL-18) a un sujeto en riesgo de desarrollar degeneración macular asociada con la edad. IL-18 puede administrarse para proporcionar un efecto local o sistémico.

Según una realización preferida, los medios de administración local incluyen inyección intraocular directa. Las inyecciones pueden ser subretinianas, hechas en el vítreo del ojo (intravítrea), detrás del ojo (retrobulbar), debajo de

la conjuntiva (subconjuntival) o debajo de la cápsula de Tenon (subtenones).

Según otra realización preferida, la Interleucina-18 proinflamatoria (IL-18) puede administrarse al sujeto sistémicamente. Los medios de administración sistémicos pueden incluir medios parenterales o enterales y esencialmente abarcan todos los medios de administración no locales. Idealmente, los medios de administración sistémica incluyen inyección, inyección directa, y/o administración mediada por virus. Según una realización más preferida, las técnicas de inyección sistémica incluyen administración intravenosa por inyección intravenosa. La inyección intravenosa puede ser en una vena periférica del sujeto. Para esta ruta de administración, IL-18 recombinante se administra/inyecta directamente en el torrente sanguíneo del sujeto.

También se describe el uso de mediadores inducidos por NLRP3-Inflamasoma, preferiblemente IL-18 proinflamatoria (IL-18), como un biomarcador para indicar el riesgo de desarrollar enfermedades relacionadas con drusas y neovascularización coroidea inducida por anafilatoxinas, tales como la degeneración macular asociada con la edad húmeda o seca.

También se describe un procedimiento para determinar el riesgo de desarrollar o monitorear la progresión de enfermedades relacionadas con drusas y neovascularización coroidea inducida por anafilatoxinas, como la degeneración macular relacionada con la edad húmeda o seca, en un sujeto, utilizando mediadores inducidos por inflamasoma, preferiblemente IL-18 pro-inflamatorio (IL-18), como biomarcador, el procedimiento comprende:

obtener el nivel de IL-18 circulante y/o niveles de proteína de unión a IL-18 en un sujeto;

comparar el nivel de IL-18 y/o niveles de proteína de unión a IL-18 a una referencia, donde el riesgo del sujeto de desarrollo o progresión de la enfermedad por drusas y neovascularización coroidea inducida por anafilatoxina se basa en los niveles de IL-18 y/o proteína de unión a IL-18 en comparación con una referencia.

Se entenderá que la proporción de IL-18 y su proteína de unión (proteína de unión a IL-18) se usa convencionalmente como una medida de variación de la referencia normal, aunque los niveles de IL-18 se pueden usar solos.

La invención se describirá ahora en relación con las siguientes figuras y ejemplos no limitativos.

**Figura 1: Drusas activan el inflamasoma NLRP3:** (a) Fotografía del fondo de ojo de personas no fumadoras, no afectadas, afectadas por DMAE seca y húmeda. (b) Fragmentos de drusas en un intervalo de tamaños desde poco menos de 500  $\mu\text{m}$  hasta partículas de tamaño submicroscópico. (c) Análisis SDS-PAGE de la membrana de Bruch (Bm)/preparación de drusas. (d) Imágenes de células vivas de MDMO BL6 inmortalizadas que expresan de forma estable ASC marcado con proteína fluorescente amarilla (YFP-ASC). Las células se prepararon durante 3 horas con LPS seguido de tratamiento con 250  $\text{ng ml}^{-1}$  drusas durante otras 2 horas, se usó Poly(dAdT) como control positivo. La oligomerización de ASC-YFP se observó mediante la formación de manchas, aumento original x 60. (e, f) La producción de IL-1 $\beta$  e IL-18 se midió por ELISA en MCSP Humano preparado durante la noche con 100  $\text{ng ml}^{-1}$  LPS y posteriormente tratado por 7 horas con dosis crecientes de la preparación de drusas (250  $\text{ng ml}^{-1}$  y 500  $\text{ng ml}^{-1}$ ) (\*\*\*) ( $P \leq 0,0001$ ). (g) Western Blot de productos de escisión de caspasa-1 después de tratamiento de células THP-1 con drusas. (h) Producción de IL-1 $\beta$  (panel izquierdo) e IL-6 (panel derecho) medido por ELISA en macrófagos derivados de médula ósea (MDMO) naturales (WT) (barras azules) y deficiente en NLRP3 (*Nlrp3*<sup>-/-</sup>) (barras rojas) después del tratamiento con dosis crecientes de drusas (\*\*\*) ( $P \leq 0,0001$ ) (i) Producción de IL-1 $\beta$  (panel izquierdo) y TNF  $\alpha$  (panel derecho) medido por ELISA en células dendríticas derivadas de médula ósea (CDMO) WT (barras azules) y *Nlrp3*<sup>-/-</sup> (barras rojas) después del tratamiento con dosis crecientes de drusas (\*\*\*) ( $P \leq 0,0001$ ). Todos los datos de ELISA son representativos de un mínimo de 3 experimentos separados realizados por triplicado.

**Figura 2: CEP, un componente de Drusas puede preparar el inflamasoma NLRP3:** (a) Producción de IL-1 $\beta$  en MCSP Humano preparado con LPS, albúmina aducida con CEP (CEP-HSA) o HSA en dosis crecientes (50 y 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) y posteriormente tratado con 5 mM ATP. (b) Producción de IL-1 $\beta$  en MDMO WT y *Nlrp3*<sup>-/-</sup> preparados con CEP-HSA y a continuación activados con ATP o Poly(dAdT). (c, d) Producción de IL-1 $\beta$  e IL-6 en MDMO WT o *Tlr2*<sup>-/-</sup> preparadas con HSA o CEP-HSA, activadas con ATP o dejadas sin tratar. (e, f) La producción de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  se midió en MDMO C3H/HeN (WT) o MDMO C3H/HeJ (que contienen un TLR4 mutante) preparados con LPS o CEP y activados con ATP. (g) Imágenes de células vivas de MDMO BL6 inmortalizadas que expresan YFP-ASC de forma estable. Las células se prepararon durante 3 h con CEP-HSA (panel superior) o HSA (panel inferior) seguido de tratamiento con 250  $\text{ng/ml}$  Drusas por otras 2 horas. La oligomerización de ASC-YFP se observó por formación de manchas, aumento original x 60. Todos los datos de ELISA son representativos de un mínimo de 3 experimentos separados realizados por triplicado.

**Figura 3: El factor complementario C1Q, un componente de Drusas, activa el inflamasoma NLRP3:** (a)

Producción de IL-1 $\beta$  (panel izquierdo) y TNF $\alpha$  (panel derecho) en MDMO preparados con CEP durante 3 horas y activados durante 6 horas con C1q a dosis crecientes. (b) Western Blot de productos de escisión de caspasa-1 en células THP1 preparadas con LPS y tratadas con dosis crecientes de C1Q. (c) Imágenes de células vivas de MDMO BL6 inmortalizadas que expresan YFP-ASC de forma estable. Las células se prepararon durante 3 horas con LPS (panel superior) o CEP-HSA seguido de tratamiento con 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  C1Q (panel derecho) durante otras 2 horas. La oligomerización de ASC-YFP se observó mediante la formación de manchas, aumento original x 60. (d) Producción de IL-1 $\beta$  (panel izquierdo) y TNF- $\alpha$  (panel derecho) en CDMO WT y *Nlrp3*<sup>-/-</sup> preparados con LPS (3 h) y activados con C1Q (16 h) a dosis crecientes (2.5, 5 y 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  C1Q). (e) Producción de IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-6 en MCSP humano preparado con 100ng  $\text{ml}^{-1}$  LPS durante la noche y activado con 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  C1Q durante 6 h, con la adición, 1 h antes del tratamiento con C1Q de dosis crecientes (10 veces) de ZVAD (inhibidor de caspasa-1). Todos los datos de ELISA son representativos de un mínimo de 3 experimentos separados realizados por triplicado.

**Figura 4: La caspasa-1 p10 escindida se localiza conjuntamente con macrófagos activados en ratones inmunizados con CEP-MSA:** (a-c) Inmunotinción de criosecciones de la retina de ratones inmunizados con CEP-MSA que muestran la localización de macrófagos positivos F4/80 (a) a regiones de la coroides (b) que se extienden desde la coroides hacia la membrana de Bruch y (c) presentes por encima del EPR en los segmentos externos (SE) y la capa nuclear externa (CNE) de la retina. (a,b) Panel superior (c) panel izquierdo, imagen de contraste de interferencia diferencial (CID), (a,b) panel inferior (c) panel derecho, imagen fluorescente (F4/80-rojo, DAPI-azul). (d,e) Co-etiquetado de criosecciones de la retina de ratones inmunizados con CEP-MSA con caspasa-1 p10 (rojo) y F4/80 (verde) que muestra la co-localización en (d) un macrófago presente dentro y trascendiendo la coroides/membrana de Bruch y (e) una protuberancia de macrófagos en el SE de la retina. (f) Co-etiquetado de criosecciones de la retina de ratones inmunizados con CEP-MSA muestra la co-localización de NLRP3 (rojo) y F4/80 (verde). (g) Gran aumento de NLRP3 y tinción con F4/80.

**Figura 5: NLRP3 protege contra la formación de lesiones de NVC inducidas por láser de manera independiente de IL-1 $\beta$ :** (a) NVC inducida por láser en ratones WT (panel superior izquierdo), *Nlrp3*<sup>-/-</sup> (panel central superior) e *Il1r1*<sup>-/-</sup> (panel superior derecho) que muestran el desarrollo de NVC 6 días después de la quemadura con láser. Imágenes reconstruidas en 3-D de pilas Z confocales de WT (panel inferior izquierdo), *Nlrp3*<sup>-/-</sup> (panel central inferior) e *Il1r1*<sup>-/-</sup> (panel inferior derecho). Representación de volumen de NVC (gráfico de barras). (b) Análisis electroretinográfico (ERG) de la función de conos y bastones de ratones *Nlrp3*<sup>-/-</sup> y *Il1r1*<sup>-/-</sup>. (c) Inmunotinción que muestra la localización de macrófagos activados (F4/80-green) al sitio de la lesión inducida por láser en ratones *Nlrp3*<sup>-/-</sup>. (d) Inmunotinción de criosecciones de la retina WT (panel izquierdo) o *Nlrp3*<sup>-/-</sup> (panel derecho) 3 horas después de la lesión, para caspasa-1 escindida (rojo).

**Figura 6: NLRP3 confiere su protección contra la formación de lesiones de NVC a través de su papel en la producción de IL-18, que a su vez regula los niveles de FCEV:** (a) Análisis electroretinográfico (ERG) de la función de conos y bastones de ratones *Il18*<sup>-/-</sup>. (b) NVC inducida por láser en ratones *Il18*<sup>-/-</sup> mostrando desarrollo de NVC 6 días después de la quemadura con láser (panel izquierdo). Imágenes 3D reconstruidas de pilas Z confocales (panel derecho). Representación de volumen de NVC (gráfico de barras). (c) Los volúmenes de NVC aumentaron significativamente en comparación con ratones WT (Fig. 5) (\*P = 0,0292). La producción de FCEV se analizó mediante ELISA en (d) células ARPE-19 y (e) células endoteliales microvasculares cerebrales de ratón (B.end3) tratadas con dosis crecientes de IL-18 durante 24 horas o sin tratamiento. Los datos de ELISA son representativos de un mínimo de 3 experimentos separados realizados por triplicado.

**Figura 7:** (a) Western Blot de expresión de NLRP3 en células ARPE-19 (lado izquierdo) y células THP1 (lado derecho), se cargaron cantidades iguales de proteína según lo determinado por el ensayo BCA. (b) las células ARPE-19 se prepararon con varios ligandos TLR; 100 ng/ml LPS o 2  $\mu\text{g/ml}$  Pam3Cys, o 25  $\mu\text{g/ml}$  Poly(I:C), o 1  $\mu\text{g/ml}$  R848 o 5  $\mu\text{g/ml}$  CpG-ODN y se dejó sin tratar o se activó con ATP durante una hora más. A continuación, se midió la producción de IL-1 $\beta$ .

**Figura 8:** a) Se observó un caldo de EPR bajo un microscopio óptico para contener material de la retina/EPR producido tras el aislamiento de drusas. b) Este material (100 ng/ml, 250 ng/ml y 500 ng/ml) se añadió a los MCSP preparados con LPS, pero no causó ningún aumento en los niveles de IL-1 $\beta$ , o c) los niveles de IL-18. d) La expresión de IL-6 no cambió con dosis crecientes de caldo de EPR. e) El caldo de EPR no produjo cambios en los niveles de IL-1 $\beta$  en CDMO de ratón WT o *Nlrp3*<sup>-/-</sup>. f) No hubo cambios diferenciales en la expresión de IL-6 entre los grupos experimentales.

**Figura 9:** Análisis densitométrico de Western Blot de Caspasa-1 P10 después del tratamiento de células THP1 con drusas.

**Figura 10:** a) Los niveles de IL-1 $\beta$  aumentaron significativamente en MDMO WT preparado con LPS y *Tlr2*<sup>-/-</sup> activado por ATP b) Los niveles de IL-6 no fueron significativamente diferentes.

**Figura 11:** Análisis densitométrico de Western Blot de Caspasa-1 P10 después del tratamiento de células THP1 con dosis crecientes de C1Q.

**Figura 12:** La medición del potencial Zeta de C1Q en solución muestra un zeta promedio de 11,8 mV.

**Figura 13:** Producción de IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-6 en MCSP humano preparado con 100ng/ml LPS durante la noche y activado con 5  $\mu\text{g/ml}$  C1Q durante 6 h, con la adición, 1 h antes del tratamiento con C1Q, de dosis crecientes (10

veces) de (a) DPI (inhibidor de ERO), (b) Bafilomicina (inhibe la acidificación lisosómica), (c) CA-074 Me (inhibidor de catepsina B).

**Figura 14:** La tinción con CD68 (rojo) en una retina de ratón inmunizado con CEP-MSA, mostró células positivas en la esclerótica y segmentos externos (SE) de la retina.

5 **Figura 15:** Las criosecciones de la retina de ratón inmunizadas con CEP-MSA se tiñeron para NLRP3 y se observó inmunorreactividad positiva en (a) segmentos externos de la retina, (b) epitelio del pigmento de la retina (EPR), (c) células dentro de la esclerótica y (d) células dentro de la coroides.

**Figura 16:** F4/80 (panel izquierdo, rojo) y caspasa-1 p10 (panel central, verde) co-localizados en el sitio de NVC inducida por láser en ratones WT (panel derecho)

10 **Figura 17:** Se observó IL-18 en el sitio de lesión inducida por láser en ratones WT 24 h después de la lesión (tinción en rojo del panel izquierdo). Esta tinción no fue evidente en el sitio de la lesión en ratones *Nlrp3<sup>-/-</sup>* (tinción en rojo, panel derecho).

15 **Figura 18** (a) El anticuerpo neutralizador IL-18 (1 µg) inyectado después de la NVC inducida por láser aumentó significativamente el tamaño de la NVC en ratones WT medido por microscopía epifluorescente, (b) imagen representada 3-D de pilas Z confocales de NVC. (c) Se observaron NVC significativamente aumentados en ratones WT inyectados con 1 µg de anticuerpo neutralizante IL-18 después de la lesión por láser en comparación con ratones inyectados simulados (\*P = 0,0368).

**Figura 19** Análisis de citometría de flujo de (a) CDMO y (b) MDMO teñidos para CD11c y CD11b.

20 **Figura 20** (a) El EPR se encuentra adyacente a los segmentos externos de los fotorreceptores. (b) Una disrupción térmica específica del complejo retina/EPR/membrana de Bruch/coroides complejo con un láser de 532 nm que causa una lesión de 50 µm de diámetro, Griffonia simplicifolia isolectin-Alexa-568 (rojo) y Phalloidin-Alexa-488 (Verde).

## **EJEMPLOS**

25

### **Materiales y Procedimientos**

#### **Aislamiento de Drusas**

30 **[0061]**Drusas y pequeñas cantidades de membrana de Bruch se aislaron como se describió previamente (8) de seis ojos de donantes con DMAE (88M, 91F, 97M, 85F, 85M y 80M) para usar en estos experimentos.

#### **Producción de CEP-Albúmina**

35 Albúmina de Suero Humano (Sigma Aldrich, EE. UU.) se adujo con CEP como se describió previamente (54).

#### **Análisis por ELISA**

40 ELISA fue utilizado para cuantificar las citocinas en los sobrenadantes de los diversos grupos experimentales utilizados a lo largo de este estudio. Se analizaron IL-1β (RnD Systems), IL-18 (MBL International), IL-6 (RnD Systems), TNF-α (RnD Systems) y FCEV (RnD Systems). Todos los ELISA se realizaron por lo menos 3 veces por triplicado. Los inhibidores utilizados durante este estudio se agregaron a las siguientes concentraciones más altas 1 h antes de la activación del inflamasoma: 1 µg/ml del inhibidor de caspasa-1 VI (Calbiochem), citocalasina D 5 µM (Sigma Aldrich, Irlanda), CA-074 Me 10 µM (inhibidor de catepsina B) (Sigma Aldrich, Irlanda), DPI 10 µM (Sigma Aldrich, Irlanda).

45

#### **Análisis por Western Blot**

50 En general, los anticuerpos específicos para caspasa-1 (Santa-Cruz Biotech), beta-actina (Abcam), NLRP3 (Sigma Aldrich, Irlanda), TLR-4 (Santa-Cruz Biotech) se incubaron en membranas durante la noche a 4°C. Las membranas se lavaron con TBS y se incubaron con un anticuerpo secundario contra conejo (IgG) con conjugados de Peroxidasa de Rábano de Caballo (HRP) (1:2500) (Sigma-Aldrich, Irlanda) o ratón (IgG) (1:1000), (Sigma-Aldrich, Irlanda), durante 3 horas a temperatura ambiente. Los complejos inmunes se detectaron usando quimioluminiscencia mejorada (ECL). Todos los Western Blots se repitieron un mínimo de 3 veces.

#### **55 Cultivo celular**

60 La línea celular ARPE-19 (ATCC CRL 2302) se obtuvo a partir de LGC promochem, las células THP1 y los monocitos mononucleares de sangre periférica (MCSP) humanos aislados primarios se usaron para los ensayos de activación del inflamasoma *in vitro*. Las células se cultivaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% de aire en una mezcla 1:1 de medio de Eagle modificado de Dulbecco (MEMD) y medio F12 de Ham con 1,2g/L bicarbonato de sodio, L-glutamina 2,5 mM, HEPES

15 mM, piruvato sódico 0,5 mM (Sigma Aldrich) con suero fetal de ternera al 10% (SFT). Los CDMO y MDMO también se aislaron de ratones WT, *NLRP3*<sup>-/-</sup>, *TLR2*<sup>-/-</sup>, C3H/HeN y C3H/HeJ en un antecedente C57/Bl6 congénito. Los CDMO y MDMO se tiñeron con anti-CD11c-APC y anti-CD11b-PeCy7. Las células se regularon en células individuales vivas y la expresión de CD11c y CD11b se evaluó mediante citometría de flujo (**Fig. 19**). Se cultivaron células endoteliales microvasculares bEnd.3 de ratón en matraces de cultivo de tejidos recubiertos con fibronectina (Sigma Aldrich Ireland) en MEMD que contenía Glutamax y SFT al 10 %.

#### **Análisis de formación de manchas ASC.**

10 Los MDMO inmortalizados (Regalo del Dr. Eicke Latz, Universidad de Bonn) que expresan ASC marcado con proteína fluorescente amarilla (YFP) fueron preparados con LPS, HSA o CEP-HSA, a continuación, activados con drusas o C1Q durante 3 o 6 horas respectivamente. Imágenes de células vivas de la formación de la mancha se tomaron usando microscopía de escaneo láser confocal regulada por temperatura y CO<sub>2</sub> (Olympus FluoView TM FV1000).

#### **15 Inmunización CEP-MSA**

Utilizamos protocolos estándar de inmunización de ratones (55). Anestesiábamos ratones con ketamina-xilazina en PBS (80-90 mg/kg ketamina, 2-10 mg/ml xilazina). Utilizamos 200 µg de CEP-MSA en CFA o IFA (Difco Labs) para las dosis iniciales y todas las dosis de refuerzo como se describió anteriormente (18).

20

#### **Modelos murinos de neovascularización coroidea (NVC).**

Todos los experimentos con animales realizados durante el curso de este trabajo se adhirieron a los estándares de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO) y todas las aprobaciones nacionales e institucionales relevantes se obtuvieron antes del comienzo del trabajo. La NVC, en la que el lecho vascular prolifera en la retina, imitando la DMAE neovascular, se indujo en ratones usando un láser verde Iris Iridex de 532 nm (532 nm, 140 mW, 100 mSec, tamaño de punto de 50 µm, 3 puntos por ojo) que incorpora un sistema de administración microscópico como se describió anteriormente (21). Esta técnica se utilizó para inducir la NVC en ratones *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, *Il1r1*<sup>-/-</sup>, *IL-18*<sup>-/-</sup> y WT, y en cada ensayo experimental los animales fueron emparejados por género. En tándem, también inyectamos directamente, intravitrealmente después de la quemadura con láser, neutralizando anticuerpos dirigidos contra IL18 (Abcam). Los ratones se sacrificaron 6 días después del experimento y se retiró la retina neural. A continuación, se incubaron las copas oculares con una molécula de Griffonia-simplicifolia-isolectina-Aleax-568 (Molecular Probes) (1:300) durante la noche a 4°C y las NVC evaluadas por microscopía confocal (**Fig. 20a,b**).

#### **35 Inmunotinción indirecta de montajes planos de la retina y criosecciones de la retina**

Se utilizó inmunotinción indirecta para analizar los macrófagos activados y la caspasa-1 escindida, presente en la retina neural en los modelos animales de DMAE. Se utilizaron anticuerpos contra F4/80, CD68 (Abcam) para macrófagos activados y caspasa-1 (P10) (Santa Cruz Biotech), NLRP3 (Santa Cruz Biotech y Abcam) e IL18 (Abcam) junto con microscopía de escaneo láser confocal (Olympus FluoView TM FV1000).

#### **Análisis Estadísticos:**

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba T de Student, con significación representada por un valor P de ≤0,05 cuando se analizaron 2 grupos experimentales individuales. Para comparaciones múltiples, como fue el caso en los análisis ELISA, se utilizó ANOVA con una post-prueba de Tukey-Kramer y la significación se representó con un valor P de ≤0,05.

#### **Resultados**

50

El EPR es una monocapa de células cuboidales ubicadas entre la retina externa y la coroides. Este neuroepitelio melanizado tiene numerosas funciones que incluyen a) la adsorción de luz dispersa y reflejada, b) la formación de la barrera sangre externa-retina (oBRB) y c) la eliminación por fagocitosis de las puntas decadentes de los segmentos externos del fotorreceptor (22). El análisis proteómico e inmunohistoquímico de drusas ha identificado prácticamente todas las proteínas involucradas en la cascada del complemento, proteínas que se encuentran en depósitos amiloides, así como una cantidad de cristalinas, proteínas sintetizadas en respuesta al estrés (23, 24). Teniendo en cuenta el reciente descubrimiento de que la materia particulada derivada del huésped, como los cristales de colesterol y los depósitos de amiloide (25, 26) pueden activar el inflammasoma NLRP3, nos interesó determinar si las drusas también podrían iniciar la activación del inflammasoma.

60

### Drusas activan el inflammasoma NLRP3

Fotografía de fondo de ojo de un ojo no afectado en comparación con los de individuos con DMAE seca o húmeda (**Fig. 1a**). Los depósitos ligeros punteados en las imágenes de fondo de ojo representan acumulación de drusas tanto en la DMAE seca como en la húmeda, con NVC de la subretina aparente en la fotografía de la DMAE húmeda. Las drusas aisladas se sonicaron para disociar la muestra en pequeñas partículas (**Fig. 1b**). El análisis SDS-PAGE de la muestra de drusas mostró una cohorte de proteínas de alto peso molecular superiores a 60 kDa (**Fig. 1c**). El inflammasoma es un complejo proteico multimérico. La caspasa-1 es la cisteína proteasa activada en el complejo de inflammasoma para escindir pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18 en sus formas maduras. La activación de caspasa-1 requiere la proteína ASC que forma oligómeros creando una plataforma para el complejo multimérico. Normalmente, el ASC se distribuye uniformemente por toda la célula, pero una vez activado, el ASC se agrega a un solo punto, conocido como "mancha". Los MDMO que expresan de forma estable un ASC marcado con proteína fluorescente amarilla (YFP-ASC) se prepararon con LPS y se trataron con drusas o se transfectaron con Poly(dAdT) (control positivo). ASC-YFP es difícil de discernir en los macrófagos tratados con LPS solo (**Fig. 1d, paneles izquierdos**), sin embargo, en los macrófagos preparados con LPS activados con drusas, la formación de manchas fluorescentes individuales intensas es claramente evidente, indicativas de oligomerización de ASC.

Se cree que la respuesta inflamatoria asociada con DMAE tiene un componente local y sistémico. Inicialmente probamos la línea celular ARPE-19 para detectar la presencia de NLRP3 y su capacidad para producir IL-1 $\beta$  en respuesta a un intervalo de ligandos TLR y activación con ATP. Descubrimos que mientras las células ARPE-19 expresan NLRP3, los niveles de IL-1 $\beta$  estaban en el límite inferior de la sensibilidad del ensayo (**Fig. 7**). Las células mieloides periféricas son la fuente principal de IL-1 $\beta$  e IL-18, con su capacidad de acceder a la retina en la DMAE, planteamos la hipótesis de que estas células serían células clave de interés en nuestro sistema. Las células mononucleares de sangre periférica humana (MCSP) produjeron IL-1 $\beta$  e IL-18 en respuesta a la activación con drusas incluso a concentraciones muy bajas (**Fig. 1e,f**). Usamos material EPR que se produjo durante la disección de drusas de los ojos con DMAE como control para estos experimentos (**Fig. 8**). El análisis de inmunotransferencia de la expresión de caspasa-1 en lisados de células THP-1 post-tratamiento con drusas confirmó niveles aumentados de caspasa-1 p10 escindida (**Fig. 1g y Fig. 9**). Juntos, estos resultados demuestran que las drusas de los ojos de donantes con DMAE pueden activar la caspasa-1 y el complejo de inflammasoma ASC, lo que a su vez da como resultado la producción de IL-1 $\beta$  e IL-18 en los MCSP.

Razonamos que NLRP3 era el sensor probable para la activación del inflammasoma inducida por drusas, ya que se requiere para la activación del inflammasoma por partículas. Aislamos médula ósea de ratones tanto de tipo natural (WT) como deficiente en NLRP3 (*Nlrp3*<sup>-/-</sup>) y macrófagos y células dendríticas derivadas de médula ósea cultivadas (MDMO y CDMO). Tanto MDMO como CDMO WT produjeron niveles significativos de IL-1 $\beta$  en respuesta a drusas, por el contrario, BMDM y BMDC *Nlrp3*<sup>-/-</sup> (**Fig. 1h, i, paneles izquierdos**) no pudieron promover la producción de IL-1 $\beta$  madura en respuesta a drusas. Los niveles de IL-6 y TNF $\alpha$  no fueron alterados por la presencia de drusas, lo que indica un efecto específico sobre la producción de IL-1 $\beta$  (**Fig. 1h, i paneles de la derecha**). Estos resultados demuestran que las drusas en la DMAE son capaces de activar el inflammasoma NLRP3.

### La albúmina de suero humano aducida por CEP prepara el inflammasoma NLRP3

Hasta el 65% de las proteínas que se han identificado en drusas se encontraron en drusas aisladas tanto de donantes con DMAE como de donantes normales. Sin embargo, también se han observado modificaciones oxidativas de la proteína en drusas, incluidos los aductos de la proteína carboxietil pirrol. El daño oxidativo acumulativo contribuye al envejecimiento y desde hace tiempo se sospecha que contribuye a la patogénesis de la DMAE (27, 28, 29). Los aductos de carboxietil pirrol (CEP) se generan de manera única a partir de la oxidación de lípidos que contienen docosahexaenoato (DHA) y son significativamente más abundantes en drusas y en suero de sujetos con DMAE (19). Recientemente, se ha demostrado que los carboxialquilpirroles, entre ellos el CEP, son reconocidos por el receptor tipo Toll 2 (TLR2) en las células endoteliales (30). Dado que la activación de TLR2 prepararía las células para inducir pro-IL-1 $\beta$ , pro-IL-18 y NLRP3, planteamos la hipótesis de que las proteínas aducidas por CEP en drusas y en la membrana de Bruch podrían presentar un nuevo agente de preparación.

Para probar esto, preparamos MCSP con concentraciones crecientes de HSA aducida por CEP o HSA sola y activamos las células con ATP. Los niveles de IL-1 $\beta$  aumentaron con el aumento de las concentraciones de CEP-HSA, pero no se observaron cambios en las células preparadas con HSA solo (**Fig. 1a**). Los MDMO WT preparados con CEP-HSA y activados con ATP también produjeron IL-1 $\beta$ , un efecto no observado en ratones *Nlrp3*<sup>-/-</sup> (**Fig. 2b**). Para determinar si CEP-HSA estaba preparando las células a través de la activación de TLR2, preparamos MDMO WT y *TLR2*<sup>-/-</sup> con HSA o CEP-HSA y activados con ATP. La activación de ATP indujo aumentos de IL-1 $\beta$  en MDMO WT pero no en *TLR2*<sup>-/-</sup> preparados con CEP-HSA. Además, no se observó inducción de IL-1 $\beta$  en MDMO preparados con

HSA antes de la activación, confirmando nuevamente que es la modificación de CEP la que infiere la capacidad de activar TLR2 (**Fig. 2c**). Los niveles de IL-6 son equivalentes entre las células WT tratadas con CEP-HSA, confirmando la especificidad de la respuesta para IL-1 $\beta$  (**Fig. 2d**). Los niveles de IL-1 $\beta$  se midieron en MDMO preparado con LPS WT y *TLR2*<sup>-/-</sup> activados por ATP para garantizar que MDMO *TLR2*<sup>-/-</sup> respondían de manera óptima (**Fig. 10**). Para garantizar que nuestro CEP-HSA no estuviera contaminado con LPS, aislamos MDMO de ratones C3H/HeN y C3H/HeJ. Los ratones C3H/HeJ portan una mutación en su gen *Tlr4* que los hace insensibles a LPS (31). Los MDMO C3H/HeJ producían IL-1 $\beta$  en respuesta a ATP cuando se preparaban con CEP-HSA pero no con LPS (**Fig. 2e**), lo que indica que nuestro aducto de CEP no tiene LPS y prepara el inflammasoma mediante ligadura TLR2. TNF- $\alpha$  se detectó en MDMO C3H/HeN preparado con LPS WT pero no células preparadas con CEP (**Fig. 2f**). Examinamos además la capacidad de CEP para preparar el inflammasoma NLRP3 midiendo la formación de mancha ASC-YFP en MDMO tratados con CEP. Se observaron manchas de ASC-YFP enfocadas en MDMO preparados con CEP-HSA y activados con drusas (**Fig. 2g, panel superior**). Drusas solo podrían ser capaces de causar la oligomerización de ASC (**Fig. 2g, panel inferior**), lo que implica que solo drusas podrían iniciar la formación de la plataforma de multi-proteínas para la activación del inflammasoma. Sin embargo, no pudimos detectar consistentemente aumentos de IL-1 $\beta$  cuando MCSP o MDMO/BMDC fueron tratados con drusas solas y analizados por ELISA.

### El factor del complemento del componente drusas C1Q, activa el inflammasoma

Aunque las drusas pueden distorsionar y eventualmente dañar la retina como en GA (29), no todas las personas que se presentan con drusas desarrollan pérdida de visión, por lo tanto, es concebible que, además de la naturaleza particulada de las drusas, cause un daño mecánico al EPR, algunos componentes de drusas pueden estar involucradas en la activación del inflammasoma de una manera más específica. Elegimos estudiar C1Q, el componente iniciador primario de la vía clásica del complemento, que se ha identificado en drusas (32). Dado que C1Q es un efector del sistema inmune innato con el potencial de ser extremadamente dañino para el tejido del huésped, su presencia en drusas es indicativo de un ataque inflamatorio anterior o continuo. Evaluamos directamente la capacidad de C1Q para activar el inflammasoma NLRP3. La adición de C1Q solo a MDMO no causó la producción de IL-1 $\beta$ , sin embargo, las células que fueron preparadas con CEP-HSA antes de la adición de C1Q produjeron niveles significativos de IL-1 $\beta$  (**Fig. 3a, panel izquierdo**). La secreción de la citocina proinflamatoria TNF $\alpha$  se mantuvo sin cambios tras la adición de C1Q a los MDMO preparados con CEP-HSA (**Fig. 3a, panel derecho**), lo que indica que C1Q está activando específicamente el inflammasoma y no está involucrado en la regulación al alza de citoquinas proinflamatorias en general. Observamos caspasa-1 p10 escindida en células monocíticas humanas THP1 activadas con C1Q (**Fig. 3b, Fig. 11**) y establecimos además que C1Q podría causar oligomerización de ASC ya que las manchas de YFP-ASC pueden verse en puntos focales concentrados dentro de las células activadas con C1Q después de la preparación con LPS (**Fig. 3c, panel superior derecho**) o con CEP (**Fig. 3c, panel inferior derecho**).

Los MDMO WT tratados con C1Q produjeron un nivel significativo de IL-1 $\beta$ , sin embargo, MDMO *Nlrp3*<sup>-/-</sup> no lograron producir IL-1 $\beta$  en respuesta a la activación de C1Q (**Fig. 3d, izquierda**), los niveles de TNF $\alpha$  se mantuvieron sin cambios (**Fig. 3d, derecha**). Para confirmar el papel de la caspasa-1, agregamos un inhibidor de la caspasa-1, ZVAD, a MCSP humanos antes de la activación de C1Q. La inhibición de la caspasa-1 disminuyó la producción de IL-1 $\beta$  e IL-18 de una manera dependiente de la dosis (**Fig. 3e**). Juntos, estos resultados muestran que C1Q puede actuar como una señal de peligro detectada por el inflammasoma NLRP3. Todo el C1Q aislado de la sangre humana y el C1Q encontrado en drusas tienen una propensión a agregarse y hemos demostrado esto después del análisis de potencial zeta de una solución de C1Q, creemos que este es un factor clave en cómo C1Q puede activar el inflammasoma NLRP3 (**Fig. 12**).

### La activación del inflammasoma C1Q involucra al fagolisosoma

Se ha demostrado que los depósitos de C1Q junto con otros factores del complemento están asociados o son componentes de las estructuras amiloides (33, 34). Por lo tanto, es probable que C1Q como componente de drusas resulte en su agregación y ayude a los macrófagos a medida que intentan fagocitar estos depósitos de partículas. Los mecanismos que conducen a la activación del inflammasoma NLRP3 todavía son tema de debate y pueden depender del estímulo. Un mecanismo implica la fagocitosis de estructuras particuladas que conducen a la ruptura lisosómica y la liberación de contenido lisosómico (35). Otro mecanismo propuesto implica la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) que conducen a la activación del inflammasoma NLRP3 a través de la proteína TXNIP sensible a ERO (36). Para determinar si la inducción de ERO de C1Q (37,38) fue responsable de la activación del inflammasoma, tratamos MCSP con el inhibidor de la NADPH oxidasa DPI antes de la activación de C1Q. La inhibición de ERO por DPI no tuvo efecto sobre la liberación de IL-1 $\beta$  inducida por C1Q (**Fig. 13a**). El mecanismo alternativo propuesto es que la inestabilidad lisosómica conduce a la fuga de la exopeptidasa lisosómica, la cathepsina B, hacia el citosol, que es detectado por los componentes del inflammasoma que conduce a su montaje (35). Para determinar el papel del fagolisosoma en la activación del inflammasoma por C1Q, utilizamos bafilomicina A, un inhibidor que bloquea el Sistema

H<sup>+</sup> ATPasa vacuolar necesario para la acidificación lisosómica y el inhibidor de la cathepsina B CA-074 Me. Inhibición de cualquiera H<sup>+</sup> ATPasa vacuolar o cathepsina B restringieron la producción activada por C1Q de IL-1β e IL-18 sin ningún efecto sobre la producción de IL-6 (**Fig. 13b, c**). Esto implica directamente que C1Q altera el proceso fagolisosómico para desencadenar la activación de NLRP3.

5

### **El inflammasoma NLRP3 es activo en ratones inmunizados con CEP-MSA**

Intentamos determinar si el inflammasoma estaba involucrado en la patología de un modelo bien caracterizado de DMAE seca, el modelo de ratón inmunizado con CEP-MSA. Este animal desarrolla lesiones similares a DMAE en su retina y EPR después de la inmunización con CEP-MSA. Analizamos secciones de la retina de ratones inmunizados con CEP-MSA, para detectar la presencia de macrófagos activados (F4/80 y tinción con CD68), caspasa-1 p10 y NLRP3. Se observó que los macrófagos activados estaban presentes dentro de la coroides y la membrana de Bruch (**Fig. 4a,b, Fig. 14**). También observamos macrófagos infiltrantes por encima del EPR en los segmentos externos de la retina (**Fig. 4c**). La tinción de estas secciones mostró co-localización de F4/80 con caspasa-1 p10 escindida (**Fig. 4d,e**) y NLRP3 (**Fig. 4f,g, Fig. 15**).

15

### **NLRP3 protege contra el desarrollo exacerbado de NVC inducido por láser**

Un modelo muy utilizado para la DMAE húmeda (exudativa) es la NVC inducida por láser, que también es un modelo ideal para la inflamación estéril (39), probablemente debido a la inducción de un microambiente necrótico dentro del tejido. Se sabe que las células necróticas provocan una respuesta inflamatoria estéril a través del inflammasoma NLRP3 (17). Presumimos que el inflammasoma NLRP3 puede desempeñar un papel clave en el desarrollo de NVC en respuesta a la lesión tisular localizada. Para probar nuestra hipótesis, administramos quemaduras por láser focal a las retinas de ratones WT, *Nlrp3*<sup>-/-</sup> y *Il1r1*<sup>-/-</sup> y evaluamos los volúmenes de NVC. Sorprendentemente, encontramos significativamente más desarrollo de NVC y hemorragia de la subretina en ratones *Nlrp3*<sup>-/-</sup> en comparación con ratones WT e *Il1r1*<sup>-/-</sup> (**Fig. 5a**). La representación del volumen confocal de pilas Z en 3D de NVC confirmó un aumento significativo en el volumen de NVC en ratones *Nlrp3*<sup>-/-</sup> 6 días después de la lesión (**Fig. 5d, histograma**). El análisis electroretinográfico (ERG) confirmó que ambos ratones knockout tienen respuestas funcionales de conos y bastones de antes de la lesión (**Fig. 5b**). Observamos infiltración activada de macrófagos (inmunoreactividad F4/80 positiva) en el sitio de la lesión en ratones *Nlrp3*<sup>-/-</sup> (**Fig. 5c**), sin embargo, la caspasa-1 e IL-18 escindidos solo fueron evidentes en el sitio de la lesión de los ratones WT y estuvieron notablemente ausentes en los ratones *Nlrp3*<sup>-/-</sup> (**Fig. 5d, Fig. 16, 17**). Estos resultados describen un papel para el inflammasoma NLRP3 en la respuesta inflamatoria estéril observada en este modelo animal de NVC y apuntan hacia IL-18 como un regulador del desarrollo de la NVC.

20

25

30

### **NLRP3 confiere protección contra la formación de lesiones de NVC a través de IL-18**

Para confirmar el papel de IL-18 en la protección mediada por NLRP3 contra el desarrollo exacerbado de NVC, administramos NVC inducidos por láser en ratones *IL18*<sup>-/-</sup>. Se observó que estos ratones tenían una función normal de la retina (**Fig. 6a**) según lo evaluado por análisis ERG. Disrupción inducida por láser de la membrana de Bruch y cuantificación del volumen de NVC en ratones *IL18*<sup>-/-</sup> 6 días después de la lesión mostraron lesiones marcadamente aumentadas (**Fig. 6b**) en comparación con las NVC WT (**Fig. 6c**). Los anticuerpos neutralizantes de IL-18 inyectados por vía intravítrea posteriores a la NVC inducida por láser también produjeron un aumento significativo del desarrollo de NVC (**Fig. 18**).

40

45

50

### **Conclusión**

Nuestros estudios han demostrado que drusas aisladas de ojos de donantes de DMAE pueden activar el inflammasoma NLRP3. Además, mostramos que el carboxietil-pirrol (CEP), una modificación proteica asociada con el estrés oxidativo que comúnmente se encuentra decorando proteínas drusas, puede preparar el inflammasoma. En conjunto, mostramos que el componente del complemento C1Q puede activar el inflammasoma NLRP3 de una manera dependiente de caspasa-1 y fagolisosoma. Observamos caspasa-1 activada y NLRP3 en macrófagos que rodean las lesiones similares a drusas asociadas con ratones inmunizados con CEP-MSA, un modelo aceptado de DMAE seca. También encontramos que un modelo animal comúnmente usado de DMAE húmeda, depende de la activación de NLRP3, pero

55

60

inesperadamente en ausencia de NLRP3, el desarrollo de NVC se exacerbó. Implicamos a IL-18 como un regulador clave de la neovascularización patológica y sugerimos un papel protector para el inflammasoma NLRP3 en el desarrollo de la DMAE.

- 5 Nuestras observaciones tienen implicaciones importantes con respecto a la prevención de la DMAE. Las terapias actuales basadas en anticuerpos se dirigen a formas avanzadas de la DMAE al inhibir la bioactividad del FCEV. Sin embargo, la inyección intraocular directa y regular de estos anticuerpos monoclonales (Lucentis® y Avastin®) conlleva el riesgo de desprendimiento, hemorragia e infección de la retina.
- 10 Hemos demostrado que drusas aisladas de ojos de donantes de DMAE pueden activar el inflammasoma NLRP3. Drusas de DMAE se componen de una colección de depósitos de proteínas, muchos de los cuales se aducen en CEP. Debido a su naturaleza particulada, es posible que las drusas de los ojos de los donantes normales también puedan inducir la activación del inflammasoma, sin embargo, sus niveles en la retina, por definición, son más bajos que los de las drusas en la DMAE y las composiciones bioquímicas son diferentes. Estas diferencias son probablemente importantes para
- 15 la progresión de la DMAE. Sin embargo, aún no se ha dilucidado por completo una comparación de control y de drusas de la DMAE en relación con la activación del inflammasoma.

Hemos demostrado que CEP-HSA puede preparar el inflammasoma a través de la activación de TLR2, proporcionándonos un agente de preparación natural que se acumula en los puntos focales a niveles altos dentro del

20 ojo con DMAE. En el caso de NLRP3, la señal de peligro suele ser de naturaleza particulada y extracelular. Se ha demostrado que C1Q, un componente de drusas, se agrega de forma amiloide. Mostramos que C1Q, aislado de la sangre humana, activa el inflammasoma NLRP3 de una manera dependiente de la acidificación lisosómica y la catepsina B.

- 25 La respuesta inflamatoria estéril que ocurre en la DMAE es probablemente el resultado de la necrosis focal que ocurre en las células del EPR sub-adyacentes a la acumulación excesiva de drusas. La acumulación de drusas en la membrana de Bruch es una característica distintiva e indicador de diagnóstico del desarrollo temprano de DMAE y se cree que es fundamental para la patología de la enfermedad. Si bien hemos observado la activación del inflammasoma en macrófagos asociados con lesiones similares a DMAE en ratones inmunizados con CEP-MSA, nuestras
- 30 observaciones por primera vez indican directamente un papel protector para los procesos inflamatorios en la progresión a NVC, la forma exudativa de DMAE, y se oponen directamente al dogma actual dirigido a la supresión de procesos inflamatorios en la prevención de enfermedades. De hecho, ahora se acepta que cierto nivel de inflamación, "parainflamación", puede ser beneficioso para el huésped. Desde una perspectiva clínica, si bien los procesos inflamatorios se han asociado durante mucho tiempo con la patología y el desarrollo de la enfermedad DMAE,
- 35 sugerimos que la inhibición global de la inflamación en la retina en el caso de DMAE húmeda no sería una buena terapia. Prestando fuerza a nuestras observaciones, los resultados de ensayos clínicos recientes de Infiximab (Remicade®) en individuos con DMAE húmeda mostraron que en más del 50 % de estos sujetos, los síntomas se exacerbaban enormemente.
- 40 También se ha demostrado recientemente que el inflammasoma NLRP3 confiere protección, a través de la producción de IL-18, contra la colitis experimental y el cáncer colorrectal en ratones.

Estudios previos indican que IL-18 juega un papel importante en el desarrollo vascular de la retina. Los ratones *Il-18<sup>-/-</sup>* mostraron angiectasia y fuga vascular, los niveles de FCEV y bFGF también estaban regulados al alza en las retinas

45 de ratón *Il-18<sup>-/-</sup>*. También se han observado funciones antiangiogénicas para IL-18 en la lesión post-isquémica y en la inhibición de la angiogénesis tumoral.

La activación del inflammasoma NLRP3 por drusas sugiere que puede existir un equilibrio, por lo que se tolera cierto nivel focal de drusas debido a su capacidad para inducir IL-18 que a su vez puede actuar como un efector

50 antiangiogénico, manteniendo la homeostasis coroidea en un microambiente inflamatorio. Es probable que una vez que se acumula un nivel crítico de drusas, su papel protector es negado por el daño excesivo a los tejidos circundantes. Es importante destacar que hemos demostrado que los mediadores inflamatorios inducibles por drusas son protectores contra el desarrollo de NVC y que es la elevación resultante de IL-18 mediada por NLRP3 lo que impide la producción aguas abajo de FCEV. Además, se ha demostrado que IL-18 no juega un papel en el desarrollo de la uveítis

55 experimental, un modelo más convencional de inflamación, un resultado que tiene implicaciones directas para las formas futuras de terapia derivadas de nuestros resultados. En general, nuestras observaciones implican directamente a NLRP3 como agente protector contra la principal patología de la enfermedad DMAE y sugieren que las estrategias destinadas a producir o administrar IL-18 al ojo pueden resultar beneficiosas para prevenir la progresión de la NVC en el contexto de la DMAE húmeda.

60

## Procedimientos Suplementarios

### Evaluación Clínica

- 5 Los sujetos con DMAE y los individuos no afectados fueron evaluados por un oftalmólogo clínico luego del consentimiento informado. La agudeza visual a distancia mejor corregida se midió usando una tabla de Snellen. La visión de cerca se evaluó utilizando el tipo de prueba estándar. El segmento anterior del ojo se examinó mediante biomicroscopía con lámpara de hendidura. La presión intraocular se midió por Tonometría de Goldmann. El examen detallado del fondo de ojo y la fotografía del fondo de ojo en colores se llevaron a cabo después de la dilatación pupilar
- 10 usando tropicamida (1 %). La DMAE seca fue diagnosticada por la presencia de distorsión visual debido a cambios maculares asociados a la DMAE (drusas, hiperpigmentación, hipopigmentación del EPR o atrofia geográfica). La DMAE húmeda se diagnosticó mediante un examen clínico complementado con una fotografía angiográfica con fluoresceína para ilustrar la NVC.

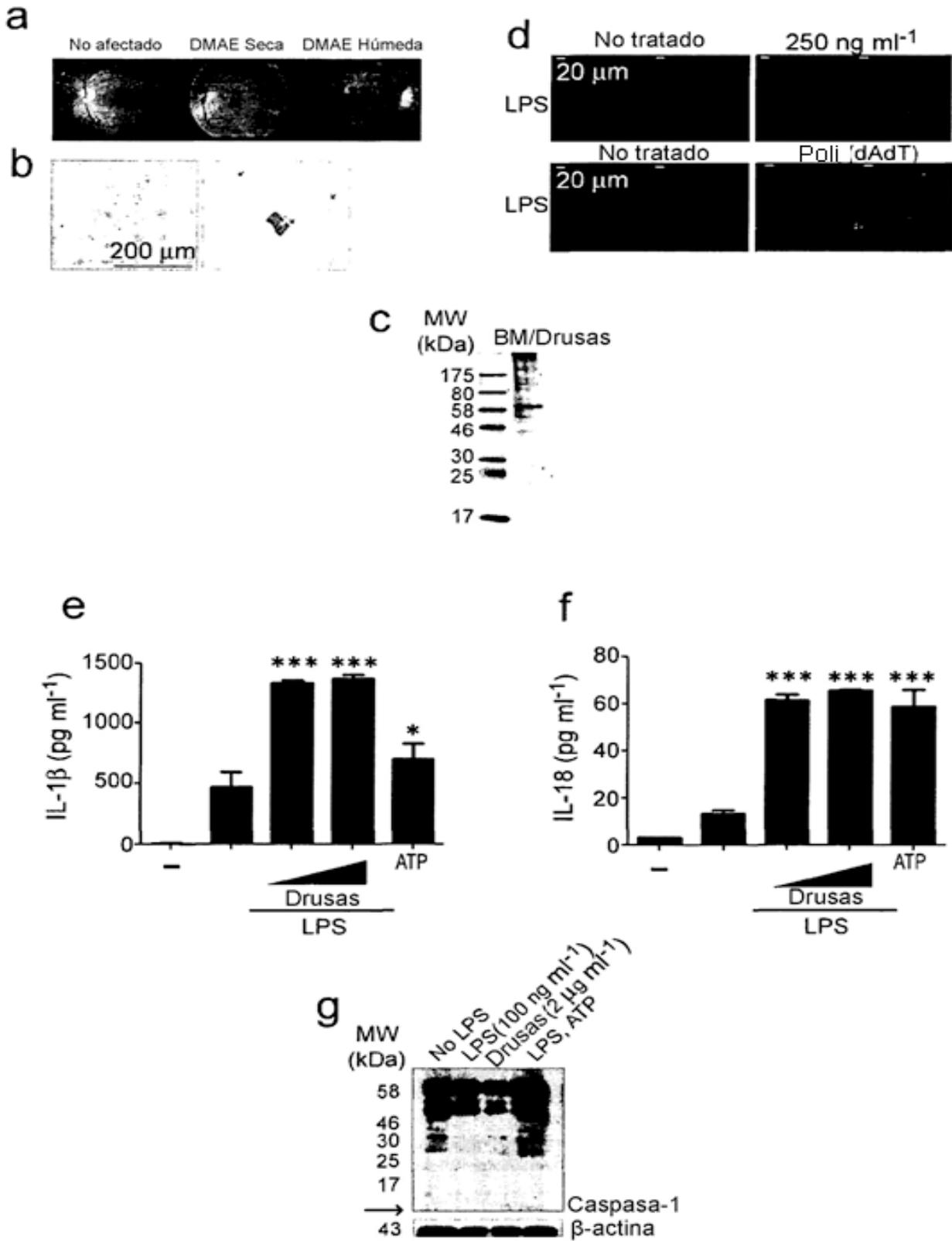
### 15 Análisis ERG de ratones

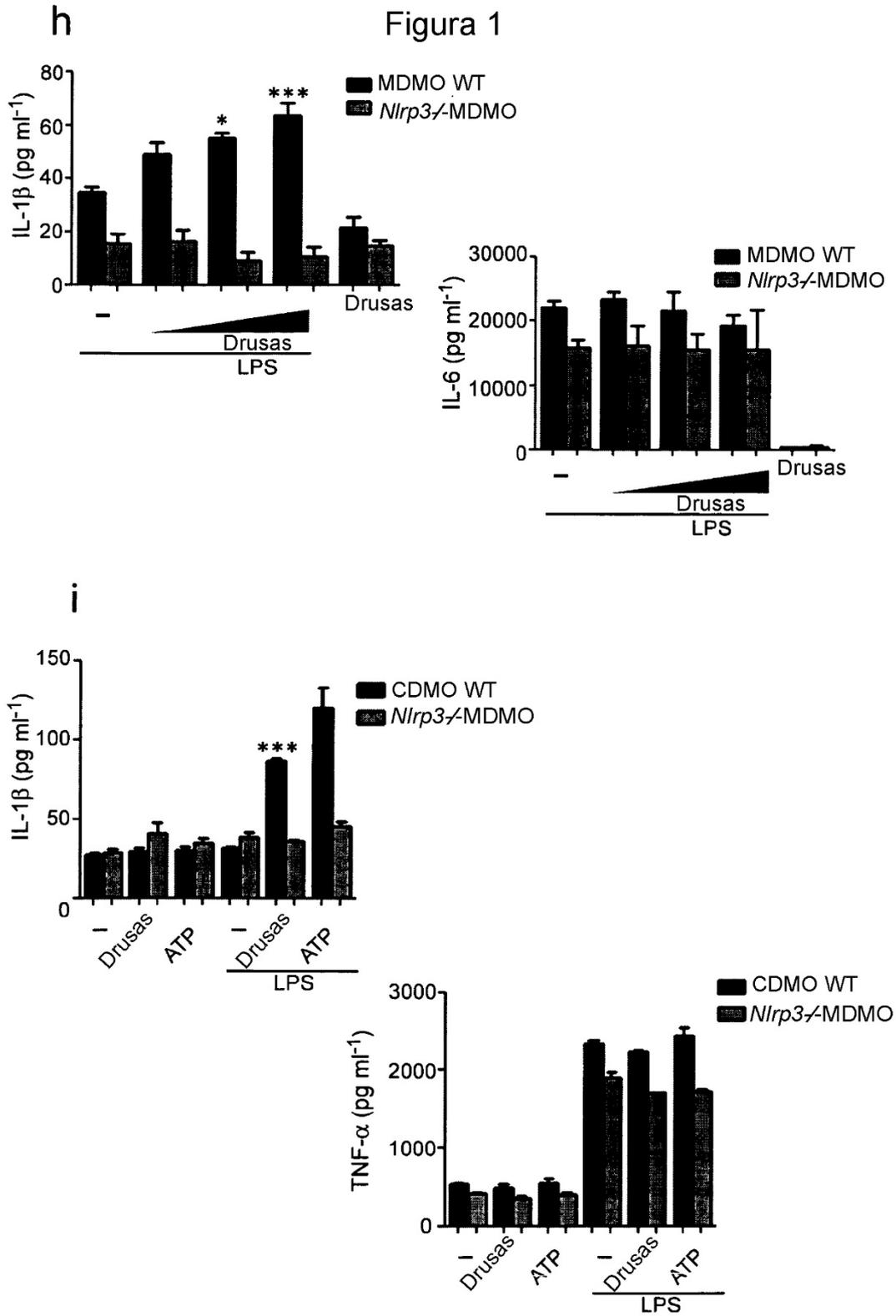
- Los ratones se adaptaron a la oscuridad durante la noche y se prepararon para electroretinografía bajo luz roja tenue. La dilatación pupilar se realizó por instilación de 1 % ciclopentalato y 2,5 % fenilefrina. Los animales se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal (IP) de ketamina (2,08 mg por 15 g de peso corporal) y xilazina (0,21 mg por 15 g
- 20 de peso corporal). Destellos de luz estandarizados se presentaron al ratón en un recipiente Ganzfeld para asegurar una iluminación de la retina uniforme. Las respuestas ERG se registraron simultáneamente en ambos ojos por medio de electrodos de alambre de oro (Roland Consulting GmbH) utilizando Vidisic (Dr Mann Pharma, Alemania) como agente conductor y para mantener la hidratación corneal. Los electrodos de referencia y de tierra se colocaron por vía subcutánea, aproximadamente a 1 mm del canto temporal y anterior a la cola, respectivamente. La temperatura
- 25 corporal se mantuvo a 37°C utilizando un dispositivo de calentamiento controlado por una sonda de temperatura rectal. Las respuestas se analizaron utilizando una unidad de electrofisiología RetiScan RetiPort (Roland Consulting GmbH). El protocolo se basó en el aprobado por el Comité de Normas Clínicas Internacionales para la electroretinografía humana. Las respuestas aisladas en conos se registraron usando un destello blanco de intensidad 3 candelas/m<sup>2</sup> /s presentado contra una luz de fondo supresora de bastones de 30 candelas/m<sup>2</sup> a la que el animal previamente
- 30 adaptado a la oscuridad ha estado expuesto durante 10 minutos antes de la estimulación. Las respuestas a 48 destellos individuales, presentadas a una frecuencia de 0,5 Hz, fueron promediadas por ordenador. Siguiendo la convención estándar, las ondas a se midieron desde la línea base hasta la depresión de la onda a y las ondas b desde la depresión de la onda a al pico de la onda b.
- 35 La invención se describirá ahora mediante el siguiente conjunto de realizaciones. Interleucina-18 (IL-18) para su uso en el tratamiento de afecciones degenerativas de la retina que involucran las drusas y la neovascularización coroidea (NVC) inducida por anafilatoxina, donde la afección degenerativa de la retina es la degeneración macular asociada con la edad (DMAE), incluida la DMAE húmeda y seca.
- 40 IL-18 para uso según cualquiera de las realizaciones anteriores, donde la actividad de IL-18 es IL-18 mantenida y/o estimulada para su uso según la realización precedente, donde el tratamiento implica la administración de IL-18 a la médula ósea o a células o tejidos derivados de médula ósea y/o directamente a células o tejidos oculares. IL-18 para uso según la realización anterior que comprende la administración de IL-18 mediada por virus.

**REIVINDICACIONES**

1. Interleucina-18 (IL-18), preferiblemente IL-18 recombinante (rIL-18), para uso en el tratamiento de la degeneración macular asociada con la edad relacionada con drusas y neovascularización coroidea inducida por anafilatoxina.  
5
2. Interleucina-18 (IL-18) para uso según la reivindicación 1, donde la degeneración macular asociada con la edad es degeneración macular asociada con la edad húmeda.
- 10 3. Interleucina-18 (IL-18) para uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para uso en el control y/o la supresión de la neovascularización coroidea (NVC) en un paciente con riesgo de desarrollar degeneración macular asociada con la edad (DMAE) húmeda.
4. Interleucina-18 (IL-18) para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde IL-18  
15 previene la producción del FCEV y tiene un efecto protector sobre el desarrollo de la neovascularización coroidea (NVC).
5. Interleucina-18 (IL-18) para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la interleucina-18  
20 (IL-18) se administra sistémicamente, preferiblemente por inyección, más preferiblemente por inyección intravenosa, y/o por administración mediada por virus.
6. Interleucina-18 (IL-18) para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la interleucina-18  
25 (IL-18) se administra localmente, preferiblemente mediante inyección intraocular, más preferiblemente mediante inyección subretiniana, intravítrea, retrobulbar, inyección subconjuntival y/o subtenónica.
7. Interleucina-18 (IL-18) para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para administración  
en el ojo, preferiblemente para la administración en la retina, más preferiblemente para la administración en la coroides.
8. Interleucina-18 (IL-18) para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en  
30 un procedimiento en el que la Interleucina-18 (IL-18) se administra a un sujeto antes del desarrollo de la enfermedad neovascular o en etapa temprana de la enfermedad neovascular.
9. Interleucina-18 (IL-18) para su uso según la reivindicación 5, donde la interleucina-18 (IL-18) se  
35 administra en la retina mediante administración mediada por virus adenoasociado (VAA), preferiblemente donde un virus adenoasociado (VAA) que expresa una IL-18 inducible es administrada en la retina.

Figura 1





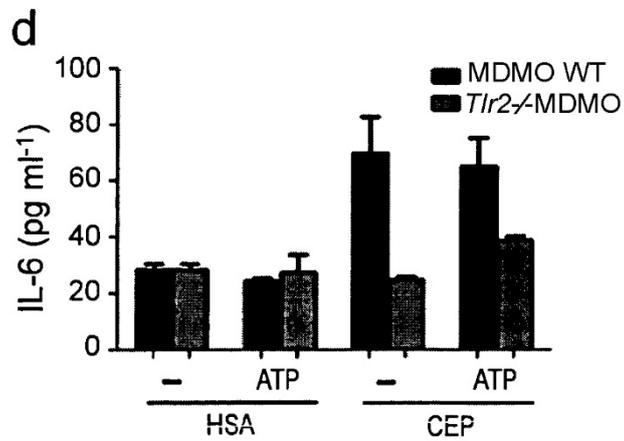
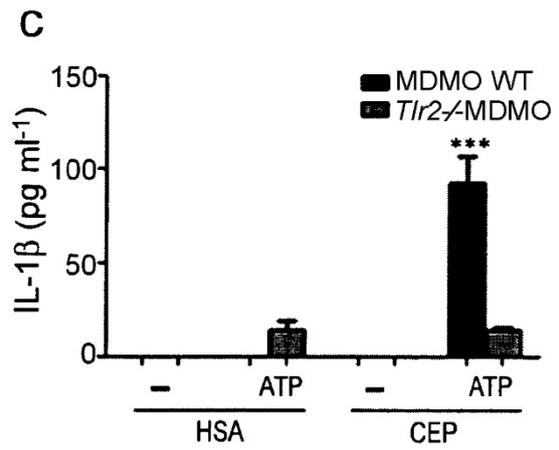
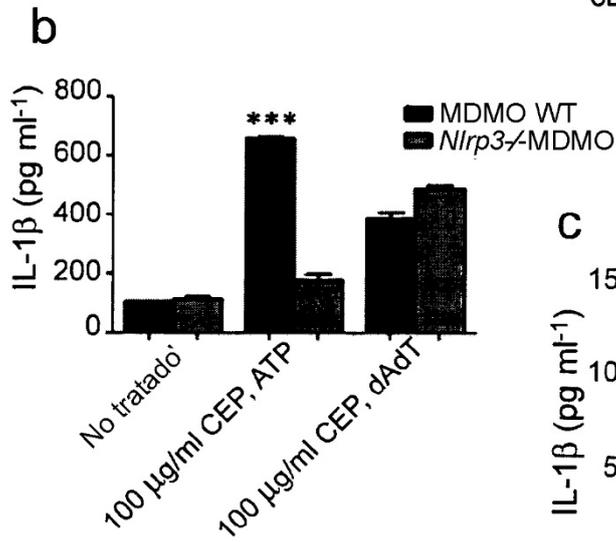
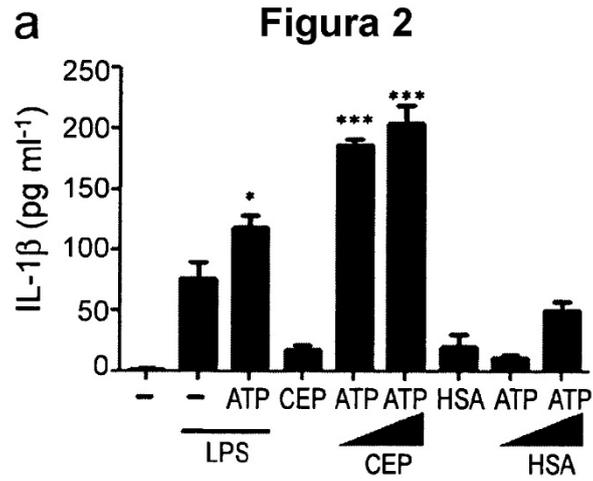
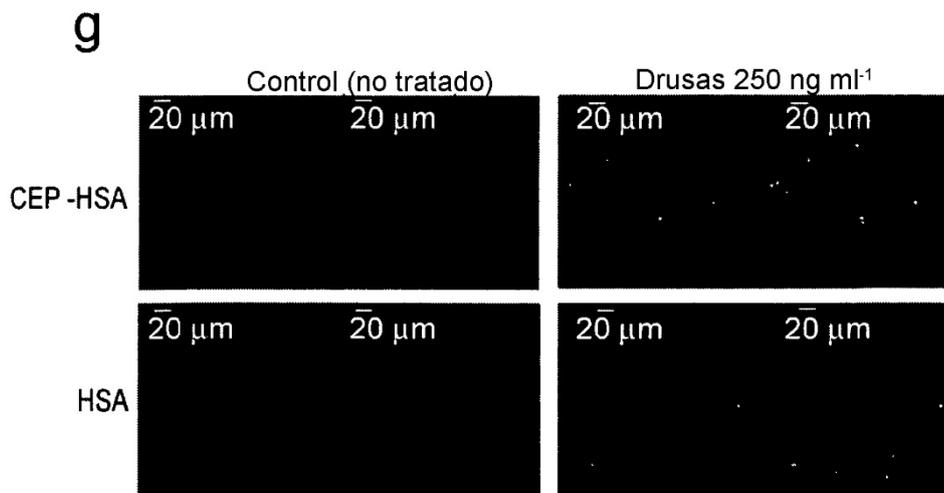
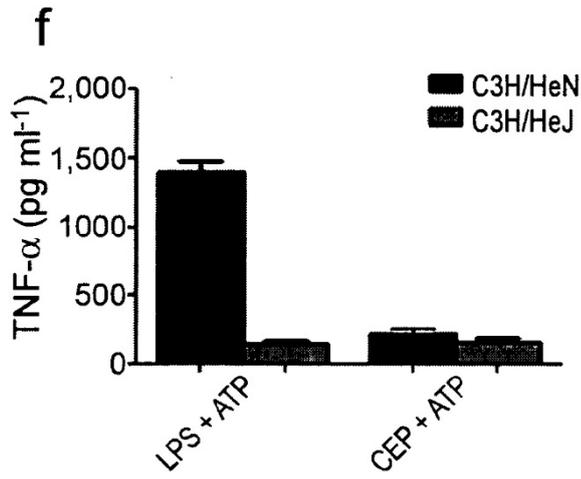
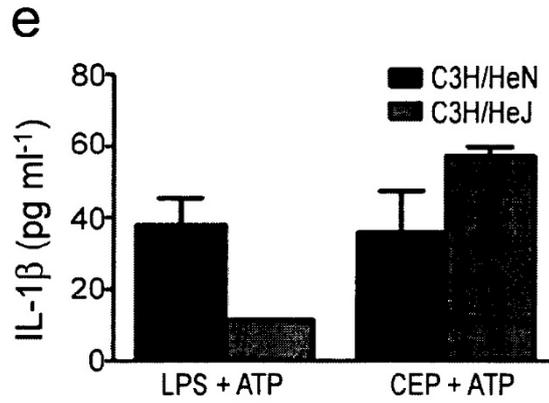


Figura 2



**a** **Figura 3**

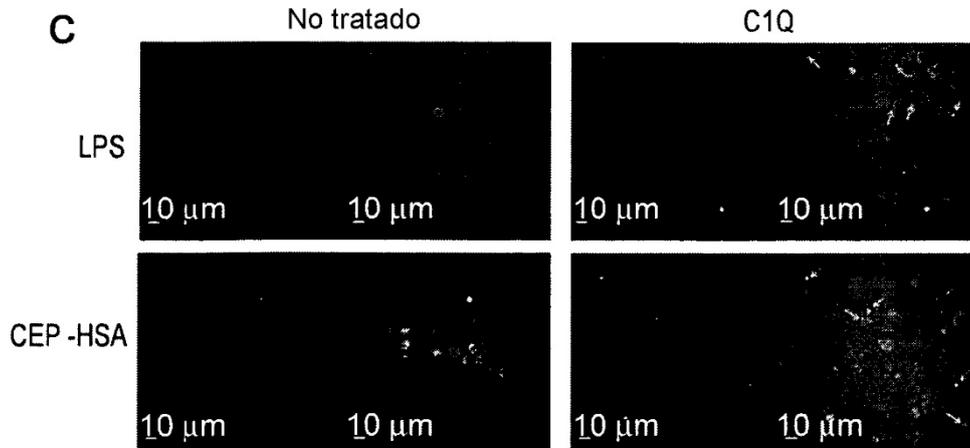
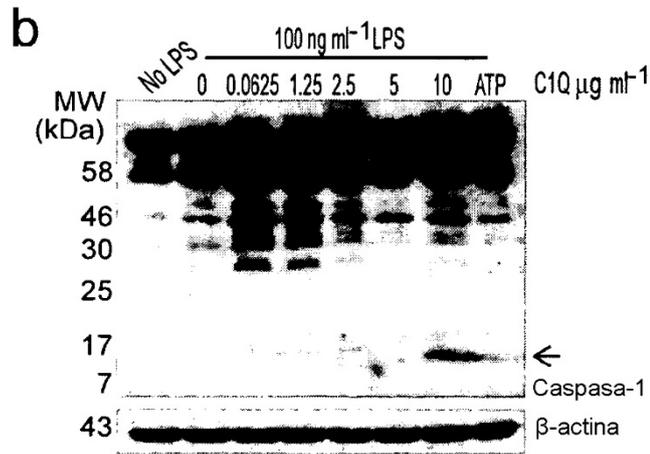
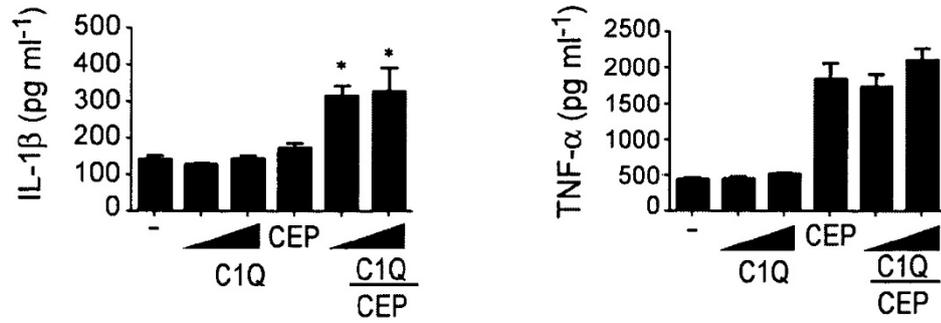


Figura 3

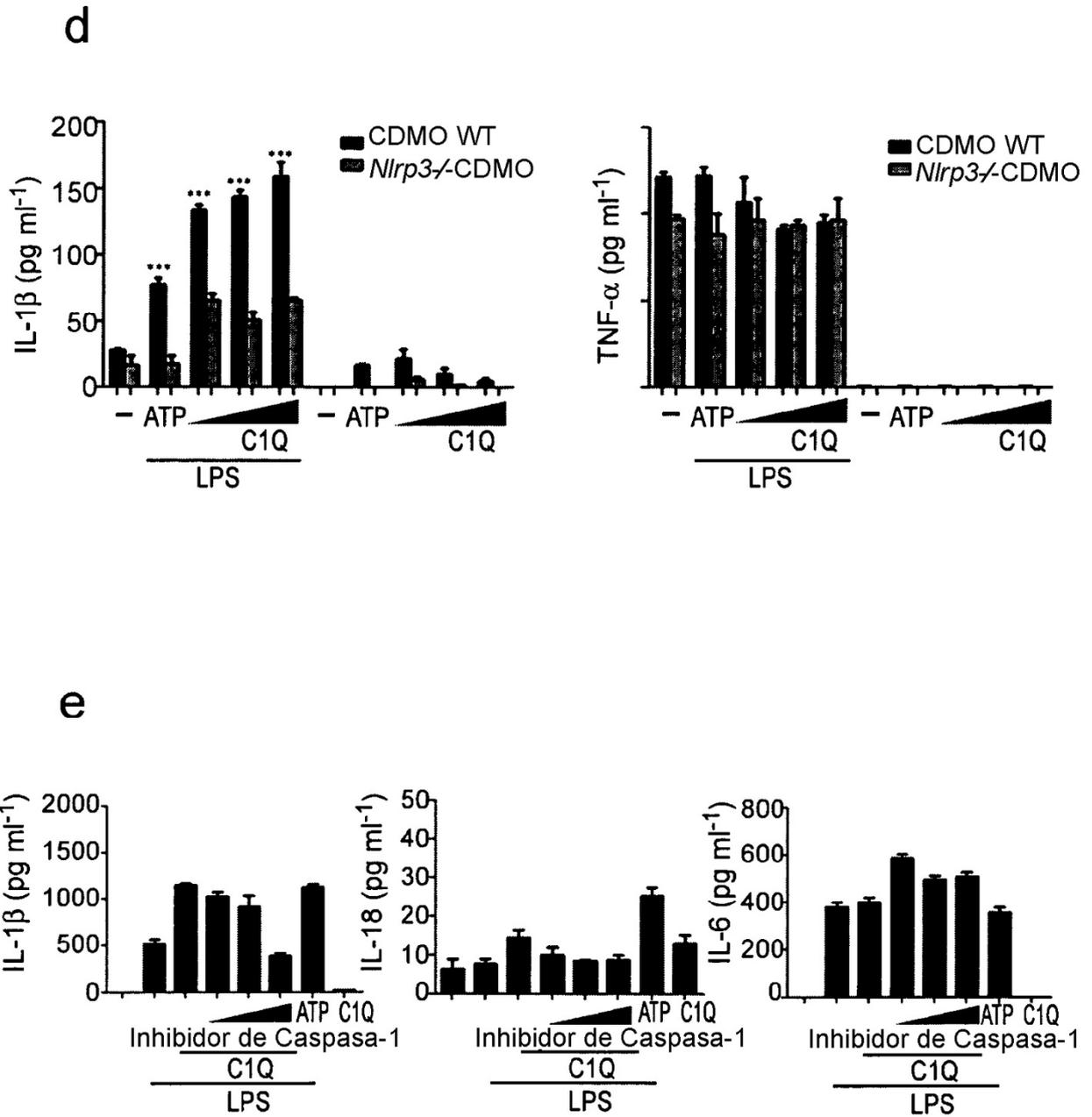
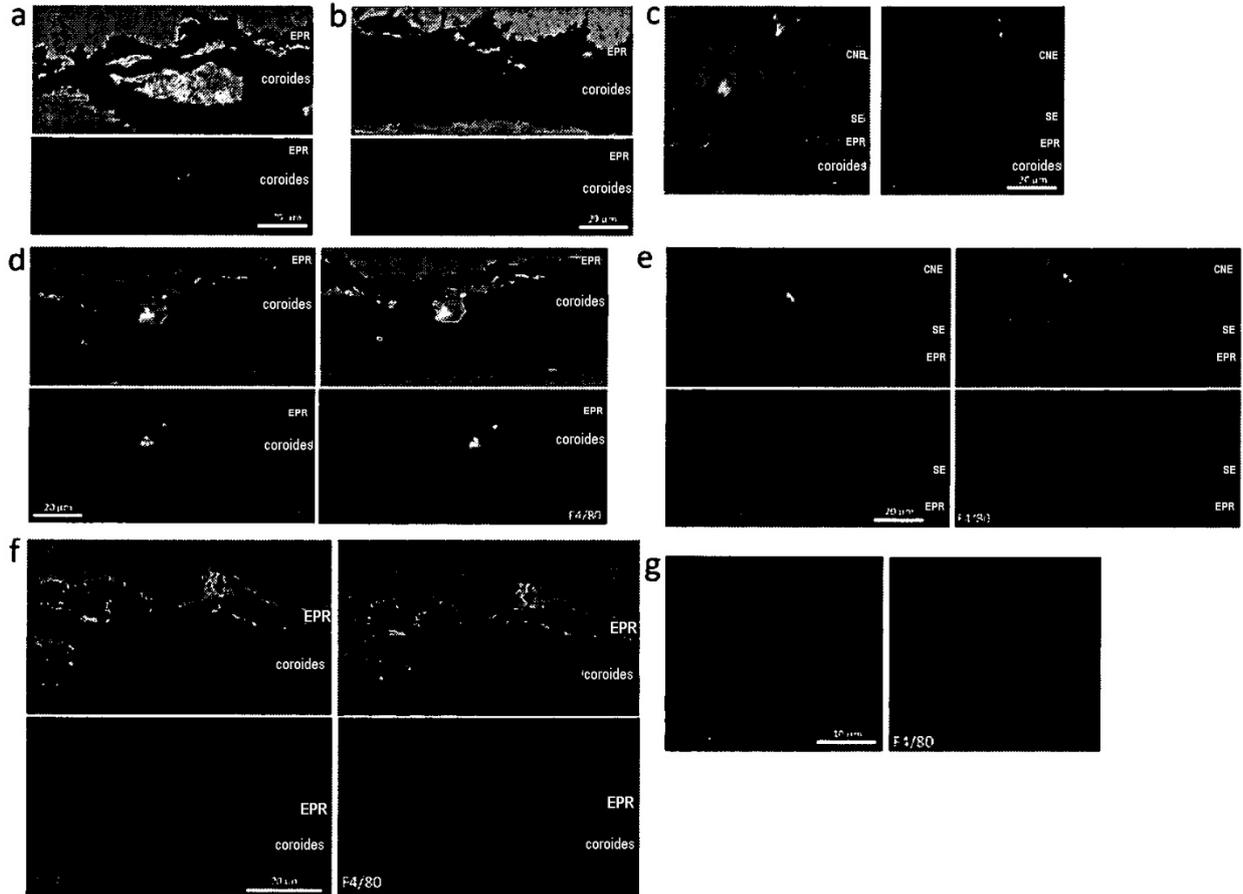
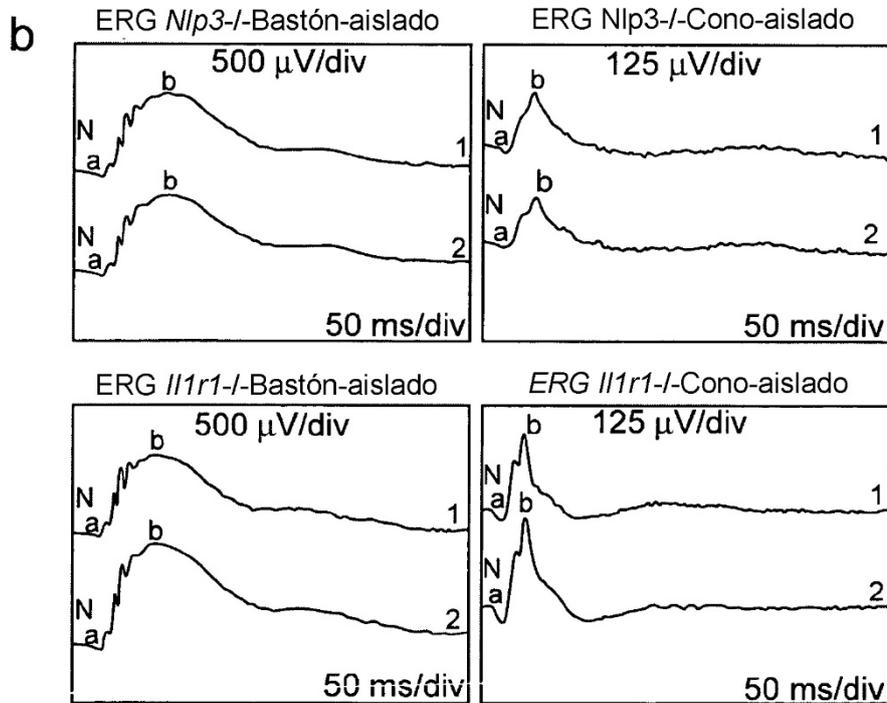
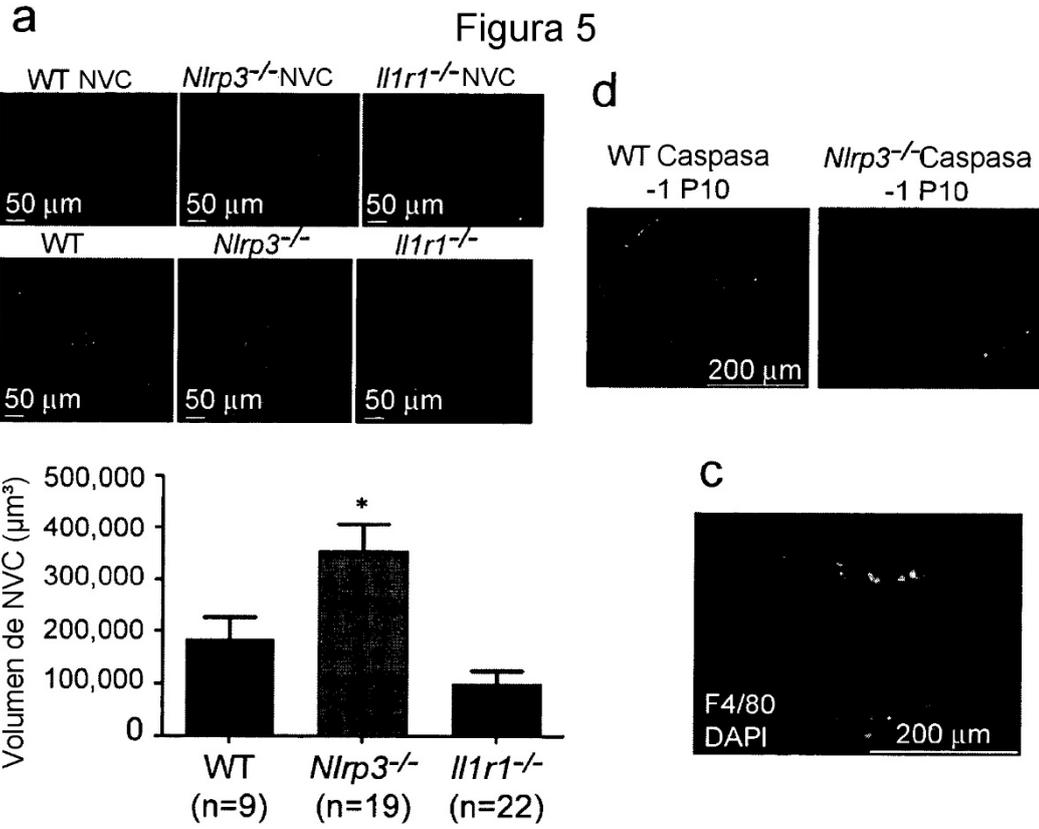


Figura 4





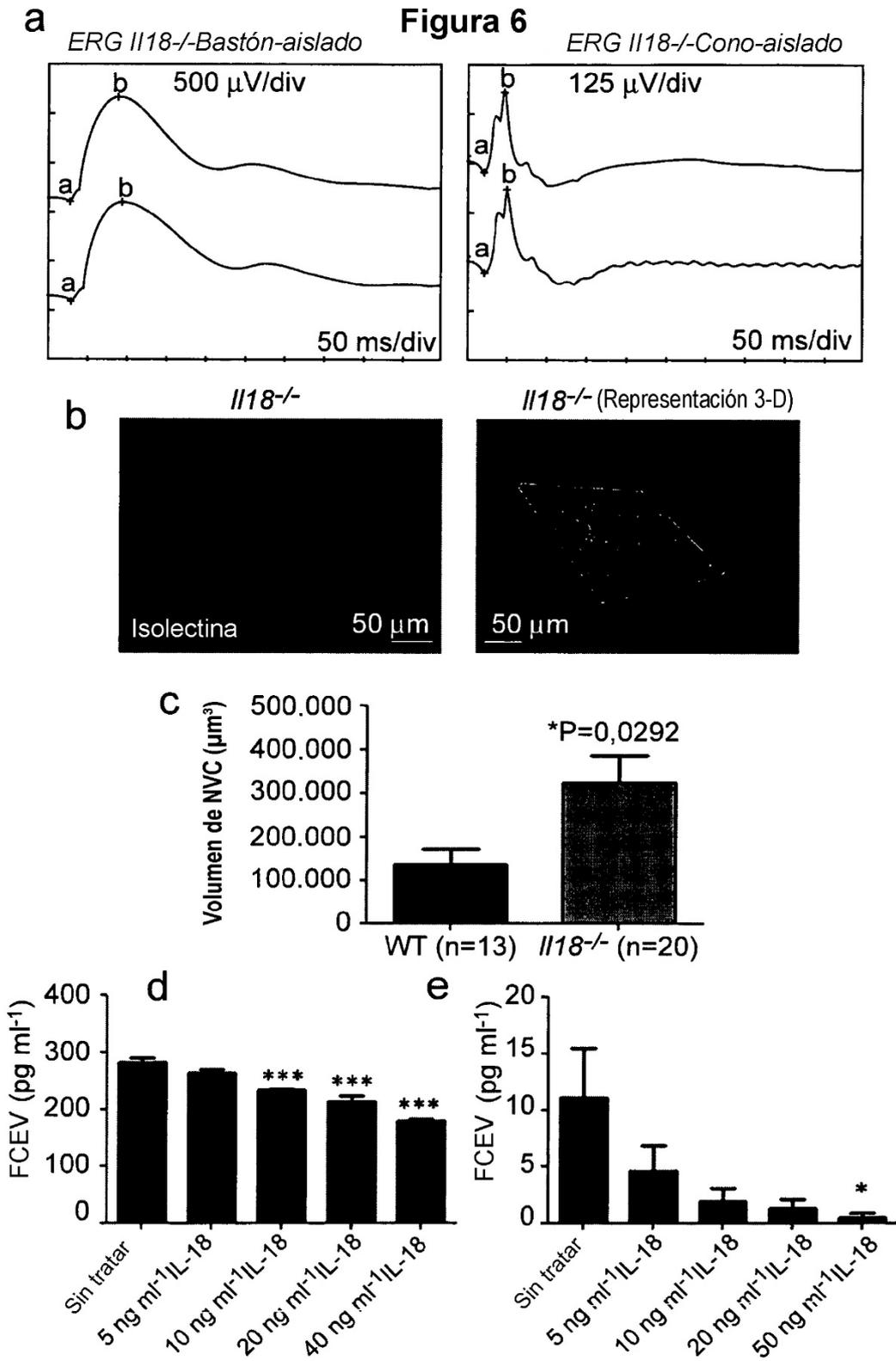
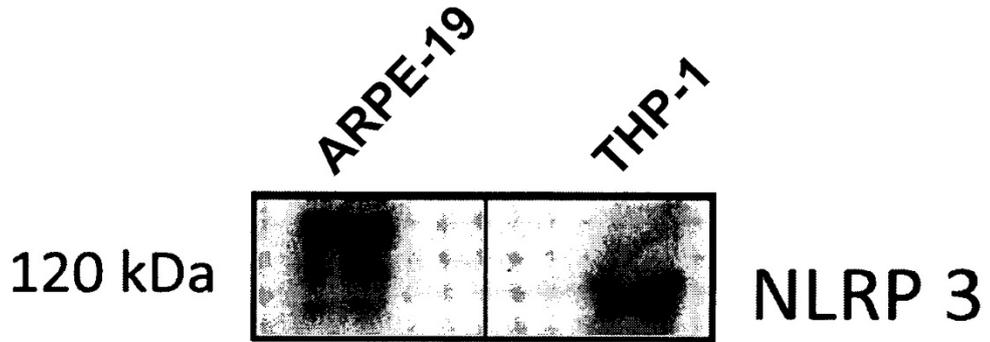


Figura 7

**a**



**b**

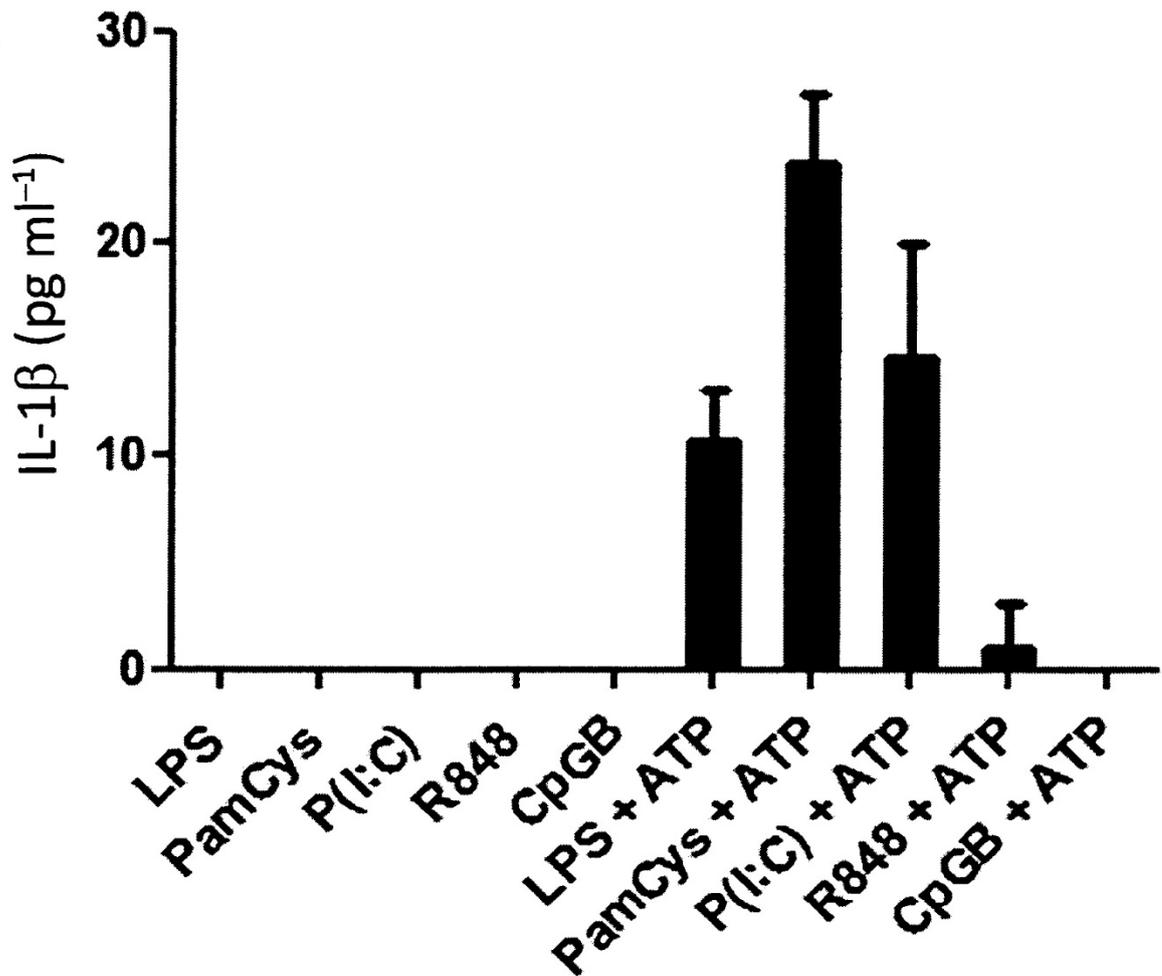


Figura 8

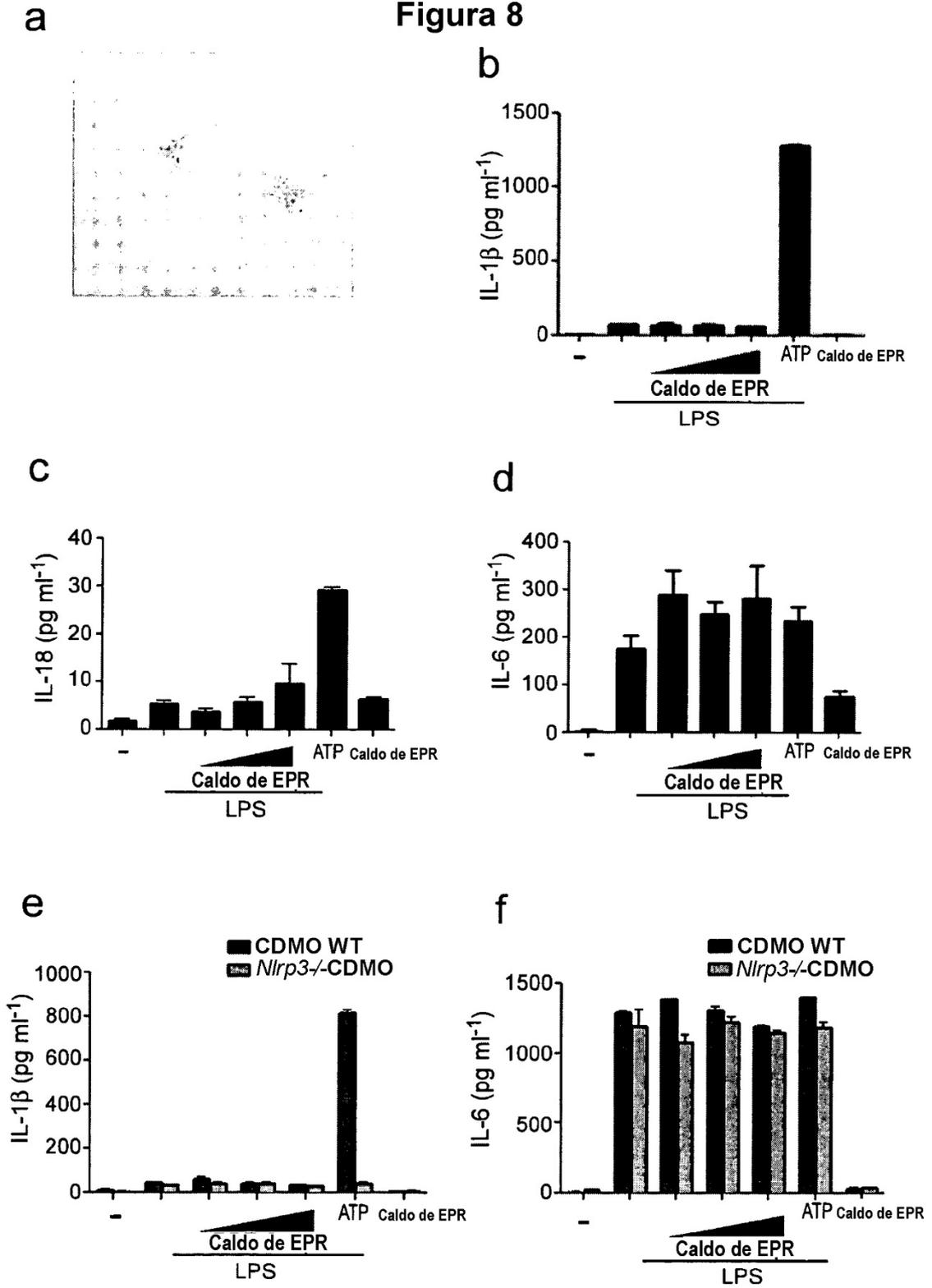


Figura 9

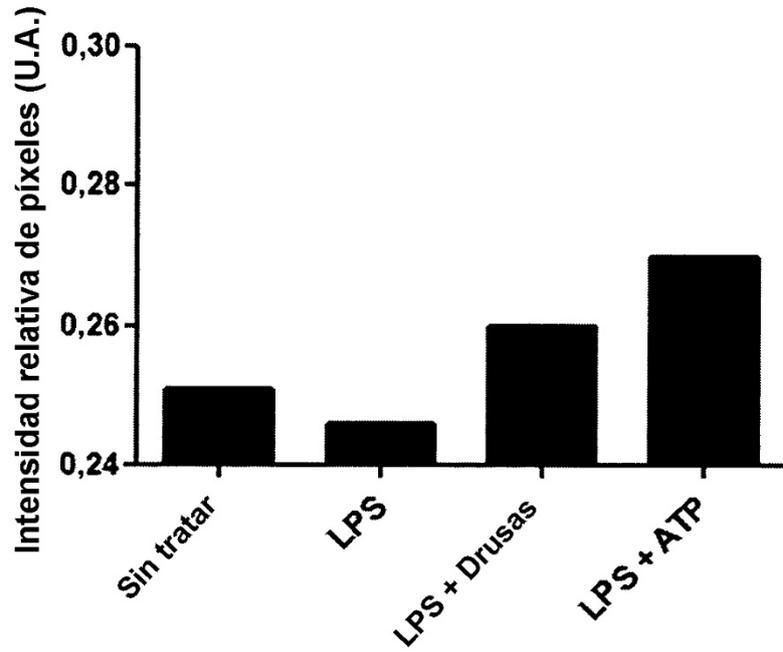


Figura 10

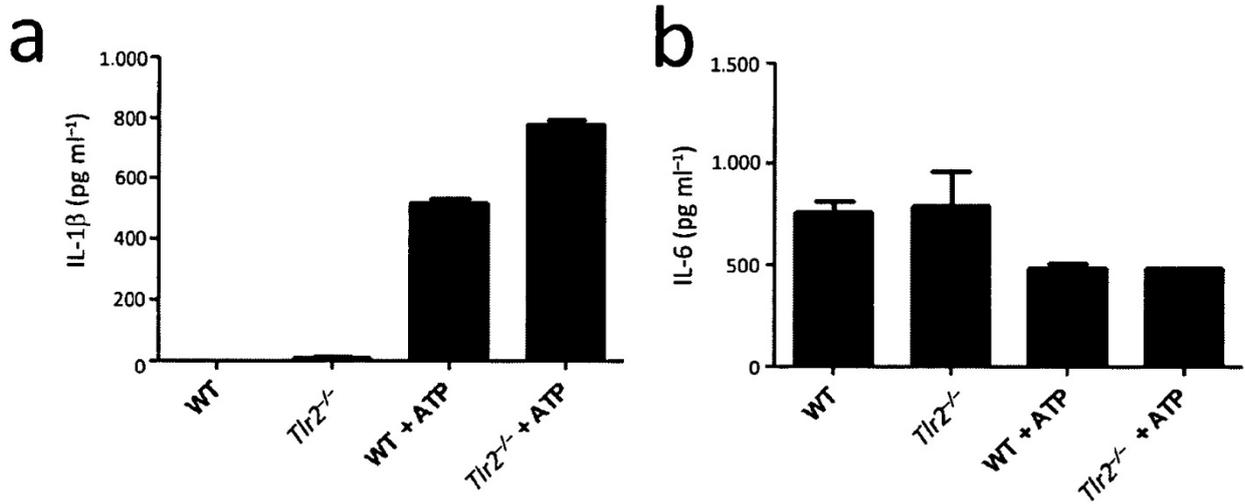


Figura 11

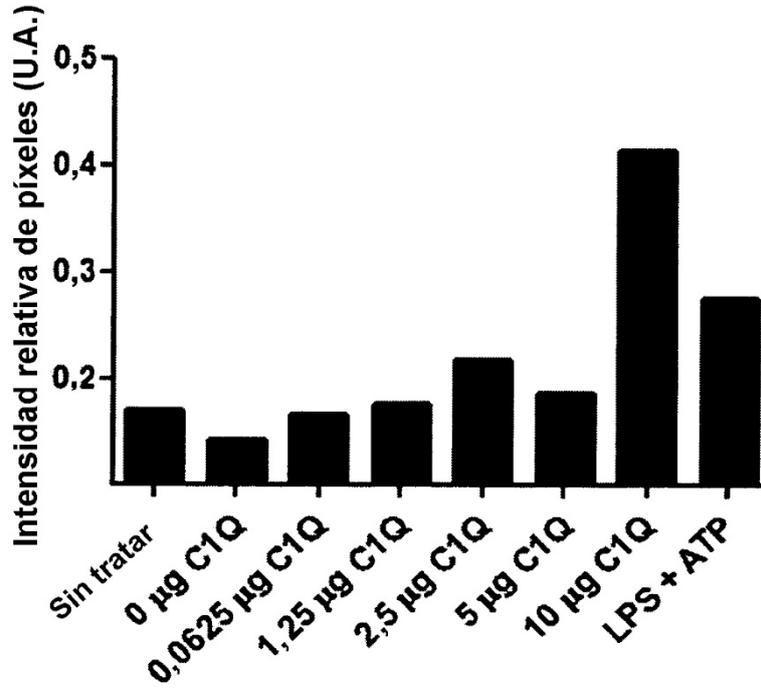
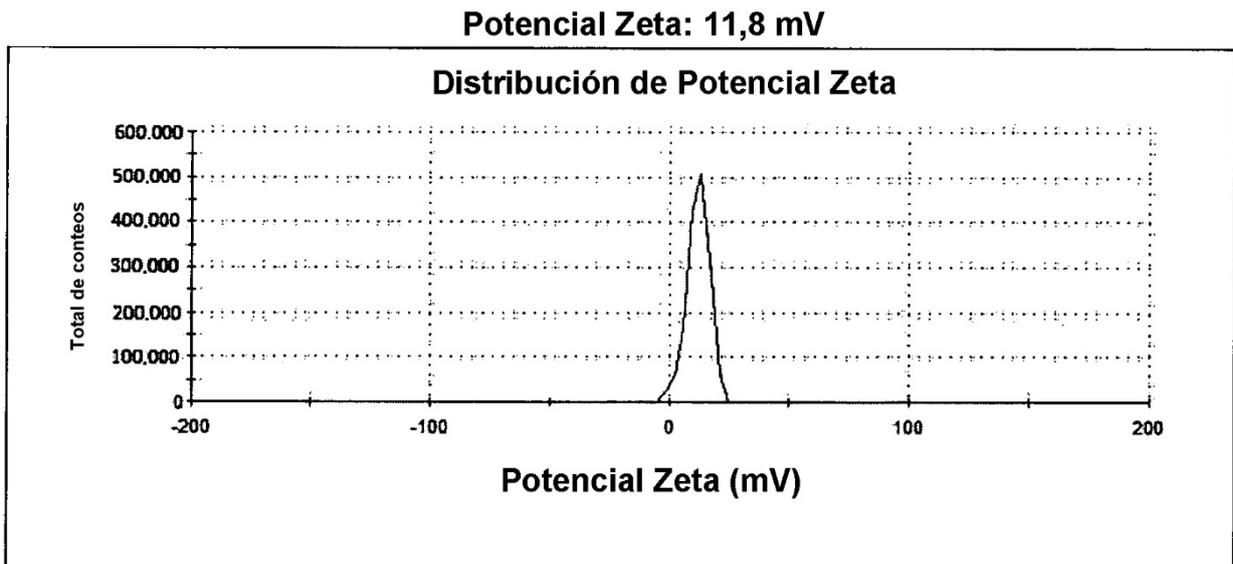
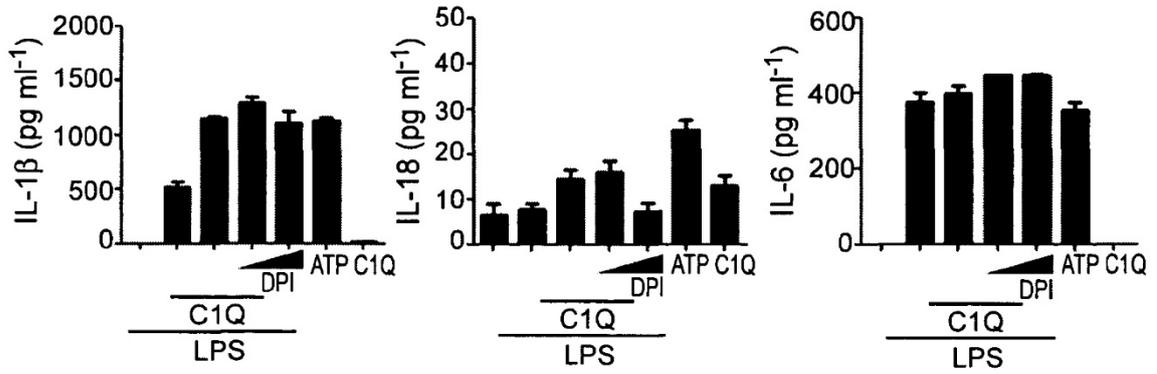


Figura 12

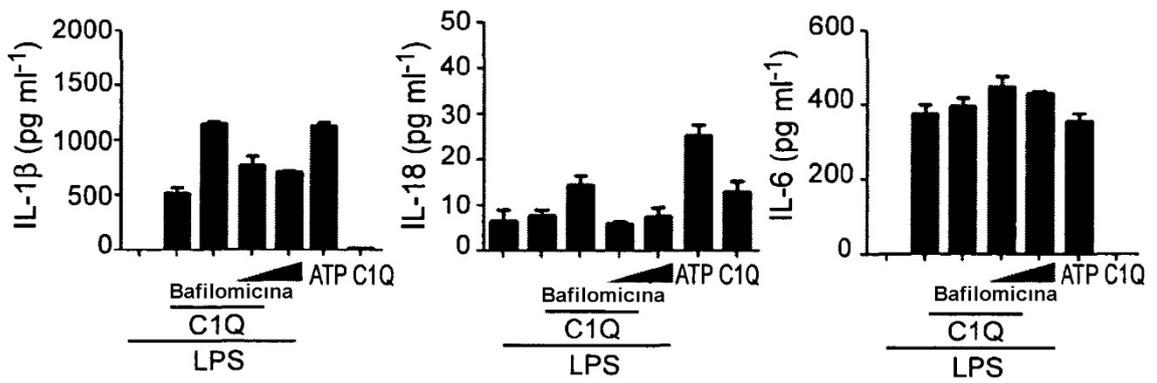


**Figura 13**

**a**



**b**



**c**

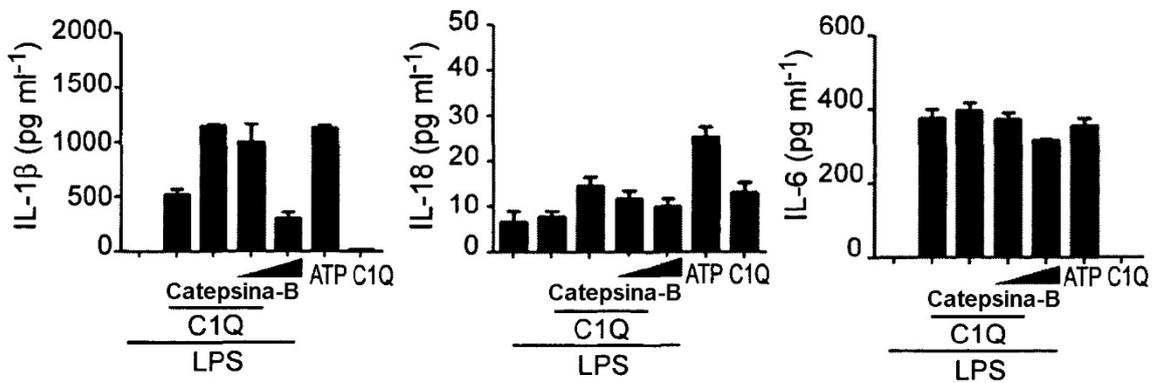


Figura 14

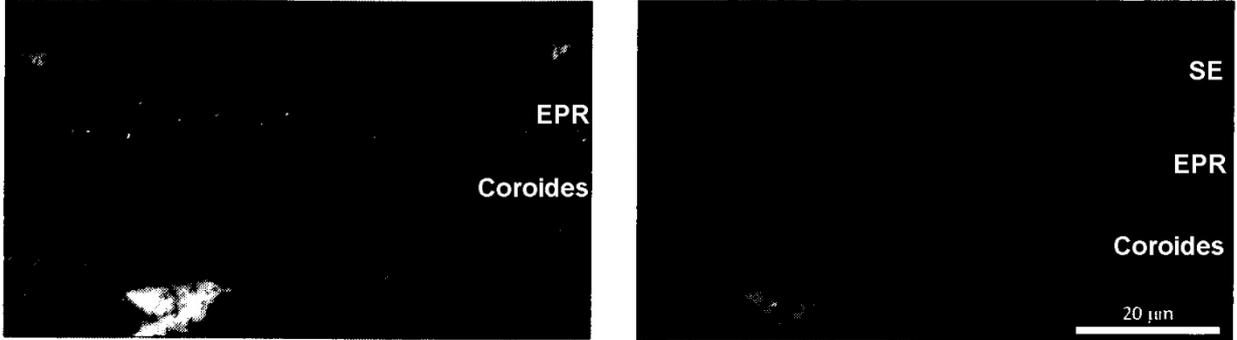


Figura 15

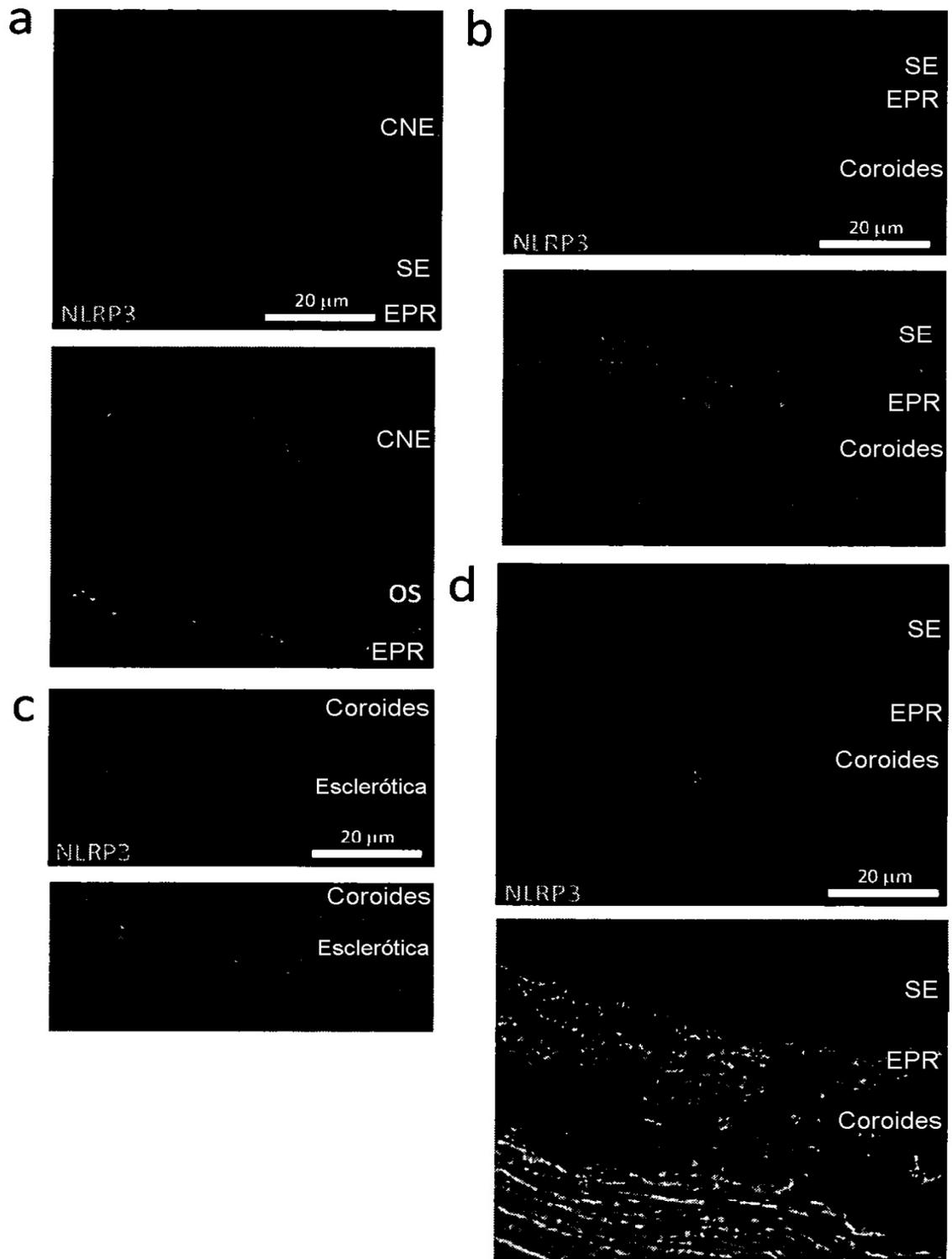


Figura 16



Figura 17

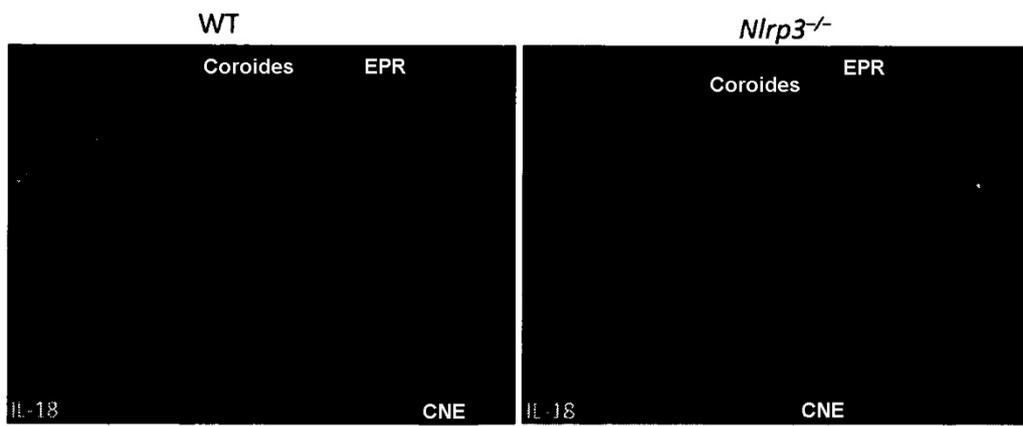


Figura 18

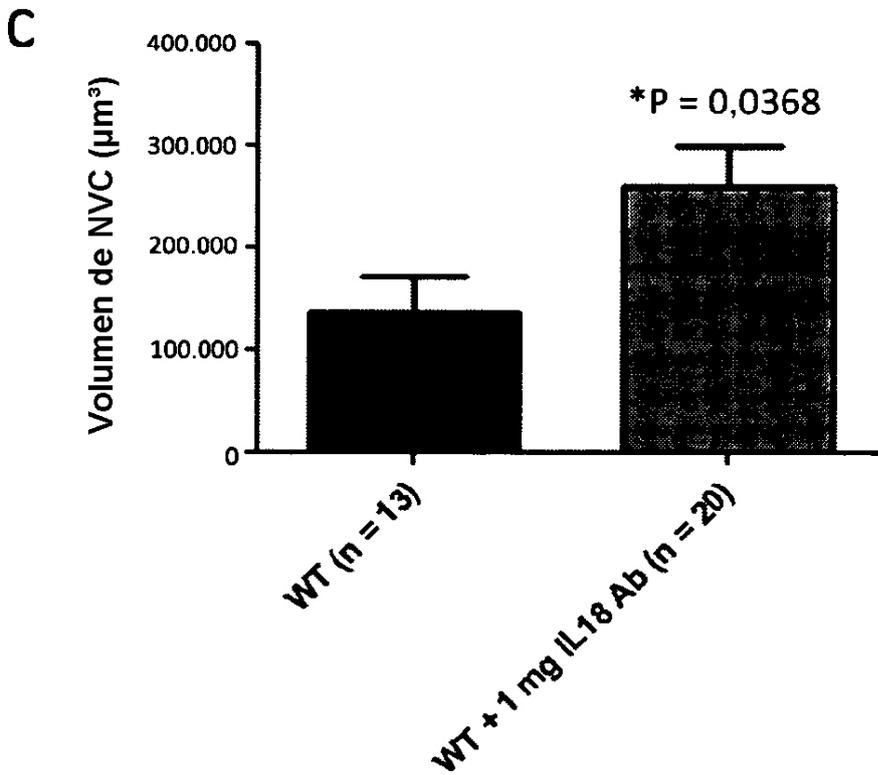
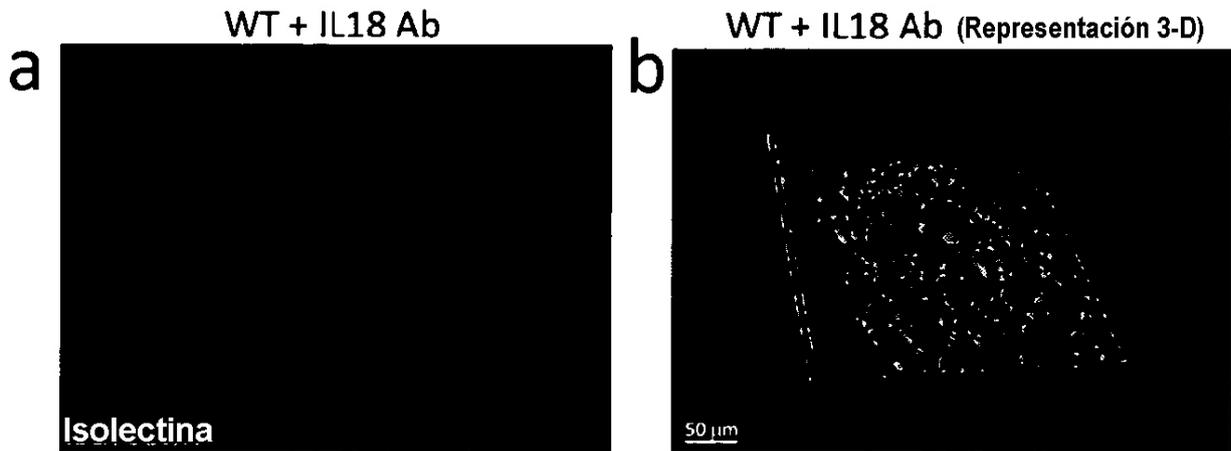


Figura 19

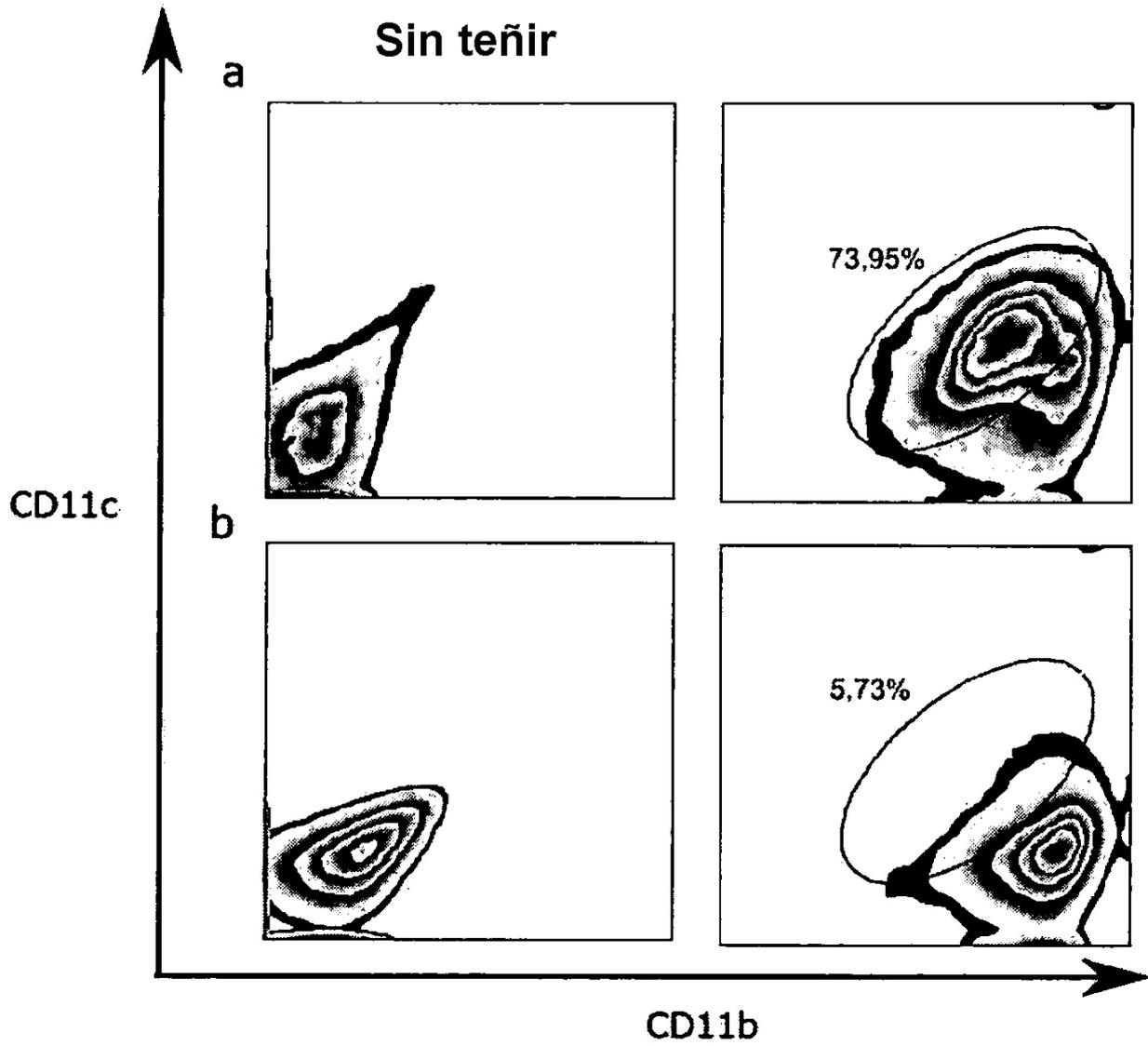


Figura 20

