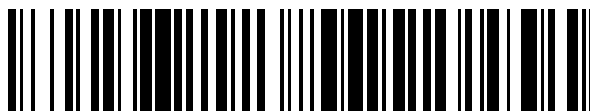


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 478 820**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/16** (2006.01)

**A61K 31/70** (2006.01)

**A01N 43/04** (2006.01)

**G01N 33/564** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2009 E 09709784 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014 EP 2252317**

54 Título: **Tratamiento de degeneración macular**

30 Prioridad:

**15.02.2008 US 66062 P**

**19.02.2008 US 66288 P**

**25.03.2008 US 70650 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.07.2014**

73 Titular/es:

**TUFTS UNIVERSITY (100.0%)**

**136 Harrison Avenue**

**Boston, MA 02110, US**

72 Inventor/es:

**KUMAR-SINGH, RAJENDRA;**

**CASHMAN, SIOBHAN M. y**

**RAMO, KASMIR**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 478 820 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

Tratamiento de degeneración macular

5 Campo técnico

En este documento se describen métodos y composiciones para tratar a un sujeto que tiene degeneración macular relacionada con la edad (AMD), métodos para ensayar la degeneración macular humana (MD), y métodos y kits para ensayar agentes terapéuticos potenciales para tratamiento de MD humana. La invención es una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la degeneración macular.

10 Antecedentes

La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es una enfermedad asociada con el envejecimiento que destruye gradualmente la visión central nítida, y es la causa principal de ceguera en los ancianos (Klein et al. Ophthalmology 114:253 - 262, 2007). La mácula es un tejido específico localizado en el centro de la retina, el tejido sensible a la luz en la parte posterior del ojo que convierte la luz o una imagen en impulsos eléctricos.

La AMD se clasifica como húmeda o seca (Inana et al. número de patente de Estados Unidos 7.309.487). La AMD húmeda se caracteriza por el crecimiento de vasos sanguíneos anormales detrás de la retina bajo la mácula. Estos nuevos vasos sanguíneos son frágiles y a menudo filtran sangre y fluido. La sangre y el fluido elevan la mácula desde su posición normal en la parte posterior del ojo, causando pérdida de visión central. La AMD húmeda se trata con cirugía láser, terapia fotodinámica, e inyecciones en el ojo. Ninguno de estos tratamientos, sin embargo, cura la AMD húmeda, más bien los tratamientos ralentizan la progresión de la enfermedad. La AMD seca se caracteriza por una lenta descomposición de las células sensibles a la luz de la mácula, emborronando gradualmente la visión central en el ojo afectado. Con el tiempo, cada vez funciona menos la mácula y se pierde gradualmente la visión central. No existe forma conocida de tratamiento para la fase avanzada de AMD seca, y la pérdida de visión es inevitable. Se ha demostrado que una formulación específica de alta dosis de antioxidantes y zinc evita que la fase intermedia de AMD progrese hasta AMD avanzada. Se preparó una proteína de fusión compuesta por una proteína CD59a murina y una IgG2a murina dirigida a membrana para reducir los síntomas de neovascularización coroidea en ratones (Bora et al., 2007 J. Immunol 178 (3) páginas 1783 - 1790). Sin embargo, la eficacia de la proteína de fusión no está clara y la administración de proteína de ratón a seres humanos puede provocar efectos secundarios. Ibid., página 1788 columna derecha último párrafo líneas 6 - 7.

Existe una necesidad de métodos para ensayar (es decir, pronosticar o diagnosticar) la degeneración macular humana (MD), métodos para ensayar entre entidades químicas para identificar agentes terapéuticos potenciales para tratar la AMD, y métodos para tratar a un sujeto humano que tiene AMD.

40 Sumario

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la degeneración macular en un sujeto, incluyendo la composición una proteína CD59 soluble recombinante (rsCD59) o un fuente de expresión de la proteína rsCD59, de modo que la proteína rsCD59 comprende una delección del dominio de anclaje a glucosil fosfatidil inositol presente en el cuarto exón. La composición se formula para suministro ocular, en una dosis eficaz para tratar la degeneración macular. Una fuente de la proteína rsCD59 es un vector viral que tiene un genoma modificado por ingeniería genética derivado de: adenovirus, virus adeno-asociado, herpesvirus, o un lentivirus. La composición es adecuada para suministro mediante una vía ocular tal como inyección, colirio, y pomada. La composición puede incluir un agente tal como: anti-tumoral, antiviral, antibacteriano, antimicobacteriano, anti-fúngico, anti-proliferativo y anti-apoptótico.

50 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 panel A es un dibujo que muestra construcciones de vector adenoviral serotipo 5 AdCAGCD59 que contiene un gen que codifica CD59 humana bajo el control del promotor de beta actina de pollo (CAG), y de dos vectores adenovirales de control, AdCAGGFP que expresa GFP también regulado por el promotor de CAG, y el vector de control negativo AdvACIO. Símbolos usados: pA, señal de poliadenilación; CAG, promotor de  $\beta$ -globina de  $\beta$ -actina de pollo citomegaloviral;  $\Psi$ , señal de empaquetado Ad; ITR, repetición terminal invertida adenoviral;  $\Delta$ , delecionado; E, marcadores de región temprana.

La Fig. 1 panel B es una fotografía de transferencias de Western usando un anticuerpo monoclonal específico para su unión a CD59 humana (parte superior) y para la proteína de control actina (parte inferior), que muestra la presencia de CD59 humana en lisados de células en contacto con AdCAGCD59 (banda oscura a aproximadamente 18kD en el grupo de lisado celular de ratón hepa-1c1c7, canal de la izquierda). La señal de CD59 no se detectó en lisados celulares de células en contacto con el vector viral de control o en lisados en células de control no pretratadas con vector (grupo de lisado celular de ratón hepa-1c1c7, canales central y de la derecha). También se detectó CD59 humana endógena en lisados celulares de retinoblastos embrionarios humanos (911) (banda débil a

aproximadamente 18kD en el grupo de lisado celular 911). Esta señal fue mucho más débil comparada con la señal de las células de ratón en contacto con AdCAGCD59 (comparando la banda oscura a aproximadamente 18kD en el grupo de lisado celular de ratón hepa-1c1c7, canal de la izquierda con la banda débil a aproximadamente 18kD en el grupo de lisado celular 911). La segunda transferencia de Western fue un control para expresión del gen constitutivo de  $\beta$ -actina.

La Fig. 1 panel C es una serie de fotomicrografías que muestra células en contacto con AdCAGCD59 (en la izquierda), y estas células se inmunotifieron con anticuerpo anti-hCD59 (CD59 indicado a la derecha). La microfotografía superior izquierda se visualizó usando contraste de interferencia diferencial (DIC) de las células, a dos diferentes aumentos (barras de longitud de 100  $\mu$ m y 20  $\mu$ m). Las fotomicrografías de derecha muestran detección inmunohistoquímica de estas células para la expresión de CD59 y su localización sobre la membrana celular. Se descubrió que una cantidad sustancial o posiblemente todas las células expresan la proteína CD59. La Fig. 1 panel C (derecha) es una serie de fotomicrografías de células de control (en contacto con vector de control AdCAGGFP) tratadas como en las fotomicrografías de la izquierda. Estos datos muestran que CD59 no se expresaba en estas células.

La Fig. 2 es una serie de gráficos que muestran la actividad funcional de CD59 humana expresada en células en contacto con vector AdCAGCD59.

La Fig. 2 panel A es un gráfico de líneas que muestra el porcentaje de lisis de células de control no en contacto con el vector, en la ordenada, como una función de la concentración de suero (suero humano normal, en este documento NHS), en la abscisa, las células se incubaron. Se observó que la lisis de células de control no tratadas era una función de la concentración de suero durante la incubación. La concentración más baja de suero que produjo la lisis celular máxima fue del 1% (dilución 1/100; la lisis celular fue del  $96,06\% \pm 0,87\%$ ). Esta concentración de suero se usó en los posteriores Ejemplos en este documento.

La Fig. 2 paneles B, C, y D son impresiones de los datos de clasificación celular que muestran los resultados de ensayos de lisis celular de suero humano con el grado de marcaje con yoduro de propidio (PI) de las células mostrado en la abscisa (adquirido en el canal FL3-H) y el número de células en la ordenada. La Fig. 2 panel B muestra que en células no tratadas (etiquetadas no infectadas), las células tratadas con HI-NHS se clasificaron en una ubicación de células de menor captación de PI tratadas con NHS (mayor captación de PI). La Fig. 2 panel C muestra que células en contacto con vector AdCAGGFP se clasificaron de manera similar a las células no tratadas. La Fig. 2 panel D muestra que sustancialmente todas las células tratadas con vector AdCAGCD59 se clasificaron en la misma posición que aquellas tratadas con NHS inactivado por calor (HI-NHS), es decir, la susceptibilidad a NHS estuvo sustancialmente o incluso completamente disminuida por pretratamiento con AdCAGCD59. En este ejemplo, PI se capta preferentemente por células no vivas, a saber, el pico de la derecha. Las células en contacto con el vector AdCAGCD59 estuvieron significativamente protegidas, es decir, se reducía la lisis celular mediada por el complemento hasta el  $12,29\% \pm 0,18\%$ . La Fig. 2 panel C muestra que células de ratón en contacto con el vector de control (AdCAGGFP) eran susceptibles a lisis celular debida al complemento de suero humano (la lisis celular fue del  $95,27\% \pm 0,01\%$ ). De manera similar, la Fig. 2 panel B muestra que las células de control no pretratadas o en contacto con el vector eran susceptibles al complemento humano y lisis celular. Estos datos muestran que las células estaban protegidas de la lisis debido a la expresión de CD59 humana a partir del vector AdCAGCD59, en lugar de a partir del contacto con un vector adenoviral.

La Fig. 2 panel E es un gráfico de barras que compara el porcentaje de lisis celular (ordenada) de diferentes grupos de células en la abscisa: células de control (no pretratadas con vector, y células en contacto con vector de control AdCAGGFP) respecto a células en contacto con AdCAGCD59. Cada barra representa una muestra de tratamiento diferente de las células. Los datos en este gráfico muestran que células en contacto con vector AdCAGCD59 estaban significativamente protegidas, ya que la lisis celular mediada por el complemento era del  $12,29\% \pm 0,18\%$  (barra de la derecha). Las células tratadas con el vector de control AdCAGGFP eran susceptibles al complemento humano con lisis celular del  $95,27\% \pm 0,01\%$  (barra central). Las células no tratadas eran susceptibles a complemento humano y lisis celular (también aproximadamente un 95% de lisis celular; barra de la izquierda). Estos datos muestran que el pretratamiento con CD59 humana de las células con el vector AdCAGCD59 protegía las células de la lisis.

La Fig. 2 panel F es un gráfico de líneas que muestra el porcentaje de lisis celular (ordenada) de células pretratadas como una función de la multiplicidad (partículas de vector/célula de pretratamiento; abscisa). En células pretratadas con vector AdCAGCD59, la lisis celular disminuía con una multiplicidad creciente. El tratamiento con 250 partículas de virus (vp/célula) provocó la inhibición de lisis celular en más del 50%. Las células pretratadas con el vector de control demostraron lisis completa de las células incluso a multiplicidades más elevadas.

La Fig. 3 paneles A y B son cada uno una serie de cuatro fotomicrografías que muestran que las células de ratón son susceptibles a deposición de C5b-9 cuando se exponen a NHS.

La Fig. 3 panel A muestra células de ratón en portaobjetos con cámara recubiertos con poli-D-lisina incubados con NHS al 10% a 37°C durante uno a diez minutos y después lavados y fijados. Las fotomicrografías de la izquierda se

visualizan por DIC a diferentes aumentos (indicados por barras de longitud de 100  $\mu\text{m}$  y 20  $\mu\text{m}$ ). Las fotomicrografías de la derecha muestran los resultados de células en contacto con anticuerpo anti-MAC y con DAPI a diferentes aumentos (100  $\mu\text{m}$  y 20  $\mu\text{m}$ ). DAPI es 4'-6-diamidino-2-fenilindol, un compuesto que forma complejos fluorescentes con ADN bicatenario natural. Estas fotomicrografías muestran que la incubación de células con NHS durante cinco minutos causaba cambios significativos en la morfología celular en comparación con células de control incubadas con HI-NHS; las células perdieron sus procesos citoplasmáticos extensivos y se volvieron redondas y granulares (Fig. 3 panel A, fotomicrografías de la izquierda) en comparación con células tratadas con HI-NHS (Fig. 3 panel B, fotomicrografías de la izquierda). El análisis inmunocitoquímico usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra un neopéptido sobre el complejo C5b-9 mostró tinción extensiva de membrana en los bordes de células tratadas con NHS lo que confirma la deposición de MAC en estas células (Fig. 3 panel A) en comparación con células de control tratadas con HI-NHS (Fig. 3 panel B).

La Fig. 3 panel B muestra resultados de ejemplos similares a los de la Fig. 3 panel A, excepto en el uso de HI-NHS. Los datos muestran que las células no cambiaban la morfología, es decir, el HI-NHS no tenía el mismo efecto perjudicial sobre las células que NHS.

La Fig. 3 panel C es una serie de fotomicrografías tomadas con DIC, en que la microfotografía de la izquierda muestra células en contacto con NHS y después teñidas con azul tripán, y la microfotografía de la derecha muestra células en contacto con HI-NHS y después teñidas con azul tripán. Se observó lisis de una cantidad sustancial de células tratadas con NHS determinada por tinción con azul tripán (izquierda); se observó sustancialmente ausencia de lisis con células en contacto con HI-NHS (derecha), indicado por la morfología celular normal y ausencia de captación de azul tripán (derecha). Adicionalmente, las células tratadas con HI-NHS mantenían una morfología celular normal, mientras que las expuestas a NHS perdían los procesos asociados con células normales. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes para cada tipo de suero ensayado.

La Fig. 4 panel A es una serie de fotomicrografías de células de ratón hepa-1c1c7 pretratadas con el vector de control AdCAGGFP y después incubadas con NHS durante tres, cinco, y siete minutos, y visualizadas por varios métodos. La fila superior muestra células visualizadas por DIC; la fila central muestra las mismas células visualizadas por MAC/DAPI; y la fila inferior muestra un aumento mejorado de las partes destacadas de las fotomicrografías a los cinco minutos. Las células mostraron lisis creciente y pérdida de morfología normal durante el tiempo transcurrido de incubación con NHS, después de cinco minutos y siete minutos. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes para cada tipo de suero ensayado.

La Fig. 4 panel B es una serie de fotomicrografías de otra muestra de células pretratadas con el vector AdCAGCD59 que expresa CD59 con el mismo protocolo experimental que la Fig. 4 panel A. En contraste con los datos de la Fig. 4 panel A, las células pretratadas con el vector CD59 conservaban morfología normal, y estaban protegidas de tinción MAC incluso después de siete minutos de incubación con NHS. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes para cada tipo de experimento de suero.

La Fig. 4 panel C es una serie fotomicrografías tomadas por DIC de células pretratadas con AdCAGGFP y después teñidas con azul tripán (izquierda), y células pretratadas con AdCAGCD59 y después teñidas con azul tripán (derecha).

La Fig. 4 paneles A, B, y C muestra que el pretratamiento de células de ratón hepa-1c1c7 con vector AdCAGCD59 protegía significativamente estas células de deposición MAC y lisis (Fig. 4 panel B y 4 panel C microfotografía de la derecha). Las células pretratadas con vector de expresión de CD59 y después expuestas a NHS durante cinco minutos mantenían robustas características morfológicas normales (Fig. 4 panel B, fila superior, microfotografía central y microfotografía derecha inferior). Las células pretratadas con el vector adenoviral de control y que expresan GFP no estaban protegidas contra deposición MAC después de cinco minutos de tratamiento con NHS (Fig. 4 panel A). Se observaron cambios morfológicos anormales en estas células incluyendo pérdida de procesos citoplasmáticos y forma redonda y granular (Fig. 4 panel A, fila superior, fotomicrografías central y derecha inferior). Se observó inmunotinción MAC (Fig. 4 panel A, fila central, fotomicrografías central y derecha inferior), y lisis de una cantidad sustancial de células de control por tinción con azul tripán (Fig. 4 panel C, microfotografía de la izquierda).

Estas fotomicrografías muestran adicionalmente un pequeño grado de tinción MAC en algunas células pretratadas con AdCAGCD59 después de siete minutos de tratamiento con NHS (Fig. 4 panel B, fila central, fotografía de la derecha). Las células de control pretratadas con AdCAGGFP después de siete minutos de tratamiento con NHS, tenían una tinción MAC significativamente más fuerte (Fig. 4 panel A, fila central, microfotografía de la derecha) que las células tratadas con AdCAGCD59 (Fig. 4 panel B, fila central, microfotografía de la derecha).

La Fig. 5 es una serie de fotografías que muestran el efecto sobre células del pretratamiento a diferentes multiplicidades de partículas de vector por célula (vp/célula) de partículas de vector AdCAGCD59 por célula, a dos aumentos (véanse las barras de distancia), sobre la supervivencia con NHS durante cinco minutos. Columna de la izquierda: células tratadas con 100 vp/célula y cinco minutos de tratamiento con NHS, visualizadas en cuatro condiciones. Columna central: células tratadas con 500 vp/célula y cinco minutos de tratamiento con NHS. Columna de la derecha: 1000 vp/célula y cinco minutos de tratamiento con NHS. Estas fotomicrografías muestran que la

inmunotinción MAC se redujo en células pretratadas a multiplicidades mayores con vector AdCAGCD59. Las células pretratadas a multiplicidades de vector mayores muestran adicionalmente un porcentaje mayor de morfologías normales. La Fig. 5 muestra la relación inversa entre la deposición de MAC humano y la cantidad de adenovirus adCAGCD59 usada para pretratar las células.

La Fig. 6 es una serie de fotomicrografías de ojerías murinas (paneles A, B, y C) y células RPE murinas primarias (paneles D y E) incubadas con (+) o sin (-) un anticuerpo anti-emmprin de ratón activador del complemento (indicado anticuerpo anti-emmprin en las figuras), seguido por tratamiento indicado con NHS o HI-NHS de control durante periodos de tiempo mostrados en la figura. Las ojerías y células RPE se ensayaron para deposición de MAC humano. Las células RPE primarias se marcaron con DAPI. Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes cada para serie de ojerías (n = 4 ojerías para cada condición) y cada serie de células RPE primarias.

La Fig. 6 panel A (izquierda) muestra datos de inmunohistoquímica de deposición de MAC humano obtenidos de tejidos de ojería (disecccionados en una superficie plana, barra de longitud de 1 mm) en contacto con un anticuerpo anti-emmprin después en NHS al 50%. Las microfotografías 1 - 3 (derecha) muestran dos aumentos (barras de longitud de 100 y 400  $\mu\text{m}$ ) de las células disecccionadas. Se observó inmunotinción MAC extensiva de células de las ojerías, y la monocapa RPE de estas ojerías aparecía intrincada y se observaron diversos patrones de tinción.

La Fig. 6 panel B muestra datos como en la Fig. 6 panel A, usando sin embargo HI-NHS. No se observó inmunotinción MAC en las RPE de las ojerías murinas, en comparación con la inmunotinción extensiva observado de células incubadas con NHS (Fig. 6 panel A).

La Fig. 6 panel C muestra datos como en la Fig. 6 paneles A y B, incubadas sin embargo con NHS al 100% durante 60 minutos a 37°C, y no en contacto con anticuerpo anti-emmprin antes de la adición de NHS. Los datos demuestran que la tinción fue ocasional, dispersa y débil.

La Fig. 6 panel D muestra células RPE murinas primarias analizadas por resultados de inmunohistoquímica de MAC humano, DIC, y DAPI para células en contacto con un anticuerpo anti-emmprin seguido por NHS. Las células se muestran a dos diferentes aumentos (indicados por barras de longitud de 300  $\mu\text{m}$  y 75  $\mu\text{m}$ ). Se observó inmunotinción MAC extensiva como la observada para las ojerías (Fig. 6 panel B).

La Fig. 6 panel E muestra resultados para células RPE murinas primarias como en la Fig. 6 panel D pero con HI-NHS durante 7 minutos a 37°C. Se observó inmunotinción MAC menos extensiva que en células incubadas con NHS (Fig. 6 panel D).

La Fig. 7 es una serie de fotomicrografías que muestran células RPE ensayadas analizadas con un ensayo de doble anticuerpo usando anticuerpo anti-RPE65 de ratón (indicado RPE65 en la figura, tercera fila) visualizado por un anticuerpo secundario conjugado con Cy3 adecuado. La columna en la izquierda muestra fotomicrografías de células teñidas con anticuerpo anti-RPE65 de ratón (primario). La columna en la derecha muestra fotomicrografías de células de control no en contacto con el anticuerpo primario anti-RPE65 y adicionalmente tratadas con anticuerpo secundario, indicado en la figura como no primarias (control). Las células se visualizaron por cada uno de DIC, DAPI, y por superposición de la tinción RPE65 y DAPI (indicado RPE65/DAPI, cuarta fila).

La Fig. 8 es una serie de fotomicrografías que muestran datos obtenidos de poner en contacto células RPE con anticuerpo anti-emmprin y NHS al 50% durante cuatro minutos (Fig. 8 panel A, columna de la izquierda), o de poner en contacto células RPE con el anticuerpo anti-emmprin y NHS al 50% durante siete minutos (Fig. 8 panel A, columna de la derecha), o de poner en contacto células RPE con el anticuerpo anti-emmprin y HI-NHS al 50% durante siete minutos (Fig. 8 panel B), o de poner en contacto células RPE con NHS al 50% solamente durante siete minutos (control; Fig. 8 panel C). Fila superior: células visualizadas por BF; segundo fila: células teñidas con DAPI; tercera fila: células en contacto con anticuerpo anti-C5b-9 humano; y cuarta fila: combinación de los resultados de DAPI y anticuerpo de la segunda y tercera fila.

La Fig. 8 panel A muestra inmunotinción MAC extensiva sobre las células RPE tratadas con el anticuerpo anti-emmprin y NHS al 50% durante cuatro minutos (columna de la izquierda, tercera fila), y después de siete minutos de tratamiento con NHS. Esta Fig. muestra que una cantidad sustancial de células RPE se ha desprendido del portaobjetos (columna de la derecha, tercera fila). La Fig. 8 panel A también muestra que agregados celulares de áreas de elevada confluencia ocasionalmente permanecen y que estas áreas son fuertemente positivas para MAC (columnas de la izquierda y de la derecha, tercera fila). La Fig. 8 panel B muestra que células tratadas con HI-NHS no se unían a anticuerpo anti-MAC (tercera fila).

La Fig. 9 es una serie de fotografías que muestran tejidos de ratón de ojería y fotomicrografías de tejidos de ratón de córnea.

La Fig. 9 panel A muestra resultados para tejidos de ojería (disecccionados para presentarlos en superficie plana) en contacto con un anticuerpo anti-emmprin de ratón seguido por adición de NHS (concentración final del 50% durante

15 minutos a 37°C). Después de exposición a NHS, la monocapa RPE aparecía intrincada y presentaba diversos patrones de tinción debido a diferentes cantidades de deposición de MAC y diversas cantidades de daño celular.

La Fig. 9 panel B muestra resultados para tejidos de ojera en contacto con un anticuerpo anti-emmprin de ratón seguido por adición de HI-NHS (concentración final del 50% durante 15 minutos a 37°C). Las células en contacto con HI-NHS muestran ausencia de inmunotinción MAC en células RPE y endotelio de la córnea.

La Fig. 9 panel C muestra resultados para tejidos de córnea en contacto con un anticuerpo anti-emmprin de ratón seguido por adición de NHS (concentración final del 50% durante 20 minutos a 37°C). Después de exposición a NHS, la monocapa RPE aparecía intrincada y presentaba diversos patrones de tinción debido a diferentes cantidades de deposición de MAC y diversas cantidades de daño celular.

La Fig. 9 panel D muestra células en contacto con HI-NHS que muestran ausencia de inmunotinción MAC en células RPE y endotelio de la córnea.

La Fig. 10 es una serie de fotomicrografías de células pre-tratadas con mezclas de vectores de control y vectores de expresión de hCD59.

La Fig. 10 panel A muestra células RPE primarias de ratón pre-tratadas con una mezcla de AdVACÍO+ AdCAGGFP (proporción 4:1, total de  $1 \times 10^3$  vp/célula), después se pusieron en contacto tres días post infección con anticuerpo anti-emmprin y con NHS al 50% durante 7 minutos después de lavados y fijación. Las células se observaron con DIC (izquierda) o por fluorescencia GFP (derecha).

La Fig. 10 panel B muestra células RPE primarias de ratón pre-tratadas como en la Fig. 10 panel A excepto con una mezcla de AdCAGCD59 + AdCAGGFP. El uso de AdCAGGFP reveló vesículas (Fig. 10 paneles A y B, flechas). Los datos muestran inhibición de vesiculación asociada a MAC por suministro mediado por adenovirus de hCD59.

La Fig. 11 es una serie de fotografías de tejidos diseccionados, y una serie de fotomicrografías de estos tejidos para analizar datos celulares.

La Fig. 11 panel A muestra tejidos de ojera pre-tratados durante seis días por inyección subretiniana de cualquier AdCAGCD59. Los tejidos se tiñeron por inmunohistoquímica para la expresión de CD59, y se detectó directamente la fluorescencia tisular de GFP. La Fig. 11 panel B muestra tejidos de ojera como en la Fig. 11 panel A, excepto que se pre-trataron con vector de control AdCAGGFP. La Fig. 11 panel C muestra tejidos de córnea recogidos de ratones y pre-tratados ex vivo durante tres días con cualquier AdCAGCD59. La Fig. 11 panel D muestra tejidos de córnea como en la Fig. 11 panel C excepto que se pre-trataron con vector de control AdCAGGFP.

Los datos de la Fig. 11 paneles A y C muestran expresión de CD59 humana por RPE murinas y endotelio de la córnea después de pre-tratamiento con AdCAGCD59. Las córneas pre-tratadas con AdCAGCD59 y AdCAGGFP se visualizaron con anticuerpo anti-CD59.

La Fig. 12 es una serie de fotografías, fotomicrografías y un gráfico de barras de datos de montajes en plano de ojerías de ojos pretratados por inyección con una mezcla de vectores de control AdVACÍO + AdCAGGFP, en la Fig. 12 panel A, y vectores AdCAGCD59 + AdCAGGFP en la Fig. 12 panel B (proporción 9:1,  $3 \times 10^8$  vp/célula). Las células se pusieron en contacto seis días post-inyección con el anticuerpo anti-emmprin de ratón seguido por NHS al 50% durante 15 minutos. GFP (izquierda en cada serie) muestra fluorescencia en el sitio de inyección (barra de longitud de 1 mm), y las fotomicrografías inferiores son dos aumentos del sitio de inyección (barras de longitud de 400  $\mu$ m y 100  $\mu$ m). MAC muestra tinción MAC con anticuerpo anti-C5b-9 humano, con fotomicrografías inferiores de aumentos del sitio de inyección (indicado por barras de longitud de 400  $\mu$ m y 100  $\mu$ m). La combinación es una superposición de las fotografías de tejido diseccionado de GFP y MAC (aumento de 1 mm).

Los datos de la Fig. 12 paneles A y B muestran que la inmunotinción MAC de tejidos de control pretratados con una mezcla de vectores de control es sustancial, y que MAC en células de control era significativamente más extensivo y más fuerte que MAC en la área de expresión de GFP en tejidos que reciben inyección de la mezcla de AdCAGCD59 y AdCAGGFP (Fig. 12 panel B). Se observó que las células RPE en el área de expresión de GFP de ojerías inyectadas de control estaban extensivamente dañadas indicado por la forma redondeada, la pérdida de morfología hexagonal normal y pérdida de bordes celulares definidos (Fig. 12 panel A fila central).

La inmunohistoquímica de la Fig. 12 panel B para MAC humano se redujo significativamente en RPE en el área de expresión de GFP, lo que se correlaciona con la expresión de CD59 humana en comparación con el resto del tejido de ojera. Se observó que las células RPE en esta área estaban sin dañar con bordes celulares definidos y morfología hexagonal normal.

Los gráficos de la Figura 12 panel C muestran tejidos de ojera en contacto con suero durante 7,5 minutos (gráfico de la izquierda) o 15 minutos (gráfico de la derecha). El suero fue HI-NHS (barras abiertas) o NHS (barras cerradas). Los cuatro tipos de tejidos: no inyectado/no pretratado con adenovirus y en contacto con HI-NHS (no inyectado,

barra abierta primera desde la izquierda), no inyectado/no pretratado con adenovirus y en contacto con NHS (no inyectado, barra cerrada segundo desde la izquierda), tejidos inyectados con una mezcla de adenovirus de control y contacto con NHS (VACÍO + GFP, barra cerrada segunda desde la derecha), tejidos inyectados con una mezcla de adenovirus AdCAGCD59 + AdCAGGFP y contacto con NHS (CD59 + GFP, barra cerrada primera desde la derecha). Los datos expresados como media  $\pm$  s.e.m. \* $p < 0,01$ , \*\* $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,0001$  muestran que en ambos periodos de tratamiento las células pretratadas con CD59 tenían niveles inferiores de MAC.

La Fig. 12 panel D es una serie de fotomicrografías de células RPE primarias inyectadas con una mezcla de vectores de control (AdVACÍO + AdCAGGFP), después tratadas con el anticuerpo anti-emmprin de ratón seguido por NHS al 50% durante 15 minutos a 37°C seis días post-inyección. Las imágenes son representativas de tres experimentos diferentes.

La Fig. 12 panel E muestra células RPE primarias como en la Fig. 12 panel D pero inyectadas con una mezcla de vectores de expresión de hCD59 (AdCAGCD59 + AdCAGGFP). Se observó una deposición de MAC significativamente menor que en las células comparables de la Fig. 12 panel D.

La Fig. 13 panel A es un gráfico que muestra la cuantificación de la inmunofluorescencia MAC en el área de expresión de GFP con la intensidad de fluorescencia de MAC en la ordenada y la naturaleza del material inyectado con el cual se pretrataron las células RPE en la abscisa. Las células de control en contacto con NHS tienen una intensidad de fluorescencia de MAC entre 5.000 y 15.000, con una media de aproximadamente 10.000. En contraste, las células de control en contacto con HI-NHS tienen una intensidad de fluorescencia de MAC de menos que 2.500. Las células RPE pretratadas con una mezcla de AdVACÍO y AdCAGGFP y en contacto con NHS tienen una intensidad de fluorescencia de MAC entre 6.000 y 10.000, con una media de aproximadamente 9.000. Las células RPE pretratadas con una mezcla de AdCAGCD59 y AdCAGGFP y en contacto con NHS tienen una intensidad de fluorescencia de MAC entre 2.000 y 11.000, con una media menor que 5.000 debido a un punto fuera de los límites. Estos datos muestran una reducción global de aproximadamente el 55% en la intensidad de fluorescencia media de MAC para tejidos de ojera inyectados con AdCAGCD59 y AdCAGGFP ( $n = 10$ ) en comparación con tejidos de ojera inyectados con control ( $n = 10$ ), lo que fue estadísticamente significativo ( $p = 0,0014$ , Fig. 13 panel A).

La Fig. 13 panel B es un gráfico de líneas de cuantificación de intensidad de fluorescencia en el sitio de inyección (ordenada) de tejidos de ojera individuales (abscisa). Se muestran tanto la fluorescencia GFP como la intensidad de inmunofluorescencia MAC en el área de expresión de GFP para ojerías de ojos inyectados con mezclas de vectores de control (AdVACÍO + AdCAGGFP, izquierda) o vector de expresión de hCD59 (AdCAGCD59 + AdCAGGFP, derecha). Se indica la longitud de tratamiento con suero. Los datos puntuales son la intensidad de fluorescencia de GFP o MAC de una ojera, dispuestos de izquierda a derecha en orden de intensidad de fluorescencia GFP creciente. Las líneas son las medias para cada serie de datos. Se observó una relación inversa entre las intensidades de fluorescencia de GFP y MAC en las ojerías pretratadas con AdCAGCD59 + AdCAGGFP en contacto con NHS. El símbolo N.S. significa que las diferencias no son estadísticamente significativas.

La Fig. 14 es una serie de fotografías y fotomicrografías que muestran datos de inmunohistoquímica para células RPE pretratadas con mezcla de control de AdVACÍO y AdCAGGFP (Fig. 14 panel A) o una mezcla de AdCAGCD59 y AdCAGGFP (Fig. 14 panel B). Seis días post-infección con las mezclas indicadas de adenovirus, las células se pusieron en contacto con el primer anticuerpo de cabra primario anti-emmprin de ratón seguido por el primer anticuerpo de burro secundario conjugado con Cy3 anti-IgG de cabra. GFP muestra fluorescencia en el sitio de inyección, y debajo hay dos aumentos en el sitio de inyección. Emmpirin muestra inmunofluorescencia emmpirin, y dos aumentos en el sitio de inyección. La combinación es una superposición de GFP y emmpirin. Las imágenes son representativas de tres experimentos diferentes. Los datos en la Fig. 14 paneles A y B no muestran diferencia significativa en la inmunofluorescencia emmpirin entre el área de expresión de transgén y el resto de la ojera u ojerías no inyectadas.

La Fig. 14 panel C muestra datos para células RPE pretratadas por inyección con AdCAGGFP. Tres días después las células se pusieron en contacto con el primer anticuerpo de cabra primario anti-emmprin de ratón seguido por el primer anticuerpo de burro secundario conjugado con Cy3 anti-IgG de cabra, se lavaron, se fijaron, y se incubaron con el segundo anticuerpo de ratón primario anti-hCD59 seguido por el segundo anticuerpo de cabra secundario conjugado con Cy2 anti-IgG de ratón. Los núcleos celulares se marcaron con DAPI y se visualizaron por DIC, GFP, y Emmpirin. Las imágenes son representativas de tres experimentos diferentes.

La Fig. 14 panel D muestra resultados para células RPE pretratadas por inyección como en la Fig. 14 panel C excepto que con AdCAGCD59, y la inmunohistoquímica fue como anteriormente. Los datos en la Fig. 14 paneles C y D muestran que no se observó cambio significativo en emmpirin debido a la expresión de hCD59 (comparado con GFP).

La Fig. 15 es un gráfico de barras que muestra la inmunofluorescencia emmpirin (ordenada) por células RPE que se pretrataron con vectores (que se muestran en la abscisa) antes de la inmunotinción con emmpirin. Las células RPE mostradas eran de control no pretratadas (barra de la izquierda), pretratadas con una mezcla de vectores de control

(VACÍO + AdCAGGFP; barra central), y una mezcla de vector de expresión de hCD59 y GFP (CD59 + GFP, barra de la derecha). Para cada grupo, se cuantificaron 12 imágenes (adquiridas con un objetivo 40X) de tres ojerías. El gráfico incluye datos obtenidos de experimentos mostrados en la Fig. 14 paneles A y B. Los datos se expresan como medias  $\pm$  s.e.m. Los datos muestran que no hubo efecto sobre la tinción con emmprin por los pretratamientos.

La Fig. 16 es una serie de fotografías de células RPE primarias de ratón tres días después de pretratamiento. Las células RPE se pretrataron con AdCAGGFP (columna de la izquierda) o con AdCAGCD59 (columna de la derecha). Se observó que la pigmentación de células RPE pretratadas con AdCAGGFP (fotografía BF, columna de la izquierda) era similar a la pigmentación de células pretratadas con AdCAGCD59 (fotografía BF, columna de la derecha). Las células RPE pretratadas con AdCAGGFP y teñidas con DAPI mostraron la misma cantidad de fluorescencia (fotografía DAPI, columna de la izquierda) en comparación con células RPE pretratadas con AdCAGCD59 y teñidas con DAPI (fotografía DAPI, columna de la derecha). Las células RPE pretratadas con AdCAGGFP mostraron fluorescencia verde significativamente mayor (fotografía GFP, columna de la izquierda) en comparación con células RPE pretratadas con AdCAGCD59 (fotografía GFP, columna de la derecha). Las células RPE pretratadas con AdCAGGFP seguido por anticuerpo anti-emmprin de ratón y NHS mostraron inmunofluorescencia MAC significativamente mayor (fotografía MAC, columna de la izquierda) en comparación con células RPE pretratadas con AdCAGCD59 seguido por el mismo tratamiento anti-emmprin de ratón y NHS y detectadas por anticuerpo anti-MAC humano (fotografía MAC, columna de la derecha).

La Fig. 17 panel A es una serie de fotografías que muestran una sección de una córnea pretratada con un control AdCAGGFP y seguido por anticuerpo anti-emmprin de ratón y NHS. La fotografía marcada MAC muestra la inmunotinción MAC con anticuerpo anti-MAC sobre el endotelio de esta córnea. La fotografía marcada GFP muestra fluorescencia GFP sobre el endotelio de la córnea. La fotografía marcada DAPI muestra fluorescencia de ADN marcado de las células de la córnea. La fotografía marcada combinación muestra una superposición de las fotografías anteriores.

La Fig. 17 panel B es una serie de fotografías que muestran células pretratadas con AdCAGCD59 seguido por el mismo tratamiento anti-emmprin de ratón y NHS que la córnea de la Fig. 17 panel A. La fotografía marcada MAC muestra inmunotinción MAC sobre el endotelio de esta córnea. La fotografía marcada GFP muestra ausencia de fluorescencia GFP por estas células. La fotografía marcada DAPI muestra fluorescencia de ADN marcado de las células de la córnea. La fotografía marcada combinación muestra una superposición de las fotografías anteriores.

La Fig. 17 panel C es una serie de fotografías que muestran células pretratadas con un control AdCAGGFP. La fotografía marcada emmprin muestra inmunotinción de anticuerpo emmprin de estas células. La fotografía marcada GFP muestra fluorescencia GFP directa por estas células. La fotografía marcada DAPI muestra fluorescencia de ADN marcado de estas células. La fotografía marcada combinación muestra una superposición de las fotografías anteriores.

La Fig. 17 panel D es una serie de fotografías que muestran células pretratadas con AdCAGCD59. La fotografía marcada emmprin muestra inmunotinción de anticuerpo emmprin de estas células. La fotografía marcada GFP muestra fluorescencia GFP directa por estas células. La fotografía marcada DAPI muestra fluorescencia de ADN marcado de estas células. La fotografía marcada combinación muestra una superposición de las fotografías anteriores.

Estas fotografías muestran que la protección contra MAC sobre el endotelio de la córnea de córneas pretratadas con AdCAGCD59 (Fig. 17 paneles B y D) no se debía a una diferencia en la expresión de emmprin o la unión de anticuerpo anti-emmprin, ya que la inmunohistoquímica no mostró diferencias en la inmunotinción emmprin del endotelio de la córnea entre córneas en contacto con AdCAGCD59 y AdCAGGFP (Fig. 17 panel C, fotografía emmprin comparada con la Fig. 17 panel D, fotografía emmprin). Estas fotografías muestran adicionalmente reducción significativa en la inmunotinción MAC sobre el endotelio de la córnea de córneas pretratadas con AdCAGCD59 (Fig. 17 panel B, fotografía MAC) en comparación con inmunotinción MAC sobre el endotelio de la córnea de córneas pretratadas con AdCAGGFP (Fig. 17 panel A, fotografía MAC).

La Fig. 18 es una serie de fotografías y gráficos de barras de córneas inyectadas ex vivo con vectores AdCAGGFP o AdCAGCD9 y tratadas con o sin anticuerpo emmprin y NHS o HI-NHS, mostrando los gráficos de barras cada intensidad de fluorescencia de de MAC y emmprin.

La Fig. 18 panel A muestra emmprin en córneas de control no pretratadas con vector y en contacto con anticuerpo anti-emmprin de ratón y después con NHS (fila superior) o HI-NHS (fila inferior). Se observó la tinción con MAC (rojo en el original no mostrado aquí), DAPI (azul en el original) y DIC para estas córneas. Se observó inmunotinción brillante con MAC en endotelios de córnea de las córneas tratadas con NHS y tinción mínima en los endotelios de córnea tratados con HI-NHS.

La Fig. 18 panel B muestra un análisis inmunohistoquímico similar al de la Fig. 18 panel A, pero de córneas pretratadas durante tres días con adenovirus AdCAGGFP o AdCAGCD59 (fila superior y fila inferior respectivamente,  $1,5 \times 10^9$  vp). No se observó expresión de CD59 para las córneas pretratadas con el adenovirus



AdCAGGFP (parte superior), y se observó fuerte expresión de CD59 para córneas pretratadas con adenovirus adCADCD59 (parte inferior).

La Fig. 18 panel C muestra córneas pretratadas con adenovirus AdCAGGFP (parte superior) o AdCAGCD59 (parte inferior), tratadas con 25 µg/ml de anticuerpo de cabra anti-emmprin de ratón y con NHS (fila superior) o HI-NHS (parte inferior). El gráfico de barras en la Fig. 18 panel C muestra cuantificación de inmunofluorescencia MAC (ordenada) sobre el endotelio de la córnea de doce secciones de cuatro grupos de córneas en cada grupo pretratado con o sin adenovirus (abscisa). Los grupos incluyen: córneas de control (no pretratadas, indicado no infectadas en la figura) que se pusieron en contacto con suero, (AdCAGGFP) córneas pretratadas con adenovirus AdCAGGFP antes del contacto con suero, y (AdCAGCD59) córneas pretratadas con adenovirus AdCAGCD59 antes del contacto con suero. Los grupos de córneas después se expusieron a NHS (barras sólidas) o HI-NHS (barras abiertas). El gráfico incluye datos mostrados en la Fig. 18 paneles A y C. Se observó tinción MAC extensiva para córneas pretratadas con adenovirus AdCAGGFP y en contacto con NHS. \*\*\* $p < 0,0001$ , N.S., no significativo. Los datos muestran que MAC en córneas pretratadas con CD59 es tan bajo como el de córneas de control.

La Fig. 18 panel D muestra córneas pretratadas con adenovirus AdCAGGFP (fila superior) o AdCAGCD59 (fila inferior), y tratadas solamente con anticuerpo de cabra anti-emmprin de ratón. Estas córneas no se trataron con NHS o HI-NHS como en la Fig. 18 panel C. Se muestra la expresión de emmprin, la fluorescencia GFP, la tinción DAPI y DIC para estas córneas a aumento 300 pm. El gráfico de barras en la Fig. 18 panel D muestra la cuantificación de inmunofluorescencia MAC (ordenada) sobre el endotelio de la córnea de doce secciones de cuatro grupos de córneas en cada grupo pretratado con o sin vectores (abscisa). Los grupos incluyen: córneas no pretratadas con un vector antes de contacto con NHS (indicado no infectadas), córneas pretratadas con adenovirus AdCAGGFP antes de tratamiento con NHS, y (AdCAGCD59) córneas pretratadas con adenovirus AdCAGCD59 antes de tratamiento con NHS. El gráfico comprende datos de experimentos mostrados en la Fig. 18 panel D y datos no mostrados. Se marcaron los núcleos celulares sobre todas las secciones de córnea con DAPI. Todas las imágenes son representativas de secciones obtenidas de cuatro córneas para cada grupo de infección o tratamiento. N.S., no significativo. Los datos no muestran diferencias significativas en emmprin entre los grupos de córneas.

La Fig. 19 es una fotografía de una transferencia de western de células pretratadas con cada uno de una diversidad de vectores indicados, con muestras visualizadas con anticuerpo anti-Cd59. Se observó CD59 humano en una muestra de medios no filtrados de células pretratadas con AdCAG<sub>s</sub>CD59 (banda oscura a aproximadamente 16 kD, segundo canal desde la derecha indicado CAG<sub>s</sub>CD59), un vector que expresa un CD59 soluble del cual se había eliminado el enlazador de glucosil fosfatidil inositol (GPI). Por tanto se construyó AdCAG<sub>s</sub>CD59 para expresar una versión soluble y secretada de la construcción de CD59 usada en ejemplos anteriores que está asociada a membrana (AdCAGCD59/lisado, primero canal en la derecha). Los marcadores de peso molecular (6 a 148 kDa) se muestran en el canal de la izquierda. Las células se pretrataron con plásmidos (indicado p) o vectores adenovirales (indicado Ad). Los controles fueron células no pretratadas con plásmidos o vectores (indicado no infectadas), pretratadas con la construcción CD59 unida a membrana (CAGCD59), o pretratadas con construcción de expresión de GFP (CAGGFP). Las muestras se tomaron de medios que después se filtraron usando un filtro de 100 kDa, o un filtro de 0,2 µm, o eran medios no filtrados, o eran lisados. No se detectó señal CD59 en lisados de células no pretratadas (sexto canal desde la izquierda).

#### Descripción detallada

El análisis de polimorfismos en varias proteínas reguladoras del complemento incluyendo el factor H ha implicado el complemento hiper-activo en las patogénesis de AMD (Hageman et al. Proc Natl Acad Sci USA, 102:7227 - 7232, 2005; Klein et al. Science, 308:385 - 389, 2005; y Haines et al., Science, 308:419 - 421, 2005; Edwards et al., Science, 308:421 - 424, 2005). El análisis inmunohistoquímico de drusas, que son depósitos amarillos bajo la retina, y el epitelio de pigmento retiniano (RPE) de pacientes con AMD indicó la presencia de una diversidad de proteínas de complemento incluyendo el complejo de ataque a membrana (MAC). Sin embargo, las diferencias entre especies entre sistemas del complemento humano y no humano han limitado la capacidad de ensayar la eficacia de proteínas reguladoras del complemento humano en sistemas no humanos *in vivo*.

En este documento se proporciona un modelo murino humanizado para medir la deposición de MAC humano *in vitro* e *in vivo*. Los ejemplos en este documento usan este modelo para medir la protección por CD59 humana de RPE murino, la capa celular pigmentada justo fuera de la retina neurosensorial que nutre las células visuales de la retina, del ataque por MAC humano. Usando este modelo, se descubrió que la expresión local de la proteína reguladora del complemento humano CD59 suministrada de forma exógena protegía el RPE de la deposición de MAC humano *in vivo*. Dicha protección del RPE por CD59 indica que esta protección puede evitar o tratar la AMD. El modelo humanizado de deposición de MAC sobre la retina murina permite un ensayo seguro y rápido de proteínas del complemento humano *in vivo*.

El sistema del complemento, un componente del sistema inmune global de un organismo, es una cascada bioquímica que ayuda a eliminar patógenos dentro de un organismo. El sistema del complemento incluye varias proteínas pequeñas halladas en circulación en la sangre, habitualmente como zimógenos inactivos. Estimuladas por uno de varios activadores, las proteasas en el sistema escinden proteínas específicas para liberar citoquinas e iniciar

una cascada amplificada de escisiones adicionales. La activación de esta cascada bioquímica provoca la activación de MAC, una función para eliminar patógenos.

El sistema del complemento se clasifica en una serie de vías activadas de forma diferente: la vía clásica del complemento, la vía alternativa del complemento, y la vía de lectinas de unión a manosa. Estas vías generan variantes homólogas de una proteasa, la C3-convertasa. La vía clásica del complemento típicamente implica anticuerpos para activación (respuesta inmune específica), mientras que las vías alternativa y de lectina de unión a manosa se activan por hidrólisis de C3 o antígenos sin la presencia de anticuerpos (respuesta inmune no específica).

En estas vías, una C3-convertasa escinde y activa el componente C3, creando C3a y C3b y causando una cascada de escisión adicional y eventos de activación. Uno de dichos eventos de activación inicia el componente C5b. La activación de C5b inicia la vía de ataque a la membrana, que provoca la formación de MAC, un producto final citolítico de la cascada del complemento que forma un canal transmembrana y causa lisis osmótica de células diana.

MAC se forma por ejemplo, sobre la superficie de células bacterianas patógenas intrusas como resultado de la activación del sistema del complemento. MAC es un complejo de cuatro proteínas del sistema del complemento (C5b, C6, C7, y C8) que se unen a la superficie exterior de una membrana plasmática de una célula diana, y con una quinta proteína (C9) que se une posteriormente (Sims et al., número de patente de Estados Unidos 7.166.568). Las proteínas del complemento se unen juntas en una conformación tal que una cara externa de las proteínas es hidrófoba y se asocia con la bicapa lipídica de la membrana de la célula diana, mientras una cara interna es hidrófila, permitiendo el paso de agua a través de la célula. Las proteínas forman un anillo a través de la membrana de la célula y la estructura anular actúa como un túnel a través de la membrana, permitiendo la difusión libre de moléculas a través de la célula, lo que altera el medio ambiente interno de la célula eliminándola rápidamente.

#### Proteína CD59

Los datos de los Ejemplos en este documento muestran que CD59 actúa inhibiendo MAC, evitando la lisis de las células de la retina. CD59 es una glucoproteína unida a membrana encontrada asociada con membranas de células incluyendo eritrocitos, linfocitos, y células del endotelio vascular humano. La proteína CD59 inhibe el ensamblaje de MAC funcionales y así protege a las células de la activación mediada por el complemento y/o la lisis.

Sin el deseo de limitarse a teoría o mecanismo de acción alguno, aquí se concibe que las membranas plasmáticas de las células normalmente están protegidas de los efectos del complemento por proteínas de superficie celular, por ejemplo, CD59, que inhibe específicamente la activación del poro C5b-9 tras la unión de la proteína del complemento C9 a C5b-8 de membrana (Holguin, et al., J. Clin. Invest. 84, 7 17, 1989; Sims et al., J. Biol. Chem. 264, 19228 19235, 1989; Davies, et al., J. Exp. Med. 170, 637 654, 1989; Rollins et al. J. Immunol. 144, 3478 3483, 1990; y Hamilton et al., Blood 76, 2572 2577, 1990). CD59 parece funcionar por competición con la proteína del complemento C9 por la unión a la proteína del complemento C8 en el complejo C5b-8, disminuyendo de este modo o evitando la formación del complejo de ataque a membrana C5b-9 (Rollins et al., 1990). CD59 por tanto actúa reduciendo tanto la activación celular como la lisis celular por MAC terminales del complemento.

La proteína CD59 humana madura está compuesta por 77 aminoácidos y tiene un peso molecular de 18 kD. La proteína CD59 humana precursora tiene un peso molecular de 21 kD. Las secuencias de aminoácidos de CD59 humana precursora, una CD59 humana madura, y CD59 de otros mamíferos, por ejemplo, babuino, mono verde africano, mico nocturno, tití, HVS-15, cerdo, conejo, rata, y ratón, se muestran en Sims et al. (patente de Estados Unidos número 7.166.568, expedida el 23 de enero de 2007).

La estructura proteica de CD59 se caracteriza como un único dominio rico en cisteínas, que tiene un núcleo hidrófobo con tres bucles y un pequeño cuarto bucle helicoidal (Yu et al., Journal de Experimental Medicine, 185(4):745 - 753, 1997). Pares de cisteína unidos por disulfuro conectan cada uno de estos bucles (Yu et al., 1997).

La estructura del gen que codifica CD59 se ha caracterizado (Fodor et al. patente de Estados Unidos número 5.624.837, expedida el 29 de abril de 1997). El gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 11 en seres humanos, específicamente el cromosoma 11p13 y 11p14 (número de acceso del Online Mendelian Inheritance in Man and107271), y consta de 4 exones que abarcan 20 kb (Petranka et al. Proc. Nat. Acad. Sci. 89:7876 - 7879, 1992). Un primer exón no traducido está precedido por una G y una región promotora rica a C que carece de un motivo TATA o CAAT consenso. El segundo exón codifica la secuencia líder hidrófoba de la proteína, y el tercer exón codifica la parte N-terminal de la proteína madura. El cuarto exón codifica el resto de la proteína madura, incluyendo la secuencia hidrófoba para la unión por anclaje glucosfosfoinositol a una membrana celular.

El análisis de la asociación física de CD59 con componentes de MAC muestra que hay diferentes sitios de unión para CD59 contenidos dentro de las cadenas  $\alpha$  de cada uno de C8 humano y C9 humano (Sims et al.). Se ha identificado el sitio de unión para interacciones de CD59 humana con C9 humano como los restos aminoácidos 42 a 58 en la secuencia de CD59 humana madura, que se une a la región de C9 humano correspondiente a los restos aminoácidos humanos 334 a 418 de esa proteína, más particularmente los restos aminoácidos de C9 humano

359 a 384, inmediatamente C-terminales al dominio de inserción en membrana predicho de C9 (documento PCT/US96/17940 "C9 Complement Inhibitor" de Oklahoma Medical Research Foundation; Sims et al.).

Las cadenas laterales de los restos aminoacídicos activos expuestos en superficie que están disponibles para unirse a C8/C9, identificados a partir de la estructura en solución de CD59 humana madura de los datos de RMN publicados y el conocimiento de la parte activa de la molécula CD59, son histidina en la posición 44, asparagina en la posición 48, ácido aspártico en la posición 49, treonina en las posiciones 51 y 52, arginina en la posición 55, y ácido glutámico en la posición 58. Las estructuras de RMN para CD59 se describen en depósitos de Kieffer et al., Human Complement Regulatory Protein CD59 (Extracellular Region, Residues 1 70; NMR, 10 Structures), MMDB Id: 891, PDB Id: 1ERH; Kieffer et al., Human Complement Regulatory Protein CD59 (Extracellular Region, Residues 1 70; RMN, Restrained), MMDB Id: 890, PDB Id: 1ERG; Fletcher et al., CD59 Complexed With Glnac-Beta-1,4-(Fuc-Alpha-1,6)-Glnac-Beta-1 (NMR, 10 Structures), MMDB Id: 498, PDB Id: 1CDS; Fletcher et al., CD59 Complexed With Glnac-Beta-1,4-Glnac-Beta- (NMR, 10 Structures), MMDB Id: 497, PDB Id: 1CDR. Los depósitos 1CDS y 1CDR de Fletcher et al. Las secuencias de aminoácidos de CD59 que presentan estas cadenas laterales a las mismas posiciones relativas funcionan de una manera similar a CD59 humana (Sims et al.), y dichas variantes están dentro del alcance de los métodos, kits y composiciones farmacéuticas de este documento.

Por tanto, en ciertas realizaciones, la proteína CD59 incluye modificaciones conservativas de secuencia. Como se usa en este documento, la expresión "modificaciones conservativas de secuencia" se refiere a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de la proteína CD59 que contiene la secuencia de aminoácidos, es decir, secuencias de aminoácidos de CD59 que presentan estas cadenas laterales en las mismas posiciones relativas funcionarán de una manera similar a CD59 humana. Dichas modificaciones conservativas incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. La modificación de la secuencia de aminoácidos de CD59 se consigue usando cualquier técnica conocida en la técnica, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis basada en PCR. Dichas técnicas se describen en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY, 1989 y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1989.

Las sustituciones conservativas de aminoácidos son aquellas en que el resto aminoacídico se reemplaza con un resto aminoacídico que tiene una cadena lateral similar. Las familias de restos aminoacídicos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales con ramificación beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de CD59 es una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la de la secuencia de tipo silvestre. La expresión "sustancialmente idéntica" se usa en este documento para hacer referencia a una primera secuencia de aminoácidos que contiene una cantidad suficiente o mínima de restos aminoacídicos que son idénticos a restos aminoacídicos alineados en una segunda secuencia de aminoácidos de modo que la primera y segunda secuencias de aminoácidos pueden tener un dominio estructural común y/o actividad funcional común. Por ejemplo, secuencias de aminoácidos que contienen un dominio estructural común tienen al menos aproximadamente un 95%, 96%, 98%, o 99% de identidad.

Los cálculos de identidad de secuencia entre secuencias se realizan del siguiente modo. Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos, las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en uno o las dos de una primera y una segunda secuencias de aminoácidos para una alineación óptima). Los restos aminoacídicos en posiciones de aminoácido o posiciones de nucleótido correspondientes se comparan después. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto aminoacídico o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las proteínas son idénticas a esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta la cantidad de huecos, y la longitud de cada hueco, que tienen que introducirse para una óptima alineación de las dos secuencias.

La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad de entre dos secuencias se consiguen usando un algoritmo matemático. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando un programa de software de alineación usando los parámetros por defecto. Los programas adecuados incluyen, por ejemplo, CLUSTAL W de Thompson et al., Nuc. Acids Research 22:4673, 1994 ([www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)), BL2SEQ de Tatusova y Madden, FEMS Microbiol. Lett. 174:247, 1999 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html)), SAGA de Notredame y Higgins, Nuc. Acids Research 24:1515, 1996 ([igs-server.cnrs-mres.fr/~cnotred](http://igs-server.cnrs-mres.fr/~cnotred)), y DIALIGN de Morgenstern et al., Bioinformatics 14:290, 1998 ([bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign](http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign)).

Vectores

En diversas realizaciones de la invención de este documento, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en un método para el tratamiento de AMD, incluyendo el método poner en contacto células o tejido con una composición farmacéutica que incluye una fuente de proteína CD59 o como un fuente de expresión de CD59 in vivo. Por ejemplo, la proteína CD59 se administra como una proteína producida de forma recombinante. El término "recombinante" se refiere a proteínas producidas por manipulación de organismos modificados genéticamente, por ejemplo, microorganismos.

De acuerdo con la presente invención un fuente de CD59 incluye secuencias polinucleotídicas que codifican la proteína CD59, por ejemplo, modificadas por ingeniería en moléculas de ADN recombinantes para la expresión directa de la proteína CD59 en células hospedadoras adecuadas. Para expresar una proteína CD59 biológicamente activa, se inserta una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína CD59, o equivalente funcional, en un vector de expresión adecuado, es decir, un vector que contiene los elementos codificantes de ácido nucleico necesarios que regulan la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada, unidos de forma funcional a la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína CD59.

Se usan métodos que son bien conocidos para los especialistas en la técnica para construir vectores de expresión que contienen una secuencia codificante de la proteína CD59 unida de forma funcional a elementos adecuados de control de la transcripción y la traducción. Estos métodos incluyen técnicas *in vitro* de ADN recombinante, técnicas sintéticas y recombinación *in vivo* o recombinación genética. Dichas técnicas se describen en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY, 1989.

Es útil una diversidad de sistemas de vector de expresión/hospedador disponibles en el mercado para contener y expresar una secuencia codificante de la proteína CD59. Estos incluyen, aunque sin limitación, microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, plásmido o cósmico; levaduras transformadas con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insecto en contacto con vectores de expresión viral (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células vegetales transfectados con vectores de expresión viral (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, plásmido Ti, pBR322, o pET25b); o sistemas de células animales. Véase Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1989.

Los vectores virales incluyen, aunque sin limitación, vectores adenovirales, vectores lentivirales, vectores de virus adeno-asociados (AAV), y vectores adenovirales dependientes de auxiliar. Los vectores virales suministran una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína CD59 que como se muestra en este documento impide la acción perjudicial del MAC en la patogénesis de AMD. Los vectores adenovirales de empaquetado están disponibles en el mercado en la American Type Tissue Culture Collection (Manassas, VA). Los métodos para construir vectores adenovirales y usar vectores adenovirales se muestran en Klein et al., Ophthalmology, 114:253 - 262, 2007 y van Leeuwen et al., Eur. J. Epidemiol., 18:845 - 854, 2003.

Los vectores adenovirales se han usado en expresión génica eucariota (Levrero et al., Gene, 101:195 - 202, 1991) y desarrollo de vacunas (Graham et al., Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocols 7, (Murray, Ed.), Humana Press, Clifton, NJ, 109 - 128, 1991). Además, se usan vectores adenovirales recombinantes para terapia génica (Wu et al., patente de Estados Unidos número 7.235.391).

Los vectores adenovirales recombinantes se generan, por ejemplo, a partir de recombinación homóloga entre un vector lanzadera y un vector proviral (Wu et al., patente de Estados Unidos número 7.235.391). Los vectores adenovirales en este documento son defectuosos en la replicación, por ejemplo, son condicionalmente defectuosos, careciendo de la región adenoviral E1, y se introduce un polinucleótido que codifica CD59 en la posición de la cual se han eliminado las secuencias codificantes de E1. El polinucleótido que codifica el gen de CD59 como alternativa se inserta en la región E3, o se inserta en una región E4 usando una línea celular auxiliar.

Las líneas celulares auxiliares pueden obtenerse de células humanas tales como células de riñón embrionario humano 293, células musculares, células hematopoyéticas u otras células mesenquimáticas o epiteliales embrionarias humanas. Como alternativa, las células auxiliares pueden obtenerse de las células de otras especies de mamífero que son permisivas para adenovirus humanos, por ejemplo, células Vero u otras células mesenquimáticas o epiteliales embrionarias de mono. La generación y propagación de estos vectores adenovirales defectuosos en la replicación que usan una línea celular auxiliar se describe en Graham et al., J. Gen. Virol., 36:59 - 72, 1977.

Están disponibles en el mercado vectores lentivirales de empaquetado en Invitrogen Corporation (Carlsbad CA). Un sistema de empaquetado basado en VIH para la producción de vectores lentivirales se prepara usando construcciones de Naldini et al., Science 272: 263 - 267, 1996; Zufferey et al., Nature Biotechnol., 15: 871 - 875, 1997; y Dull et al., J. Virol. 72: 8463 - 8471, 1998.

Están disponibles varias construcciones de vector para empaquetarse usando un sistema basado en la estructura de vector SIN lentiviral de tercera generación (Dull et al., J. Virol. 72: 8463 - 8471, 1998). Por ejemplo la construcción de vector pRRLsinCMVGFPpre contiene una LTR 5' en que se ha remplazado la secuencia promotora de VIH con la del virus del sarcoma de Rous (RSV), una LTR 3' de auto-activación que contiene una delección en la región promotora U3, la señal de empaquetamiento del VIH, secuencias RRE unidas a un casete de gen de marcador que consta de la proteína fluorescente verde (GFP) de medusa *Aequora* dirigido por el promotor CMV, y el elemento PRE del virus de la hepatitis de la marmota canadiense, que parece potenciar la exportación nuclear. El gen de marcador de GFP permite la cuantificación de la eficacia de transfección o transducción por observación directa de microscopía de fluorescencia UV o citometría de flujo (Kafri et al., Nature Genet., 17: 314 - 317, 1997 y Sakoda et al., J. Mol. Cell. Cardiol., 31: 2037 - 2047, 1999).

La manipulación de ácidos nucleicos retrovirales para construir un vector retroviral que contenga el gen que codifica la proteína CD59 y empaquete las células se consigue usando técnicas conocidas en la técnica. Véase Ausubel, et al., 1992, Volumen 1, Sección III (unidades 9.10.1 - 9.14.3); Sambrook, et al., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Segunda Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Miller, et al., Biotechniques. 7:981 - 990, 1989; Eglitis, et al., Biotechniques. 6:608 - 614, 1988; patentes de Estados Unidos número 4.650.764, 4.861.719, 4.980.289, 5.122.767, y 5.124.263; y publicaciones de patente PCT número WO 85/05629, WO 89/07150, WO 90/02797, WO 90/02806, WO 90/13641, WO 92/05266, WO 92/07943, WO 92/14829, y WO 93/14188.

Un vector retroviral se construye y empaqueta en partículas virales de transducción no infecciosas (viriones) usando un sistema de empaquetado anfotrófico. Ejemplos de dichos sistemas de empaquetado se encuentran en, por ejemplo, Miller, et al., Mol. Cell Biol. 6:2895 - 2902, 1986; Markowitz, et al., J. Virol. 62:1120 - 1124, 1988; Cosset, et al., J. Virol. 64:1070 - 1078, 1990; patentes de Estados Unidos número 4.650.764, 4.861.719, 4.980.289, 5.122.767, y 5.124.263, y publicaciones de patente PCT número WO 85/05629, WO 89/07150, WO 90/02797, WO 90/02806, WO 90/13641, WO 92/05266, WO 92/07943, WO 92/14829, y WO 93/14188.

La generación de "células productoras" se consigue introduciendo vector retrovirales en las células de empaquetado. Ejemplos de dichos vectores retrovirales se encuentran en, por ejemplo, Korman, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:2150 - 2154, 1987; Morgenstern, et al., Nucleic Acids Res. 18:3587 - 3596, 1990; patentes de Estados Unidos número 4.405.712, 4.980.289, y 5.112.767; y publicaciones de patente PCT número WO 85/05629, WO 90/02797, y WO 92/07943.

Están disponibles en el mercado vectores de empaquetado de herpesvirus en Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA). Herpesvirus ejemplares son un  $\alpha$ -herpesvirus, tal como el virus *Varicella-Zoster* o el virus de la pseudo-rabia; un virus del herpes simple tal como HSV-1 o HSV-2; o un herpesvirus tal como el virus de Epstein-Barr. Un método para preparar partículas vacías de herpesvirus que se puedan empaquetar con un segmento deseado de nucleótidos, por ejemplo una secuencia de nucleótidos o polinucleotídica de CD59, en ausencia de un virus auxiliar que tenga las capacidades de la mayoría de los herpesvirus se muestra en Fraefel et al. (patente de Estados Unidos número 5.998.208, expedida el 7 de diciembre de 1999).

El vector de ADN de herpesvirus se puede construir usando técnicas conocidas para los especialistas en la técnica. Por ejemplo, los segmentos de ADN que codifican el genoma completo de un herpesvirus se dividen entre varios vectores capaces de portar segmentos de ADN grandes, por ejemplo, cósmidos (Evans, et al., Gene 79, 9 - 20, 1989), cromosomas artificiales de levadura (YACS) (Sambrook, J. et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) o plásmidos de elemento F de *E. coli* (O'Conner, et al., Science 244:1307 - 1313, 1989).

Por ejemplo, se han aislado series de cósmidos que contienen clones solapantes que representan los genomas completos de una diversidad de herpesvirus incluyendo el virus de Epstein-Barr, el virus *Varicella-Zoster*, el virus de la pseudo-rabia y HSV-1. Véase M. van Zijl et al., J. Virol. 62, 2191, 1988; Cohen, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 90, 7376, 1993; Tomkinson, et al., J. Virol. 67, 7298, 1993; y Cunningham et al., Virology 197, 116, 1993.

AAV es un parvovirus dependiente porque depende de la co-infección con otro virus (adenovirus o un miembro de la familia de herpesvirus) para experimentar una infección productiva en células cultivadas (Muzyczka, Curr Top Microbiol Immunol, 158:97 - 129, 1992). Por ejemplo, un virus AAV recombinante (rAAV) se prepara por co-transfección de un plásmido que contiene el gen de interés, por ejemplo, el gen de CD59, flanqueado por las dos repeticiones terminales de AAV (McLaughlin et al., J. Virol., 62(6):1963 - 1973, 1988; Samulski et al., J. Virol, 63:3822 - 3828, 1989) y un plásmido de expresión que contiene la secuencia codificante de AAV de tipo silvestre sin las repeticiones terminales. Las células también se ponen en contacto o se transfectan con adenovirus o plásmidos que portan los genes adenovirales necesarios para la función auxiliar de AAV. Las reservas de virus AAV recombinante preparadas de este modo incluyen adenovirus que se deben separarse físicamente de las partículas AAV recombinante (por ejemplo, por centrifugación en densidad de cloruro de cesio).

Los vectores de empaquetado de virus adeno-asociado (AAV) están disponibles en el mercado en GeneDetect (Auckland, Nueva Zelanda). El AAV ha demostrado tener alta frecuencia de integración e infecta células no en

división, haciéndolo de este modo útil para suministrar genes a células de mamífero en cultivo tisular (Muzyczka, Curr Top Microbiol Immunol, 158:97 129, 1992). El AAV tiene un amplio rango de hospedador para su infectividad (Tratschin et al., Mol. Cell. Biol., 4:2072 2081, 1984; Laughlin et al., J. Virol., 60(2):515 524, 1986; Lebkowski et al., Mol. Cell. Biol., 8(10):3988 3996, 1988; McLaughlin et al., J. Virol., 62(6):1963 1973, 1988).

Los métodos para construir vectores AAV y usar vectores AAV se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos número 5.139.941 y 4.797.368. El uso de AAV en el suministro de genes se describe adicionalmente en LaFace et al., Virology, 162(2):483 486, 1988; Zhou et al., Exp. Hematol, 21:928 933, 1993; Flotte et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 7(3):349 356, 1992; y Walsh et al., J. Clin. Invest, 94:1440 1448, 1994.

Los vectores AAV recombinantes se han usado satisfactoriamente para transducción *in vitro* e *in vivo* de genes marcadores (Kapliitt et al., Nat Genet., 8(2):148 54, 1994; Lebkowski et al., Mol. Cell. Biol., 8(10):3988 3996, 1988; Samulski et al., EMBO J., 10:3941 3950, 1991; Shelling y Smith, Gene Therapy, 1: 165 169, 1994; Yoder et al., Blood, 82 (Sup.): 1:347A, 1994; Zhou et al., Exp. Hematol, 21:928 933, 1993; Tratschin et al., Mol. Cell. Biol., 5:3258 3260, 1985; McLaughlin et al., J. Virol., 62(6):1963 1973, 1988) y la transducción de genes implicados en enfermedades humanas (Flotte et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 7(3):349 356, 1992; Ohi et al., Gene, 89(2):279 282, 1990; Walsh et al., J. Clin. Invest, 94:1440 1448, 1994; y Wei et al., Gene Therapy, 1:261 268, 1994).

#### Anticuerpos

La presente divulgación se refiere también a diagnosticar o pronosticar la presencia o progresión de degeneración macular determinando el grado de deposición de MAC sobre una retina por inmunohistoquímica, usando anticuerpos que son específicos para MAC humano. El término "anticuerpo" mencionado en este documento incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "parte de unión a antígeno") o cadenas individuales de éstos. Un "anticuerpo" de origen natural es una glucoproteína que incluye al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) inter-conectadas por enlaces disulfuro.

Como se usa en este documento, un anticuerpo que "se une específicamente a MAC humano" pretende hacer referencia a un anticuerpo que se une a MAC humano con una  $K_D$  de  $5 \times 10^{-9}$  M o menor,  $2 \times 10^{-9}$  M o menor, o  $1 \times 10^{-10}$  M o menor. Por ejemplo, el anticuerpo es monoclonal o policlonal. Los términos al., Ophthalmology, 114:253 - 262, 2007 y van Leeuwen et al., Eur. J. Epidemiol., 18:845 - 854, 2003.

Los vectores adenovirales se han usado en expresión génica eucariota (Levrero et al., Gene, 101:195 - 202, 1991) y desarrollo de vacunas (Graham et al., Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocols 7, (Murray, Ed.), Humana Press, Clifton, NJ, 109 - 128, 1991). Además, se usan vectores adenovirales recombinantes para terapia génica (Wu et al., patente de Estados Unidos número 7.235.391).

Los vectores adenovirales recombinantes se generan, por ejemplo, a partir de recombinación homóloga entre un vector lanzadera y un vector proviral (Wu et al., patente de Estados Unidos número 7.235.391). Los vectores adenovirales en este documento son defectuosos en la replicación, por ejemplo, son condicionalmente defectuosos, careciendo de la región adenoviral E1, y se introduce un polinucleótido que codifica CD59 en la posición de la cual se han eliminado las secuencias codificantes de E1. El polinucleótido que codifica el gen de CD59 como alternativa se inserta en la región E3, o se inserta en una región E4 usando una línea celular auxiliar.

Las líneas celulares auxiliares pueden obtenerse de células humanas tales como células de riñón embrionario humano 293, células musculares, células hematopoyéticas u otras células mesenquimáticas o epiteliales embrionarias humanas. Como alternativa, las células auxiliares pueden obtenerse de las células de otras especies de mamífero que son permisivas para adenovirus humanos, por ejemplo, células Vero u otras células mesenquimáticas o epiteliales embrionarias de mono. La generación y propagación de estos vectores adenovirales defectuosos en la replicación que usan una línea celular auxiliar se describe en Graham et al., J. Gen. Virol., 36:59 - 72, 1977.

Están disponibles en el mercado vectores lentivirales de empaquetado en Invitrogen Corporation (Carlsbad CA). Un sistema de empaquetado basado en VIH para la producción de vectores lentivirales se prepara usando construcciones de Naldini et al., Science 272: 263 - 267, 1996; Zufferey et al., Nature Biotechnol., 15: 871 - 875, 1997; y Dull et al., J. Virol. 72: 8463 - 8471, 1998.

Están disponibles varias construcciones de vector para empaquetarse usando un sistema basado en la estructura de vector SIN lentiviral de tercera generación (Dull et al., J. Virol. 72: 8463 - 8471, 1998). Por ejemplo la construcción de vector pRRLsinCMVGFPpre contiene una LTR 5' en que se ha remplazado la secuencia promotora de VIH con la del virus del sarcoma de Rous (RSV), una LTR 3' de auto-activación que contiene una delección en la región promotora U3, la señal de empaquetamiento del VIH, secuencias RRE unidas a un casete de gen de marcador que consta de la proteína fluorescente verde (GFP) de medusa *Aequora* dirigido por el promotor CMV, y el elemento PRE del virus de la hepatitis de la marmota canadiense, que parece potenciar la exportación nuclear. El gen de marcador de GFP permite la cuantificación de la eficacia de transfección o transducción por observación directa de microscopía de

fluorescencia UV o citometría de flujo (Kafri et al., Nature Genet., 17: 314 - 317, 1997 y Sakoda et al., J. Mol. Cell. Cardiol., 31: 2037 - 2047, 1999).

La manipulación de ácidos nucleicos retrovirales para construir un vector retroviral que contenga el gen que codifica la proteína CD59 y empaquete las células se consigue usando técnicas conocidas en la técnica. Véase Ausubel, et al., 1992, Volumen 1, Sección III (unidades 9.10.1 - 9.14.3); Sambrook, et al., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Segunda Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Miller, et al., Biotechniques. 7:981 - 990, 1989; Eglitis, et al., Biotechniques. 6:608 - 614, 1988; patentes de Estados Unidos número 4.650.764, 4.861.719, 4.980.289, 5.122.767, y 5.124.263; y publicaciones de patente PCT número WO 85/05629, WO se producen anticuerpos monoclonales reactivos a antígeno, incluyendo anticuerpos monoclonales IgG e IgM específicos de antígeno. Cualquier anticuerpo o fragmento del mismo que tenga afinidad y especificidad por MAC humano está dentro del alcance del ensayo para la deposición de MAC proporcionado en este documento.

#### Composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de la degeneración macular

Un aspecto de la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas especificadas en las reivindicaciones que incluyen una proteína CD59 o una fuente de expresión de la proteína CD59. En ciertas realizaciones, estas composiciones opcionalmente incluyen además uno o más agentes terapéuticos adicionales. En ciertas realizaciones, el agente o agentes terapéuticos adicionales se seleccionan entre el grupo que consiste en factores de crecimiento, agentes anti-inflamatorios, agentes vasopresor incluyendo, aunque sin limitación, óxido nítrico y bloqueantes de canales de calcio, inhibidores de colagenasa, esteroides tópicos, inhibidores de metaloproteínasa de matriz, ascorbato, angiotensina II, angiotensina III, calreticulina, tetraciclinas, fibronectina, colágeno, trombospondina, factor de crecimiento transformante (TGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento tipo insulina (IGF), proteínas de unión a IGF (IGFBP), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de diferenciación neu (NDF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), EGF de unión a heparina (HBEGF), trombospondinas, factor-C de von Willebrand, heparina y sulfatos de heparina, y ácido hialurónico.

En otras realizaciones, el agente adicional es un compuesto, composición, agente biológico o similar que potencia, estabiliza o sinergiza o incluso sustituye la capacidad de la proteína CD59 de proteger las células de la deposición de MAC. También se incluyen agentes terapéuticos que pueden proporcionarse de forma beneficiosa o conveniente al mismo tiempo que la proteína CD59, tales como agentes usados para tratar el mismo síntoma, afección o enfermedad, una concurrente o una relacionada. En algunas realizaciones, el fármaco puede incluir sin limitación agentes anti-tumores, antivirales, antibacterianos, antimicobacterianos, anti-fúngicos, anti-proliferativo o anti-apoptóticos. Los fármacos que se incluyen en las composiciones de la invención son bien conocidos en la técnica. Véase por ejemplo, Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9ª Ed., Hardman, et al., eds., McGraw-Hill, 1996.

Como se usa en este documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, diluyentes, u otros vehículos líquidos, auxiliares de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, adaptados para la forma de dosificación particular deseada. Remington's Pharmaceutical Sciences Ed, de Gennaro, Mack Publishing, Easton, PA, 1995 proporciona diversos vehículos usados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de las mismas. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque sin limitación, azúcares tales como glucosa y sacarosa; excipientes tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz, y aceite de soja; glicoles tales un propilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido alginico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; y soluciones de tampón fosfato, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos tales como lauril sulfato sódico y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, conservantes y antioxidantes pueden estar presentes en la composición, de acuerdo con el criterio del formulador.

#### Dosis terapéuticamente eficaz

El tratamiento de AMD por métodos proporcionados en este documento implica poner en contacto células pigmentadas de la retina con una composición farmacéutica, por ejemplo, administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que tiene como agentes activos una proteína CD59 o una fuente de expresión de una proteína CD59, a un sujeto que lo necesite, en cantidades tales y durante un tiempo tal necesario para conseguir el resultado deseado.

Las composiciones, de acuerdo con el método de la presente invención, pueden administrarse usando cualquier cantidad y cualquier vía de administración eficaz para tratar AMD. Por tanto, la expresión "cantidad eficaz para tratar

AMD", como se usa en este documento, se refiere a una cantidad suficiente de composición para evitar de forma beneficiosa o mejorar los síntomas de AMD.

La dosificación exacta se elige por el médico individual en vista del paciente a tratar. La dosificación y administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del agente o agentes activos o para mantener el efecto deseado.

Factores adicionales que pueden tenerse en cuenta incluyen la gravedad de la patología, por ejemplo, fase intermedia o avanzada de AMD; edad, peso y género del paciente; dieta, tiempo y frecuencia de administración; vía de administración; combinaciones de fármacos; sensibilidad de reacción; y tolerancia/respuesta a la terapia. Podrían administrarse composiciones farmacéuticas de larga acción oralmente cada hora, cada dos horas, cada 3 a cuatro horas, diariamente, cada dos días, cada 3 a 4 días, cada semana, o una vez cada dos semanas dependiendo de la semivida y tasa de eliminación de la composición particular.

Los agentes activos de la invención se formulan preferiblemente en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de dosificación. La expresión "forma unitaria de dosificación" como se usa en este documento se refiere a una unidad físicamente concreta de agente activo apropiada para el paciente a tratar. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de las composiciones de la presente invención se decidirá por el médico asistente dentro del alcance del criterio médico razonable. Para cualquier agente activo, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, como se proporciona en este documento, habitualmente ratones, pero también potencialmente en ratas, conejos, perros o cerdos. El modelo de células animales proporcionado en este documento también se usa para conseguir una concentración deseable e intervalo de dosificación total y vía de administración. Dicha información después puede usarse para determinar dosis y vías de administración útiles en seres humanos.

Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a esa cantidad de agente activo que mejora los síntomas o afección o evita la progresión de AMD. La eficacia terapéutica y la toxicidad de los agentes activos puede determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, ED50 (la dosis es terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y LD50 (la dosis es letal para el 50% de la población). La proporción de efectos tóxicos a terapéuticos de la dosis es el índice terapéutico, y puede expresarse como la proporción LD50/ED50. Se prefieren composiciones farmacéuticas que muestran grandes índices terapéuticos. Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios animales se usan en la formulación de un intervalo de dosificación para uso humano.

La dosis diaria de los productos puede variarse sobre un amplio intervalo, tal como de 0,001 a 100 mg por ser humano adulto por día. Para administración ocular, las composiciones se proporcionan preferiblemente en forma de una solución que contiene 0,001, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100,0, 250,0, ó 500,0 microgramos del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente a tratar.

Una dosis unitaria típica contiene de aproximadamente 0,001 microgramos a aproximadamente 500 microgramos del ingrediente activo, preferiblemente de aproximadamente 0,1 microgramos a aproximadamente 100 microgramos de ingrediente activo, más preferiblemente de aproximadamente 1,0 microgramos a aproximadamente 10 microgramos de ingrediente activo. Una cantidad eficaz del medicamento se suministra habitualmente a un nivel de dosificación de aproximadamente 0,0001 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal por día. Por ejemplo, el intervalo es de aproximadamente 0,001 a 10 mg/kg de peso corporal por día, o de aproximadamente 0,001 mg/kg a 1 mg/kg de peso corporal por día. Las composiciones pueden administrarse en un régimen de, por ejemplo, una a cuatro o más veces por día.

La administración de un fuente de expresión de una proteína CD59 se administra a una dosis de un vector viral o un vector de ácido nucleico, de modo que la dosis contenga al menos aproximadamente 50, 100, 500, 1000, o al menos aproximadamente 5000 partículas por célula a tratar. La cantidad de células puede calcularse a partir del área de retina en necesidad de tratamiento por métodos conocidos para un especialista en la técnica de AMD.

#### Administración de composiciones farmacéuticas

Formulada con un vehículo farmacéuticamente aceptable apropiado en una dosificación deseada, la composición farmacéutica proporcionada en este documento se administra a seres humanos y otros mamíferos por vía tópica tal como por vía ocular (mediante soluciones, pomadas, o colirios), por vía nasal, bucal, oral, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, o intraperitoneal.

Las inyecciones oculares incluyen inyección intraocular en el humor acuoso o vítreo, o inyección en las capas externas del ojo, tal como mediante inyección subconjuntival o inyección subtenoniana.

Las formas líquidas de dosificación para administración ocular, oral, u otra administración sistémica incluyen, aunque sin limitación, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del agente o agentes activos, las formas líquidas de dosificación pueden contener diluyentes inertes habitualmente usados en la técnica tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceite de algodón,



cacahuete, maíz, aceite de germen, oliva, ricino, y de sésamo), glicerol, tetrahidrofurfuril alcohol, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones suministradas por vía ocular, oral, u otras composiciones suministradas por vía sistémica también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, y agentes emulsionantes y de suspensión.

Las formas de dosificación para administración tópica o transdérmica de una composición farmacéutica de la invención incluyen pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, pulverizaciones, inhalantes, o parches. El agente activo se mezcla en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y cualquier conservante necesario o tampón que pueda requerirse. Por ejemplo, se consiguen vías oculares o cutáneas de administración con colirios acuosos, una nebulización, una emulsión, o una crema. La administración puede ser terapéutica o puede ser profiláctica. La invención incluye dispositivos oftalmológicos, dispositivos quirúrgicos, dispositivos audiológicos o productos que contienen composiciones descritas (por ejemplo, vendajes de gasa o tiritas), y métodos para preparar y usar dichos dispositivos o productos. Estos dispositivos pueden recubrirse con, impregnarse con, unirse a o tratarse de otro modo con una composición descrita en este documento.

Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar suministro controlado de los ingredientes activos al organismo. Dichas formas de dosificación pueden prepararse disolviendo o dispersando el compuesto en medio apropiado. También pueden usarse potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del compuesto a través la piel. La velocidad puede controlarse proporcionando una membrana de control de velocidad o por dispersando el compuesto en una matriz polimérica o gel.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes de dispersión o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución inyectable estéril, suspensión o emulsión en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están también el agua, solución de Ringer, U.S.P. y solución isotónica de cloruro sódico. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos estéril, como un disolvente o medio de suspensión. Para este propósito puede emplearse cualquier aceite fijo suave incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, se usan ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de inyectables. Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, por filtración a través de un filtro que retiene las bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de uso. Para prolongar el efecto de un agente activo, a menudo es deseable ralentizar la absorción del agente desde la inyección subcutánea o intramuscular. La absorción retardada de un agente activo administrado por vía parenteral puede conseguirse disolviendo o suspendiendo el agente en un vehículo oleoso. Las formas de depósito inyectables se preparan formando matrices microencapsuladas del agente en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la proporción de agente activo a polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la velocidad de liberación del agente activo. Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el agente en liposomas o microemulsiones que son compatibles con tejidos corporales.

Las composiciones para administración rectal o vaginal son preferiblemente supositorios que pueden prepararse mezclando el agente o agentes activos de esta invención con excipientes o vehículos no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a temperatura corporal y por lo tanto se funden en el recto o cavidad vaginal y liberan el agente o agentes activos.

Las formas sólidas de dosificación para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, y gránulos. En dichas formas sólidas de dosificación, el agente activo se mezcla con al menos un excipiente o vehículo inerte, farmacéuticamente aceptable tal como citrato sódico o fosfato dicálcico y /o a) cargas o diluyentes tales como almidones, sacarosa, glucosa, manitol, y ácido silícico, b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa, y goma arábica, c) humectantes tales como glicerol, d) agentes disgregantes tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido alginico, ciertos silicatos, y carbonato sódico, e) agentes retardadores de la solución tales como parafina, f) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, h) absorbentes tales como caolín y arcilla bentonita, e i) lubricantes tales como talco, estearato cálcico, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato sódico, y mezclas de los mismos.

También pueden prepararse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina de relleno blando y duro usando excipientes tales como azúcar de la leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas sólidas de dosificación de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras, y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y capas tales como recubrimientos entéricos, recubrimientos de control de la liberación y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. En dichas formas sólidas de dosificación el agente o agentes activos pueden mezclarse con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa o almidón. Dichas formas de dosificación también pueden comprender, como es práctica normal, sustancias

adicionales diferentes a los diluyentes inertes, por ejemplo, lubricantes de formación de comprimidos y otros auxiliares de formación de comprimidos tales como estearato de magnesio y celulosa microcristalina. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación también pueden comprender agentes tamponantes. Pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y también pueden ser de una composición que libere el agente o agentes activos solamente, o preferentemente, en una cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente, de un modo retardado. Ejemplos de composiciones integrantes que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras.

La invención que se ha descrito ahora completamente, se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y reivindicaciones, que son ilustrativos y no pretenden ser adicionalmente limitantes.

Una parte de este trabajo se publicó también en artículo titulado, "Evaluation of Adenovirus-Delivered Human CD59 as a Potential Therapy for AMD in a Model of Human Membrane Attack Complex Formation on Murine RPE", co-redactado por los inventores Kasmir Ramo, Siobhan Cashman, y Rajendra Kumar-Singh, (Invest Ophthalmol Vis Sci. septiembre de 2008; vol. 49, pág. 4126-4136).

### Ejemplos

Las composiciones que incluyen la proteína CD59 o una fuente de expresión *in vivo* de proteína CD59 se muestran por los siguientes Ejemplos como eficaces para tratar AMD. Se muestra un modelo murino humanizado para medir la deposición de MAC humano *in vitro* e *in vivo* en los siguientes Ejemplos, y este modelo se usa para medir la protección de RPE murino de la deposición perjudicial de MAC humano por un vector que expresa proteína CD59 humana.

#### Ejemplo 1: Construcciones de vector adenoviral

El ADNc de CD59 humana se obtuvo de la American Type Tissue Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) y se amplificó por PCR usando un cebador directo que contenía un sitio XhoI (subrayado; 5'ccccctcgagtggacaatcacaatggg3'; SEC ID N° 1) y un cebador inverso con un sitio EcoRV (subrayado; 5'cccccgatcatcaacggggagtttgggagaag3'; SEC ID N° 2).

El producto de PCR se purificó en gel y, después de digestión con XhoI/EcoRV, se clonó en pShCAG digerido con XhoI/EcoRV (construido por clonación de un fragmento SalI/BamHI de pCAGEN en pShuttle digerido con XhoI/BglII) generando pShCAGCD59. La secuenciación automatizada confirmó que la secuencia de CD59 se había introducido en el plásmido generado. Este plásmido lanzadera después se usó para producir el vector adenoviral usando protocolos publicados en Klein et al., Ophthalmology, 114:253 - 262, 2007 y van Leeuwen et al., Eur. J. Epidemiol., 18:845 - 854, 2003. PShCAGCD59 se linealizó con PmeI, se purificó en gel y se recombinó con pAdEasy-1 por co-transformación de células BJ5183 de *Escherichia coli*. El plásmido recombinado se linealizó con PacI, se introdujo por transfección en la línea celular de retinoblasto embrionario humano (911) y el vector resultante (AdCAGCD59) se purificó usando el kit de purificación de adenovirus Adenopure (Puresyn, Inc., Malvern, PA).

El vector de control AdVACÍO se generó de manera similar recombinando el pSHCAG linealizado con PmeI con pAdEasy-1. El vector de control AdCAGGFP se describe en Johnson et al., Exp. Eye Res., 70:441 - 449, 2000.

#### Ejemplo 2: Líneas celulares y pretratamiento con CD59 por contacto con adenovirus

La línea celular de retinoblasto embrionario humano 911 se mantuvo en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero de bovino fetal (FBS) al 10% y la línea celular de hepatoma de ratón hepa-1c1c7 (ATCC, Manassas, VA) en  $\alpha$ -MEM suplementado con FBS al 10%. Las células se cultivaron en una incubadora humidificada a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%:aire al 95%.

Para el análisis de transferencia de Western o el ensayo de lisis celular de suero humano se pusieron en contacto  $1,2 \times 10^6$  células hepa-1c1c7 y para inmunocitoquímica de CD59 o el ensayo de deposición de MAC humano en suero  $2,5 \times 10^4$  células hepa-1c1c7 con los vectores AdCAGGFP o AdCAGCD59 a multiplicidades de infección de las partículas de virus por célula indicadas, o las células de control no se pusieron en contacto. El contacto del adenovirus con las células se realizó en medio con FBS al 2%. Tres días después del contacto, las células se trataron adicionalmente como se describe en los Ejemplos en este documento. Aunque las condiciones específicas se describen en este documento, condiciones equivalentes de medios, temperatura, etc., para conseguir un pretratamiento eficaz de células o tejidos con CD59 están dentro del alcance de los métodos de este documento.

Se recogieron células RPE primarias de ratón de ojos de ratones C57B1/6J de 6 - 10 semanas de edad sacrificados. Después de retirar la cámara anterior, el cristalino y la retina como se describe a continuación, se incubaron los tejidos de ojera en 200  $\mu$ l de tripsina-EDTA al 0,25% en tubos eppendorf de 1,5 ml durante 40 a 50 minutos a 37°C. Los tejidos de ojera después se transfirieron a una placa de cultivo celular de 60 mm que contenía  $\alpha$ -MEM suplementado con FBS al 10%. Las células RPE se rasparon suavemente con una punta de pipeta, se aspiraron las láminas de RPE usando una pipeta de 200  $\mu$ l y se transfirieron a un tubo eppendorf. Después de dispersar las

láminas RPE por pipeteo del medio varias veces, se contaron las células y se sembraron aproximadamente  $3 \times 10^4$  células (generalmente el rendimiento obtenido de uno ojo) en una cámara de un portaobjetos con cámara recubierto con poli-D-lisina (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Después de una semana en cultivo, las células se usaron como se describe en los Ejemplos en este documento. El contacto de las células con vector adenoviral se realizó en medio con FBS al 2%.

#### Ejemplo 3: Análisis de transferencia de Western

Las células se lisaron en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0/NaCl 150 mM/dodecil sulfato sódico al 0,1%/Triton X-100 al 1% que contenía de cóctel inhibidor de proteasa al 2% (v:v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Se recogieron los medios de las células, se centrifugaron, se pasaron a través de un filtro de  $0,22 \mu\text{m}$  u otro filtro indicado en las figuras, para retirar los desechos celulares restantes y los medios se concentraron 10X usando un filtro de centrifuga Biomax con un tamaño de poro de 10.000 Dalton (Millipore Corporation, Billerica, MA). Los lisados se analizaron por electroforesis de gel en condiciones no reductoras en un gel de SDS-PAGE de Tris-glicina al 15% (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y las proteínas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore, Billerica, MA). Después de bloquear leche desnatada al 5% (p:v) (Becton Dickinson, Sparks, MD), la membrana se sondeó para CD59 humana usando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD59 humana (dilución 1:1000; Clon Mem-43; Abcam, Cambridge, MA), seguido por un anticuerpo secundario de cabra conjugado con peroxidasa de rábano rusticano anti-anticuerpo de ratón (dilución 1:10.000; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Tras bandearla y bloquearla como se ha descrito anteriormente, la misma membrana se sondeó para  $\beta$ -actina con un anticuerpo monoclonal de ratón anti- $\beta$ -actina (dilución 1:5.000; Clon AC-15; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). La detección secundaria se realizó como se ha descrito anteriormente.

#### Ejemplo 4: Ensayo de lisis celular en suero humano

Se adquirió suero humano normal (NHS) en forma liofilizada de Sigma (St. Louis, MO) y se reconstituyó (según las instrucciones del fabricante) con 1 ml de agua desionizada estéril fría para obtener un volumen de suero igual al de plasma humano del cual se obtuvo el polvo. Los lotes de suero humano resultantes que tenían un título hemolítico de 43 unidades  $\text{CH}_{50}/\text{ml}$  o 74 unidades  $\text{CH}_{50}/\text{ml}$  respectivamente (determinado por el fabricante usando el método de Kabat y Mayer) se repartieron en alícuotas y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$ . El primer lote con un título hemolítico de 43 unidades  $\text{CH}_{50}/\text{ml}$  se usó en experimentos con células hepa-1c1c7. El segundo lote, con un título hemolítico de 74 unidades  $\text{CH}_{50}/\text{ml}$ , se usó en los otros experimentos.

Para el ensayo de lisis celular en suero humano, se usaron suspensiones de células individuales de células pretratadas, es decir, que incluían células de control no en contacto con vector, o células hepa-1c1c7 en contacto con adenovirus en un volumen total de  $500 \mu\text{l}$ . Después de retirar el medio, las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1 x y después de un breve tratamiento con tripsina (tripsina-EDTA al 0,25%, 4 - 6 min.), se recogieron con PBS 1 x que contenía FBS al 0,5%. Las células se recogieron por centrifugación a  $4^\circ\text{C}$  y se resuspendieron en tampón veronal en gelatina de enfriada en hielo con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (GVB<sup>++</sup>, Complement Technology, Tiler, TX). Las células se contaron en un hemacitómetro y se repartieron en alícuotas  $5 \times 10^5$  células en tubos eppendorf. Se añadió suero humano normal (NHS) o suero humano normal inactivado por calor ( $56^\circ\text{C}$  durante 1 hora) (HI-NHS) a las células, y las suspensiones celulares se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 hora con agitación rotatoria suave. La lisis celular se determinó por el método de exclusión de yoduro de propidio (PI) seguido por análisis FACS.

Poco antes de FACS, se añadió un microlitro de PI (1 mg/ml; Fluka BioChemica, Buchs, Suiza) a una suspensión celular y se contaron 25.000 eventos por muestra en un FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Los resultados se analizaron usando el software CellQuest Pro (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) y se calculó el porcentaje de lisis celular usando la fórmula mostrada a continuación.

$$\text{\% de lisis celular} = [1 - (\text{\% de células vivas en HI-NHS} / \text{\% de células vivas en NHS})] \times 100$$

#### Ejemplo 5: Ensayo de deposición de MAC en cultivo celular

Se cultivaron células hepa-1c1c7 de ratón durante tres días, y se pretrataron por contacto con AdCAGGFP (control negativo), o AdCAGCD59, en portaobjetos con cámara recubiertos con poli-D-lisina (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) y se lavaron dos veces con PBS 1 x. Las células después se incubaron con NHS al 10% (v:v) o HI-NHS en GVB<sup>++</sup> (Complement Technology, Tiler, TX) a  $37^\circ\text{C}$  durante 1, 3, 5, 7 ó 10 minutos.

Se incubaron células RPE primarias de ratón con o sin  $25 \mu\text{g}/\text{ml}$  de anticuerpo de cabra anti-emmprin de ratón (R&D Systems, Minneapolis, MN) en GVB<sup>++</sup> (Complement Technology, Tiler, TX) durante 1 hora y se lavaron y fijaron (para inmunocitoquímica emmprin) o se trataron para el ensayo de deposición de MAC seguido por la adición de NHS o HI-NHS (concentración final del 50%) durante 4 ó 7 minutos. Después de ello las células se lavaron tres veces con PBS 1 x enfriado en hielo y se fijaron con formaldehído al 3,7% (MP Biomedicals, Solon, OH) en PBS 1 x durante 15

minutos. Las células se lavaron otras tres veces con PBS 1 x para eliminar el fijador restante y se almacenaron en PBS 1 x a 4°C hasta el análisis inmunocitoquímico, como se describe en los Ejemplos en este documento.

#### Ejemplo 6: Inmunocitoquímica/inmunohistoquímica

Las células o tejidos fijados descritos anteriormente se incubaron con anticuerpos monoclonales de ratón primarios contra CD59 humana (clon M-43) o C5b-9 humano (clon aE11) (cada uno a una dilución 1:50, Abcam, Cambridge, MA) en PBS 1 x que contenía suero de cabra normal al 6% (p:v) (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) durante 2,5 horas con agitación rotatoria suave. La detección secundaria se realizó usando un anticuerpo de cabra conjugado con Cy3 anti-ratón (dilución 1:400; Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) durante 1,5 horas en una cámara oscura.

Para la inmunotinción RPE65, las células RPE primarias se pre-bloquearon y permeabilizaron en PBS 1 x que contenía suero de cabra normal al 6% (p:v) (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) y Triton X-100 al 0,25% (v:v) (Fisher Bio-reagents, Fair Lawn, NJ) durante 1 hora. Después se aplicó un anticuerpo de ratón anti-RPE65 y se realizó la detección primaria y secundaria como anteriormente excepto en que el anticuerpo y las soluciones de lavado contenían Triton X-100 al 0,25% (v:v) (Fisher Bio-reagents, Fair Lawn, NJ).

Para la tinción con emmprin de ratón, se bloquearon las células y tejidos fijados y tratados con anticuerpo de cabra anti-emmprin de ratón en PBS 1 x que contenía suero de burro normal al 6% (p:v) (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) durante 1 hora y la detección secundaria se realizó usando un anticuerpo de burro conjugado con Cy3 anti-cabra (dilución 1:400; Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) en PBS 1 x que contenía suero de burro normal al 6% (p:v) durante 1,5 horas.

#### Ejemplo 7: Ensayo de exclusión de azul tripán

Las células se trataron como para el ensayo de deposición de MAC en cultivo celular descrito en los Ejemplos anteriormente, excepto que después del lavado para retirar el suero, las células se incubaron en solución de azul tripán al 0,1 % durante 5 minutos. Las células después se lavaron dos veces con PBS 1 x y se fijaron como se ha descrito en los Ejemplos anteriormente.

#### Ejemplo 8: Inyecciones subretinianas

Se adquirieron ratones (C57B1/6J) de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME), criados y mantenidos en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Los ratones se anestesiaron por inyección intraperitoneal de xilazina (10 mg/ml)/ketamina (1 mg/ml). Las inyecciones subretinianas se realizaron como se describe en Anderson Am J Ophthalmol., 134:411 - 431, 2002, usando el enfoque transesclerótico-transcoroideo con una aguja de calibre 32 unida a una jeringa de vidrio de 5 µl (Hamilton, Reno, NV). Se inyectó un microlitro de una mezcla de control de nueve partes de AdVACÍO y una parte de AdCAGGFP (total de  $3 \times 10^8$  partículas de vector; control) o de una mezcla de nueve partes de AdCAGCD59 y una parte de AdCAGGFP (total de  $3 \times 10^8$  partículas de vector) en cada ratón sometido.

#### Ejemplo 9: Deposición de MAC sobre RPE y córnea

Seis días después de la administración para pretratamiento por inyección, los ratones se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub> y se recogieron los ojos y se pusieron en PBS 1 x que contenía penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 U/ml). Se hizo una incisión circular 1 - 2 mm posterior a la ora serrata y se retiró con cuidado la cámara anterior completa incluyendo el cristalino. Después de hacer una pequeña incisión en la base del nervio óptico para cortar los axones gangliónicos, se retiró la retina y el tejido de ojera se fijó inmediatamente en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (pH 7,4) durante una noche (para inmunohistoquímica de CD59) o se incubó con 25 µg/ml de anticuerpo de cabra anti-emmprin de ratón (R&D Systems, Minneapolis, MN) en GVB<sup>++</sup> frío (Complement Technology, Tiler, TX) a 4°C durante 1 hora.

Los tejidos de ojera después se lavaron tres veces con PBS frío y se fijaron para inmunohistoquímica de emmprin. Para el ensayo de deposición de MAC, se añadió un volumen igual de NHS o HI-NHS (concentración final del 50%) a los tejidos de ojera que después se incubaron a 37°C durante 15 minutos y se lavaron tres veces con PBS frío y se fijaron.

Se recogieron tejidos de córnea de ratones no inyectados, se retiró el iris y se cultivaron las córneas en 300 µl de DMEM con FBS al 2%. Las córneas se pusieron en contacto con  $1,5 \times 10^9$  partículas de vector AdCAGGFP (control negativo) o el vector AdCAGCD59. Tres días después de la recogida/contacto, cada una de las córneas no tratadas (control negativo), córneas pretratadas con AdCAGGFP (control negativo) y córneas pretratadas con AdCAGCD59 se mezcló con anticuerpo anti-emmprin de ratón como con los tejidos de ojera, y cada uno se lavó y fijó (para inmunohistoquímica de emmprin), o se puso en contacto con NHS o HI-NHS al 50% durante 20 minutos y después se lavó y fijó (para el ensayo de deposición de MAC). Antes de la inmunohistoquímica, los tejidos se lavaron tres tiempos durante diez minutos cada uno con PBS 1 x para eliminar el fijador restante.

Ejemplo 10: Construcciones de vector y expresión de CD59 humana en células hepa-1c1c7 pretratadas con vector

Para suministrar CD59 humana (hCD59) para pretratar RPE murino y retina *in vivo*, se produjo un adenovirus de serotipo 5 de primera generación que contenía ADNc de hCD59 bajo el control del promotor de la beta actina de pollo (CAG) (vector AdCAGCD59; Fig. 1 panel A). También se construyeron dos vectores adenovirales de control negativo, AdCAGGFP que expresaba GFP bajo el control del promotor CAG, y AdvACÍO (Fig. 1 panel A). Estos vectores se construyeron para que tuvieran una delección en la región E1 del adenovirus, y por lo tanto son defectuosos en la replicación fuera de las células de empaquetado.

CD59 humana es una proteína de membrana anclada a glucosilfosfatidilinositol (GPI) de 18 - 21 kDa. Para analizar la expresión de la proteína, se pusieron en contacto células de ratón hepa-1c1c7 para pretratamiento con una multiplicidad de 1000 partículas de vector (vp/célula) del vector AdCAGCD59 purificado o de control. Los lisados celulares se analizaron por transferencia de Western usando un anticuerpo monoclonal contra hCD59, y se observó la presencia de hCD59 en lisados celulares de células pretratadas con AdCAGCD59 (Fig. 1 panel B). No se detectó proteína CD59 en lisados celulares en contacto con el vector de control (AdCAGGFP, control negativo) o células de control no pretratadas con vector (control negativo; Fig. 1 panel B).

Se detectó hCD59 endógena en lisados celulares de retinoblasto embrionario humano (911) (Fig. 1 panel B), sin embargo esta señal fue mucho más débil en comparación con la señal de las células de ratón en contacto con AdCAGCD59. El ligero cambio en el desplazamiento electroforético entre la hCD59 endógena detectada en lisados celulares 911 y la hCD59 recombinante detectada en lisados celulares de ratón en contacto con AdCAGCD59 pueden deberse a diferencias en la modificación de la proteína; por ejemplo, la variación en el patrón de glucosilación de la proteína en la dos líneas celulares.

La inmunotinción de células de ratón hepa-1c1c7 en contacto con AdCAGCD59 no permeabilizadas usando el anticuerpo anti-hCD59 mostró expresión y localización de hCD59 sobre la membrana celular (Fig. 1 panel C) y reveló que esencialmente el 100% de las células estaba expresando la proteína. No se observó tinción sobre células en contacto con el vector de control negativo. Controles adicionales incluyeron inmunocitoquímica de células no tratadas y omisión del anticuerpo primario para inmunocitoquímica de células en contacto con AdCAGCD59, y los resultados obtenidos usando estos controles fueron negativos.

Ejemplo 11: Pretratamiento por adenovirus con hCD59 por contacto de vector protege células de ratón de lisis celular mediada por el complemento humano

Para ensayar la actividad funcional de hCD59 expresada a partir del vector AdCAGCD59, se realizaron ensayos de lisis celular en suero humano sobre células de ratón hepa-1c1c7. Se incubaron suspensiones celulares con NHS o HI-NHS (como un control para lisis no específica del complemento) para exponer las células al complemento, y se determinó el porcentaje de celular por captación de PI detectada y cuantificada por análisis FACS.

Inicialmente se investigó el efecto de la concentración de suero sobre el grado de lisis de células de control no tratadas (Fig. 2 panel A). Las células de ratón hepa-1c1c7 activaban eficazmente el complemento humano, y se observó que una concentración de suero tan baja como del 0,5% (dilución 1/200) lisaba más del 50% de las células. Se observó que la lisis de las células era dependiente de la concentración de suero y la función parecía ser sigmoidea (Fig. 2 panel A). La concentración de suero más baja ensayada que provocaba la lisis celular máxima era del 1% (dilución 1/100; la lisis celular era del  $96,06\% \pm 0,87\%$ ). Esta concentración de suero se usó en los posteriores Ejemplos de lisis celular con células pretratadas por contacto con vector adenoviral.

Las células se pretrataron con 1000 vp/célula del vector AdCAGCD59 o AdCAGGFP de control negativo y 65 horas después del contacto, las células se recogieron y se usaron en experimentos de lisis celular en suero humano. El pretratamiento con adenovirus a las cantidades aquí usadas no provocó toxicidad celular como se observó por microscopía o se detectó por captación de PI seguida por FACS, y por comparación con los datos obtenidos de células en contacto con los dos vectores y de células de control no tratadas como se muestra en este documento. Se observó que la lisis celular de células puestas en contactado incubadas en HI-NHS era mínima y era similar a la de células no pretratadas con un vector (control) incubadas con HI-NHS (Fig. 2 paneles B, C y D). Las células pretratadas con el vector AdCAGCD59 estaban significativamente protegidas, ya que se redujo la lisis celular mediada por el complemento (aproximadamente ocho veces) hasta el  $12,29\% \pm 0,18\%$  (la lisis celular es una indicación de la eliminación celular y una medida inversa de la supervivencia celular; Fig. 2 paneles B, D y E).

En contraste, las células de ratón pretratadas con el vector de control negativo AdCAGGFP no estaban protegidas, es decir, permanecían susceptibles al complemento humano, con un grado de lisis celular mediada por el complemento observado en el  $95,27\% \pm 0,01\%$  de las células (Fig. 2 paneles C y E). De manera similar, se observó que células de ratón no tratadas eran susceptibles al complemento humano y la lisis celular (Fig. 2 paneles A, B y E). El pretratamiento con vector de control AdCAGGFP, en contraste, no protegía las células, ya que el grado de lisis observado era del  $95,27\% \pm 0,01\%$  (Fig. 2 paneles C y E), similar al observado para células de control (Fig. 2 paneles B y E). Estos datos muestran que la protección se debía a la expresión de hCD59 en lugar de al pretratamiento con adenovirus *per se*.

Se obtuvo protección de las células contra la lisis en este documento por expresión de CD59 humana en células pretratadas con vector AdCAGCD59. Se observó adicionalmente que la protección era dependiente de la multiplicidad del vector AdCAGCD59 administrado. La administración de 250 vp/célula y 500 vp/célula de AdCAGCD59, respectivamente, inhibía la lisis celular en más del 50% y 70%, respectivamente (Fig. 2 panel F). En contraste, las células pretratadas con AdCAGGFP eran susceptibles a lisis independientemente de la multiplicidad del vector administrado. Por tanto, la expresión de hCD59 recombinante a partir del vector AdCAGCD59 protegía significativamente a las células de ratón de la lisis celular mediada por el complemento humano.

#### Ejemplo 12: La proteína hCD59 protege células de ratón de la deposición de MAC humano

Los datos en los Ejemplos anteriores muestran que la incubación de células de ratón hepa-1c1c7 con suero humano normal conducía a activación del complemento y lisis celular extensiva, y que esta lisis se inhibía eficazmente cuando se expresaban CD59 humana recombinante en estas células.

Se realizaron Ejemplos para determinar si CD59 humana recombinante expresada por células de ratón pretratadas con adenovirus evitaría la formación del complejo C5b-9 en un ensayo de deposición de MAC *in vitro* desarrollado con este fin.

Se incubaron células de ratón en portaobjetos con cámara recubiertos con poli-D-lisina con NHS o HI-NHS al 10% en GVB<sup>++</sup> a 37°C durante 1 a 10 minutos y posteriormente se lavaron y fijaron. La incubación de estas células con NHS durante 5 minutos causó cambios significativos en la morfología celular (Fig. 3 panel A, visualización DIC de las células). Las células mostraron efectos perjudiciales ya que perdieron sus extensos procesos citoplasmáticos y se volvieron redondas y granulares. En contraste, estos efectos no se observaron con células incubadas con HI-NHS (Fig. 3 panel B, visualización DIC de las células) en que el complemento está inactivado.

El análisis inmunocitoquímico usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra un neopéptido sobre el complejo C5b-9 reveló tinción extensiva de la membrana en los bordes de células expuestas a NHS confirmando la deposición de MAC sobre estas células (Fig. 3 panel A). Casi no se observó tinción MAC sobre células expuestas a HI-NHS (Fig. 3 panel B). Las muestras de control incluyeron inmunocitoquímica de células no tratadas (no incubadas con suero humano) así como omisión del anticuerpo primario para inmunocitoquímica de células en contacto con NHS, produciendo los dos controles datos negativos. En condiciones de exposición al complemento en suero humano, la lisis de una cantidad sustancial de las células expuestas a NHS se mostró también por tinción con azul tripán (Fig. 3 panel C). No se observó lisis en células expuestas a HI-NHS indicada por la ausencia de captación de azul tripán por estas células (Fig. 3 panel C).

Se descubrió que el pretratamiento de células de ratón hepa-1c1c7 con 1000 vp/célula del vector AdCAGCD59 protegía significativamente estas células de la deposición de MAC humano y la eventual lisis (Fig. 4 paneles B y C). Después de la exposición a NHS durante 5 minutos, estas células pretratadas mantenían sus características morfológicas normales (Fig. 4 panel B, DIC). La inmunocitoquímica usando anticuerpo anti-MAC mostró ausencia casi completa de tinción MAC (Fig. 4 panel B), y la lisis celular se inhibió eficazmente indicada por la ausencia de tinción con azul tripán (Fig. 4 panel C). En contraste, las células pretratadas con el vector de control negativo que expresaba GFP no estaban protegidas de la deposición de MAC después de 5 minutos de exposición al NHS. Los cambios morfológicos (Fig. 4 panel A, DIC), la inmunotinción MAC (Fig. 4 panel A) y la lisis celular (Fig. 4 panel C) de estas células fueron similares a los observados para células de control no tratadas (control; Fig. 3 paneles A y C), es decir, característicos de la deposición de MAC y lisis celular.

Se observó que había tinción MAC presente en incluso unas pocas de las células pretratadas con AdCAGCD59 después de 7 minutos de tratamiento con NHS (Fig. 4 panel B) y esta cantidad aumentaba después de 10 minutos de tratamiento con suero. Después de 7 minutos de tratamiento con NHS, la tinción MAC de células pretratadas con AdCAGGFP (Fig. 4 panel A) era significativamente más fuerte que la de células pre-contactadas con AdCAGCD59 (Fig. 4 panel B). Después de 10 minutos de tratamiento con suero casi todas las células pretratadas con AdCAGGFP se desprendían del portaobjetos de cultivo celular debido a una lisis completa, mientras solamente unas pocas células pretratadas con vector AdCAGCD59 mostraron algún cambio o deposición de MAC. Además, el patrón de inmunofluorescencia MAC indicó el grado de daño a la membrana celular, con fuerte tinción punteada delineando los bordes celulares que se correlaciona con un daño mayor a las células (Fig. 3 panel A, Fig. 4 panel A y Fig. 5), y tinción más difusa extendiéndose por toda la membrana celular que se correlaciona con células que parecen estar intactas (Fig. 4 panel B y Fig. 5). La deposición de MAC sobre células de control no tratadas y sobre células pretratadas con AdCAGGFP fue rápida y punteada. Se observó tinción difusa, que indica niveles de daño menores de deposición de MAC, principalmente en células pretratadas con AdCAGCD59 (Fig. 4 panel B y Fig. 5).

Los diferentes patrones de inmunotinción MAC se observaron más fácilmente cuando las células se ponían previamente en contacto a multiplicidades bajas del vector AdCAGCD59. Después de 5 minutos de exposición a NHS, las células pretratadas con 100 o 500 vp/célula mostraron más inmunotinción MAC en comparación con células en contacto con 1000 vp/célula (Fig. 5, aumento especialmente mayor en la microfotografía inferior izquierda). El pretratamiento por contacto de las células con multiplicidades incluso más bajas del adenovirus que

expresa hCD59 produjo protección significativa de las células contra la deposición de MAC (véase la Fig. 4 panel A para comparación).

#### Ejemplo 13: Modelo de deposición de MAC humano sobre RPE murino, células RPE primarias y endotelio de la córnea

Se desarrolló un ensayo de deposición de MAC para usar tejidos oculares murinos para ensayar el grado de daño por o potencial para AMD, y para usar agentes de exploración para tratar o prevenir la AMD.

Se recogieron tejidos de ojo de ratones C57B1/6J y se expusieron a diversas concentraciones de NHS o HI-NHS. El análisis inmunohistoquímico con el anticuerpo anti-C5b-9 humano estuvo seguido por un anticuerpo secundario conjugado con Cy3 apropiado. Los datos mostraron ausencia de señal fluorescente sobre el RPE, incluso cuando los tejidos de ojo se ponían en contacto con una concentración de NHS tan alta como del 50%. El contacto con NHS al provocó tinción débil dispersa ocasional (Fig. 6 panel C). La señal débil irregular obtenida no fue útil para fines de desarrollo cualquiera. Además, los intentos por usar la córnea para ensayar el potencial de hCD59 suministrado por adenovirus de proteger tejidos oculares murinos de la deposición de MAC humano tampoco fueron satisfactorios. No se detectó deposición de MAC, a ninguna concentración de NHS usada, sobre el endotelio de la córnea, que se sabe que se transduce eficazmente por el adenovirus. Se detectó una fuerte inmunotinción MAC siempre sobre el epitelio de la córnea.

El ensayo de deposición de MAC se realizó sobre células RPE primarias de ratón para explorar adicionalmente la ausencia de deposición de MAC sobre células RPE murinas después de exposición a suero humano, y para determinar si la matriz extracelular sobre los tejidos oculares estaba interfiriendo con la accesibilidad de las proteínas del complemento al RPE o la superficie de las células endoteliales. Se identificaron células RPE por la presencia de pigmentación típica, la morfología característica e inmunotinción rutinaria para el marcador celular de RPE, RPE65 (Fig. 7; la fila superior muestra células iluminadas con campo brillante, la tercera fila muestra tinción con anti-RPE65). Como con los tejidos, se observó inmunotinción MAC débil e irregular en las células RPE de ratón de pase 0 tras la exposición a NHS al 50% (Fig. 8 panel C).

La ausencia de deposición extensiva de MAC sobre el RPE y el endotelio de la córnea tras exposición a NHS podría ser debido a una activación del complemento ineficaz y/o a una protección potenciada por las proteínas reguladoras del complemento murino expresadas sobre la superficie de estas células. Para determinar si la activación del complemento sobre RPE murino podría potenciarse, se usó a continuación un anticuerpo contra el dominio extracelular de ratón emmprin, que es una proteína de membrana expresada abundantemente en RPE así como en el endotelio de la córnea. Se seleccionó un anticuerpo anti-emmprin de ratón producido en cabra para evitar la reactividad cruzada potencial con el anticuerpo secundario (de cabra conjugado con Cy3 anti-IgG e IgM de ratón) usado para la inmunotinción MAC.

La incubación de tejidos de ojo o tejidos de córnea de ratón con el anticuerpo anti-emmprin de ratón seguido por exposición a NHS (concentración final del 50% durante 15 minutos para tejidos de ojo, o 20 minutos para tejidos de córnea a 37°C) produjo inmunotinción MAC extensiva, brillante del tejido diseccionado RPE (Fig. 9 panel A) y el endotelio de la córnea (Fig. 9 panel C). Esta inmunotinción fue el resultado de la deposición de MAC activada por el complemento, ya que la adición de HI-NHS de control en lugar de NHS, eliminó la tinción: no se observó inmunotinción MAC con el uso de HI-NHS (Fig. 9 paneles B y D). La monocapa RPE en contacto con NHS a menudo aparecía intrincada y se observaron diversos patrones de tinción debidos a diferentes cantidades de deposición de MAC y diversas cantidades de daño celular. Controles negativos adicionales incluyeron inmunotinción MAC de tejidos de ojo y tejidos de córnea en contacto con el anticuerpo anti-emmprin de ratón, pero no con suero humano así como omisión del anticuerpo primario durante inmunohistoquímica de tejidos de ojo y tejidos de córnea en contacto tanto con el anticuerpo anti-emmprin de ratón como con NHS, y no se observó tinción con estos controles.

También se obtuvieron resultados similares con células RPE de ratón primarias de pase 0 (Fig. 8 paneles A y B). Tras la incubación con el anticuerpo anti-emmprin y la exposición a NHS al 50% durante 4 minutos, se observó destrucción celular sobre las células RPE (Fig. 8 panel A). En 7 minutos de exposición a NHS, casi todas las células se habían desprendido del portaobjetos. Ocasionalmente permanecían solamente agregados celulares de áreas de elevada confluencia (Fig. 8 panel A). Se observó tinción solamente mínima de las células expuestas a HI-NHS de control (Fig. 8 panel B).

#### Ejemplo 14: Vesiculación mediada por el complemento de membranas celulares RPE

Para investigar adicionalmente los efectos de la deposición de MAC y la protección, se pretrataron células RPE de ratón primarias (pase 0) con una mezcla de AdCAGCD59 + AdCAGGFP (800+200 vp/célula respectivamente) o con una mezcla de control de AdVACIO + AdCAGGFP (800+200 vp/célula respectivamente). Después de 7 minutos de tratamiento con NHS, lavado y fijación, se examinaron las células. Tres días después del tratamiento, estas células se analizaron mediante el ensayo de deposición de MAC.

e observó presencia de numerosas vesículas GFP-positivas asociadas con las células (Fig. 10 paneles A y B, flechas). El examen de las células reveló la presencia de numerosas vesículas GFP-positivas (Fig. 10 paneles A y B, flechas). La cantidad y tamaño de estas vesículas fue sustancialmente mayor para células pretratadas con la mezcla de AdVACÍO + AdCAGGFP (Fig. 10 panel A) en comparación con células pretratadas con la mezcla de AdCAGCD59 + AdCAGGFP (Fig. 10 panel B). Esta observación indica que la vesiculación observada en este documento fue el resultado de la deposición de MAC. Además, después del contacto con NHS, las células pretratadas con la mezcla de AdVACÍO + AdCAGGFP mostraron una reducción en la fluorescencia GFP en comparación con la fluorescencia de células pretratadas con la mezcla de AdCAGCD59 + AdCAGGFP (Fig. 10 panel A comparado con el panel B). La fluorescencia GFP reducida en células pretratadas con la mezcla de AdVACÍO + AdCAGGFP se asoció con un aumento concomitante en la fluorescencia verde difusa observada fuera de estas células, lo que indica que GFP se estaba filtrando desde las células o se había difundido través la membrana plasmática en estas células de control.

#### Ejemplo 15: Protección de tejidos oculares y células RPE primarias contra la deposición de MAC por hCD59 suministrada por adenovirus

Se evaluó la eficacia del pretratamiento con hCD59 para proteger RPE murino de la deposición de MAC humano. Se administró a ratones inyecciones subretinianas *in vivo* de cada vector adenoviral. Seis días después de la inyección, se observó la expresión de hCD59 sobre RPE murino tras la inyección subretiniana del vector AdCAGCD59 por inmunohistoquímica con anticuerpo anti-hCD59 (Fig. 11 panel A). No se observó tinción para hCD59 en tejidos de ojera a los que se había inyectado el control negativo AdCAGGFP (Fig. 11 panel B; fila superior). En su lugar, fue visible fluorescencia GFP en el sitio de inyección (Fig. 11 panel B; fila inferior).

Para el ensayo de deposición de MAC, se realizaron inyecciones subretinianas en dos grupos de ratones. A los ratones en uno grupo se les inyectó una mezcla de los vectores AdCAGCD59 y AdCAGGFP en una proporción 9:1 (AdCAGGFP se co-inyectó para permitir una fácil identificación del sitio de inyección y el área de expresión del transgén por fluorescencia espontánea). A los ratones del segundo grupo se les inyectó una mezcla de control de AdVACÍO y AdCAGGFP (controles negativos) también en una proporción 9:1. Seis días después de la inyección, se recogieron los ojos y se expusieron los tejidos de ojera a anti-emmprin de ratón y NHS, junto con tejidos de ojera de ratones de control no inyectados.

La inmunohistoquímica para MAC humano de tejidos de ojera inyectados con la mezcla de AdCAGCD59 y AdCAGGFP (n = 10) mostró tinción significativamente reducida en el RPE en el área de expresión de GFP (que se usó para identificar y se descubrió que se correlacionaba con la expresión de hCD59) en comparación con el área restante no en contacto de tejido de ojera (Fig. 12 panel B, compárense los tejidos diseccionados en la fila superior). Las células RPE en este área aparecían sin daños con bordes celulares definidos y morfología hexagonal normal (Fig. 12 panel B, compárese la microfotografía de las células con aquellas de la Fig. 12 panel A). En contraste, la inmunotinción MAC en el área de expresión de GFP de tejidos inyectados con vectores de control negativo (mezcla de vectores AdVACÍO y AdCAGGFP) de los tejidos de ojera inyectados (n = 10) fue similar al área restante no en contacto del tejido de ojera (Fig. 12 panel A), y la inmunotinción MAC fue significativamente más extensiva y más fuerte que la inmunotinción MAC observada en el área de expresión de GFP de tejidos de ojera inyectados con la mezcla de AdCAGCD59 y AdCAGGFP. Además, las células RPE en el área de expresión de GFP de los tejidos de ojera inyectados con control negativo aparecían extensivamente dañadas como se indica por su forma redondeada, la pérdida de morfología hexagonal normal y pérdida de los bordes celulares definidos (Fig. 12 panel A, fotomicrografías comparados con aquellas de la Fig. 12 panel B).

La cuantificación de la inmunofluorescencia MAC en el área de expresión de GFP reveló una reducción global de ~55% en la intensidad de inmunofluorescencia media de MAC sobre los tejidos de ojera inyectados con la mezcla de AdCAGCD59 y AdCAGGFP (n = 10) en comparación con tejidos de ojera inyectados con la mezcla del control negativo (n = 10), una diferencia que fue estadísticamente significativa ( $p = 0,0014$ , Fig. 13 panel A). Estos cálculos mostraron que la intensidad de fluorescencia media de MAC sobre los tejidos de ojera inyectados con la mezcla de AdCAGCD59 y AdCAGGFP se aumentó por la ausencia de protección significativa contra la deposición de MAC para solamente una pocos tejidos de ojera con poca expresión de hCD59 indicada por la expresión de GFP, y la cantidad del 55% se vio afectada por la inclusión de estas muestras. Se observó que había una relación inversa entre las intensidades de fluorescencia de GFP y MAC (Fig. 13 panel B) sobre los tejidos de ojera que se habían pretratado con la mezcla de AdCAGCD59 y AdCAGGFP. Esta relación inversa indica que un método terapéutico potencial que implique la expresión de CD59 puede proteger tejidos de la deposición de MAC.

Las ojerías después se pretrataron con mezclas de cada uno de AdVACÍO y AdCAGGFP, y con AdCAGCD59 y AdCAGGFP para analizar la posibilidad de que MAC reducido fuera una función de la transducción del vector. No se observó diferencia significativa en los resultados entre los dos grupos (n=10 por grupo) en los niveles de GFP (figura 13 panel B). La morfología celular de RPE en las ojerías pretratadas con AdVACÍO y AdCAGGFP y las ojerías pretratadas con AdCAGCD59 y AdCAGGFP fue similar (Fig. 12 paneles D y E). Además, la tinción MAC de las ojerías pretratadas con AdVACÍO y AdCAGGFP fue significativamente mayor que la de las ojerías pretratadas con AdCAGCD59 y AdCAGGFP (Fig. 12 paneles D y E).



La cuantificación de la reducción en la inmunofluorescencia MAC en el área de expresión de GFP reveló un promedio de aproximadamente el 68% ( $p=0,0018$ ) a los 7,5 min de tratamiento con NHS y del 56% ( $p=0,0007$ ) a los 15 min de tratamiento con NHS en las ojerías pretratadas con AdCAGCD59 y AdCAGGFP en comparación con las ojerías pretratadas con AdVACÍO y AdCAGGFP (Fig. 12 panel C). Además, había una relación inversa entre las intensidades de fluorescencia de GFP y MAC en las ojerías pretratadas con AdCAGCD59 y AdCAGGFP en comparación con las ojerías pretratadas con AdVACÍO + AdCAGGFP (Fig. 13 panel B). Esto indica adicionalmente que la protección contra la deposición de MAC es una función del nivel de expresión de hCD59.

Es posible que la diferencia en la deposición de MAC entre los tejidos de ojería pretratados con AdCAGCD59 y control negativo sea debida a una diferencia en la expresión de emmprin de ratón y/o a una diferencia en la unión del anticuerpo anti-emmprin. Para evaluar esta posibilidad, se realizó inmunohistoquímica para emmprin de ratón sobre tejidos de ojería pretratados por pretratamiento con la mezcla de AdCAGCD59 y AdCAGGFP o tejidos de ojería pretratados con el control negativo (mezcla de AdVACÍO + AdCAGGFP). El análisis del anticuerpo anti-emmprin de ratón se realizó usando el mismo procedimiento que para el ensayo de deposición de MAC, y los tejidos de ojería se lavaron, fijaron e incubaron con un anticuerpo conjugado con Cy3 apropiado. No se observaron diferencias en la inmunofluorescencia emmprin sobre el RPE entre el área de expresión del transgén y el resto del tejido de ojería (Fig. 14 paneles A y B) o los tejidos de ojería de control no inyectados (control). Además, no se observaron diferencias en la inmunofluorescencia emmprin entre las áreas de expresión del transgén de tejidos de ojería pretratados con la mezcla de AdCAGCD59 y AdCAGGFP en comparación con tejidos de ojería pretratados con control negativo (Fig. 14 paneles A y B). Estos datos muestran claramente que la protección de RPE murino contra la deposición de MAC humano se debía a la expresión *in vivo* de hCD59 suministrada por adenovirus.

No se observaron diferencias en la inmunofluorescencia emmprin entre las áreas de expresión del transgén de la mezcla de AdCAGCD59+AdCAGGFP, y en ojerías inyectadas con control (Fig. 14 paneles A y B y Fig. 15) observada a dos aumentos. Se obtuvieron resultados similares con células RPE primarias de ratón (Fig. 16). Se pretrataron células RPE de pase 0 con aproximadamente 500 vp/célula de vector AdCAGCD59 o vector AdCAGGFP, y tres días después del contacto, las células se pusieron en contacto con el anticuerpo anti-emmprin de ratón seguido por exposición a NHS al 50% durante 4 minutos. La inmunohistoquímica mostró una reducción significativa en la inmunotinción MAC de células pretratadas con vector AdCAGCD59 en comparación con células pre-tratadas con vector AdCAGGFP (Fig. 16), siendo los datos de inmunofluorescencia MAC para las últimas similares a las de células RPE primarias de ratón no en contacto con ningún vector (control).

Las células RPE murinas primarias pretratados con AdCAGGFP (Fig. 14 panel C) o AdCAGCD59 (Fig. 14 panel D) ensayadas por métodos de inmunohistoquímica demostraron que la expresión de hCD59 no provocaba cambios en los niveles de expresión de emmprin en células RPE primarias de ratón.

La protección contra la deposición de MAC no se debió a diferencias en la expresión de emmprin y/o la unión de anticuerpo anti-emmprin ya que la inmunocitoquímica para emmprin de ratón no reveló diferencias entre las células pretratadas con control y AdCAGCD59. Los datos descritos demuestran los efectos destructivos de la deposición de MAC humano sobre el RPE y sobre células RPE primarias y la protección significativa de estas células por la expresión de hCD59.

#### Ejemplo 16: Protección del endotelio de la córnea contra la deposición de MAC por suministro de hCD59 mediado por vector

Se ensayó la deposición de MAC y la protección por hCD59 suministrada por adenovirus adicionalmente usando epitelio de la córnea murino. El epitelio de la córnea es un tejido fácilmente accesible y se cultiva, y pretrata con adenovirus y otros vectores *in vivo* y *ex vivo*. Además, los ensayos de este documento usando endotelio de la córnea demostraron ser eficaces para la transducción homogénea de las células endoteliales y la medición eficaz de otros factores tales como agentes que afectan a los reguladores de complemento. La investigación de la deposición de MAC sobre endotelio de la córnea es adicionalmente útil para explorar inhibidores de deposición de MAC y ensayar complementos en RPE *in vitro* e *in vivo*.

Se observó que el suministro *ex vivo* de hCD59 al endotelio de la córnea en este documento protegía significativamente a esas células contra la deposición de MAC humano tras mezcla adicional con el anticuerpo anti-emmprin de ratón y NHS al 50% durante 20 minutos (Fig. 17 panel B; véase también la Fig. 11 panel C). En contraste, el suministro de la proteína marcadora de control GFP no lograba proteger al endotelio de la córnea contra la deposición de MAC humano (Fig. 17 panel A), que se observó que era similar en grado a la deposición de MAC sobre el endotelio de la córnea de córneas que no se habían tratado (control; Fig. 9 panel C). La expresión de GFP sobre el endotelio de la córnea de córneas contactadas con NHS aparecían fragmentadas (Fig. 17 panel A), por ejemplo debido a la pérdida de células endoteliales tras el daño por la deposición de MAC. Esta fragmentación no se observó con córneas de control no expuestas a NHS (Fig. 11 panel D y Fig. 17 panel C). Los datos mostraron que la protección del endotelio de la córnea contra MAC por AdCAGCD59 no se debía a una diferencia en la expresión de emmprin y/o la unión de anticuerpo anti-emmprin ya que la inmunohistoquímica no reveló diferencias en la inmunotinción emmprin sobre el endotelio de la córnea pretratado con cada uno de AdCAGCD59 y AdCAGGFP de control (Fig. 17 paneles C y D).

El contacto de las córneas con el anticuerpo anti-emmpin de ratón seguido por la adición de NHS al 50% durante 20 minutos a 37°C provocó una inmunotinción MAC extensiva, brillante sobre el endotelio de la córnea (Fig. 18 panel A). Se observó tinción mínima sobre el endotelio de córneas tratadas con HI-NHS al 50% (durante 20 minutos a 37°C). Para evaluar la eficacia de hCD59 de proteger el endotelio de la córnea de la deposición de MAC humano, se

pretrataron córneas *ex vivo* con los vectores AdCAGCD59 o AdCAGGFP de control. Los datos mostraron que la expresión de hCD59 sobre el endotelio de la córnea tras infección *ex vivo* con AdCAGCD59 se confirmaba por inmunohistoquímica usando el anticuerpo anti-hCD59, mientras que no se observó tinción para hCD59 sobre córneas pretratadas con control (AdCAGGFP) (Fig. 18 panel B). El pretratamiento del endotelio de la córnea con hCD59 protegía significativamente esas células de la deposición de MAC humano, ya que los datos mostraron una reducción en la intensidad de inmunofluorescencia MAC del 86% ( $p < 0.0001$ , Fig. 18 panel C) en comparación con el pretratamiento con GFP, que no logró proteger el endotelio de la córnea ya que los niveles de deposición de MAC fueron similar a aquellos sobre el endotelio de la córnea de córneas de control no pretratadas. Por otra parte, la expresión GFP sobre el endotelio de la córnea de córneas tratadas con NHS aparecía fragmentada lo que indica pérdida de células endoteliales debida a daños por deposición de MAC. Esta fragmentación no se observó sobre córneas pretratadas con AdCAGGFP no expuestas a NHS (Fig. 18 paneles B y D).

Se demostró que la protección contra la deposición de MAC sobre el endotelio de la córnea de córneas pretratadas con AdCAGCD59 no era debida a una diferencia en la expresión de emmpin y/o la unión de anticuerpo anti-emmpin, ya que los datos de inmunohistoquímica no mostraron diferencias en la inmunotinción emmpin sobre el endotelio de la córnea de cada una de las córneas pretratadas con AdCAGCD59 y AdCAGGFP, y de control no pretratadas (Fig. 18 panel D).

Estos datos muestran adicionalmente que el pretratamiento con protege los tejidos oculares contra la deposición de MAC. Se observó que la protección sobre el endotelio de la córnea era mayor que el de RPE. Factores adicionales podrían afectar a esta protección, tales como mayor transducción y más homogénea del endotelio de córneas pretratadas *ex vivo* y la eficacia de moduladores y reguladores de componentes séricos, y de otros posibles agentes que afecten a la degeneración macular.

#### Ejemplo 17: Construcción de hCD59 secretada soluble y expresión de CD59 humana en células en contacto con vector

Las construcciones de CD59 usadas en los ejemplos anteriores se construyeron para la expresión de una proteína asociada a membrana a través de un enlazador GPI. Se amplificó por PCR CD59 humana que carecía de la secuencia codificante de los 26 aminoácidos C terminales, que incluye una secuencia señal para la unión del anclaje GPI en el resto nucleotídico codificante del aminoácido asparagina en la posición 77 usando un cebador directo que contiene un sitio XhoI (subrayado) (5'ccccctcgagtggacaatcacaatggg3'; SEC ID N° 1) y un cebador inverso con un sitio EcoRV (subrayado) (5'taaggagatatcttaatttcaagctgttcgta3'; SEC ID N° 3). El cebador inverso introdujo un codón de parada tras la asparagina 77 produciendo una secuencia que codifica una forma soluble de CD59 humana. El producto de PCR digerido con XhoI/EcoRV se clonó en pShCAG digerido con XhoI/EcoRV y el plásmido resultante pShCAGsCD59 se usó para producir el adenovirus AdCAGsCD59 como se describe en este documento. Por tanto, la señal GPI se eliminó por métodos recombinantes para obtener una construcción que expresa una versión soluble, secretada, y se realizaron análisis para ensayar si la versión secretada podría ser útil como agente terapéutico, ya que se propagaría más fácilmente a través de la retina y conferiría protección contra la deposición de MAC para células que no estuvieran directamente en contacto y se transdujeran con un vector de transferencia génica.

Para evaluar esta construcción, se prepararon células que portan la construcción de CD59 soluble, expresada en un plásmido o en un adenovirus, y se cultivaron y se determinó su expresión en el medio. La Fig. 19 es una fotografía de una transferencia de Western. El segundo canal desde la derecha era la versión soluble secretada (con el enlazador GPI eliminado) y se marcó AdCAG<sub>s</sub>CD59/medios no filtrados en la fotografía. El carril muestra secreción de una gran cantidad de proteína de aproximadamente 16 kDa. El canal dos por encima y a la derecha de AdCAG<sub>s</sub>CD59/medios ni filtrados (es decir, AdCAGCD59, primer canal en la derecha) es la forma no soluble de CD59 a partir de un adenovirus. La señal para la versión unida a membrana fue mucho más débil porque el anticuerpo usado en esta transferencia detectaba la forma soluble mucho mejor que la forma unida a membrana. La potencia de la señal se comparó solamente entre las mismas formas peptídicas.

Para determinar el efecto de la expresión de CD59 que no tiene señal GPI, modificada por ingeniería de modo que la proteína CD59 secretada soluble se propague extracelularmente a través de la retina y confiera protección contra la deposición de MAC sobre células que no estuvieran directamente transducidas con un vector de transferencia génica, se expresó la proteína CD59 soluble en células de la retina y en córneas. Por tanto estas células y tejidos se prepararon para ensayo *in vivo* de la construcción de CD59 secretada soluble como un agente terapéutico mejorado potencial, para determinar si esta construcción es incluso más eficaz en reparación de la deposición de MAC que la forma unida a membrana.

Se realizaron experimentos para determinar el grado en que el vector de expresión de CD59 secretada soluble protegía los tejidos y células de los cambios de morfología celular y lisis celular asociada con la deposición de MAC. El vector de expresión de CD59 secretada soluble se ensayó también en un modelo de AMD húmeda.

- 5 Los resultados de estos experimentos serán una indicación de las ventajas potenciales de la forma soluble de CD59 como un agente terapéutico para la degeneración macular en comparación con la forma unida a membrana. Posibilidades adicionales incluyen el uso tanto de la forma unida a membrana como de la forma soluble en diferentes condiciones, o en combinación.

10 LISTA DE SECUENCIAS

<110> Tufts University

- 15 <120> Un modelo humanizado de formación de complejo de ataque a membrana (MAC) sobre retina murina y composiciones, kits y métodos para el tratamiento de degeneración macular

<130> 34724 – 076

- 20 <150> 61/066.062  
<151> 15 - 02 – 2008

<150> 61/066.288  
<151> 19 - 02 - 2008

- 25 <150> 61/070.650  
<151> 25 - 03 - 2008

<160> 3

- 30 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
<211> 27  
<212> ADN  
35 <213> Nucleótido

<400> 1  
ccccctcgag tggacaatca caatggg 27

- 40 <210> 2  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Nucleótido

- 45 <400> 2 31  
ccccgatat caacggggag ttgggagaa g 31

- 50 <210> 3  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Nucleótido

- 55 <400>3  
taaggagata tcttaatttt caagctgttc gta 34

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la degeneración macular en un sujeto, que comprende una proteína CD59 soluble o una fuente de expresión de una proteína CD59 soluble recombinante (rsCD59), en la que la proteína CD59 soluble o rsCD59 consiste esencialmente en la proteína CD59 que tiene una delección del dominio de anclaje a glucosil fosfatidil inositol presente en el cuarto exón.
- 10 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición se formula para suministro ocular, en una dosis eficaz para tratar la degeneración macular.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la fuente de la proteína rsCD59 es un vector viral que comprende un genoma modificado por ingeniería genética derivado de al menos un virus seleccionado entre el grupo de adenovirus, virus adeno-asociado, herpesvirus, y lentivirus.
- 15 4. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición es adecuada para suministro por al menos una vía seleccionada entre el grupo que consiste en inyección, colirio, y pomada.
- 20 5. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende adicionalmente al menos un agente seleccionado entre el grupo que consiste en agente anti-tumoral, antiviral, antibacteriano, antimicobacteriano, anti-fúngico, anti-proliferativo y anti-apoptótico.
- 25 6. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la proteína CD59 soluble o la proteína CD59 soluble recombinante es humana.

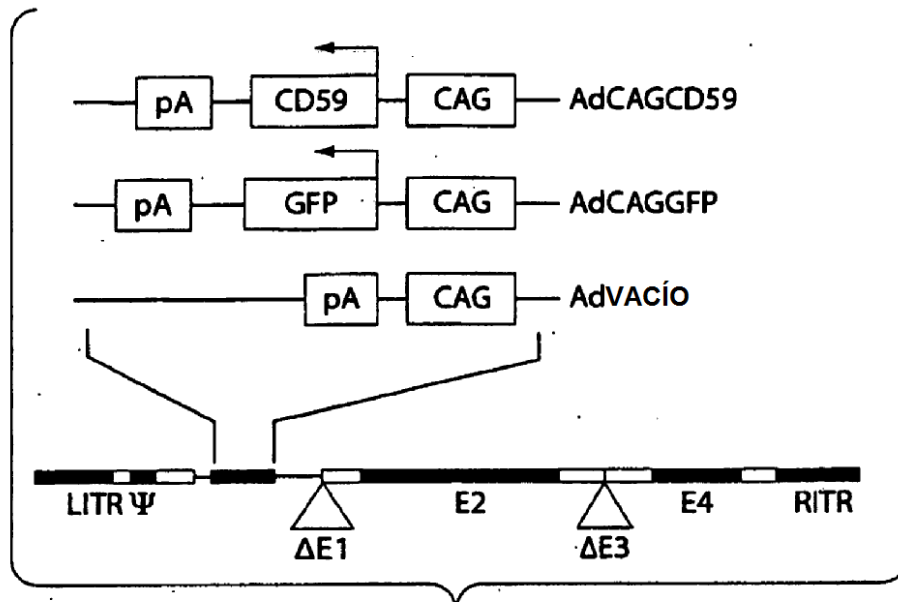


Figura 1A

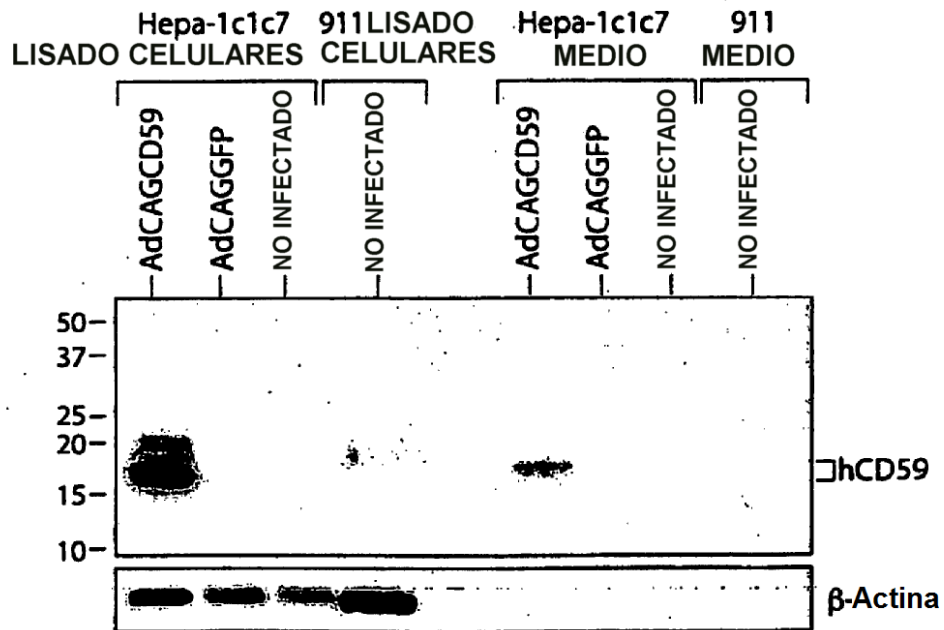
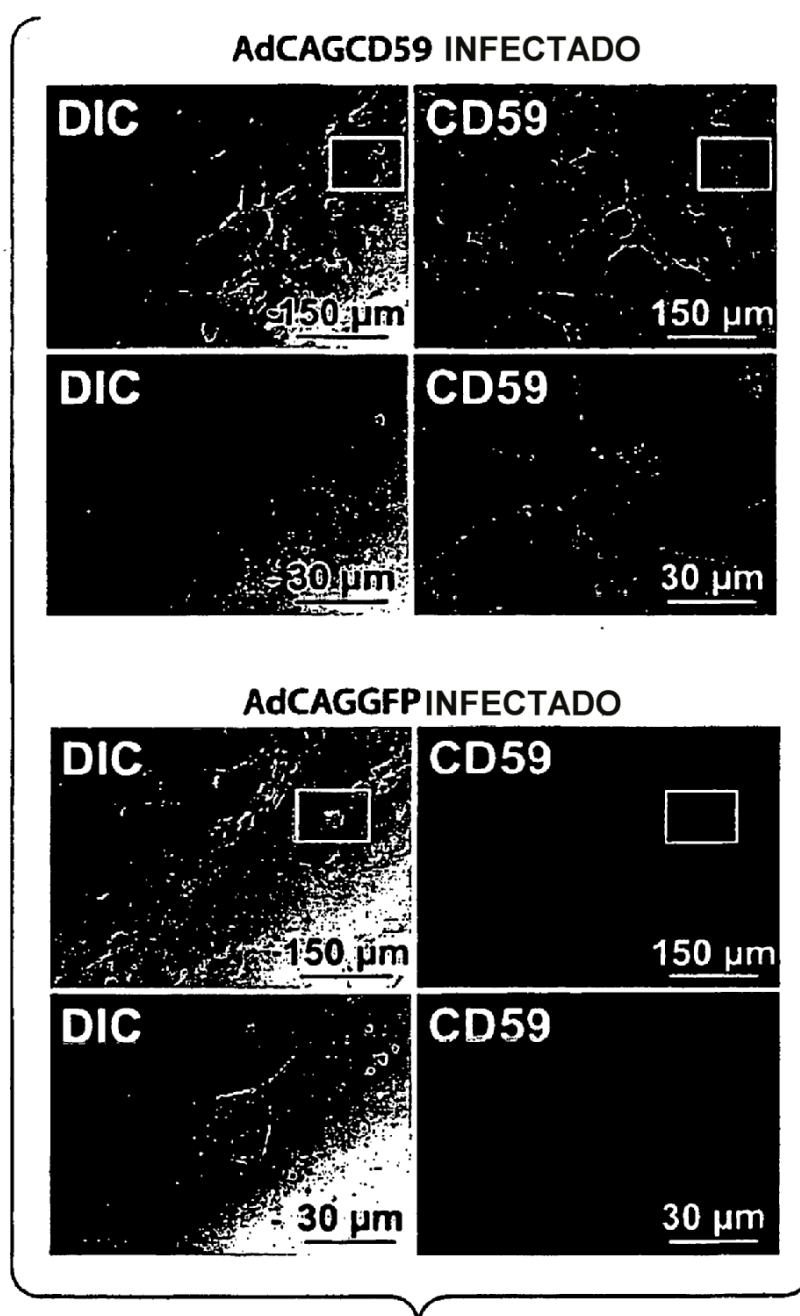


Figura 1B



**Figura 1C**

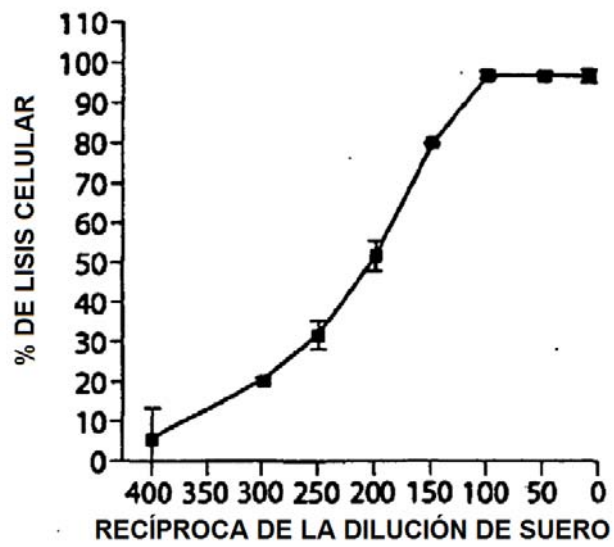


Figura 2A

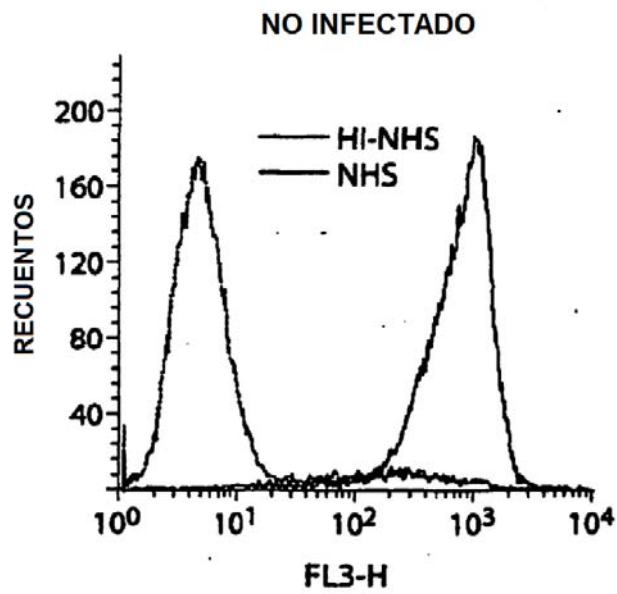
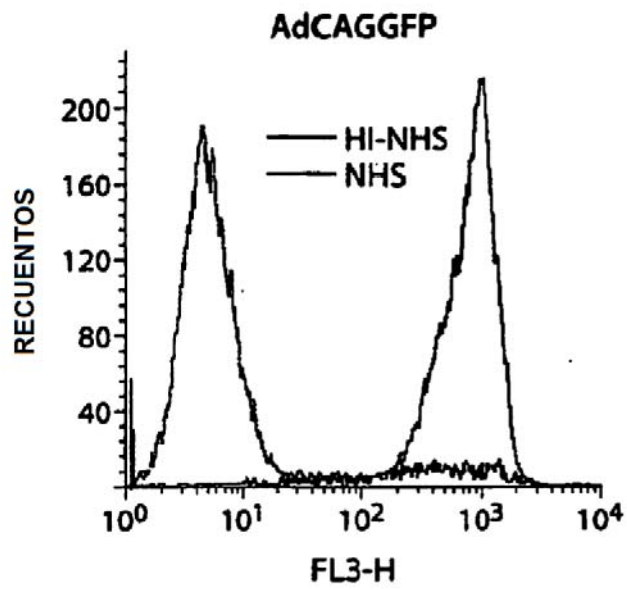
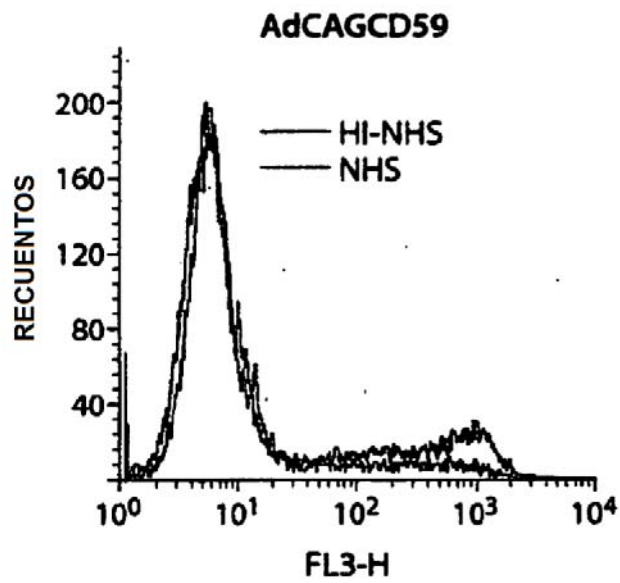


Figura 2B

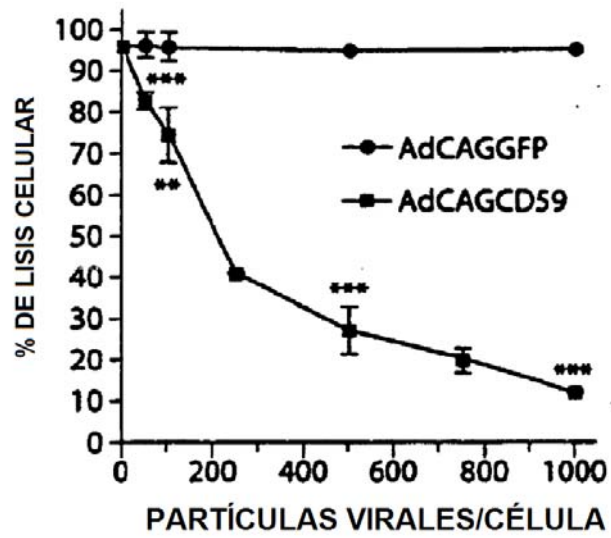
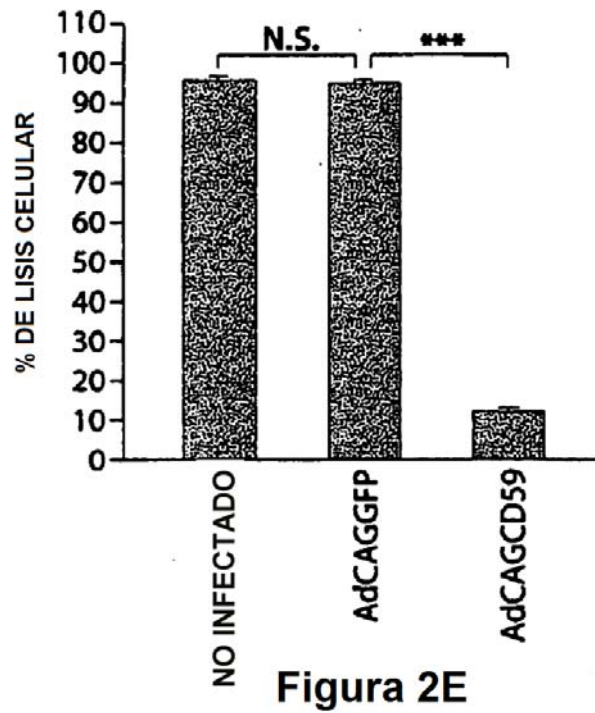


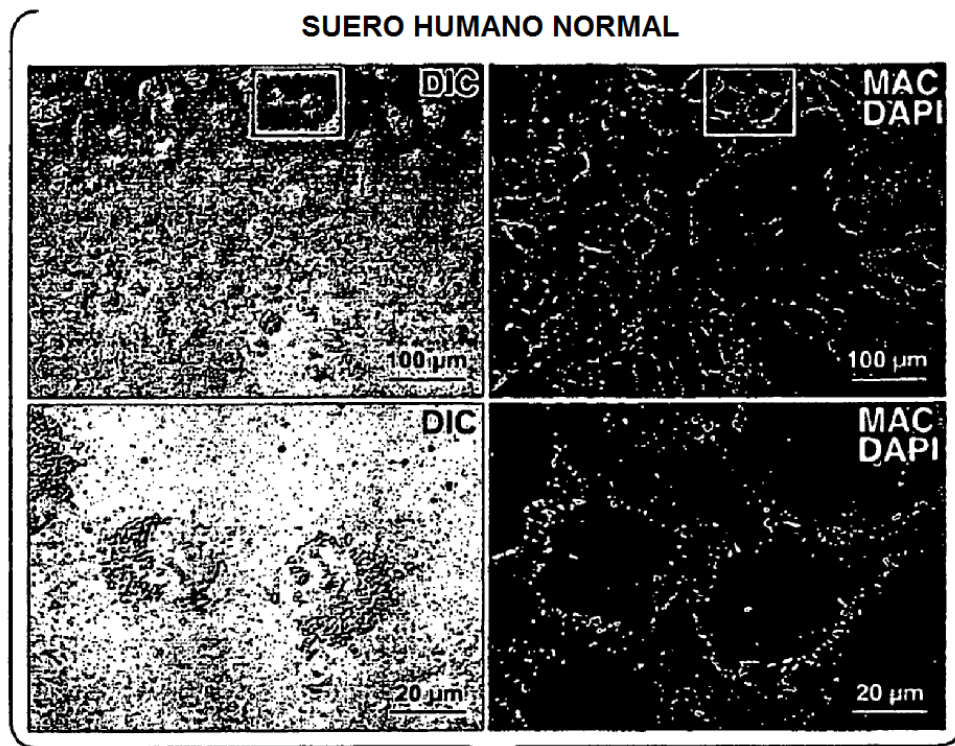
**Figura 2C**



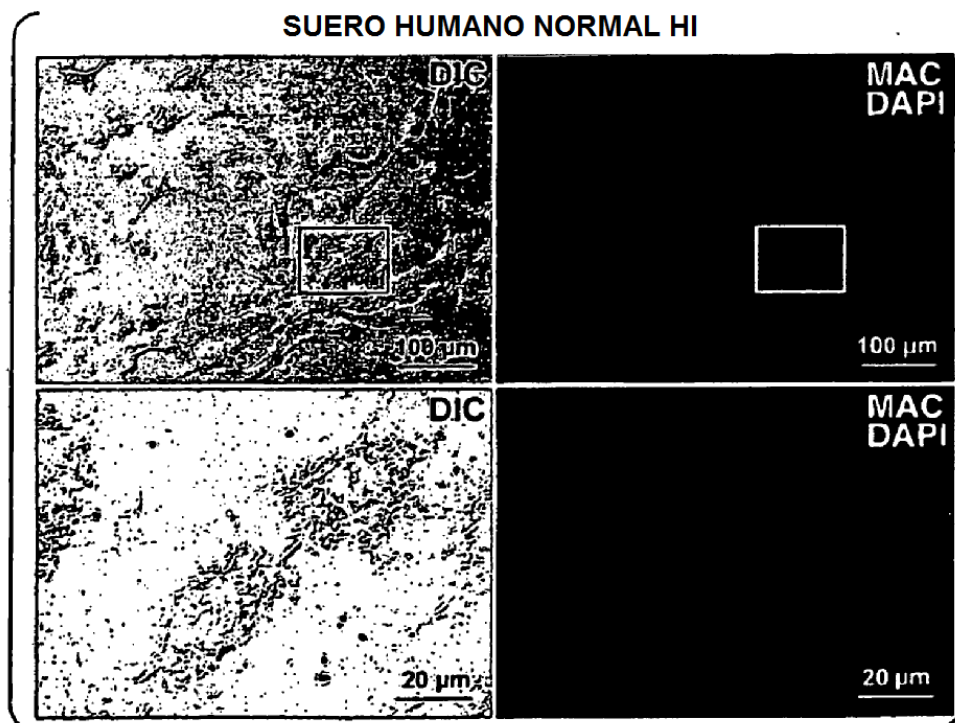
**Figura 2D**







**Figura 3A**



**Figura 3B**

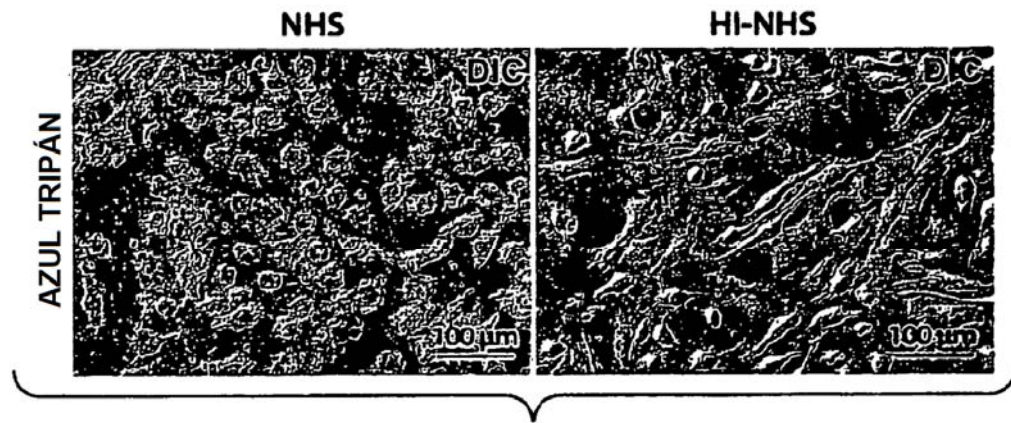


Figura 3C

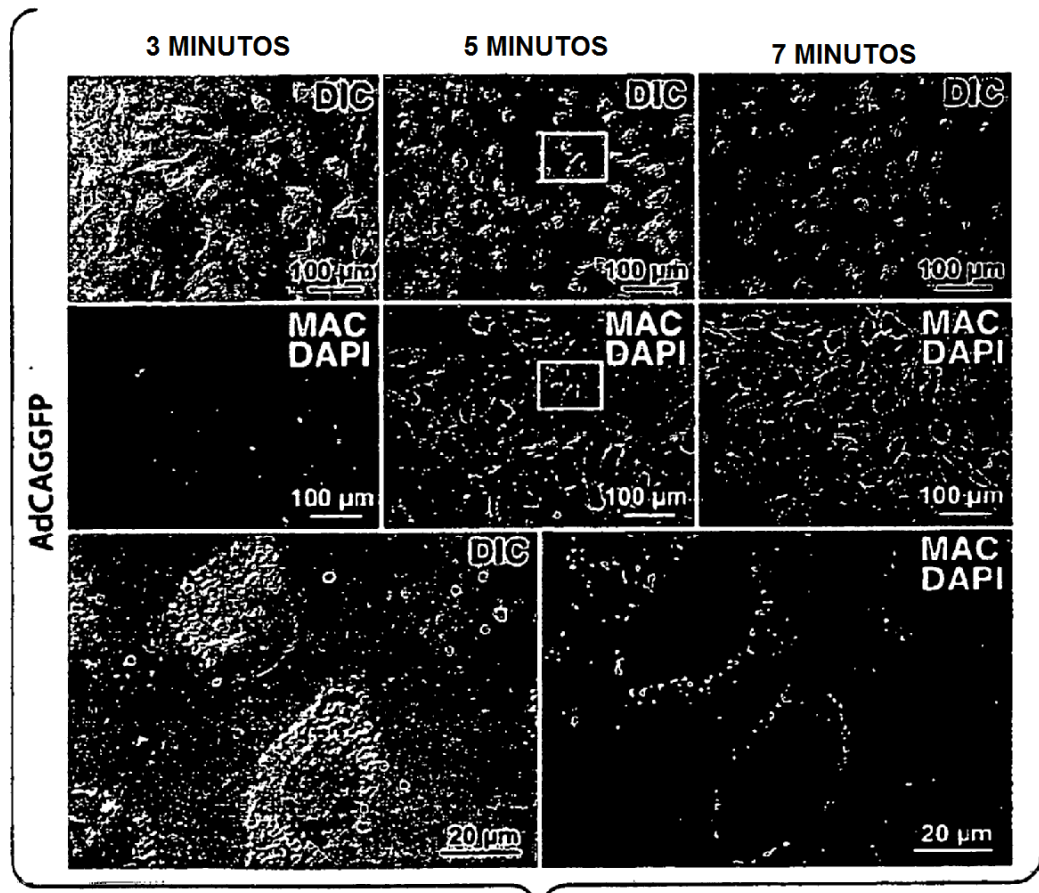


Figura 4A

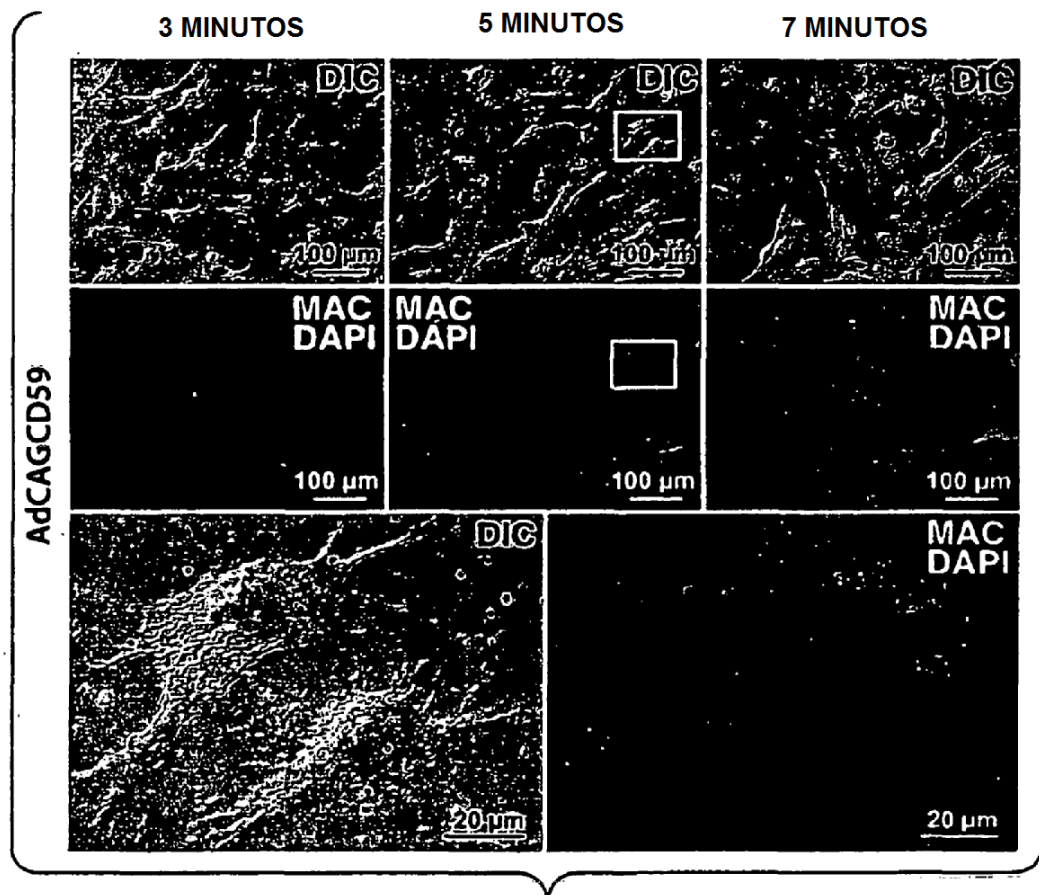
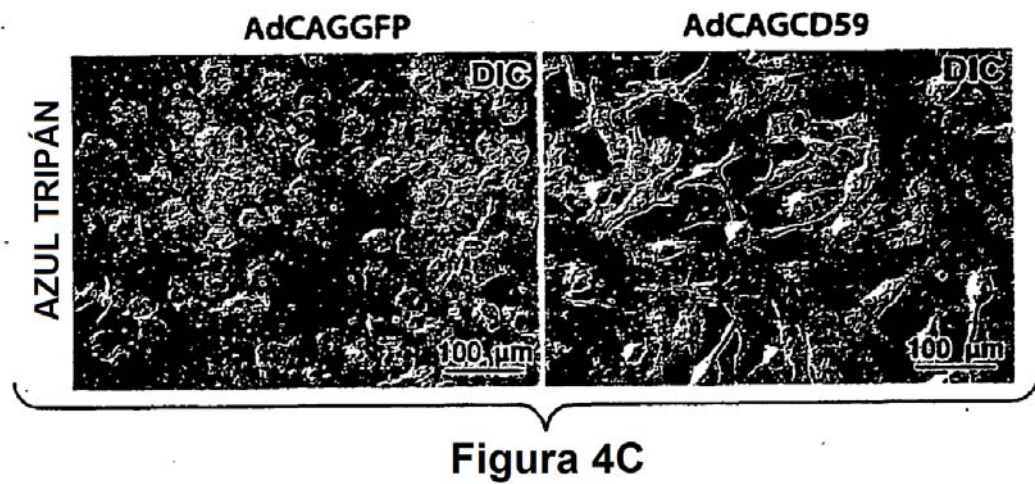
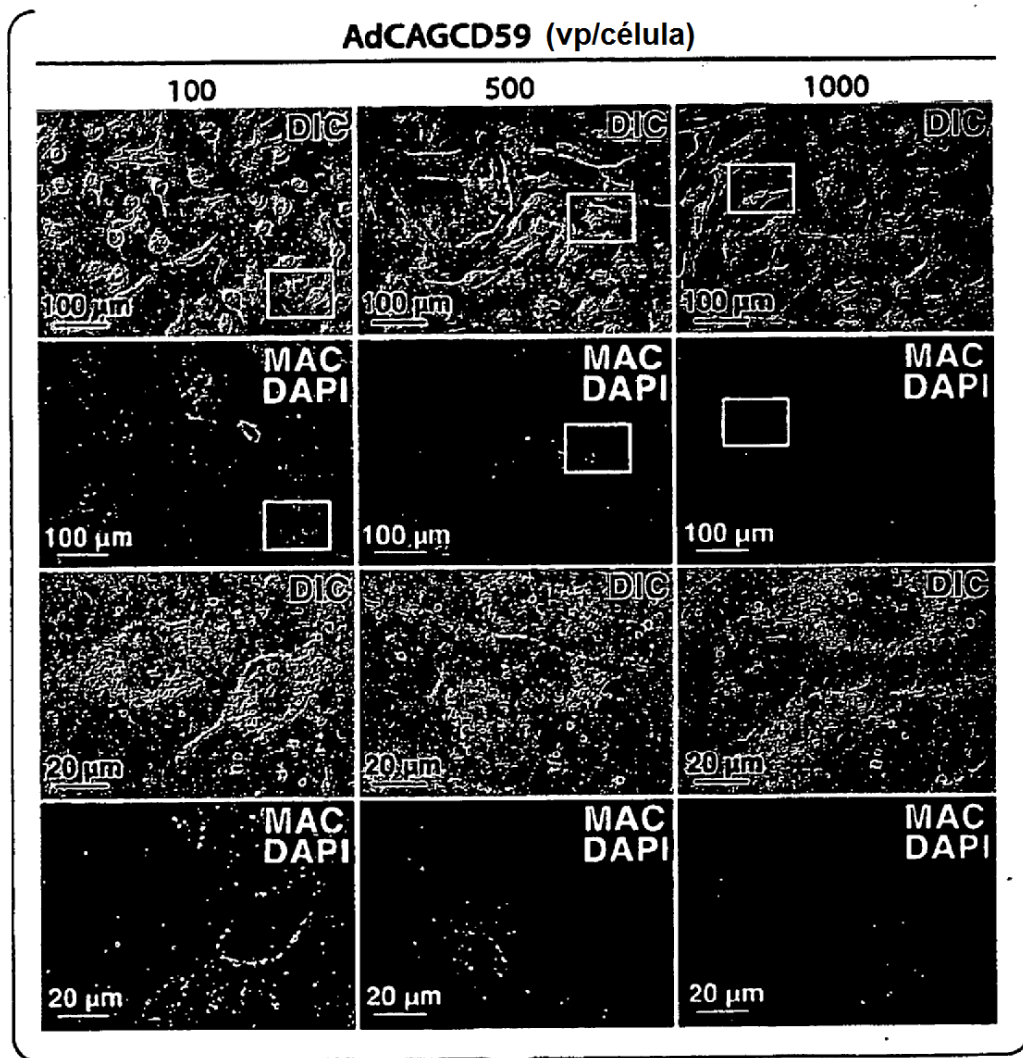


Figura 4B

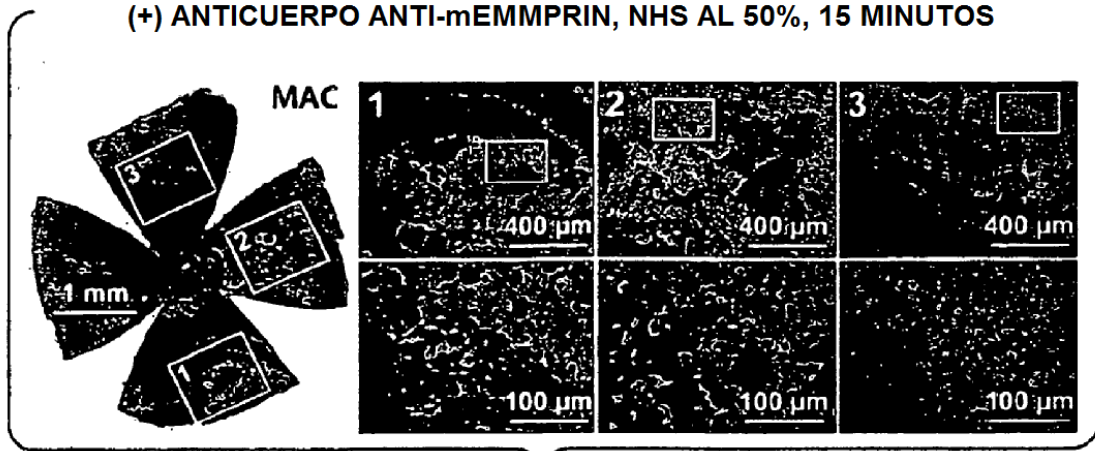






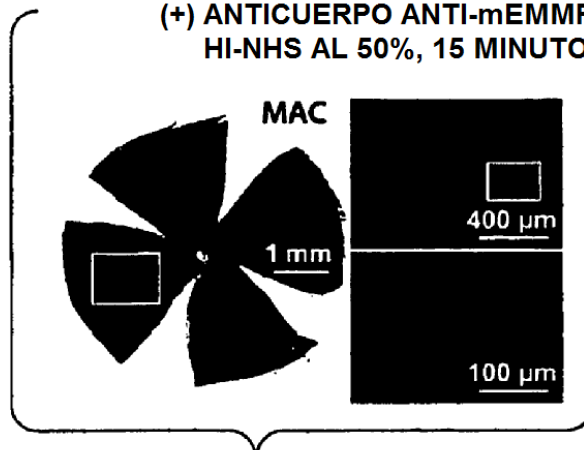
**Figura 5**

(+) ANTICUERPO ANTI-mEMMPRIN, NHS AL 50%, 15 MINUTOS



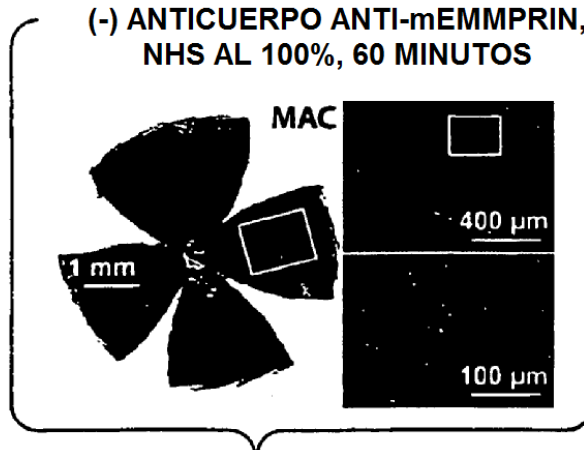
**Figura 6A**

(+) ANTICUERPO ANTI-mEMMPRIN,  
HI-NHS AL 50%, 15 MINUTOS



**Figura 6B**

(-) ANTICUERPO ANTI-mEMMPRIN,  
NHS AL 100%, 60 MINUTOS



**Figura 6C**



(+) ANTICUERPO ANTI-mEMMPRIN, NHS AL 50%, 7 MINUTOS

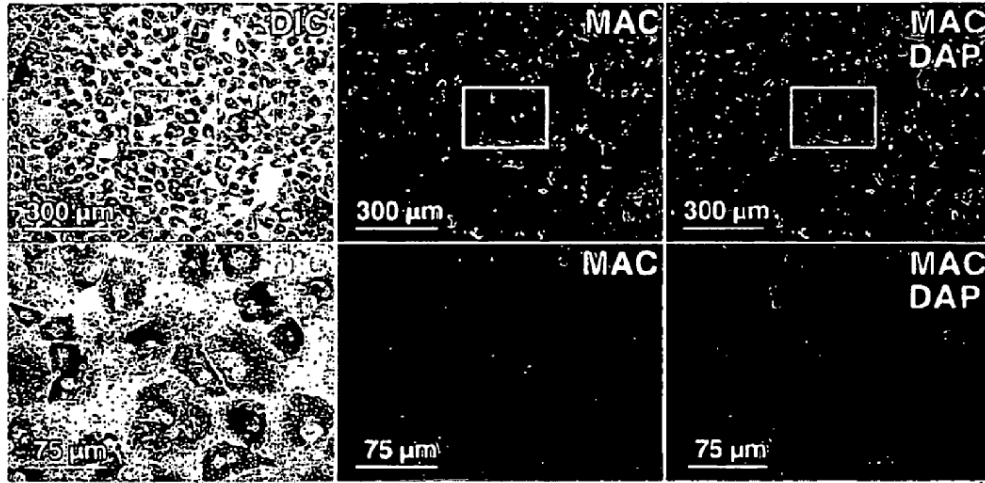


Figura 6D

(+) ANTICUERPO ANTI-mEMMPRIN, HI-NHS AL 50%, 7 MINUTOS

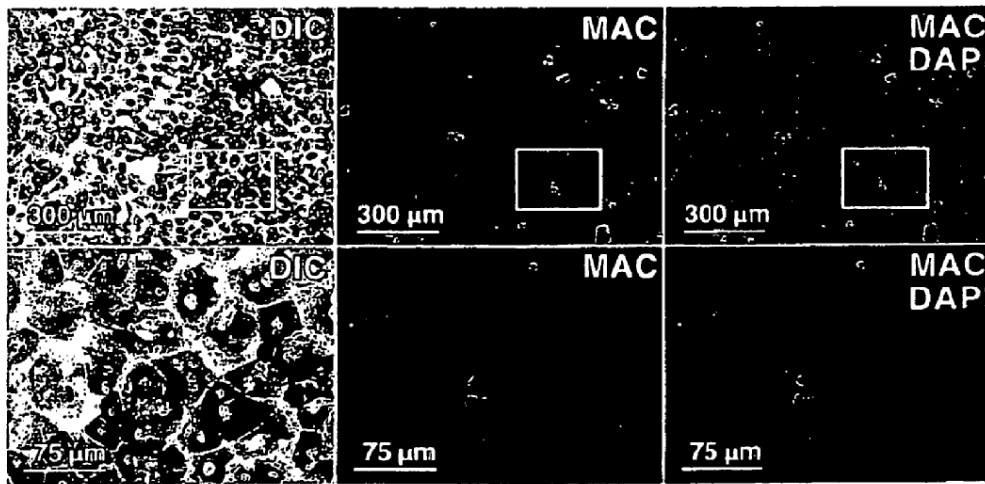


Figura 6E

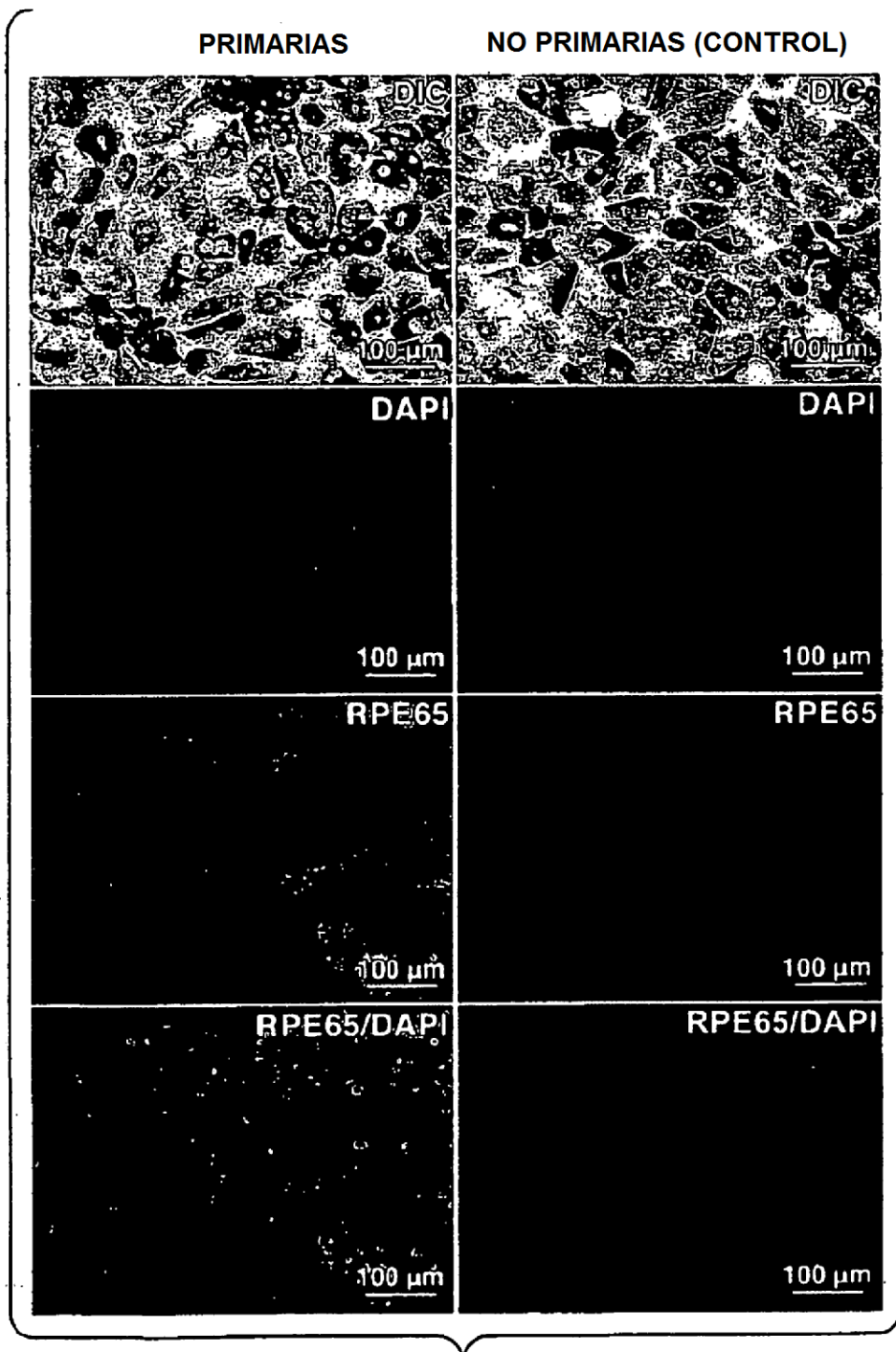
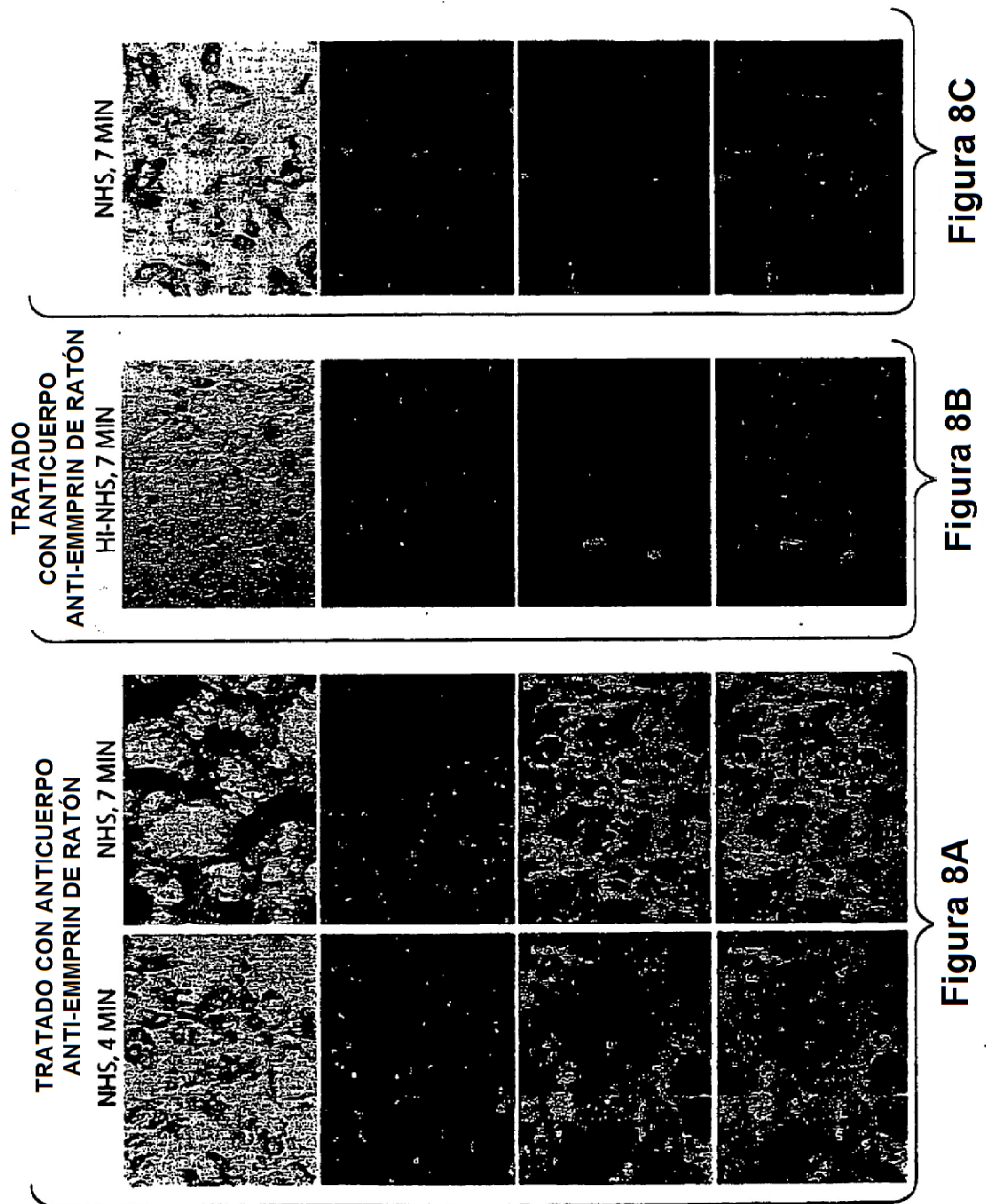
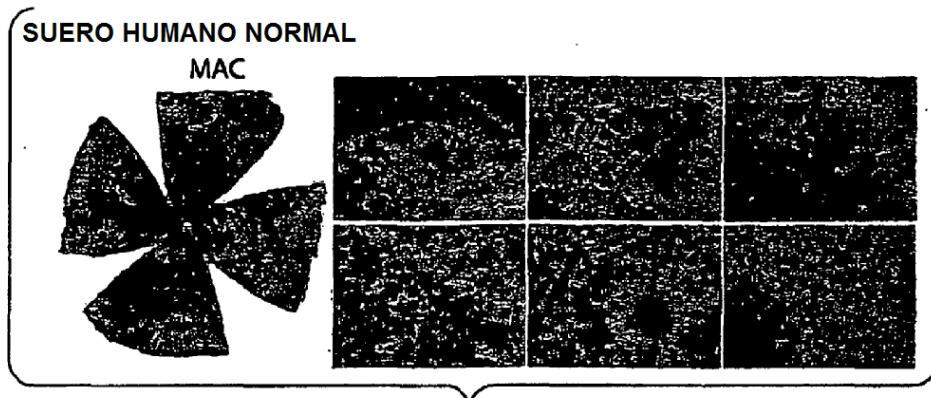
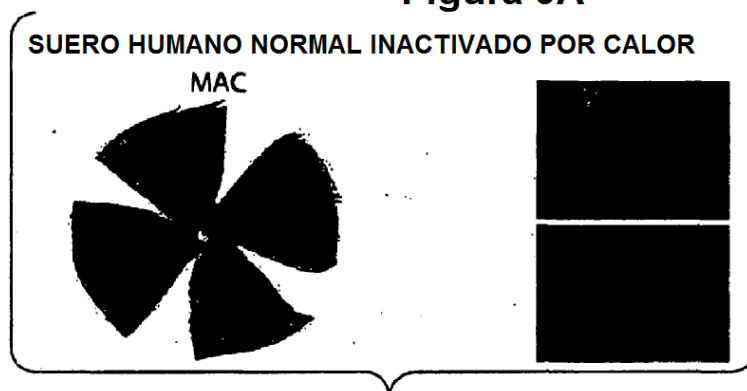


Figura 7

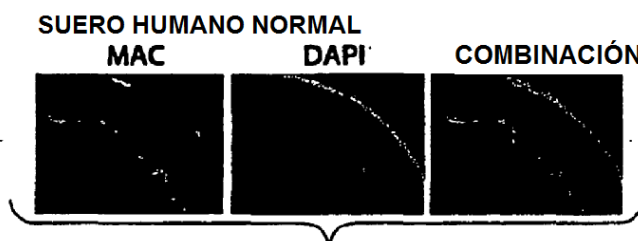




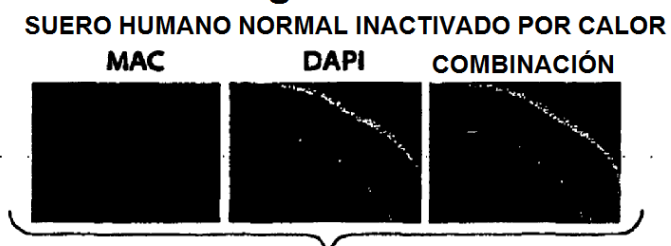
**Figura 9A**



**Figura 9B**



**Figura 9C**



**Figura 9D**

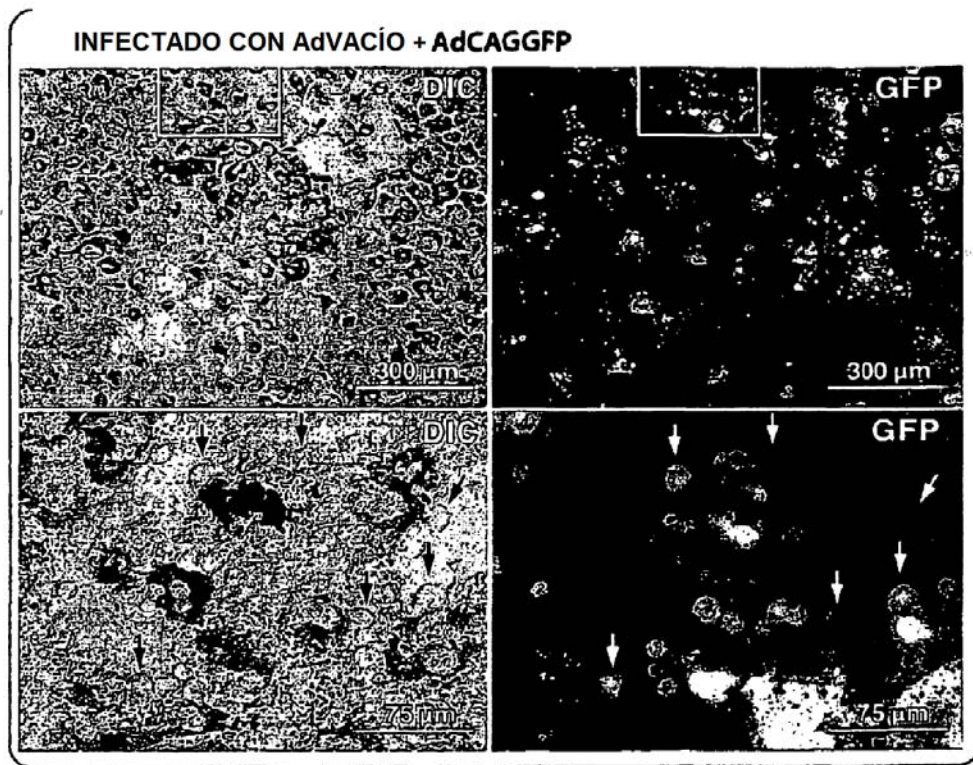


Figura 10A



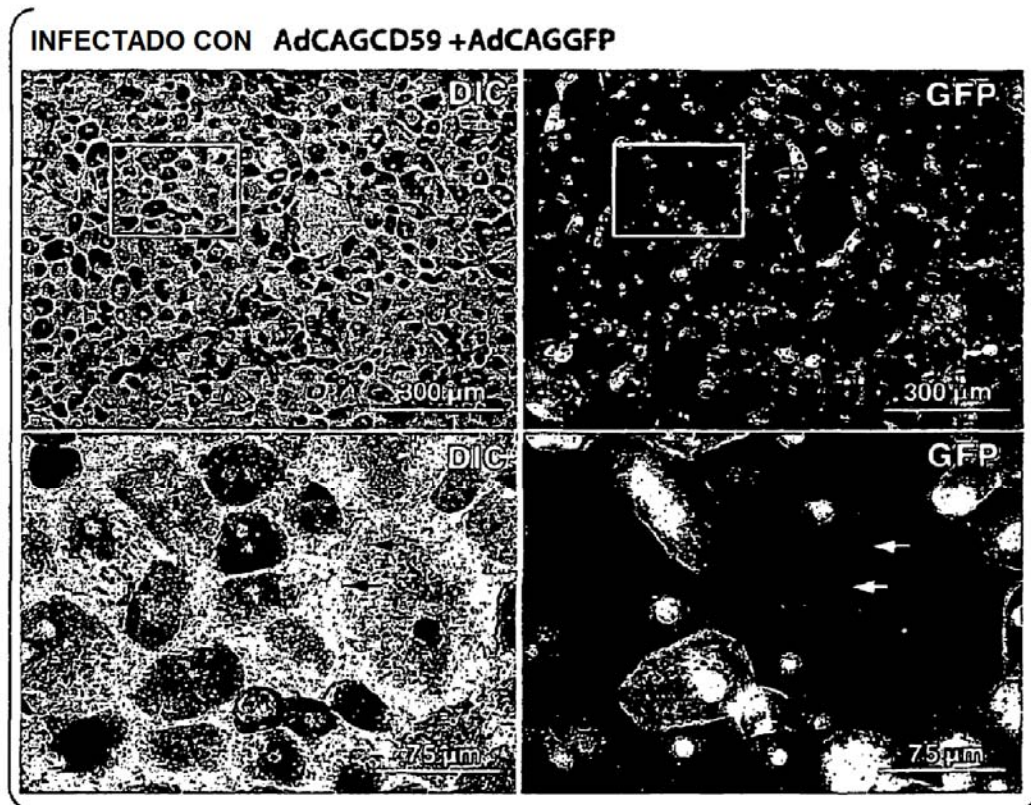
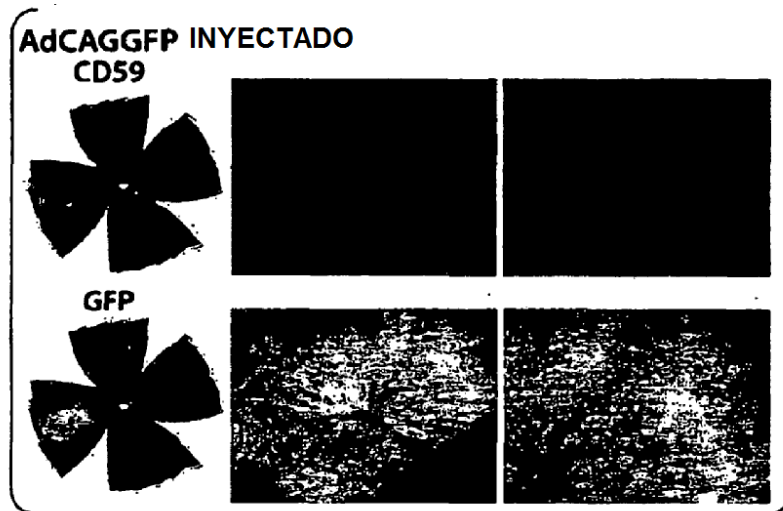


Figura 10B



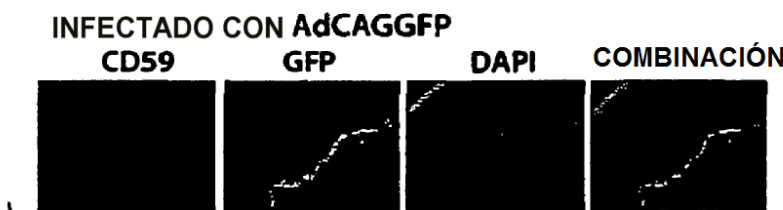
**Figura 11A**



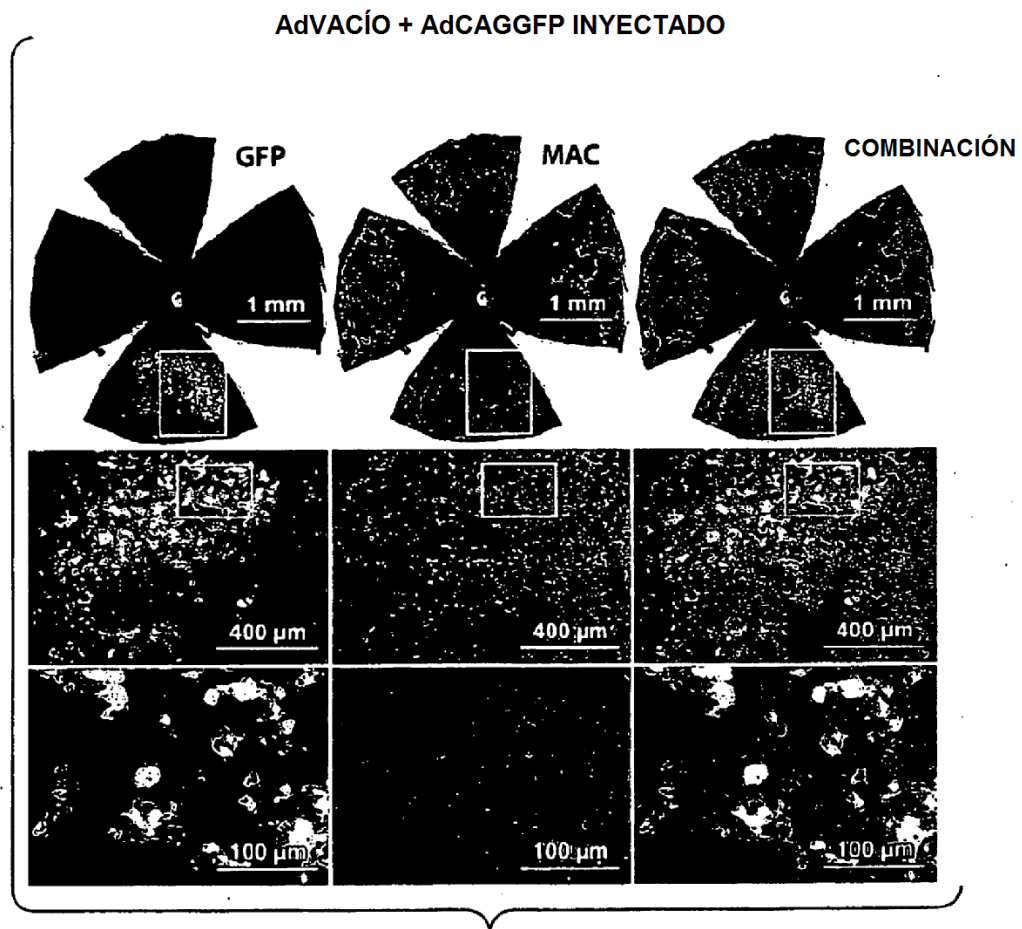
**Figura 11B**



**Figura 11C**

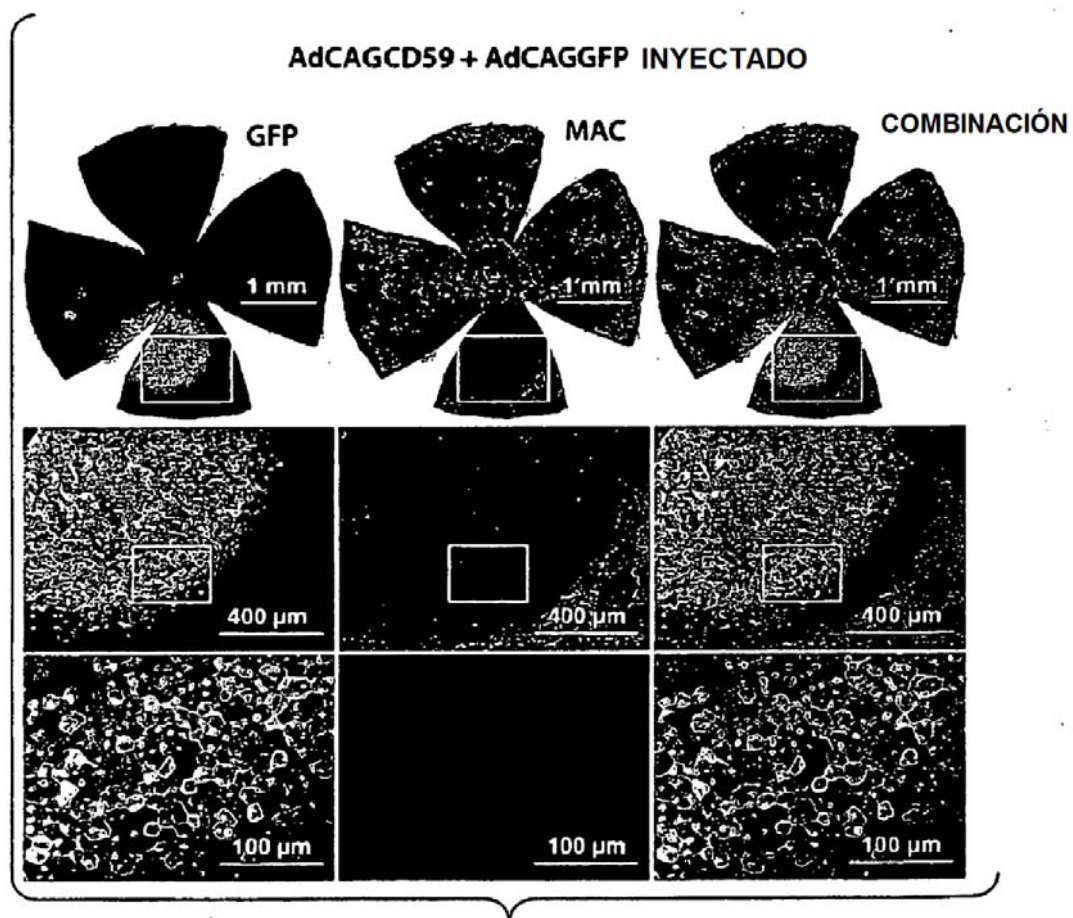


**Figura 11D**



**Figura 12A**





**Figura 12B**

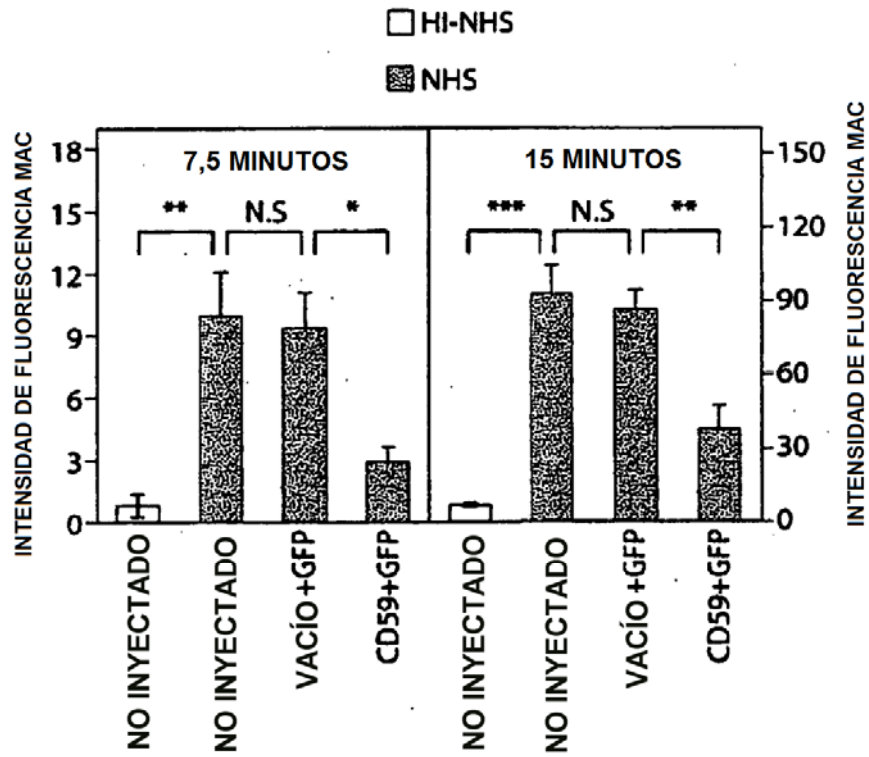
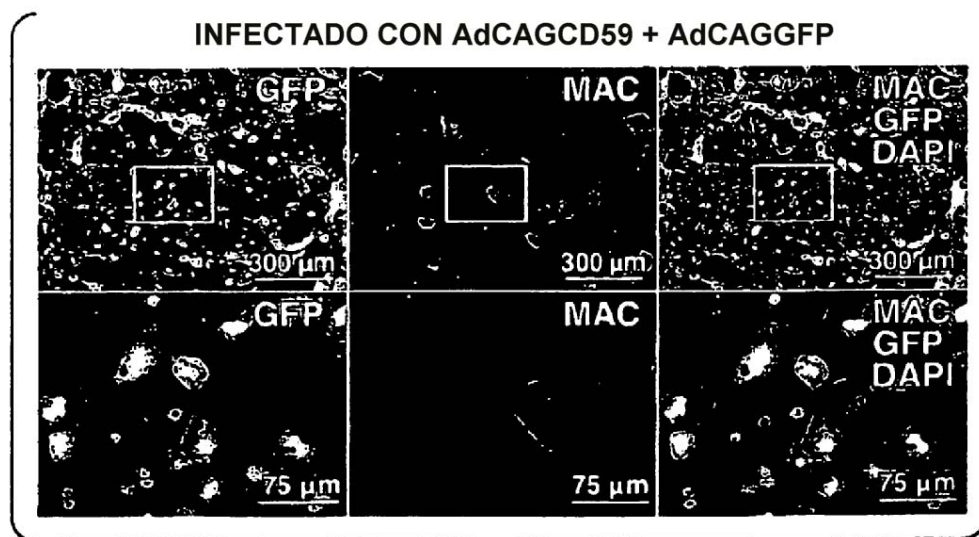
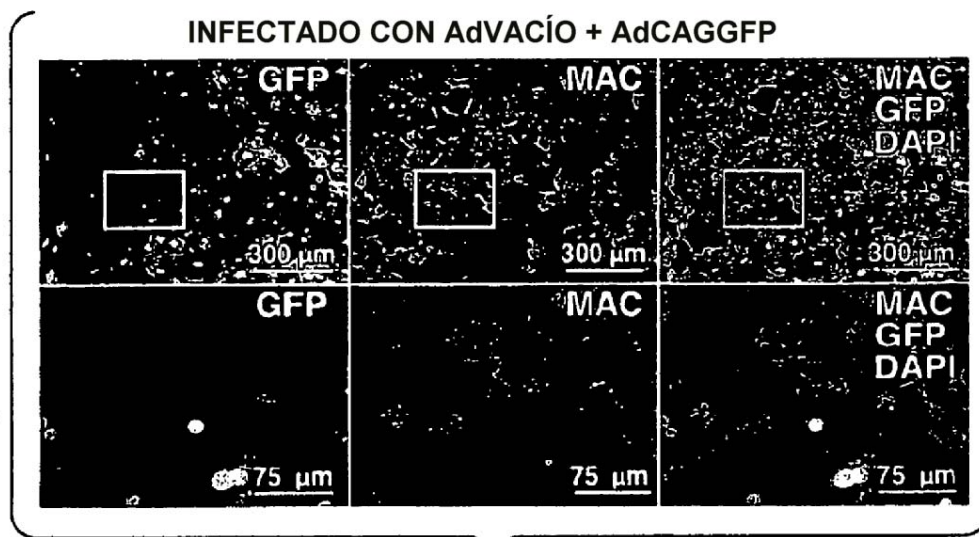


Figura 12C



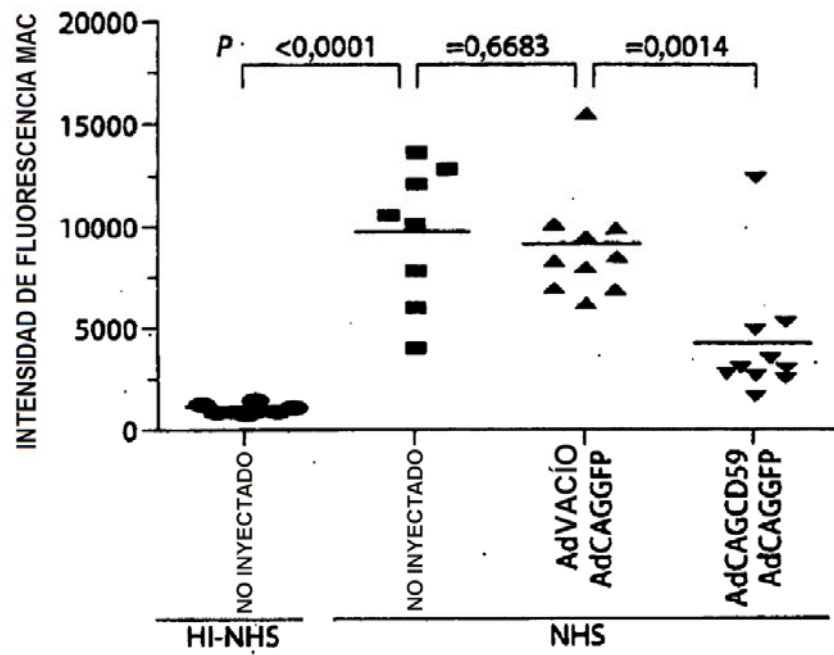


Figura 13A

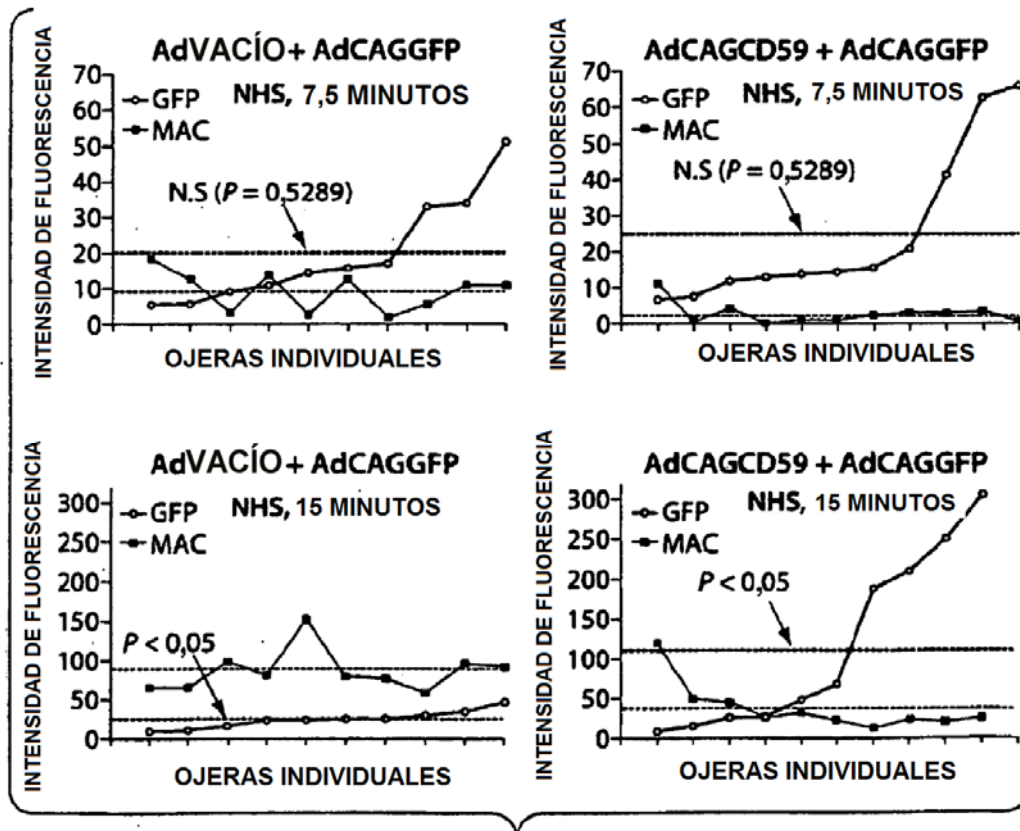
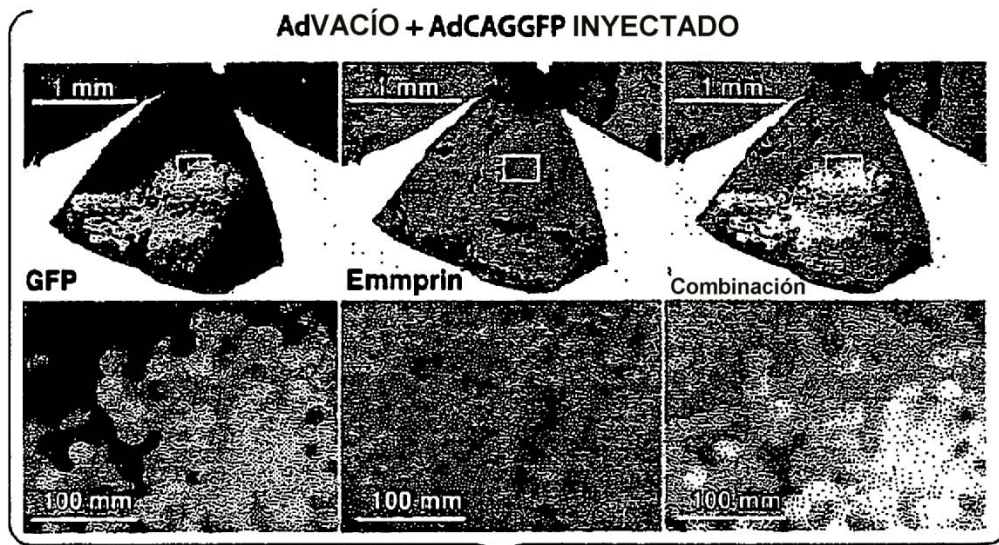
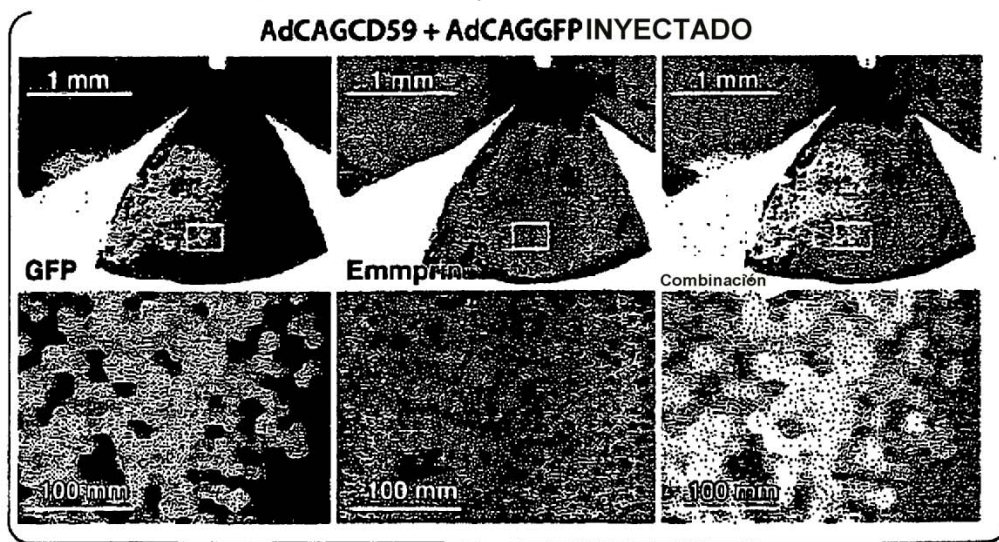


Figura 13B

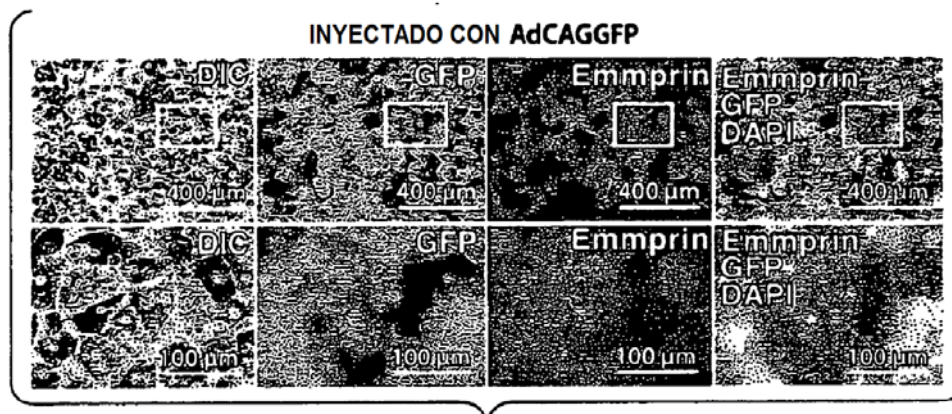




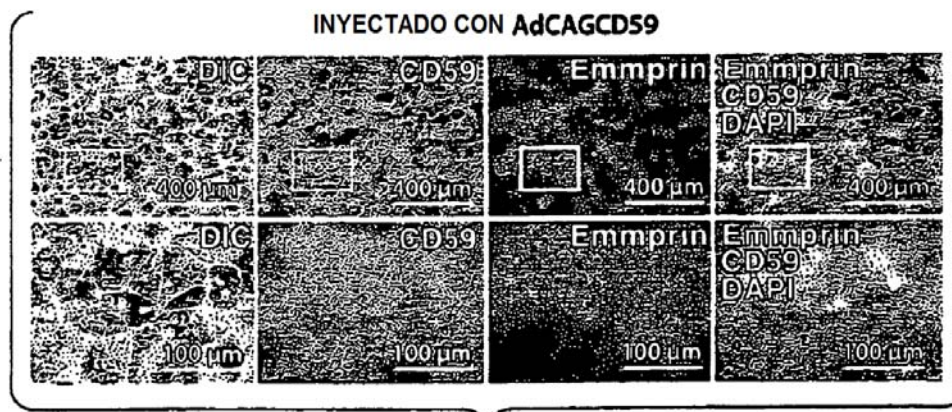
**Figura 14A**



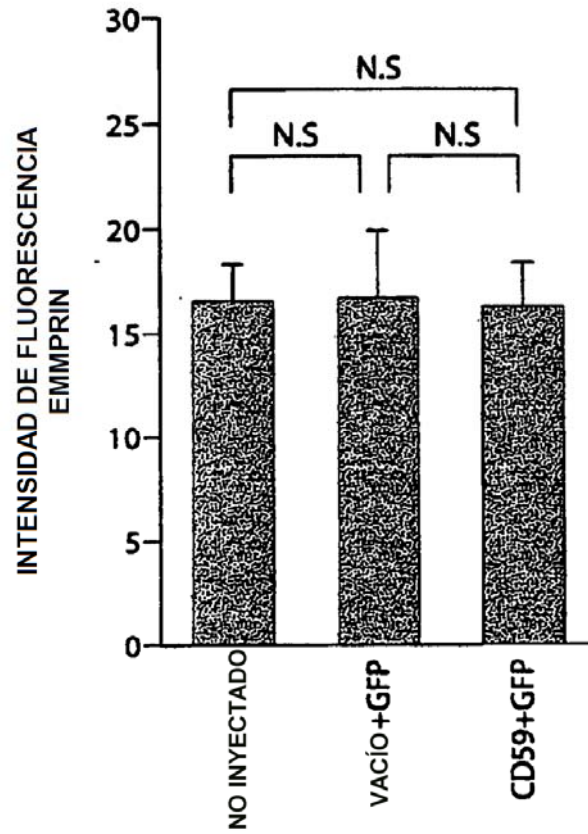
**Figura 14B**



**Figura 14C**



**Figura 14D**



**Figura 15**



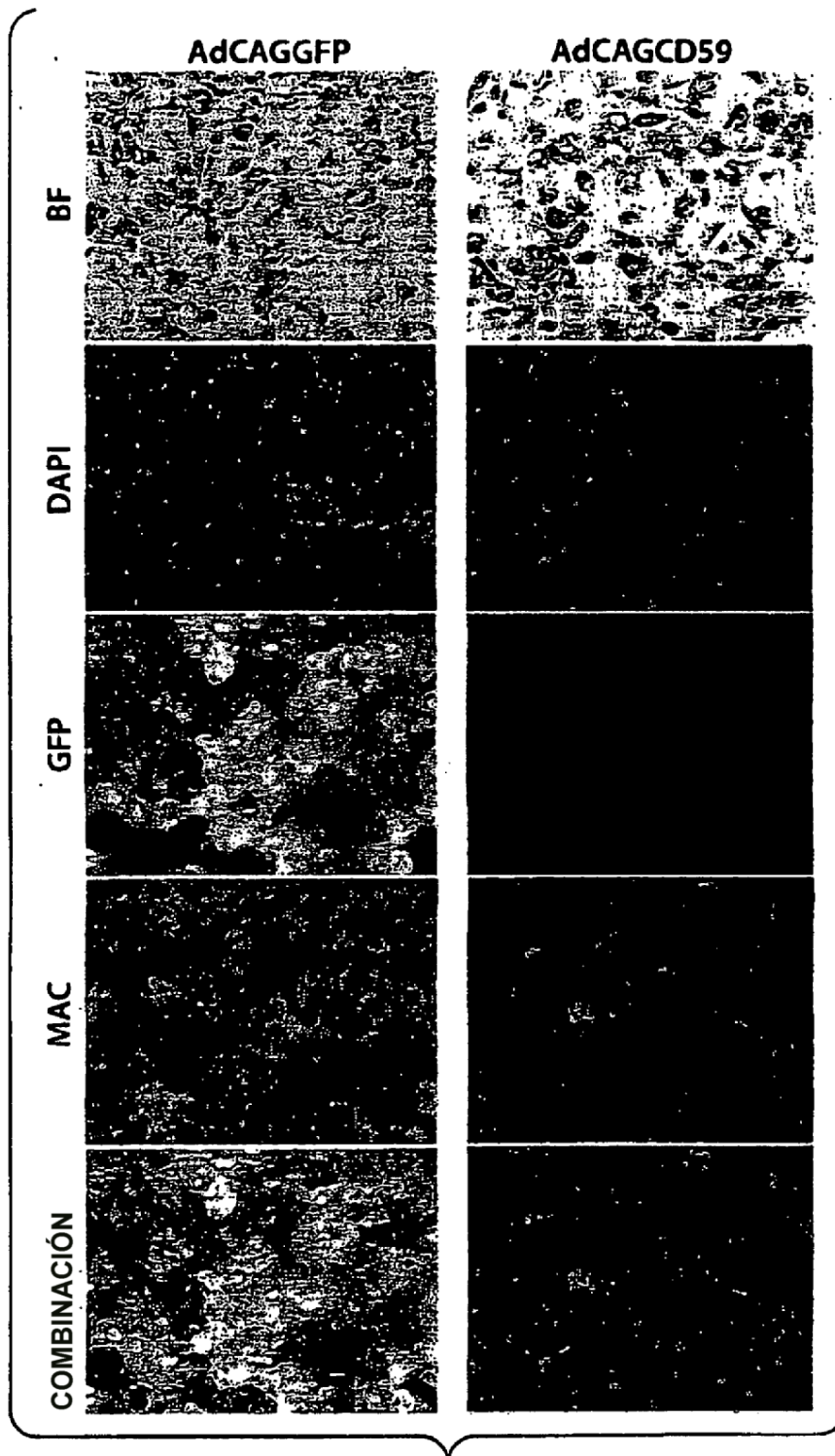


Figura 16

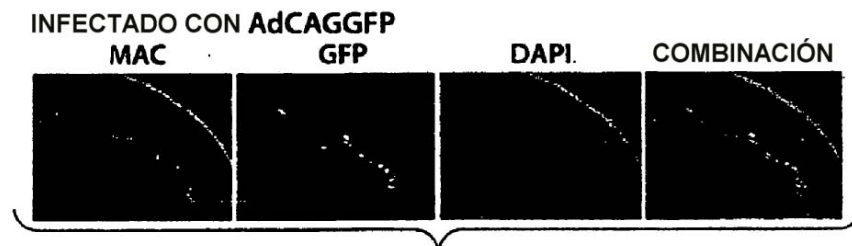


Figura 17A

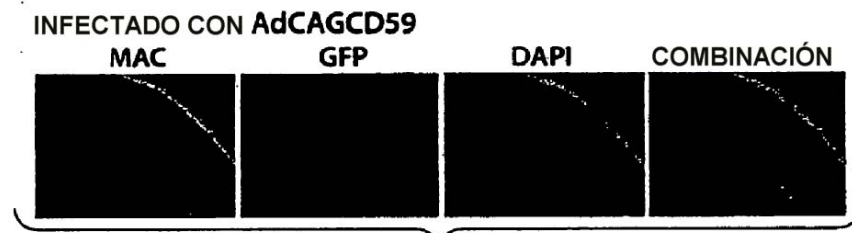


Figura 17B

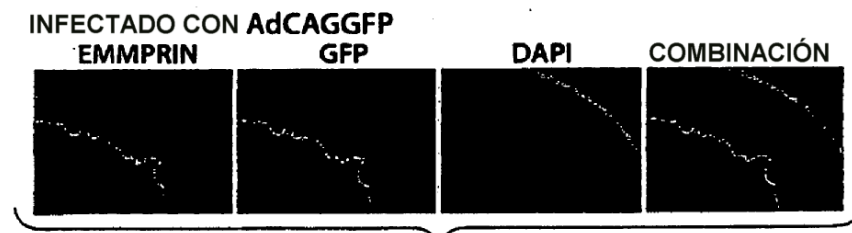


Figura 17C

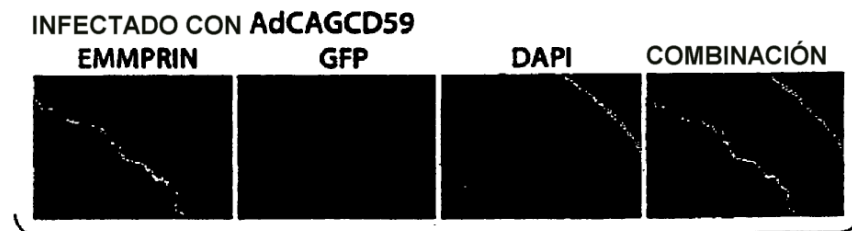
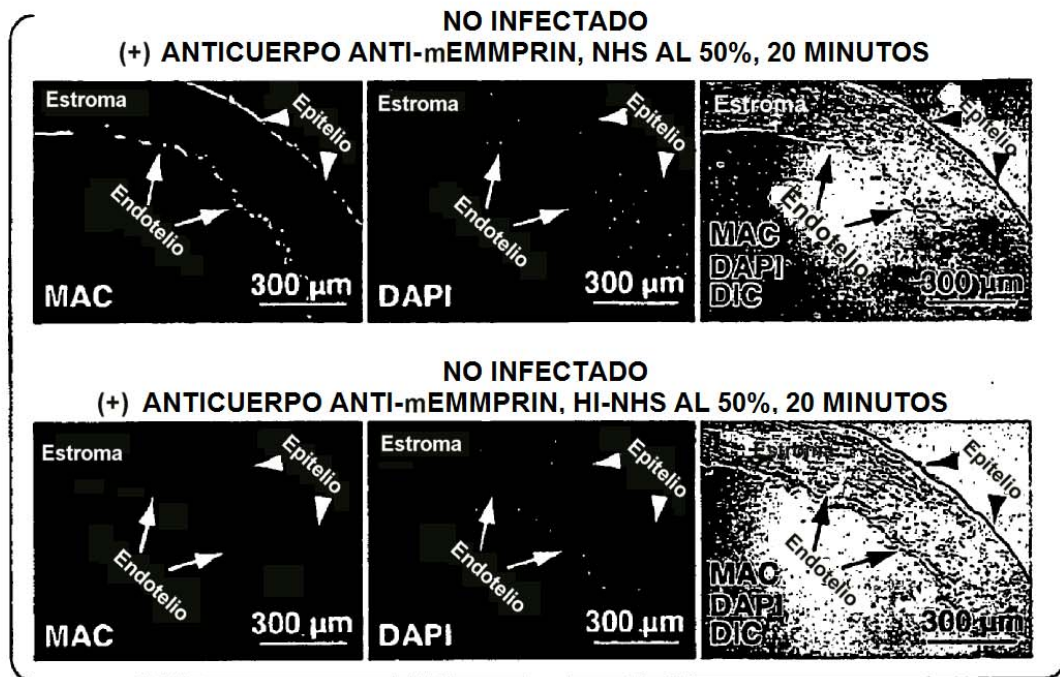
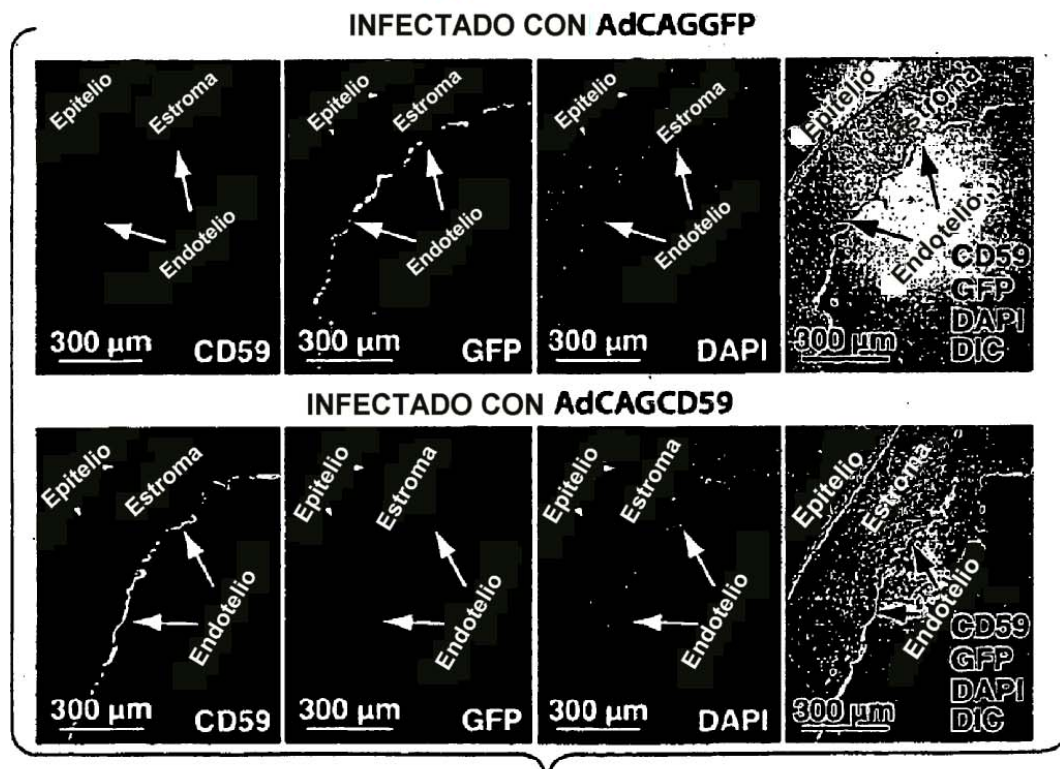


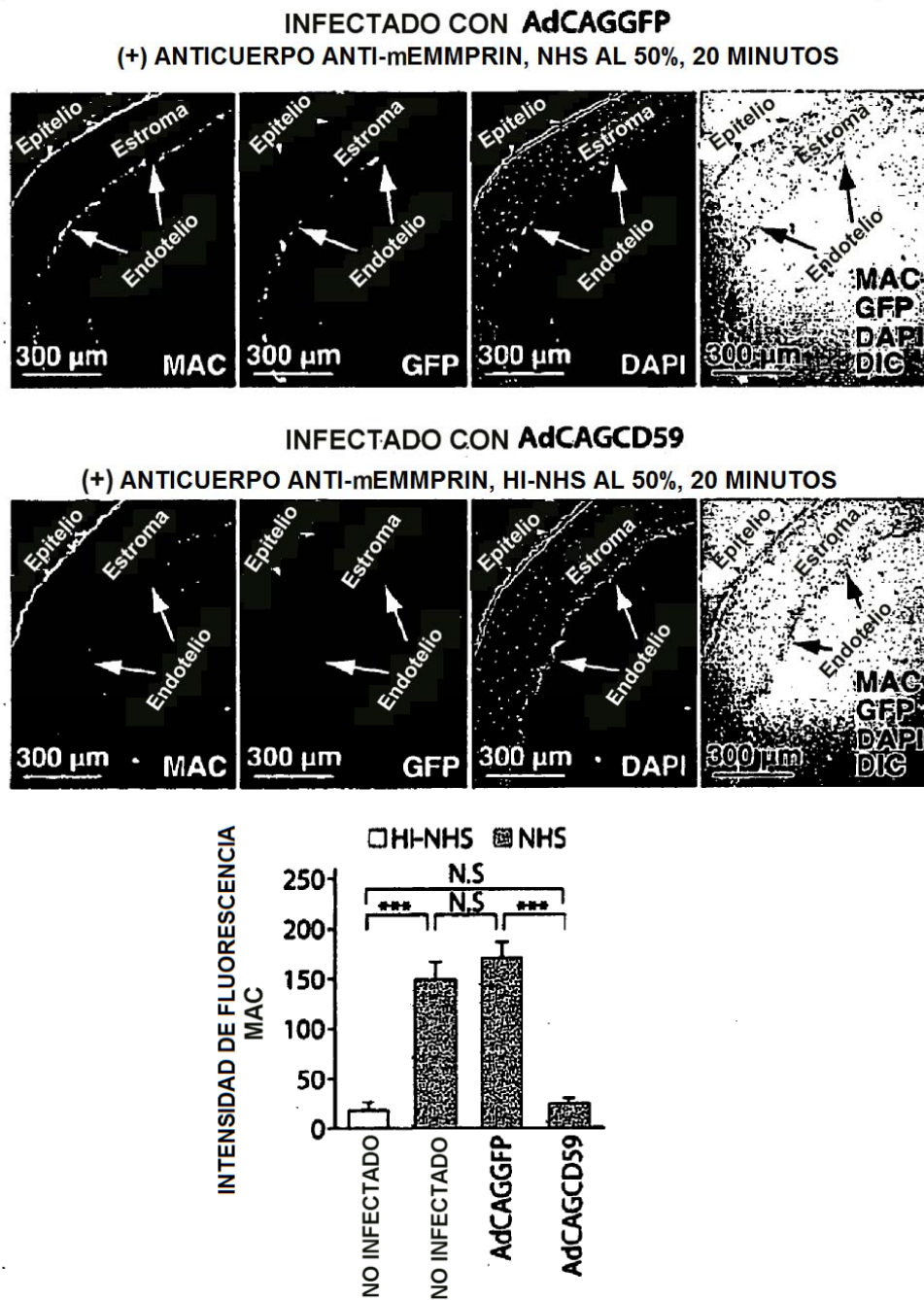
Figura 17D



**Figura 18A**



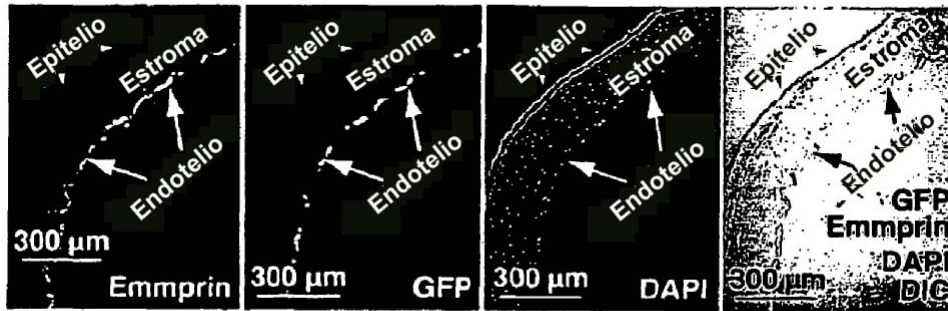
**Figura 18B**



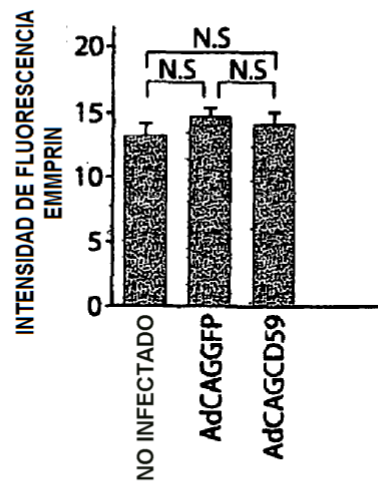
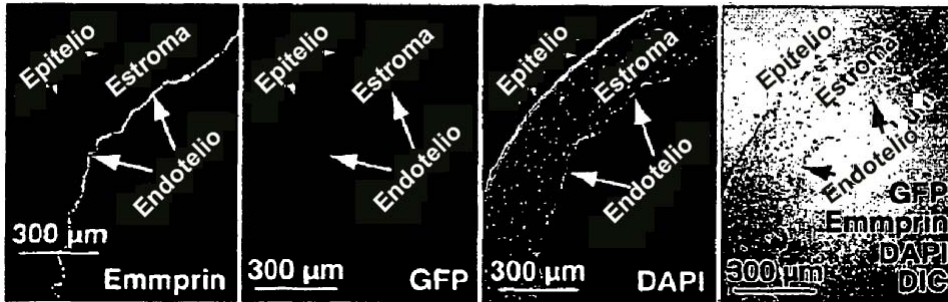
**Figura 18C**



**INFECTADO CON AdCAGGFP**  
(+) ANTICUERPO ANTI-mEMMPRIN



**INFECTADO CON AdCAGCD59**  
(+) ANTICUERPO ANTI-mEMMPRIN



**Figura 18D**

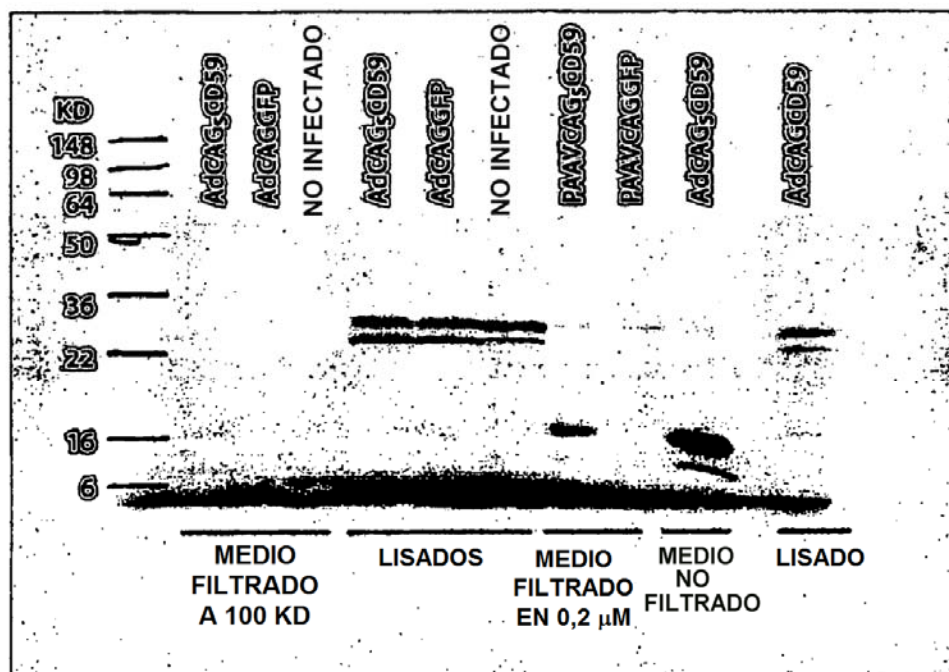


Fig. 19