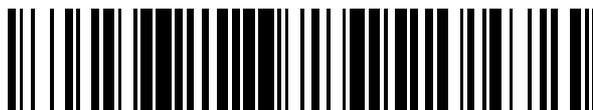


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 060**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2003 E 03718764 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2012 EP 1495120**

54 Título: **Medios y métodos para la modulación específica de genes diana en el ojo**

30 Prioridad:

18.04.2002 EP 02008761

05.12.2002 US 431173 P

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

04.03.2013

73 Titular/es:

OPKO PHARMACEUTICALS, LLC (100.0%)

4400 Biscayne Boulevard

Miami, FL 33137, US

72 Inventor/es:

DRUMM, KARINA;

SCHLÖR, STEFAN, HUBERT y

GÖHRING, FRANK

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 397 060 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

Medios y métodos para la modulación específica de genes diana en el ojo

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos para el tratamiento de trastornos en el ojo. En particular, la presente invención se refiere al uso de composiciones que comprenden un compuesto capaz de modular un gen o producto diana génico para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de trastornos del ojo, en donde la composición se diseña para ser administrada en la parte exterior de la barrera hemato-retiniana.

Técnica anterior

10 Existe actualmente una variedad de enfoques para la liberación de agentes biológicamente activos en el SNC y/o el ojo. Estos incluyen, entre otros posibles, la administración oral, la administración intravenosa, intramuscular y transcutánea así como la inyección intra-bulbosa o la aplicación en forma de gotas oculares. Si el fármaco se libera en la circulación sistémica, está siendo transportado a todos los órganos y tejidos internos y tiene que pasar a través de la barrera hemato-encefálica y/o la barrera hemato-retiniana (con el fin de acceder al SNC y/o a las partes internas del ojo). Obviamente, todos los órganos están siendo expuestos al fármaco, lo que puede conducir a una elevada incidencia de efectos secundarios, concretamente cuando el fármaco ejerce sus efectos sobre genes diana o productos génicos, que no son específicos del trastorno que se va a tratar y/o de la célula o tejido diana.

15 Otra estrategia empleada a menudo en la liberación en el cerebro es el uso de métodos invasivos tales como los sistemas de infusión intraventricular, los implantes intracerebrales (poliméricos), el trasplante de células secretoras de proteínas diseñadas genéticamente y los implantes celulares. Estos métodos desafortunadamente solo son eficaces para la liberación de fármacos en la superficie del cerebro o para células inmediatamente adyacentes al sitio de depósito o infusión y se pueden utilizar por ejemplo en el tratamiento de infiltración carcinomatosa de las meninges. Sin embargo, estos métodos tienen muchas limitaciones debido a que no se pueden alcanzar concentraciones eficaces de fármaco en el parénquima cerebral.

20 Como el sistema nervioso central humano, el ojo humano es un órgano caracterizado por una elevada complejidad y un funcionamiento coordinado de numerosas estructuras y tejidos específicos. Ambos están protegidos por barreras (secreción de lágrimas, enzimas, mecanismos de transporte, barrera hemato-retiniana y hematológica del SNC) frente a influencias medioambientales nocivas. Como la barrera hemato-encefálica, la barrera hemato-retiniana también representa una barrera fisiológica para la absorción de medicación por la parte interna del ojo, y por supuesto hace muy difícil la terapia farmacológica de las enfermedades oculares – de ser posible – en el presente estado de la tecnología.

25 La medicación disponible en el mercado en la actualidad para el tratamiento de trastornos del SNC incluyendo las enfermedades oftalmológicas se encuentra por lo tanto disponible casi exclusivamente para el tratamiento de síntomas clínicos a menudo asociados con efectos secundarios debidos a las elevadas dosis necesarias. Una terapia causal del SNC, y concretamente de las secciones posteriores del ojo, no era posible excepto con inyectables. Además, el estado actual de la información sobre la interrelación metabólica molecular compleja subyacente a la etiología de las enfermedades de la retina de origen multifactorial solo es limitado. Por consiguiente, los medicamentos disponibles en el mercado son adecuados solamente para el tratamiento de los síntomas de tales enfermedades.

30 Takashi Asahara et al.: "Induction of gene into the rabbit eye by iontophoresis: preliminary report" Japanese Journal of Ophthalmology, Vol. 45, 2001, páginas 31-39, describen la liberación de oligonucleótidos antisentido en ojo de conejo a través de iontoforesis.

En vista de la necesidad de medios terapéuticos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el ojo, el problema técnico de la presente invención es proporcionar medios y métodos para la modulación de genes implicados en los trastornos del ojo.

45 Más específicamente, el problema técnico de la presente invención es proporcionar métodos no invasivos para la modulación controlada de genes diana y productos génicos en los ojos de mamíferos a la vez que se supera la barrera hemato-retiniana sin lesionarla.

La solución a dicho problema técnico se logra proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

50 Compendio de la invención

La presente invención está dirigida al tratamiento de un trastorno del ojo como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada de la invención

La presente invención hace referencia al uso de un compuesto capaz de modular un gen o producto génico diana para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno del ojo, donde dicha composición se diseña para ser aplicada fuera de la barrera hemato-retiniana como se expone en las reivindicaciones adjuntas. En un aspecto, la presente invención se basa en el descubrimiento sorprendente de que la barrera hemato-retiniana podía ser superada por la administración de compuestos que no se consideraba que fueran capaces de hacerlo en la terapia de enfermedades oculares mediante la modulación específica de la función de las proteínas en los tejidos del ojo. Debido a la similitud funcional de la barrera hemato-retiniana con la barrera hemato-encefálica, se espera que la provisión de un método mejorado para superar la barrera hemato-retiniana con el propósito de tratar una enfermedad del ojo dada sea adecuada también para el tratamiento de trastornos del SNC.

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención las composiciones que comprenden un compuesto capaz de modular un gen o producto génico diana en el ojo se diseñan preferiblemente para ser administradas sin ninguna cantidad sustancial, es decir sustancialmente eficaz, de agentes potenciadores de la liberación que faciliten el paso de los compuestos a través de la barrera hemato-retiniana y/o sin la necesidad de aplicar métodos y dispositivos invasivos; véanse, p. ej., los compuestos, métodos y dispositivos descritos en la Patente de los Estados Unidos US2002183683 y el documento WO 03/000018. No obstante, para algunas realizaciones, que representan aspectos independientes de la invención, tales como el uso de compuestos que median la interferencia del ARN, se puede incluir el uso de tales métodos y compuestos para una liberación potenciada y controlada de un compuesto capaz de modular un gen o producto génico diana en el ojo de un mamífero a la vez que se salva la barrera hemato-retiniana.

Esas últimas realizaciones se basan, entre otros, en la provisión de métodos novedosos que superen la dificultad de aplicación de las estrategias experimentales convencionales para la identificación de genes, que ocasionan trastornos en el SNC y/o enfermedades del ojo, y su validación como dianas para la diagnosis y para estrategias de intervención farmacológica. Esto se aplica especialmente para la DMAE, puesto que los síntomas de este trastorno aparecen solo de manera tardía, generalmente en la 7ª década de vida. El estado actual del conocimiento referente a las interrelaciones metabólicas patológicas no es suficiente para el tratamiento médico de la mayoría de las enfermedades del SNC y del ojo. No se encuentran disponibles modelos de animales o de cultivos celulares adecuados para tales enfermedades, debido a la complejidad de los patrones de enfermedad y a la carencia de estrategias apropiadas para una simple intervención y manipulación en el SNC y el ojo.

También se describe, pero no forma parte de la presente invención un análisis basado en una célula, tejido y modelo animal para la identificación y aislamiento de genes diana y productos génicos implicados en trastornos del SNC y/o del ojo y su uso como dianas para la intervención terapéutica y/o la diagnosis de tales trastornos.

Los ejemplos de los trastornos del SNC son, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la depresión, el trastorno bipolar, la esquizofrenia, la amnesia, la migraña-dolor de cabeza, la apoplejía, el insomnio, el abuso de alcohol, la ansiedad, el trastorno obsesivo-compulsivo, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida humano cerebral, el dolor crónico y otros muchos.

Las composiciones se pueden administrar localmente o sistémicamente p. ej., intravenosamente. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones, y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Los ejemplos de los disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medio tamponado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, solución de Ringer con lactato añadido, o aceites fijados. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer), y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, anti-oxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y similares. Además, la composición farmacéutica de la invención puede comprender agentes adicionales tales como interleuquinas o interferones dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica.

De acuerdo con la presente invención las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto en una dosis eficaz entre aproximadamente 0,1 µg y aproximadamente 10 mg de unidades/día y/o unidades/kg de peso corporal; véase también más abajo. Además, se puede determinar el régimen de dosificación apropiado de acuerdo con el Ejemplo 21.

En la presente invención el trastorno a tratar está relacionado con el ojo. Tales trastornos incluyen coriorretinitis y retinitis por herpes, que se pueden considerar formas adquiridas de enfermedad retiniana, la mayor parte de los trastornos por enfermedad retiniana se reducen a una predisposición genética. Estos incluyen por ejemplo desprendimiento de retina primario (ablatio retinae), blastoma retiniano, astrocitoma retiniano (Bourneville-Pringle), angiomatosis retinae (Hippel-Lindau), enfermedad de Coat (retinitis exudativa), enfermedad de Eale, retinopatía serosa central, albinismo ocular, retinitis pigmentosa, retinitis punctata albescens, síndrome de Usher, amaurosis congénita de Leber, distrofia de conos, degeneración macular viteliforme (enfermedad de Best), retinosquiasis juvenil, distrofia macular de Carolina del Norte, distrofia del fundus de Sorsby, distrofia retiniana en panal de abeja

de Doyne (Malattia Leventinese), enfermedad de Stargardt, degeneración vitreoretiniana de Wagner o degeneración macular asociada con la edad (DMAE) así como retinopatías de un solo gen como Morbus Best o Morbus Stargardt. Se conocen varios defectos genéticos que conducen o predisponen a esta amplia gama de fenotipos de enfermedad ocular.

5 Algunos de estos fenotipos clínicos se caracterizan por una generación de novo patológica de vasos sanguíneos, que se denomina neoangiogénesis o neovascularización. Partiendo de la coriocapilaris, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en el ojo interno conduce a continuación a una degeneración creciente de las células fotorreceptoras en las áreas afectadas de la retina humana. En el campo de la oftalmología, se puede distinguir entre dos formas de neovascularización: neovascularización subretiniana (coroidal = NVC) y neovascularización
10 retiniana. La neovascularización subretiniana, que también se denomina neovascularización subfoveal, está asociada con trastornos degenerativos como la degeneración macular y se caracteriza por pérdida de agudeza visual y metamorfopsias. Por otra parte, la neovascularización retiniana, del cuerpo vítreo o la neovascularización del iris están asociadas con procesos isquémicos (p. ej. vasculitis retiniana y retinopatía diabética). Además, la neoangiogénesis es un importante patomecanismo en diferentes patrones de enfermedades no oftalmológicas tales como el crecimiento de tumores, la artritis y la retinopatía diabética. Por lo tanto, en una realización preferida de los métodos y usos de la presente invención dicho trastorno que se va a tratar está relacionado con la angiogénesis y/o la neovascularización y de manera particularmente preferida con el epitelio pigmentado retiniano (EPR), la retina neurosensorial y/o la corioidea. Lo más preferido es que el trastorno sea la degeneración macular asociada con la edad de tipo húmeda (DMAE) o la retinopatía diabética.

20 La siguiente descripción aborda la DMAE como ejemplo de una enfermedad ocular compleja con un componente genético. Considerando la forma húmeda de la DMAE, ésta también sirve como ejemplo para un patrón de enfermedad, que se caracteriza por una neovascularización evidente. El ejemplo ilustrará los problemas técnicos asociados en referencia al estudio de las causas moleculares y el desarrollo de estrategias de diagnóstico y de intervención farmacológica. La DMAE, que se puede considerar como un subtipo de degeneración retiniana, es la causa más común de morbilidad visual en el mundo desarrollado con una prevalencia creciente de 9% en personas de más de 52 años a más de 25% en personas con una edad de más de 75 (Paetkau et al. 1978, Leibowitz et al. 1980, Banks y Hutton 1981, Ghafour et al. 1983, Hyman 1987, Hyman et al. 1983, Grey et al. 1989, Yap y Weatherill 1989, Heiba et al. 1994).

30 Una fase temprana en la evolución de la patología de la DMAE está acompañada por una acumulación creciente de partículas de tipo lipofuscina amarillenta dentro del epitelio pigmentado retiniano (RPE; Feeney 1978). Se piensa que estas partículas representan remanentes de membranas del segmento externo de fotorreceptores fagocitados no digeridos que, en el proceso normal, son excretados basalmente a través de la membrana de Bruch a la coriocapilaris. Con el tiempo, la acumulación de partículas de tipo lipofuscina afecta a la membrana de Bruch y conduce a su progresiva destrucción (Hogan y Alvarado 1967, Sarks 1976, Feeney-Burns y Ellersieck 1985, Pauleikhoff et al. 1990). Los depósitos en el EPR y la membrana de Bruch consisten en gran medida en lípidos aunque su composición exacta puede variar entre los individuos, revelando algunos depósitos más fosfolípidos polares mientras otros contienen predominantemente lípidos neutros apolares. Se piensa que estas diferencias individuales en la composición de los drusen es la base para la heterogeneidad clínica en la DMAE (Green et al. 1985). Si bien algunos pacientes se presentan con un crecimiento hacia el interior de los vasos desde la coriocapilaris a través de la membrana de Bruch (neovascularización) (Bressler et al. 1982), otros muestran un desprendimiento del epitelio pigmentado debido a la exudación por debajo del EPR (Gass 1967, Green et al. 1985), y un tercer grupo de pacientes experimenta un lento descenso de pérdida visual debido a cambios atróficos en el EPR y la neuroretina sensorial que lo recubre (Maguire y Vine 1986).

45 Aunque muchos menos común la forma exudativa/neovascular de la DMAE representa más de 80% de las cegueras con una agudeza visual de $\leq 20/200$ (Bressler et al. 2002). En contraste con la forma "seca" de la DMAE descrita más arriba, la DMAE "húmeda" exudativa está asociada con una neovascularización coroidal (NVC), que conduce a ceguera y, de este modo, a una pérdida en la calidad de vida (seguido de trastornos psíquicos, aumento del riesgo de lesión etc; Bressler et al. 2002). Existe un elevado riesgo de desarrollar NVC (> 40%) en el segundo ojo en los 5 años siguientes al desarrollo de NVC-DMAE en el primer ojo (Bressler et al. 2002). La DMAE neovascular se caracteriza por lesiones neovasculares coroidales. Estas lesiones se desarrollan cuando los vasos sanguíneos anormales de la corioide se desarrollan y proliferan a través de roturas en la membrana de Bruch hasta debajo del epitelio pigmentado retiniano (Bressler et al. 2002, Campochiaro et al. 1999). La filtración anormal procedente de estos vasos puede dar como resultado una hemorragia o un desprendimiento del epitelio pigmentado retiniano o la retina neurosensorial (que recubre el epitelio pigmentado retiniano). La formación de la cicatriz acompañante puede sustituir el tejido retiniano y producir pérdida de visión permanente.

60 La DMAE es una enfermedad compleja causada por factores exógenos y también endógenos (Meyers y Zachary 1988; Seddon et al. 1997). Además de los factores medioambientales, se han sugerido varios factores de riesgo personales tales como la hipermetropía, un color claro de piel e iris, niveles elevados de colesterol en suero, hipertensión y el hábito de fumar cigarrillos (Hyman et al. 1983, Klein et al. 1993, Sperduto y Hiller 1986, The Eye Disease Case-Control Study Group 1992, Bressler y Bressler 1995). Varios grupos (Gass 1973, Pigué et al. 1993, Silvestri et al. 1994) han documentado un componente genético para la DMAE y ha conducido a la hipótesis de que la enfermedad puede ser desencadenada por factores medioambientales/individuales en aquellas personas que

están predispuestas genéticamente. El número de genes que, cuando son mutados, pueden conferir susceptibilidad a la DMAE no es conocido pero pueden ser numerosos.

5 El comienzo tardío de los síntomas generalmente en la 7ª década de la vida así como la heterogeneidad clínica y probablemente genética hacen difícil aplicar enfoques convencionales para la identificación de los genes que predisponen a la DMAE. Debido a la complejidad del fenotipo clínico, se puede suponer que el número de genes es grande, los cuales, cuando mutan contribuyen a la susceptibilidad a la DMAE.

10 Con los recientes enfoques físicos para el tratamiento de la DMAE tales como la fotocoagulación con láser, la terapia fotodinámica (utilizando verteporfina nombre comercial Visudyne®, Novartis), las terapias por irradiación o quirúrgicas, solamente habían tenido éxito con un número moderado de los pacientes (Bressler et al. 2002, Yuzawa et al. 2001).

Por consiguiente, la presente invención representa una importante mejora y una intervención terapéutica alternativa para el tratamiento de esta enfermedad concreta así como de otras. Las composiciones farmacéuticas se diseñan para que sean eficaces (y aplicadas) en el segmento posterior del ojo, en una forma diseñada para ser aplicada fuera de la región retiniana de la barrera hemato-retiniana.

15 En una realización de la invención dicho compuesto es un inhibidor/antagonista de dicho gen diana o producto génico y preferiblemente inhibe la expresión de un gen implicado en la angiogénesis y/o la neovascularización; véase más arriba.

20 El término "antagonista/inhibidor" de acuerdo con la presente invención incluye agentes químicos que modulan la acción de un gen o la actividad de un producto génico o bien a través de la alteración de su actividad enzimática o a través de la modulación de la expresión, p. ej., afectando a la transcripción o la traducción. En algunos casos el antagonista/inhibidor también puede ser un sustrato de un producto génico implicado en el trastorno o una molécula de unión al ligando.

El término "inhibidor" incluye tanto las sustancias que reducen la actividad del polipéptido como aquellas que la anulan completamente.

25 Un "antagonista" que modula la actividad del producto génico y ocasiona por ejemplo una respuesta en un análisis basado en células descrito más abajo, hace referencia a un compuesto que altera directamente o indirectamente la actividad del producto génico o la cantidad de producto activo. El efecto de un antagonista se puede observar como un bloqueo de la activación de un gen diana inducida por antagonista. Los antagonistas incluyen antagonistas competitivos así como no competitivos. Un antagonista competitivo (o bloqueador competitivo) interacciona con o
30 cerca del sitio específico para la unión al agonista. Un antagonista o bloqueador no competitivo inactiva la función del producto génico interaccionando con un sitio distinto del sitio de interacción con el agonista. Por lo tanto, habrá preferiblemente una relación directa entre la cantidad molar de compuesto requerida para inhibir o estimular la actividad del gen diana y la cantidad molar del producto génico presente o ausente en la célula.

35 En la presente invención dichos antagonistas son moléculas de ARNdH que son capaces de mediar la interferencia del ARN. Los métodos y programas de ordenador para la selección racional de la preparación, por ejemplo de secuencias de oligonucleótidos antisentido se describen en la técnica anterior; véase por ejemplo Smith, Eur. J. Pharm. Sci. 11 (2000), 191-198; Toschi, Methods 22 (2000), 261-269; Sohail, Adv. Drug Deliv. Rev. 44 (2000), 23-34; Moulton, J. Comput. Biol. 7 (2000), 277-292. Estos procedimientos comprenden cómo encontrar sitios de hibridación óptimos, y en segundo lugar cómo seleccionar secuencias que se unen por ejemplo a los ARNm expresados en exceso en un trastorno del SNC o del ojo. Estos métodos pueden incluir un ensayo más empírico de un gran número de secuencias complementarias al ARNm con respecto a las técnicas más sistemáticas, es decir mapeo con ARNasa H, uso de matrices combinatorias y predicción de la estructura secundaria del ARNm mediante métodos computacionales. También se pueden emplear estructuras que se unen a ARN estructurado, esto es, aptaestructuras y sondas de oligonucleótidos trabadas, y oligonucleótidos que forman triplex replegados para los
45 fines de la presente invención. En relación con la selección de secuencias antisentido con la ayuda del análisis computacional, más abajo se proporcionan direcciones www valiosas.

50 En la presente invención dicho antagonista/inhibidor consiste sustancialmente en ribonucleótidos que contienen una porción de oligorribonucleótidos de doble hebra (ARNdh). La predicción de la estructura secundaria y la accesibilidad *in vitro* del ARNm como herramientas en la selección de sitios diana son descritas por ejemplo por Amarzguioui, en Nucleic Acids Res. 28 (2000), 4113-4124. La minimización de la estructura secundaria de dianas del ADN mediante la incorporación de un desoxinucleósido modificado: implicaciones para el análisis de ácido nucleico mediante hibridación es descrita por Nguyen, en Nucleic Acids Res. 28 (2000), 3904-3909. El ARNdH tiene entre 21 y 23 nucleótidos de longitud. La molécula de ARNdH también puede contener un grupo 3'-hidroxilo terminal y puede representar un análogo de ARN de origen natural, que difiere de la secuencia de nucleótidos de dicho gen o
55 producto génico por la adición, delección, sustitución o modificación de uno o más nucleótidos. Los procesos generales de introducción de un ARN en una célula viva para inhibir la expresión génica de un gen diana en aquella célula que comprende ARN con una estructura de doble hebra, es decir, ARNdH o ARNi son conocidos por los expertos en la técnica y se describen, en los documentos WO 99/32619, WO 01/68836, WO 01/77350, WO

00/44895, WO 02/055692 y WO 02/055693. El ARNm diana de dicho ARNd_h está codificado preferiblemente por un gen o un ADN_c obtenido de acuerdo con el método descrito más abajo. En una realización la secuencia de nucleótidos diana codifica una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2 ó 4 y/o comprende una secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 1 ó 3.

- 5 En la presente invención la composición está en una forma diseñada para ser introducida en las células o los tejidos del SNC o el ojo por medio de un portador adecuado, caracterizado porque la aplicación se produce fuera de las barreras hemato-encefálica y/o hemato-retiniana, por ejemplo en forma de gotas oculares. También se puede administrar sistémicamente, o por medio de inyección retrobulbar.

10 La iontoforesis, que no es una ruta de administración de la presente invención ha sido definida como la introducción activa de moléculas ionizadas en los tejidos por medio de una corriente eléctrica. La técnica ha sido utilizada para intensificar la liberación de fármaco en tejidos subyacentes al electrodo donador (p. ej. la piel) así como también en la circulación sanguínea general, proporcionado de ese modo la liberación sistémica de un fármaco en todo el organismo. Los dispositivos de iontoforesis requieren al menos dos electrodos, estando ambos en contacto eléctrico con cierta porción de una superficie de membrana biológica del organismo. Un electrodo comúnmente referido como electrodo "donador" o "activo", es un electrodo desde el cual se libera al organismo la sustancia biológicamente activa, tal como un fármaco o profármaco. Otro electrodo que tiene una polaridad opuesta funciona para completar el circuito eléctrico entre el organismo y la fuente de energía eléctrica. Este electrodo es referido comúnmente como electrodo "receptor" o "pasivo". Durante la iontoforesis, se aplica un potencial eléctrico a lo largo de los electrodos, con el fin hacer que una corriente eléctrica pase a través de la solución de fármaco y el tejido adyacente. La iontoforesis ha sido descrita para el tratamiento de trastornos relacionados con la sangre (p. ej. restenosis), trastornos de la vejiga, el útero, la uretra y la próstata. Las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.219.557; 5.588.961; 5.843.016; 5.486.160; 5.222.936; 5.232.441; 5.401.239 y 5.728.068 describen diferentes tipos de catéteres para iontoforesis para su inserción en órganos huecos, tubulares (vejiga, uretra y próstata) o en los vasos sanguíneos. La Patente de los Estados Unidos US 2002183683 sugiere el método para liberar las sustancias activas en el SNC.

25 Se requieren numerosos genes activos, a menudo expresados específicamente para realizar y controlar los procesos en las células del SNC y la retina y los intercambios metabólicos a través de la barrera hemato-encefálica y hemato-retiniana. La actividad genética específica también es necesaria para mantener la estructura y la integridad funcional de numerosos componentes de estos tejidos complejos. Como consecuencia, este sistema único y altamente evolucionado es especialmente susceptible a varios defectos genéticos, que conducen de ese modo a una amplia gama de fenotipos de enfermedad. Si bien el estudio de los trastornos monogénicos es relativamente fácil, siempre que los pacientes sean miembros de una familia suficientemente grande como para permitir la clonación posicional, la identificación de genes que contribuyen a trastornos multigénicos o confieren susceptibilidad a una enfermedad es bastante más difícil.

- 35 Asimismo se describe, pero sin formar parte de la presente invención un método de identificación y aislamiento de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido implicado en un trastorno del SNC y/o el ojo que comprende:

(a) cultivar una célula, tejido o animal no humano en condiciones de estrés que conducen a una simulación de un estado patológico relacionado con un trastorno del SNC o el ojo,

- 40 (b) aislar ácidos nucleicos y/o proteínas de una muestra de dicha célula, tejido o animal;

(c) comparar el perfil de expresión o actividad de al menos uno de dichos ácidos nucleicos y/o proteínas con el de una célula, tejido o animal no tratados correspondientes, y/o con el de una célula, tejido o animal que ha sido tratado en diferentes condiciones de estrés;

- 45 (d) determinar al menos un ácido nucleico y/o proteína en el cual se expresa diferencialmente, por medio del cual un cambio de expresión o de la cantidad activa de dicho al menos un ácido nucleico o la actividad de al menos una de dichas proteínas o una alteración de la localización de la proteína son indicativos de su papel en un trastorno del SNC o el ojo.

50 Primero, se cultiva una célula, tejido o animal no humano en condiciones de estrés que conducen a la simulación de un estado patológico relacionado con un trastorno del SNC o el ojo. Preferiblemente, dicho método es un método basado en el cultivo de células. Las células y tejidos preferidos investigados (ya sean en cultivo o comprendidos en un animal de ensayo) son aquellos que pertenecen al SNC y/o al ojo, por ejemplo células neuronales, células gliales, células de la retina, etc. En un método preferido concreto dicha célula es una célula del EPR o una línea celular establecida a partir de una célula del EPR tal como la línea celular ARPE-19; véase también más abajo. El aislamiento de células del EPR se describe, p. ej., en el Ejemplo 1 de más abajo. La línea celular ARPE-19 es descrita por Dunn et al., en Exp. Eye Res. 62 (1996), 155-169. Por ejemplo, la línea celular ARPE-19 es particularmente adecuada para imitar la respuesta reparadora observada in vivo durante la vitreoretinopatía proliferativa por tratamiento del vítreo.

Las condiciones de estrés mencionadas pueden estar generadas por un suministro aberrante de las condiciones de

- 5 cultivo de la célula, tejido o animal y comprender, por ejemplo, estrés oxidativo, condiciones de cultivo hipóxicas, nutrición insuficiente y/o suministro de factores de crecimiento, cambio del valor de pH y/o concentración patofisiológica de segmentos externos de bastones (SEB) y/o A2-E; véanse también los Ejemplos 3 a 10. Las condiciones de estrés preferidas son aquellas conferidas por una concentración patofisiológica de segmentos externos de bastones (SEB) y/o A2-E. Como ejemplo se puede suministrar el tejido del segmento interior del ojo de una manera aberrante. La Tabla 1 muestra genes comúnmente marcadores, cuya expresión alterada indica apoptosis, condiciones de cultivo hipóxicas o estrés oxidativo y que se pueden usar de este modo para verificar y/o cuantificar el estrés aplicado y la respuesta celular, respectivamente.
- 10 Una etapa adicional del método implica aislar los ácidos nucleicos y/o proteínas de una muestra de dicha célula, tejido o animal y comparar, en una etapa adicional, el perfil de expresión o de actividad de al menos uno de dichos ácidos nucleicos y/o proteínas con el de una célula, tejido o animal no tratados correspondientes, y/o con el de una célula, tejido o animal, que han sido tratados en diferentes condiciones de estrés. El aislamiento de ácidos nucleicos y proteínas se puede realizar mediante métodos conocidos por el experto en la técnica y descritos en la bibliografía citada; véanse también los Ejemplos 11 y 12.
- 15 En la última etapa se determina al menos un ácido nucleico y/o proteína que se ha expresado diferencialmente, por medio de lo cual un cambio de expresión o de la cantidad activa de dicho al menos un ácido nucleico o la actividad de al menos una de dichas proteínas o una localización alterada de la proteína es indicativo de su papel en un trastorno del SNC o el ojo.
- 20 En el método de escrutinio la expresión de los ácidos nucleicos puede ser analizada con una matriz de expresión y/o una PCR en tiempo real. Los chips y la tecnología de matrices son bien conocidos para los expertos en la técnica; véanse también los Ejemplos 14 a 20. Los avances en los enfoques para los diagnósticos basados en ADN son revisados, por ejemplo, por Whitcombe et al. en *Curr. Opin. Biotechnol.* 9 (1998), 602-608. Además, los chips de ADN y los dispositivos, sistemas y aplicaciones para la tecnología de micromatrices son descritos, p. ej. por Cuzin, en *Transfus. Clin. Biol.* 8 (2001), 291-296 y por Heller, en *Annu. Rev. Biomed. Eng.* (2002), 129-153. Del mismo modo, las aplicaciones biomédicas de los chips de proteínas son conocidas y son descritas, p. ej., por Ng, en *J. Cell. Mol. Med.* 6 (2002), 329-340. En otra realización se analiza la expresión de proteína con un análisis de inmunotransferencia o ELISA, o electroforesis en gel 2 D o MALDI-TOF y se utilizan anticuerpos particularmente preferidos que son específicos para las proteínas implicadas en la angiogénesis y/o la neovascularización.
- 25 Las descripciones detalladas de los métodos convencionales, tales como los empleados en la construcción de vectores y plásmidos, la inserción de genes que codifican polipéptidos en tales vectores y plásmidos, la introducción de plásmidos en células anfitrionas, y la expresión y determinación de genes y productos génicos se pueden obtener de numerosas publicaciones, incluyendo Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press. Los ácidos nucleicos candidato o los polipéptidos codificados identificados de esta manera se pueden validar expresándolos y observando el fenotipo. Una realización adicional del método de escrutinio por lo tanto comprende la expresión en exceso o la inhibición de la expresión del ácido nucleico o polipéptido codificado candidato identificado en dicha célula, tejido o animal por su capacidad de inducir un cambio sensible en el fenotipo de dicha célula, tejido o animal, en donde dicho fenotipo está relacionado con un trastorno del SNC o el ojo.
- 30 El cambio sensible en el fenotipo de dichas células se puede observar sometiendo las células, los factores secretados de las mismas, o los productos lisados celulares de las mismas, a cultivos celulares endoteliales; y/o analizando diferentes parámetros como la proliferación celular, la actividad electrofisiológica, la síntesis de ADN, el crecimiento de las células, la migración celular, la quimiotaxis, la quimioquinesis, la quimiotaxis, el desarrollo de vasos, la expresión o actividad de genes marcadores, la apoptosis y/o la vitalidad. Los ejemplos de tales análisis son:
- 35 El análisis de antígenos nucleares de proliferación celular (PCNA) o análisis TUNEL son descritos por Montesano, R.: *Regulation of angiogenesis in vitro.* *Eur J Clin Invest*, 22: 504-515, 1992. Montesano, R. et al.: *Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 7297-7301, 1986. Holmgren, L. et al.: *Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression.* *Nature Med*, 1: 149-153, 1995.
- 40 El análisis de la cámara de Boyden es descrito por Holmgren, L. et al.: *Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression.* *Nature Med*, 1: 149-153, 1995. Albin, A. et al.: *A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells.* *Cancer Research*, 47: 3239-3245, 1987. Hu, G. et al.: *Angiogenin promotes invasiveness of cultured endothelial cells by stimulation of cell-associated proteolytic activities.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 6: 12096-12100, 1994. Alessandri, G. et al.: *Mobilization of capillary endothelium in vitro induced by effectors of angiogenesis in vivo.* *Cancer res*, 43: 1790-1797, 1983.
- 45 El análisis de angiogénesis del anillo aórtico es descrito por Zuh, W.H., et al.: *Regulation of vascular growth and regression by matrix metalloproteinases in the rat aorta model of angiogenesis.* *Lab Invest*, 80: 545-555, 2000. Kruger, E.A. et al.: *UCN01, a protein kinase C inhibitor, inhibits endothelial cell proliferation and angiogenic hypoxic response.* *Invasion Metastasis*, 18: 209-218, 2000. Kruger, E.A. et al.: *Endostatin inhibits microvessel formation in the rat aortic ring angiogenesis assay.* *Biochem Biophys Res Commun*, 268: 183-191, 2000. Bauer, K.S. et al.: *Inhibition*
- 50
- 55

- of angiogenesis by thalidomide requires metabolic activation, which is species dependent. *Biochem Pharmacol*, 55: 1827-1834, 1998. Bauer, K.S. et al.: Carboxyamidotriazole inhibits angiogenesis by blocking the calcium-mediated nitric-oxide synthase-vascular endothelial growth factor pathway. *J Pharmacol Exp Ther*, 292: 31-37, 2000. Berger, A.C. et al.: Endothelial monocyte activating polypeptide III induces endothelial cell apoptosis and may inhibit tumor angiogenesis. *Microvasc Res*, 60: 70-80, 2000.
- El análisis de angiogénesis en vena safena es descrito por Kruger, E.A. et al.: Endostatin inhibits microvessel formation in the rat aortic ring angiogenesis assay. *Biochem Biophys Res Commun*, 268: 183-191, 2000.
- El análisis de microbolsillo de córnea es descrito por Gimbrone, E.A. et al.: Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst*, 52: 413-427, 1974. Kenyon, B.M. et al.: A model of angiogenesis in the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37: 1625-1632, 1996. Kenyon, B.M. et al.: Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization. *Exp Eye Res*, 64: 971-978, 1997. Proia, A.D. et al.: The effect of angiostatic steroids and beta-cyclodextrin tetradecasulfate on corneal neovascularization in the rat. *Exp Eye Res*, 57: 693-698, 1993.
- El análisis de membrana corioalantoica de embrión de pollo es descrito por Knighton, D. et al.: Avascular and vascular phases of tumor growth factor in the chicken embryo. *Br J Cancer*, 35: 347-356, 1977. Auerbach, R. et al.: A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos. *Dev Biol*, 41: 391-394, 1974. Ausprunk, D.H. et al.: Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: A structural and autoradiographic study. *Dev Biol*, 38: 237-248, 1974. Nguyen, M. et al.: Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Microvasc Res*, 47: 31-40, 1994.
- Además se puede tratar una muestra de dichas células con un inhibidor específico para el ácido nucleico o polipéptido codificado candidato que se va a validar y en una segunda etapa se determina si dichas células, factores secretados de las mismas o productos lisados celulares de las mismas han perdido su capacidad para inducir el cambio sensible en el fenotipo observado cuando no se utiliza inhibidor. En una realización preferida el fenotipo es la angiogénesis y/o la neovascularización. Como inhibidor se pueden utilizar las moléculas descritas más arriba. Preferiblemente, se utiliza la técnica del ARNip para inhibir la expresión del gen diana. Una colección de protocolos para el silenciamiento de la expresión de genes de mamífero mediado por ARNip, que pueden ser adaptados a un método como el que se menciona en la presente memoria es descrita, por ejemplo, por Elbashir et al., en *Methods* 26 (2002), 199-213 y Martínez et al., en *Cell* 110 (2002), 563-574.
- Para el desarrollo de análisis y fármacos para el tratamiento de trastornos causados por los genes a menudo es necesario identificar la secuencia de esos ácidos nucleicos y/o proteínas, y opcionalmente identificar también el correspondiente gen codificante o ADNc. Basándose en las funciones específicas de las células del SNC y/o específicas del ojo, se presume que los genes, cuya función aberrante ocasiona una enfermedad del SNC o del ojo, son expresados específicamente en los respectivos tejidos y células, representando de ese modo las dianas preferidas para las intervenciones con fármacos. Por lo tanto, el gen, ADNc o fragmento del mismo identificados, a menudo también son clonados y las moléculas de ácido nucleico obtenibles por medio de los métodos descritos en la presente memoria pueden ser útiles, concretamente si codifican polipéptidos implicados en la angiogénesis y/o la neovascularización. Semejante molécula de ácido nucleico puede ser ADN o ADNc y se puede obtener de un mamífero y preferiblemente de un ratón o un ser humano.
- Por lo tanto, en un primer conjunto de experimentos se pudieron identificar varias moléculas de ácido nucleico que efectivamente eran conocidas por estar implicadas en la retinitis pigmentosa retiniana autosómica recesiva (RPAR), que entre otras cosas se caracteriza por la degeneración de las células fotorreceptoras retinianas. Por ejemplo, se podrían identificar moléculas de ácido nucleico correspondientes al gen que codifica el canal alfa 1 regulado por nucleótidos cíclicos humano (CNGA1, Núm. de acceso NM_000087; SEQ ID NO: 1 y 2). Se ha descrito que las mutaciones en este gen están implicadas en la retinitis pigmentosa autosómica recesiva; véase Dryja et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92 (1995), 10177-10181. En otro experimento, se han identificado moléculas de ácido nucleico correspondientes al gen humano que codifica la subunidad beta de la GMPc fosfodiesterasa de bastón (Núm. de acceso NM_000283; SEQ ID NO: 3 y 4). El mal funcionamiento de este gen también se ha asociado con la retinitis pigmentosa autosómica recesiva, en particular con la ceguera nocturna estacionaria congénita 3, CNEC3. Estos resultados confirman que el método de la presente invención funciona.
- En otra realización la molécula de ácido nucleico hibrida específicamente con una de las moléculas de ácido nucleico descritas más arriba en donde la última codifica una versión mutada de la proteína que ha perdido su capacidad para inducir un cambio sensible en un fenotipo. Estas moléculas de ácido nucleico son particularmente útiles como sondas; véase más abajo.
- Las moléculas de ácido nucleico descritas más arriba pueden estar contenidas en un vector y preferiblemente estar conectadas operativamente con elementos reguladores que permiten la expresión en células anfitrionas procarióticas o eucarióticas. La expresión de dicha molécula de ácido nucleico comprende la transcripción a un ARNm traducible. Los elementos reguladores que aseguran la expresión en células eucarióticas, preferiblemente células de mamífero, son bien conocidos por los expertos en la técnica. Normalmente comprenden secuencias reguladoras que garantizan el inicio de la transcripción y opcionalmente señales de poli-A que garantizan la

terminación de la transcripción y la estabilización del transcrito. Otros elementos reguladores pueden incluir intensificadores de la transcripción así como de la traducción, y/o regiones promotoras naturalmente asociadas o heterólogas.

5 Los posibles elementos reguladores que permiten la expresión en células anfitrionas procarióticas comprenden, p. ej., el promotor P_L, lac, trp o tac en E. coli, y los ejemplos de los elementos reguladores que permiten la expresión en células anfitrionas eucarióticas son el promotor AOX1 o GAL1 en levadura o el promotor de CMV, de SV40, de RSV, el intensificador de CMV, el intensificador de SV40 o un intrón de globina en células de mamífero y otros animales.

10 Además de los elementos que son responsables del inicio de la transcripción, tales elementos reguladores también pueden comprender señales de terminación de la transcripción, tales como el sitio poli-A de SV40 o el sitio poli-A de tk, aguas abajo de la molécula de ácido nucleico. Además, dependiendo del sistema de expresión utilizado se pueden añadir a la secuencia codificante del polinucleótido de la invención secuencias líder capaces de dirigir el polipéptido a un compartimento celular o secretarlo al medio y son bien conocidas en la técnica. La secuencia o las secuencias líder está o están ensambladas en una fase apropiada con las secuencias de traducción, iniciación y terminación, y preferiblemente, una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida, o una porción de la misma, al espacio periplásmico o al medio extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión incluyendo un péptido de identificación C o N terminal que confiere las características deseadas, p. ej., estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado. En este contexto, se conocen en la técnica vectores de expresión adecuados tales como el vector de expresión de ADNc de Okayama-Berg pcDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, peDNA1, pcDNA3 (Invitrogen), o pSPORT1 (GIBCO BRL).

15 Preferiblemente, las secuencias de control de la expresión serán sistemas promotores eucarióticos en vectores capaces de transformar o transfectar células anfitrionas eucarióticas, pero también se pueden utilizar secuencias de control para anfitriones procarióticos. Una vez que el vector ha sido incorporado al anfitrión apropiado, el anfitrión se mantiene en condiciones adecuadas para un elevado nivel de expresión de las secuencias de nucleótidos, y, según se desee, para la recolección y purificación de la proteína así producida.

20 También se describen, pero no forman parte de la presente invención, vectores, particularmente plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos utilizados convencionalmente en la ingeniería genética que comprenden una molécula de ácido nucleico de la invención. Preferiblemente, dicho vector es un vector de expresión y/o un vector de transferencia o redireccionamiento génico. Los vectores de expresión derivados de virus tales como retrovirus, virus vaccinia, virus adeno-asociados, herpes virus, o virus de papiloma bovino, pueden ser utilizados para la liberación de los polinucleótidos o vectores de la invención en una población celular elegida como diana. Se pueden utilizar métodos bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores virales recombinantes; véanse, por ejemplo, los mecanismos descritos por Sambrook, en Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. y Ausubel, en Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). Alternativamente, los polinucleótidos y vectores de la invención pueden ser reconstituidos en liposomas para la liberación en células diana. Los vectores que contienen las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden ser transferidos a la célula anfitriona por medio de métodos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de anfitrión celular. Por ejemplo, comúnmente se utiliza la transfección con cloruro de calcio para las células procarióticas, mientras se puede utilizar el tratamiento con fosfato de calcio o la electroporación para otros anfitriones celulares; véase Sambrook, más arriba.

25 Los vectores que se pueden utilizar con fines terapéuticos y/o diagnósticos son conocidos por los expertos en la técnica; véase, p. ej., la interferencia genética hereditaria e inducible por ARN de doble hebra codificado por transgenes descrita por Tavernarakis et al., en Nat. Genet. 24 (2000), 180-183. Otros vectores y métodos para la transferencia de genes y la generación de animales transgénicos se describen en la técnica anterior; véanse, p. ej., los vectores relacionados con virus adenoasociados descritos por Qing et al., en Virol. 77 (2003), 2741-2746; la transferencia génica in vivo mediada por el vector de virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 2 (HIV-2) en retina de conejo adulto descrita por Cheng et al. Curr. Eye Res. 24 (2002), 196-201, la expresión transgénica a largo plazo en el EPR después de la transferencia génica con un vector adenoviral de alta capacidad descrita por Kreppel et al., en Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 43 (2002), 1965-1970 y la observación no invasiva de la liberación del gen GFP adenoviral repetido en el segmento anterior de ojo de mono in vivo descrita por Borrás et al., en J. Gene Med. 3 (2001), 437-449.

También ha sido descrita la transferencia génica al SNC por Leone et al., en Curr. Opin. Mol. Ther. 1 (1999), 487-492

30 Dicho vector puede estar contenido a su vez en una célula anfitriona. Se puede utilizar una célula bacteriana, fúngica, vegetal o animal como anfitrión pero se prefieren las células de mamífero, especialmente las células de EPR o de retina neurosensorial.

Si estas células anfitrionas se cultivan en condiciones que permiten la expresión del polipéptido y la recuperación del polipéptido producido del cultivo, esto constituye un método para la producción de un polipéptido capaz de inducir un cambio sensible en un fenotipo.

Además, los polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico identificadas y aisladas pueden ser utilizados para identificar miméticos de péptidos químicos sintéticos que se unen a, o pueden funcionar como un ligando, sustrato, compañero de unión o receptor del polipéptido tan eficazmente como lo hace (p. ej.) el ligando natural; véase, p. ej., Engleman, *J. Clin. Invest.* 99 (1997), 2284-2292. Por ejemplo, se pueden realizar simulaciones de plegamiento y rediseño por ordenador de motivos estructurales del péptido utilizando programas informáticos apropiados (Olszewski, *Proteins* 25 (1996), 286-299; Hoffman, *Comput. Appl. Biosci.* 11 (1995), 675-679). El modelado por ordenador del plegamiento de proteínas se puede utilizar para el análisis conformacional y energético de modelos de péptidos y proteínas detallados (Monge, *J. Mol. Biol.* 247 (1995), 995-1012; Renouf, *Adv. Exp. Med. Biol.* 376 (1995), 37-45). En particular, se pueden utilizar los programas apropiados para la identificación de sitios interactivos del polipéptido y su ligando u otras proteínas que interactúan mediante búsquedas asistidas por ordenador de secuencias de péptidos complementarios (Fassina, *Immunomethods* 5 (1994), 114-120. Otros sistemas informáticos apropiados para el diseño de péptidos y proteínas se describen en la técnica anterior, por ejemplo Berry, en *Biochem. Soc. Trans.* 22 (1994), 1033-1036; Wodak, en *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 501 (1987), 1-13; Pabo, en *Biochemistry* 25 (1986), 5987-5991. Los métodos para la generación y uso de genotecas combinatorias de peptidomiméticos se describen en la técnica anterior, por ejemplo Ostresh, en *Methods in Enzymology* 267 (1996), 220-234 y Domer, en *Bioorg. Med. Chem.* 4 (1996), 709-715. Además, se puede utilizar una estructura tridimensional y/o cristalográfica del polipéptido para el diseño de inhibidores miméticos de la actividad biológica de la proteína de la invención (Rose, *Biochemistry* 35 (1996), 12933-12944; Rutenber, *Bioorg. Med. Chem.* 4 (1996), 1545-1558). El diseño basado en la estructura y la síntesis de moléculas sintéticas de bajo peso molecular que imitan la actividad de un polipéptido biológico nativo son descritos adicionalmente, p. ej., por Dowd, en *Nature Biotechnol.* 16 (1998), 190-195; Kieber-Emmons, en *Currant Opinion Biotechnol.* 8 (1997), 435-441; Moore, en *Proc. West Pharmacol. Soc.* 40 (1997), 115-119; Mathews, en *Proc. West Pharmacol. Soc.* 40 (1997), 121-125; Mukhija, en *European J. Biochem.* 254 (1998), 433-438.

Las moléculas de ácido nucleico identificadas y aisladas mediante el método descrito también pueden servir como diana para activadores e inhibidores. Los activadores pueden comprender, por ejemplo, proteínas que se unen al ARNm del gen correspondiente, estabilizando de ese modo la conformación nativa del ARNm y facilitando la transcripción y/o traducción, p. ej., de una manera similar a la que actúa la proteína Tat sobre el RNA de HIV. Además, se describen métodos en la bibliografía para identificar moléculas de ácido nucleico tales como un fragmento de ARN que imita la estructura de una molécula de ARN diana definida o indefinida a la cual se une un compuesto en el interior de una célula dando como resultado el retraso del crecimiento celular o la muerte celular; véase, p. ej., el documento WO 98/18947 y las referencias allí citadas. Estas moléculas de ácido nucleico se pueden utilizar para identificar compuestos desconocidos de interés farmacéutico y/o agrícola, y para identificar dianas de ARN desconocidas para su uso en el tratamiento de una enfermedad. Alternativamente, por ejemplo, la estructura conformacional del fragmento de ARN que imita el sitio de unión puede ser empleada en el diseño racional de fármacos para modificar ligandos conocidos para hacer que se unan más ávidamente a la diana. Una de tales metodologías es la resonancia magnética nuclear (RMN), que es útil para identificar estructuras conformacionales de fármacos y ARN. Otros métodos más son, por ejemplo, los métodos de diseño de fármacos que se describen en el documento WO 95/35367, la patente de los Estados Unidos US-A-5.322.933, en donde la estructura cristalina del fragmento de ARN se puede deducir y se utilizan programas informáticos para diseñar compuestos de unión novedosos que actúan como antibióticos.

Los anticuerpos, las moléculas de ácido nucleico, los inhibidores y los activadores descritos tienen preferiblemente una especificidad al menos sustancialmente idéntica a la especificidad de unión del ligando natural o el compañero de unión de la proteína, en particular si se desea la estimulación. Un anticuerpo o inhibidor puede tener una afinidad de unión con la proteína de al menos 10^5 M^{-1} , preferiblemente más de 10^7 M^{-1} y ventajosamente hasta 10^{10} M^{-1} en caso de que deba mediar una supresión. En una realización preferida, un anticuerpo supresor o inhibidor tiene una afinidad de al menos aproximadamente 10^7 M , preferiblemente al menos aproximadamente 10^9 M y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 10^{11} M ; y un activador tiene una afinidad de menos de aproximadamente 10^7 M , preferiblemente menos de aproximadamente 10^6 M y lo más preferiblemente del orden de 10^5 M .

En el caso de las moléculas de ácido nucleico antisentido se prefiere que tengan una afinidad de unión con aquellas que codifican la proteína como máximo 2, 5 o 10 veces menor que un complemento exacto de 20 nucleótidos consecutivos de la secuencia codificante.

Asimismo se describe una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico descrita más arriba, un vector, una célula anfitriona, un polipéptido y/o un anticuerpo como se define más arriba, y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable, véase más arriba y más abajo. Esas composiciones se pueden utilizar en un método para tratar un trastorno del SNC o el ojo que comprende administrar al sujeto dichas composiciones farmacéuticas a una dosis eficaz.

De un modo similar la molécula de ácido nucleico, el vector, la célula anfitriona, el polipéptido y/o el anticuerpo descritos más arriba se pueden utilizar en una composición de diagnóstico que contiene opcionalmente también medios adecuados para la detección. La expresión de un gen implicado en un trastorno del SNC o del ojo puede ser detectada obteniendo ARNm de una célula; incubando el ARNm así obtenido con una sonda que comprende una molécula de ácido nucleico como se ha descrito más arriba o un fragmento de la misma en condiciones de

hibridación; y detectando la presencia del ARNm hibridado a la sonda. A nivel de la proteína el método para detectar la expresión de un gen implica obtener una muestra celular del sujeto; poner en contacto la muestra celular así obtenida con un anticuerpo como se ha definido más arriba; y detectar la presencia del anticuerpo unido de ese modo. Este modo de detección de la expresión de una proteína codificada por una molécula de ácido nucleico mutada que ha perdido su capacidad para inducir un cambio sensible en el fenotipo también resulta posible.

También se describe, pero no forma parte de la presente invención, un método para diagnosticar en un sujeto un trastorno o predisposición a dicho trastorno del SNC o del ojo que comprende:

- (a) aislar ADN del paciente que padece el trastorno;
 - (b) digerir el ADN aislado de la etapa (a) con al menos una enzima de restricción;
 - (c) separar electroforéticamente los fragmentos de ADN resultantes sobre un gel de selección por tamaño;
 - (d) incubar el gel resultante con una sonda que comprende una molécula de ácido nucleico descrita más arriba o un fragmento de la misma marcado con un marcador detectable,
 - (e) detectar las bandas marcadas sobre un gel que ha sido hibridado con la sonda definida para crear un patrón de bandas específico para el ADN de los pacientes con el trastorno,
 - (f) preparar ADN del sujeto mediante las etapas (a) a (e) para producir bandas marcadas detectables sobre un gel; y
 - (g) comparar el patrón de bandas específico para el ADN de pacientes con el trastorno de la etapa (e) y el ADN del sujeto de la etapa (f) para determinar si los patrones son iguales o diferentes y para diagnosticar de ese modo el trastorno o la predisposición al trastorno, si los patrones son iguales.
- Otro método para diagnosticar en un sujeto un trastorno o una predisposición a dicho trastorno del SNC o del ojo, pero que no forma parte de la presente invención comprende:

- (a) analizar una muestra de ácidos nucleicos de un sujeto por medio de un chip de diagnóstico, prolongación del cebador, polimorfismos de un único nucleótido o secuenciación que comprende una molécula de ácido nucleico como se ha definido más arriba, y
- (b) comparar el resultado con el de una muestra obtenida de un paciente que padece el trastorno, en donde la identidad del perfil de expresión y/o la secuencia de nucleótidos es indicativa del trastorno.

En estas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico, los (poli) péptidos, los anticuerpos o los compuestos identificados más arriba están preferiblemente marcados de manera detectable. Se encuentra disponible una variedad de mecanismos para el marcaje de biomoléculas, son bien conocidos por los expertos en la técnica y se considera que están dentro del alcance de la presente invención. Tales mecanismos son descritos, p. ej., por Tijssen, en "Practice and theory of enzyme immuno assays", Burden, RH y von Knippenburg (Eds), Volumen 15 (1985), "Basic methods in molecular biology"; Davis LG, Dimer MD; Battey Elsevier (1990), Mayer et al., (Eds) "Immunochemical methods in cell and molecular biology" Academic Press, Londres (1987), o en la serie "Methods in Enzymology", Academic Press, Inc. Existen muchas marcas y métodos de marcaje diferentes conocidos por los expertos en la técnica. Las marcas utilizadas comúnmente comprenden, entre otros, fluorocromos (como fluoresceína, rodamina, Rojo Texas, etc.), enzimas (como peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina), isótopos radiactivos (como P^{32} o I^{125}), biotina, digoxigenina, metales coloidales, compuestos quimio- o bioluminiscentes (como dioxetanos, luminol o acridinios). Los procedimientos de marcaje, como el acoplamiento covalente de enzimas o grupos biotínico, yodaciones, fosforilaciones, biotilaciones, cebado al azar, traslado de muescas, adición de cola (utilizando transferasas terminales) son bien conocidos en la técnica. Los métodos de detección comprenden, pero no están limitados a, autorradiografía, microscopía de fluorescencia, reacciones enzimáticas directas e indirectas, etc.

Además, los compuestos etc. descritos más arriba se pueden unir a una fase sólida. Las fases sólidas son conocidas por los expertos en la técnica y pueden comprender cuentas de poliestireno, cuentas de látex, cuentas magnéticas, partículas de metales coloidales, chips y superficies de vidrio y/o silicio, tiras de nitrocelulosa, membranas, láminas, glóbulos rojos de animales, o fantasmas de glóbulos rojos, duracitos y paredes de los pocillos de una bandeja de reacción, tubos de plástico u otros tubos de ensayo. Los métodos adecuados para inmovilizar ácidos nucleicos, (poli) péptidos, proteínas, anticuerpos, etc. sobre fases sólidas incluyen pero no están limitados a interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes y similares. La fase sólida puede conservar uno o más receptores adicionales que tiene/tienen la capacidad de atraer e inmovilizar la región como se ha definido más arriba. Este receptor puede comprender una sustancia cargada que tiene una carga opuesta con respecto a la del propio reactivo o una sustancia cargada conjugada con el reactivo de captura o el receptor puede ser cualquier compañero de unión específico que esté inmovilizado sobre (anclado a) la fase sólida y que sea capaz de inmovilizar el reactivo como se ha definido más arriba.

Los análisis de detección comúnmente utilizados pueden comprender métodos radioisotópicos o no radioisotópicos. Estos comprenden, entre otros, RIA (Análisis Radioisotópico) e IRMA (Análisis Inmunoconcentración), EIA (Análisis Inmunoenzimático), ELISA (Análisis Inmunológico con Enzima Ligada), FIA (Análisis Inmunofluorescente), y CLIA (Análisis Inmunoquimioluminiscente). Otros métodos de detección que se utilizan en la técnica son aquellos que no emplean moléculas trazadoras. Un prototipo de estos métodos es el análisis de aglutinación, basado en la propiedad de una molécula dada para unir por puentes al menos dos partículas.

Para la diagnosis y cuantificación de (poli) péptidos, polinucleótidos, etc. en especímenes clínicos y/o científicos, se ha desarrollado una variedad de métodos inmunológicos, como se ha descrito más arriba así como métodos biológicos moleculares, como análisis de hibridación de ácidos nucleicos, análisis por PCR o Inmunoanálisis Enzimático de ADN (Mantero et al., *Clinical Chemistry* 37 (1991), 422-429) y son bien conocidos en la técnica. En este contexto, se debe observar que las moléculas de ácido nucleico también pueden comprender PNA, análogos de ADN modificados que contienen enlaces amida en la cadena principal. Dichos PNA son útiles, entre otros, como sondas para la hibridación ADN/ARN.

Las composiciones descritas más arriba se pueden utilizar para métodos de detección de la expresión de un gen diana que detectan la presencia de ARNm que codifica un (poli) péptido que comprenden, por ejemplo, obtener ARNm de las células de un sujeto y poner en contacto el ARNm así obtenido con una sonda/cebador que comprende una molécula de ácido nucleico capaz de hibridar específicamente con el gen diana en condiciones de hibridación adecuadas, y detectar la presencia de ARNm hibridado con la sonda/cebador. Otros métodos diagnósticos que conducen a la detección de moléculas de ácido nucleico en una muestra comprenden, p. ej., la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la transferencia Southern combinada con la hibridación de ácido nucleico, la hibridación genómica comparativa (CGH) o el análisis de diferencias representativas (RDA). Estos métodos para analizar la presencia de moléculas de ácido nucleico son conocidas en la técnica y se pueden llevar a cabo sin experimentación indebida.

Además, se proporcionan, pero no forman parte de la presente invención, métodos para detectar la presencia de un producto génico diana, esto es, una proteína en una muestra, por ejemplo, una muestra celular, que comprende obtener una muestra celular de un sujeto, poner en contacto dicha muestra con uno de los anticuerpos anteriormente mencionados en condiciones que permiten la unión del anticuerpo con la proteína, y detectar la presencia del anticuerpo así unido, por ejemplo, utilizando mecanismos de inmunoanálisis tales como el radioinmunoanálisis o el inmunoanálisis enzimático. Además, un experto en la técnica puede detectar específicamente y distinguir los polipéptidos que son proteínas diana funcionales de formas mutadas que han perdido o alterado su actividad utilizando un anticuerpo o que reconoce específicamente un (poli) péptido que tiene actividad nativa pero no reconoce una forma inactiva del mismo o que reconoce específicamente una forma inactiva pero no el polipéptido correspondiente que tiene actividad nativa.

Un método para diagnosticar en un sujeto la predisposición a un trastorno del SNC y/o el ojo asociado con la expresión de un alelo de un gen diana se describe, pero no como parte de la presente invención; véase más arriba. Los marcadores detectables se pueden marcar con marcas radiactivas empleadas comúnmente, tales como, por ejemplo, P^{32} y S^{35} , aunque también se pueden emplear otras marcas tales como biotina o mercurio así como las descritas antes. Se pueden utilizar varios métodos bien conocidos por los expertos en la técnica para etiquetar los marcadores detectables. Por ejemplo, las secuencias de ADN y las secuencias de ARN se pueden etiquetar con P^{32} o S^{35} utilizando el método del cebador al azar. Una vez que se ha obtenido un marcador detectable adecuado, se pueden emplear varios métodos bien conocidos por los expertos en la técnica para poner en contacto el marcador detectable con la muestra de interés. Por ejemplo, se pueden realizar hibridaciones ADN-ADN, ARN-ARN y ADN-ARN utilizando procedimientos convencionales. Se conocen en la técnica varios métodos para la detección de ácidos nucleicos, p. ej., transferencia Southern y northern, PCR, prolongación de cebadores y similares. Los mecanismos de amplificación de ADN adicionales adecuados son conocidos en la técnica y comprenden, entre otros, Reacción en Cadena de la Ligasa, Amplificación con Desplazamiento de la Hebra, Amplificación Basada en la Secuencia de Ácido Nucleico (NASBA), o replicasa Q-beta.

Además, el ARNm, el ARNc, el ADNc o el ADN genómico obtenidos del sujeto se pueden secuenciar para identificar mutaciones que pueden ser huellas dactilares características de mutaciones del gen diana en los trastornos del SNC y/o el ojo tales como los descritos más arriba asociados con la expresión del gen diana o versiones mutadas del mismo. Dicha huella dactilar puede ser generada mediante RFLP o AFLP de ADN o ARN obtenido del sujeto, opcionalmente se puede amplificar el ADN o ARN antes del análisis, cuyos métodos son bien conocidos en la técnica. Las huellas dactilares de ARN se pueden realizar, por ejemplo, digiriendo una muestra de ARN obtenida del sujeto con una enzima para ARN adecuada, por ejemplo ARNasa T₁, ARNasa T₂ o similar o una ribozima y, por ejemplo, separando electroforéticamente y detectando los fragmentos de ARN sobre PAGE como se ha descrito más arriba. Preferiblemente, la hibridación (y el posterior lavado) se efectúa en condiciones restrictivas; véase, p. ej., Sambrook et al., *loc. cit* y más arriba.

Además, en el método descrito más arriba, opcionalmente la muestra es o deriva de pelo, sangre, suero, esputo, heces u otro fluido corporal. La muestra que se va a analizar se puede tratar como para extraer, entre otros, moléculas de ácido nucleico, (poli) péptidos, o anticuerpos.

También se proporcionan, pero no forman parte de la presente invención composiciones para kits que contienen reactivos específicos tales como los descritos anteriormente. Se pueden preparar kits que contienen oligonucleótidos, ADN o ARN, anticuerpos o proteínas. Tales kits se utilizan para detectar por ejemplo ADN que hibrida con ADN del gen diana o para detectar la presencia de proteínas o fragmentos de péptidos en una muestra. Dicha caracterización es útil para una variedad de fines incluyendo, pero no limitados a, análisis forenses, aplicaciones de diagnóstico, y estudios epidemiológicos de acuerdo con los métodos de la presente invención descritos más arriba. Las proteínas diana recombinantes, las moléculas de ADN, las moléculas de ARN y los anticuerpos se prestan a la formulación de kits adecuados para la detección y la tipificación del gen diana. Dicho kit comprendería típicamente un portador compartimentado adecuado para mantener en estricto confinamiento al menos un recipiente. El portador comprendería adicionalmente reactivos tales como proteína recombinante o anticuerpos adecuados para detectar la expresión o actividad del gen o producto génico diana. El portador también puede contener un medio para la detección tal como un antígeno marcado o sustratos de enzimas o similares.

También se describe, pero no forma parte de la presente invención, el uso de una dosis eficaz de una molécula de ácido nucleico descrita más arriba o una molécula de ácido nucleico que es complementaria a dicha molécula de ácido nucleico, o un vector como se ha definido previamente para la preparación de una composición para tratar, prevenir y/o retrasar un trastorno del SNC y/o el ojo en un sujeto mediante terapia génica somática. Según se utiliza en la presente memoria, el término "dosis eficaz" representa la cantidad total del fármaco o profármaco que es suficiente para mostrar un beneficio significativo en un paciente, esto es, tratamiento, curación, prevención o alivio de una afección relacionada con un trastorno del SNC, por ejemplo neovascularización, o un incremento en la velocidad del tratamiento, curación, prevención o alivio de tales afecciones. Además o alternativamente, en particular con respecto al ensayo preclínico del fármaco el término "dosis eficaz" incluye la cantidad total del fármaco o profármaco que es suficiente para lograr una respuesta fisiológica en un ensayo con un animal no humano.

Como se ha mencionado antes, el vector también puede ser un vector de expresión, de transferencia génica o de redireccionamiento génico. La terapia génica, que se basa en la introducción de genes terapéuticos en células mediante mecanismos *ex vivo* o *in vivo* es una de las más importantes aplicaciones de la transferencia génica. Se han generado ratones transgénicos que expresan un anticuerpo neutralizador dirigido contra un factor de crecimiento nervioso utilizando la técnica de "neuroanticuerpos"; Capsoni, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000), 6826-6831 y Biocca, *Embo J.* 9 (1990), 101-108. Los vectores, los métodos o los sistemas de liberación de genes adecuados para la terapia génica *in vitro* o *in vivo* se describen en la bibliografía y son conocidos por los expertos en la técnica; véanse, p. ej., Giordano, *Nature Medicine* 2 (1996), 534-539; Schaper, *Circ. Res.* 79 (1996), 911-919; Anderson, *Science* 256 (1992), 808-813, Isner, *Lancet* 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, *Circ. Res.* 77 (1995), 1077-1086; Onodua, *Blood* 91 (1998), 30-36; Verzeletti, *Hum. Gene Ther.* 9 (1998), 2243-2251; Verma, *Nature* 389 (1997), 239-242; Anderson, *Nature* 392 (Sup. 1998), 25-30; Wang, *Gene Therapy* 4 (1997), 393-400; Wang, *Nature Medicine* 2 (1996), 714-716; documento WO 94/29469; documento WO 97/00957; Patente de los Estados Unidos US 5.580.859; Patente de los Estados Unidos US 5.589.466; Patente de los Estados Unidos US 4.394.448 o Schaper, *Current Opinion in Biotechnology* 7 (1996), 635-640, y las referencias allí citadas. En particular, dichos vectores y/o sistemas de liberación de genes también se describen en enfoques de terapia génica en tejidos/células neurológicos (véase, entre otros, Blömer, *J. Virology* 71 (1997) 6641-6649) o en el hipotálamo (véanse, entre otros Geddes, *Front Neuroendocrinol.* 20 (1999), 296-316 o Geddes, *Nat. Med.* 3 (1997), 1402-1404). Otros constructos de terapia génica adecuados para su uso en células/tejidos neurológicos son conocidos en la técnica, por ejemplo Meier (1999), en *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 1099-1110. Se pueden diseñar moléculas de ácido nucleico y vectores para la introducción directa o para la introducción por medio de liposomas, vectores virales (p. ej. adenovirales, retrovirales), electroporación, balística (p. ej. pistola génica) u otros sistemas de liberación en la célula. El enfoque de introducción y terapia génica debe conducir, preferiblemente, a la expresión de una copia funcional del gen diana de la invención. Por otra parte, si la expresión del gen diana se debe reducir, la expresión del vector introducido conduce preferiblemente a la producción de un inhibidor como se ha descrito más arriba, por ejemplo moléculas de ARN antisentido o ARNi. En esas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico se conectan preferiblemente a promotores específicos de la célula y/o el tejido, particularmente preferiblemente a promotores que dirigen la expresión en las células y tejidos del ojo. Los ejemplos de los promotores adecuados incluyen el promotor de angiopoyetina 2 (véase Hackett, en *J. Cell. Physiol.* 184 (2000), 275-284) y particularmente preferiblemente promotores que son capaces de dirigir la expresión al epitelio pigmentado retiniano tales como el promotor de la proteína relacionada con tirosinasa-1 (Tyrp1); véase Beermann, *Cell Mol. Biol.* 45 (1999), 961-968.

También se proporciona, pero no forma parte de la presente invención, un método para el escrutinio de compuestos que modulan la expresión o la actividad de un polipéptido implicado en un trastorno del SNC o el ojo. Este método implica poner en contacto una célula que expresa un polipéptido como se ha descrito más arriba identificado por los métodos ilustrados previamente con un compuesto que va a ser escrutado y determinar si se altera la expresión o la actividad.

La cantidad de tiempo necesario para el contacto celular con el compuesto se determina empíricamente, por ejemplo, dejando transcurrir de tiempo con un modulador conocido y midiendo los cambios celulares como una función del tiempo. Los medios de medición del método de la presente invención se pueden definir adicionalmente comparando una célula que ha sido expuesta a un compuesto con una célula idéntica que no ha sido expuesta de un modo similar al compuesto. Alternativamente dos células, una que contiene un gen diana funcional y una

segunda célula idéntica a la primera, pero que carece de un gen diana funcional se podrían poner en contacto con el mismo compuesto y comparar las diferencias entre las dos células. Esta técnica también es útil para el establecimiento del ruido de fondo de estos análisis. Un experto normal en la técnica apreciará que estos mecanismos de control también permiten una fácil selección de los cambios celulares que son sensibles a la modulación del gen o producto génico diana funcionales.

El término "célula" hace referencia al menos a una célula, pero incluye una pluralidad de células apropiadas para la sensibilidad del método de detección. Las células adecuadas para la presente invención pueden ser bacterianas, de levadura, o preferiblemente eucarióticas. Los métodos emplean ciertos tipos de células, ciertas observaciones de cambios en los aspectos del estado biológico de una célula, y ciertas comparaciones de estos cambios observados. Las líneas celulares preferidas que se van a utilizar en los análisis, especialmente las células y líneas celulares obtenidas del SNC o del ojo, por ejemplo de origen humano, porcino, o murino, se describen en los ejemplos y en la técnica anterior, por ejemplo células del epitelio pigmentado retiniano humano (véase p. ej. Dunaief et al. *Curr. Eye Res.* 24 (2002), 392-396), línea celular epitelial de córnea humana inmortalizada (véase p. ej. Athmanathan et al., *BMC Ophthalmol.* 30 (2002), 3), y también células del SNC, por ejemplo líneas celulares neuronales humanas (véase p. ej. Li et al., *J. Neurosci. Res.* 71 (2003), 559-566), línea celular del SNC inmortalizada con un fragmento N-terminal de T grande de SV40 (véase p. ej. Truckenmiller et al., *Exp. Neurol.* 175 (2002), 318-337), línea celular epitelial coroidal Z310 inmortalizada de plexo coroideo murino (véase Zheng y Zhao, *Brain Res.* 958 (2002), 371-380).

Las líneas celulares adecuadas, en particular líneas celulares animales y humanas así como la información técnica sobre las características de las líneas celulares, el análisis citogenético, la sugerencias para la manipulación de los cultivos celulares, etc. se pueden obtener de las instituciones de depósito, por ejemplo la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, EEUU y DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, ALEMANIA. Se prefieren las células del EPR o las líneas celulares derivadas del EPR tales como ARPE-19, células que expresan en exceso, o con una expresión inhibida de, genes candidato implicados en trastornos del SNC o del ojo o células anfitrionas como se ha descrito previamente.

Dicho polipéptido puede ser expresado bajo el control del promotor GGTB, que es descrito por van Bokhoven et al., en *Genomics* 38 (1996), 133-140. La sustancia de ensayo puede ser un único agente quimioterapéutico o una mezcla de agentes quimioterapéuticos. La célula que está en contacto con la sustancia de ensayo puede derivar de una única célula o de un organismo multicelular. Dicho organismo multicelular se puede seleccionar del grupo que consiste en un animal vertebrado, un mamífero, un primate, un animal invertebrado, un insecto y una planta. Las células descritas más arriba también pueden estar incluidas en un tejido u organismo, esto es, un animal no humano. Los métodos generales para el escrutinio de los compuestos que tienen un efecto deseado sobre una célula u organismo medido en un análisis específico se describen en la técnica anterior; véase por ejemplo la Patente de los Estados Unidos US-A-6.165.709 y las referencias allí citadas.

Las células, los animales no humanos y los sistemas de expresión del gen diana y/o con un gen desactivado se pueden encontrar en la técnica anterior y adaptarlos al método descrito; véanse por ejemplo los documentos citados en la presente memoria.

Los cambios celulares adecuados para el método comprenden medir directamente cambios en la función o cantidad del producto génico diana, o medir los efectos aguas abajo, por ejemplo medir las concentraciones de mensajero secundario o los cambios en la transcripción o por los cambios en los niveles de proteína de los genes que están influidos transcripcionalmente por el producto génico diana, o midiendo los cambios fenotípicos en la célula. Los métodos de medición preferidos incluyen cambios en la cantidad de proteína, cambios en la actividad funcional, cambios en la cantidad de ARNm, cambios en la proteína intracelular, cambios en la proteína de la superficie celular, o la proteína secretada, o cambios en la concentración de Ca^{2+} , AMPc o GTP. Los cambios en la cantidad o actividad funcional de los productos génicos diana se describen en la presente memoria. Los cambios en los niveles de ARNm se detectan mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), mediante expresión génica diferencial o mediante micromatrices. La inmunoafinidad, la afinidad por el ligando, o la medición enzimática cuantifican los cambios en los niveles de proteína en las células anfitrionas. Se utilizan cuentas con afinidad específica por proteínas o anticuerpos específicos para aislar por ejemplo proteína marcada con ^{35}S -metionina o no marcada. La proteína marcada se analiza mediante SDS-PAGE. La proteína no marcada es detectada mediante transferencia Western, detección de la superficie celular mediante clasificación celular con fluorescencia, análisis de imágenes celulares, ELISA o RIA empleando anticuerpos específicos. Cuando la proteína es una enzima, la inducción de proteína es controlada mediante la escisión de un sustrato fluorogénico o colorimétrico.

Cuando el gen endógeno codifica una proteína intracelular soluble, los cambios en el gen endógeno se pueden medir mediante los cambios en la proteína específica contenida en el producto lisado. La proteína soluble se puede medir mediante los métodos descritos en la presente memoria.

Los análisis pueden ser simples análisis "afirmación/negación" para determinar si hay un cambio en la expresión o función, o pueden comprender uno cualquiera de los métodos descritos más arriba, por ejemplo para la detección de

la actividad angiogénica. El análisis se puede volver cuantitativo comparando la expresión o función de una muestra de ensayo con los niveles de expresión o función en una muestra patrón. Los moduladores identificados en este procedimiento son útiles como agentes terapéuticos.

5 Los métodos descritos más arriba se pueden combinar, por supuesto, con una o más etapas de cualquiera de los métodos de escrutinio descritos más arriba u otros métodos de escrutinio bien conocidos en la técnica. Los métodos para el descubrimiento de un compuesto clínico comprenden por ejemplo el escrutinio de ultra-alto rendimiento (Sundberg, Curr. Opin. Biotechnol. 11 (2000), 47-53) la identificación del compuesto principal, y el diseño de fármacos basado en la estructura (Verlinde y Hol, Structure 2 (1994), 577-587) y la química combinatoria (Salemme et al., Structure 15 (1997), 319-324) para la optimización del compuesto principal.

10 Una vez que el fármaco ha sido seleccionado, el método puede tener la etapa adicional de repetición del método utilizado para realizar un diseño racional de fármacos utilizando el fármaco modificado y para evaluar si dicho fármaco modificado presenta mejor afinidad, por ejemplo, de acuerdo con un análisis de interacción/energía.

15 En una realización preferida del método, dicha célula, tejido o animal no humano es una célula, tejido o animal no humano transgénico que presentan un nivel sustancialmente reducido o intensificado de expresión del gen diana y/o actividad del producto génico en comparación con el correspondiente animal de tipo salvaje. Normalmente, dicho animal no humano transgénico que presenta un nivel reducido de actividad del gen diana comprende al menos un alelo mutante del gen diana o un alelo trans-dominante correspondiente de un gen diferente. Preferiblemente, dicho animal no humano transgénico es un animal con el gen desactivado.

20 Preferiblemente dicho nivel sustancialmente reducido o intensificado de expresión del gen diana y/o actividad del producto génico da como resultado una respuesta alterada y fenotípica de la célula, tejido o animal no humano transgénicos. Después se identificará un agonista/activador o antagonista/inhibidor observando si un compuesto candidato es capaz, a cierta concentración, de revertir la respuesta fenotípica de dichos célula, tejido o animal no humano transgénicos a la normalidad. En una realización preferida concreta, dicho animal no humano transgénico presenta un trastorno del SNC y/o el ojo como se ha definido más arriba.

25 Los métodos de análisis pueden estar en el formato de laboratorio convencional o adaptados para un elevado rendimiento. El término "alto rendimiento" (HTS) hace referencia a un diseño de análisis que permite un fácil análisis de múltiples muestras simultáneamente, y capacidad de manipulación robótica. Otro rasgo deseado de los análisis de alto rendimiento es un diseño de análisis que se optimiza para reducir el uso de reactivo, o minimizar el número de manipulaciones con el fin de lograr el análisis deseado. Los ejemplos de los formatos de análisis incluyen las placas de 96 pocillos, de 384 pocillos o de más pocillos, las gotitas levitantes, y los chips de microcanales "laboratorio en un chip" utilizados para experimentos de manipulación de líquidos. Es bien sabido por los expertos en la técnica que a medida que avanzan la miniaturización de moldes de plástico y los dispositivos de manipulación de líquidos, o a medida que se diseñan dispositivos de análisis mejorados, se puede realizar un mayor número de muestras utilizando el diseño de la presente invención.

35 Las sustancias de ensayo que se pueden someter a ensayo e identificar pueden ser genotecas de expresión, p. ej., genotecas de expresión de ADNC, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, compuestos orgánicos pequeños, hormonas, peptidomiméticos, PNA, aptámeros o similares (Milner, Nature Medicine 1 (1995), 879-880; Hupp, Cell 83 (1995), 237-245; Cribs, Cell 79 (1994), 193-198 y referencias citadas más arriba). Las sustancias de ensayo que se van a someter a ensayo también se pueden denominar "las segundas" de fármacos conocidos. El método también hace referencia a poner en contacto las células de ensayo con una segunda sustancia de ensayo o una mezcla de sustancias de ensayo en presencia de la primera sustancia de ensayo.

40 En el método; dichas células están contenidas preferiblemente en un recipiente, por ejemplo en un pocillo de una placa de microtitulación, que puede ser una placa de 24, 96, 384 o 1586 pocillos. Alternativamente, las células pueden ser introducidas en un dispositivo Microfluidics, tal como los proporcionados por Caliper (Newton, MA, EEUU). En otra realización preferida, la etapa (b) del método comprende tomar 2, 3, 4, 5, 7, 10 o más medidas, opcionalmente en diferentes posiciones dentro del recipiente. En algunas realizaciones del método de la presente invención, se añade al medio antes de la etapa (b) un compuesto conocido para activar o inhibir el gen diana o producto génico.

45 Preferiblemente, en un primer escrutinio dicha sustancia de ensayo está incluida en y sometida en forma de una colección de compuestos. Dicha colección de compuestos puede tener una diversidad de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^5 . Los métodos para la generación y uso de genotecas combinatorias de peptidomiméticos son descritos en la técnica anterior, por ejemplo por Ostresh, en Methods in Enzymology 267 (1996), 220-234 y Domer, en Bioorg. Med. Chem. 4 (1996), 709-715. El descubrimiento de fármacos por medio de genotecas combinatorias dinámicas se describe, por ejemplo, en Nat. Rev. Drug Discov. 1 (2002), 26-36 y Drug Discov. Today 7 (2002), 117-125.

50 Además, los métodos descritos anteriormente se pueden combinar, por supuesto con una o más etapas de cualquiera de los métodos de escrutinio descritos anteriormente u otros métodos de escrutinio bien conocidos en la técnica. Los métodos para el descubrimiento de compuestos químicos comprenden por ejemplo el escrutinio de

ultra-alto rendimiento (Sundberg, *Curr. Opin. Biotechnol.* 11 (2000), 47-53) para la identificación del compuesto principal, y el diseño de fármacos basado en la estructura (Verlinde y Hol, *Structure* 2 (1994), 577-587) y la química combinatoria (Salemme et al., *Structure* 15 (1997), 319-324) para la optimización del compuesto principal. Una vez que se ha seleccionado un fármaco, el método puede tener la etapa adicional de repetición del método utilizado para realizar un diseño de fármaco racional utilizando el fármaco modificado y para evaluar si dicho fármaco modificado presenta una afinidad mejor de acuerdo, por ejemplo, con el análisis de interacción/energía. El método se puede repetir una o más veces de manera que la diversidad de dicha colección de compuestos se reduce sucesivamente. Preferiblemente, el polipéptido diana está implicado en la angiogénesis o la neovascularización.

Como se ha mencionado más arriba, se proporcionan, pero no forman parte de la presente invención, análisis convenientes, preferiblemente análisis basados en células e in vivo para identificar y obtener fármacos capaces de modular la actividad génica, siendo de ese modo útiles como agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades relacionadas con trastornos del SNC incluyendo (p. ej.) Esquizofrenia, Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Alzheimer, y enfermedades del ojo tales como las descritas anteriormente. De acuerdo con esto, también se proporciona el uso de compuestos que son conocidos en la técnica, apropiadamente también conocidos por ser capaces de modular la actividad del gen diana pero que hasta ahora no han sido sugeridos para su uso médico debido a la carencia de conocimiento de las respuestas fenotípicas de un organismo evocadas por la actividad del gen diana o la carencia de ella.

Las sustancias son metabolizadas después de su administración in vivo con el fin de ser eliminadas mediante su excreción o mediante el metabolismo a uno o más metabolitos activos o inactivos (Meyer, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 24 (1996), 449-459). De este modo, en lugar de utilizar el compuesto o fármaco real identificado y obtenido de acuerdo con los métodos, se puede utilizar una formulación correspondiente como profármaco que es convertido en su forma activa en el paciente por medio de su metabolismo. Las medidas preventivas que se pueden adoptar para la aplicación de profármacos y fármacos se describen en la bibliografía; véase, para una revisión, Ozama, *J. Toxicol. Sci.* 21 (1996), 323-329.

Además, también se describe, pero no forma parte de la presente invención, el uso de un compuesto identificado, aislado y/o producido mediante cualquiera de estos métodos para la preparación de una composición para el tratamiento de dichos trastornos del SNC y del ojo. Como método para el tratamiento se puede administrar la sustancia identificada o la composición que la contiene a un sujeto que padece dicho trastorno. También se pueden utilizar compuestos identificados, aislados y/o producidos mediante el método descrito anteriormente como compuestos principales en el descubrimiento de fármacos y la preparación de fármacos o profármacos.

Esto implica normalmente modificar el compuesto principal o un derivado del mismo o un compuesto aislado para lograr (a) un sitio de acción, espectro de actividad, especificidad de órgano modificados, y/o (ii) una mejora de la potencia, y/o (iii) una disminución de la toxicidad (índice terapéutico mejorado), y/o (iv) una disminución de los efectos secundarios, y/o (v) un comienzo de la acción terapéutica, una duración del efecto modificados, y/o (vi) parámetros farmacocinéticos modificados (resorción, distribución, metabolismo y excreción), y/o (vii) parámetros físico-químicos modificados (solubilidad, higroscopicidad, color, sabor, olor, estabilidad, estado), y/o (viii) una especificidad general, especificidad de órgano/tejido mejoradas, y/o (ix) una forma y ruta de aplicación optimizadas mediante (i) esterificación de grupos carboxilo, o (ii) esterificación de grupos hidroxilo con ácidos carbonados, o (iii) esterificación de grupos hidroxilo, p. ej. a fosfatos, pirofosfatos o sulfatos o hemisuccinatos, o (iv) formación de sales farmacéuticamente aceptables, o (v) formación de complejos farmacéuticamente aceptables, o (vi) síntesis de polímeros farmacológicamente activos, o (vii) introducción de radicales hidrófilos, o (viii) introducción/intercambio de sustituyentes en los radicales aromáticos o las cadenas laterales, cambio del patrón sustituyente, o (ix) modificación mediante introducción de radicales isostéricos o bioisostéricos, o (x) síntesis de compuestos homólogos, o (xi) introducción de cadenas laterales ramificadas, o (xii) conversión de sustituyentes alquílicos en análogos cíclicos, o (xiii) derivatización de grupos hidroxilo a cetales, acetales, o (xiv) N-acetilación a amidas, fenilcarbamatos, o (xv) síntesis de bases de Mannich, iminas, o (xvi) transformación de cetonas o aldehídos en bases de Schiff, oximas, acetales, cetales, ésteres enólicos, oxazolidinas, tiazolidinas o combinaciones de los mismos; y (b) formular el producto de dicha modificación con un portador farmacéuticamente aceptable.

Las diferentes etapas citadas anteriormente son generalmente conocidas en la técnica. Por ejemplo, se encuentran disponibles programas informáticos para implementar estos mecanismos; p. ej., Rein, *Computer-Assisted Modeling of Receptor-Ligand Interactions* (Alan Liss, Nueva York, 1989). Los métodos para la preparación de derivados y análogos químicos son bien conocidos por los expertos en la técnica y son descritos, por ejemplo, por Beilstein, en *Handbook of Organic Chemistry*, editorial Springer Nueva York Inc., 175 Quinta Avenida, Nueva York, N.Y. 10010 EEUU. y *Organic Synthesis*, Wiley, Nueva York, EEUU. Además, se pueden utilizar peptidomiméticos y/o diseño asistido por ordenador de derivados y análogos apropiados, por ejemplo, de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. Los métodos para la generación de compuestos principales en el descubrimiento de fármacos también incluyen el uso de proteínas y de métodos de detección tales como la espectrometría de masas (Cheng et al. *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995), 8859-8860) y algunos métodos de resonancia magnética nuclear (RMN) (Fejzo et al., *Chem. Biol.* 6 (1999), 755-769; Lin et al., *J. Org. Chem.* 62 (1997), 8930-8931). También pueden incluir o basarse en análisis de la relación estructura-acción cuantitativa (QSAR) (Kubinyi, *J. Med. Chem.* 41 (1993), 2553-2564, Kubinyi, *Pharm. Unserer Zeit* 23 (1994), 281-290) bioquímica combinatoria, química clásica y otros (véase, por ejemplo, Holzgrabe y Bechtold, *Pharm. Acta Helv.* 74 (2000), 149-155). Además, se pueden encontrar ejemplos de

portadores y métodos de formulación en Remington's Pharmaceutical Sciences.

Una vez que el fármaco ha sido seleccionado de acuerdo con uno cualquiera de los métodos descritos anteriormente, se puede sintetizar el fármaco o un profármaco del mismo en una cantidad terapéuticamente eficaz. Según se utiliza en la presente memoria, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" representa la cantidad total del fármaco o profármaco que es suficiente para mostrar un beneficio significativo en el paciente, esto es, tratamiento, curación, prevención o alivio de una afección relacionada con los trastornos del SNC y/o el ojo, o un incremento en el tratamiento, curación, prevención o alivio de tales afecciones. Además o alternativamente, en particular con respecto al ensayo pre-clínico del fármaco el término "cantidad terapéuticamente eficaz" incluye la cantidad total del fármaco o profármaco que es suficiente para lograr una respuesta fisiológica en un ensayo con animales no humanos.

Además las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente se pueden utilizar a su vez para la validación de sustancias de ensayo, compuestos principales, fármacos y profármacos para el tratamiento de un trastorno del SNC o del ojo o para la identificación y aislamiento de genes aguas abajo.

También se describe, pero no forma parte de la presente invención, una chip o matriz que comprende un soporte sólido y ancladas a este una o más de las moléculas de ácido nucleico o (poli) péptidos codificados descritos anteriormente, cuyo chip o análisis es útil para realizar uno cualquiera de los métodos descritos anteriormente. Los medios basados en chips u otros medios para la detección de la expresión y/o actividad de una molécula de ácido nucleico descrita más arriba o los respectivos polipéptidos pueden ser proporcionados en forma de un kit, que constituye una realización preferida de la invención. De un modo similar, se puede desarrollar un kit para los métodos de identificación, producción y escrutinio de moléculas activas.

También se describe, pero no forma parte de la presente invención, un animal no humano transgénico que presenta una expresión o actividad aberrante del gen y/o el producto génico diana mencionados previamente o identificados y obtenidos por los métodos descritos anteriormente, especialmente cuando dicho animal reproduce un trastorno del SNC y/o el ojo. Preferiblemente, dicho animal es un mamífero.

Un método para la producción de un animal no humano transgénico, por ejemplo un ratón transgénico, comprende la introducción de un polinucleótido o vector de redireccionamiento que codifica dicho polipéptido en una célula germinal, una célula embrionaria, una célula pluripotencial o un huevo o una célula derivada del mismo. El animal no humano se puede utilizar de acuerdo con un método de escrutinio descrito en la presente memoria. La producción de embriones transgénicos y el escrutinio de aquellos se pueden llevar a cabo, p. ej., como describen A. L. Joyner Ed., *Gene Targeting, A Practical Approach* (1993), Oxford University Press. Un método general para elaborar animales no humanos transgénicos se describe en la técnica, véase por ejemplo el documento WO 94/24274. Para elaborar organismos no humanos transgénicos (que incluyen animales no humanos elegidos como diana de manera homóloga), se prefieren células pluripotenciales embrionarias (células PE). Las células PE murinas, tales como la línea AB-1 desarrollada sobre capas de alimentación de células SNL76/7 mitóticamente inactivas (McMahon y Bradley, *Cell* 62: 1073-1085 (1990)) esencialmente como se ha descrito (Robertson, E. J. (1987) en *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*. E. J. Robertson, ed. (Oxford: IRL Press), págs. 71-112) para el redireccionamiento de genes homólogos. Otras líneas de PE adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, la línea E14 (Hooper et al., *Nature* 326: 292-295 (1987)), la línea D3 (Doetschman et al., *J. Embryol. Exp. Morph.* 87: 27-45 (1985)), la línea CCE (Robertson et al., *Nature* 323: 445-448 (1986)), la línea AK-7 (Zhuang et al., *Cell* 77: 875-884 (1994)). El éxito en la generación de una línea de ratón a partir de células PE que portan una mutación elegida como diana específica depende de la pluripotencia de las células PE (es decir, su capacidad, una vez inyectadas en un anfitrión que desarrolla un embrión, tal como un blastocito o mórula, para participar en la embriogénesis y contribuir a las células germinales del animal resultante). Se permite que los blastocitos que contienen las células PE inyectadas se desarrollen en los úteros de hembras no humanas pseudopreñadas y nazcan como ratones quiméricos. Los ratones transgénicos resultantes son quiméricos para las células que tienen los loci de recombinasa o informador y se someten a retrocruzamiento y se escrutan para determinar la presencia de los transgenes elegidos como diana correctamente por medio de PCR o análisis de transferencia Southern de ADN de biopsia de la cola de los vástagos con el fin de identificar ratones transgénicos heterocigotos para el locus/loci o bien de la recombinasa o bien del informador.

Los métodos para producir moscas transgénicas, tales como *Drosophila melanogaster* también se describen en la técnica, véanse por ejemplo la Patente de los Estados Unidos US-A-4.670.388, Brand & Perrimon, *Development* (1993) 118: 401-415; y Phelps & Brand, *Methods* (Abril 1998) 14: 367-379. Se pueden generar gusanos transgénicos tales como *C. elegans* como describen Mello, et al., en *Embo J.* 10 (1991), 3959-3970, Plasterk, *Methods Cell Biol* 48 (1995), 59-80.

Preferiblemente, el animal no humano transgénico comprende al menos un alelo de tipo salvaje inactivado o suprimido del correspondiente gen, implicado en un trastorno del SNC y/o el ojo, véase más arriba. Esto permite por ejemplo el estudio de la interacción de diferentes formas mutantes de estos genes o productos génicos al comienzo de los síntomas clínicos y/o se puede utilizar para verificar la implicación de dicho gen o dichos genes en el trastorno que se va a estudiar. Todas las aplicaciones que se han comentado anteriormente en la presente memoria con respecto a un animal transgénico también se pueden aplicar a animales que portan dos, tres o más transgenes.

También sería deseable inactivar la expresión o la función del gen diana en una cierta etapa del desarrollo y/o la vida del animal transgénico. Esto se puede lograr utilizando, por ejemplo, promotores evolutivos y/o regulados por células y/o inducibles específicos de los tejidos (véase más arriba) que dirijan la expresión, p. ej., de un antisentido para una ribozima dirigida contra el transcrito de ARN que codifica el ARNn del gen diana; véase también más arriba. Un sistema inducible adecuado es por ejemplo la expresión de genes regulada por tetraciclina como describen, p. ej., Gossen y Bujard (Proc. Natl. Acad. Sci. 89 USA (1992), 5547-5551) y Gossen et al. (Trends Biotech. 12 (1994), 58-62). De un modo similar, la expresión de un gen diana mutante puede ser controlada por tales elementos reguladores. Preferiblemente, la presencia de los transgenes en células de los animales transgénicos conduce a varios cambios fisiológicos, evolutivos y/o morfológicos, preferiblemente para afecciones relacionadas con los trastornos del SNC y/o el ojo tales como las descritas anteriormente.

Dicho animal no humano transgénico se puede utilizar para un procedimiento en el descubrimiento de fármacos para el tratamiento de un trastorno del SNC y/o el ojo. En particular, se prefieren animales mamíferos, especialmente ratones y ratas. Los sistemas animales correspondientes que se pueden adaptar son conocidos por los expertos en la técnica; véanse, p. ej., los enfoques de la biología molecular para trastornos neurológicos incluyendo los modelos de ratón con genes desactivados y transgénicos descritos por Shibata et al., en *Neuropathology* 22 (2002), 337-349. Sin embargo, también se puede emplear el pez cebra ampliamente utilizado puesto que se ha demostrado que este sistema modelo también proporciona resultados predictivos valiosos; véase, p. ej. Gerlai et al., *Pharmacol. Biochem. Behav.* 67 (2000), 773-782.

En la presente invención la composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de los trastornos del SNC y/o el ojo descritos anteriormente comprende uno o más oligorribonucleótidos de doble hebra (ARNdh), véase más arriba, que median la interferencia con ARN del correspondiente ARNm de una o más moléculas de ácido nucleico que se ha demostrado que están implicadas en dichos trastornos, y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable. El método para la inhibición específica de genes por oligorribonucleótidos de doble hebra (ARNdh) es conocido a partir del documento WO 01/75164.

Esta solicitud describe que los oligorribonucleótidos de doble hebra (ARNdh) inducen la degradación específica del ARNm después de la liberación en las células diana. La especificidad de este proceso está mediada por la complementariedad de una de las dos hebras de ARNdh con el ARNm del gen diana.

El proceso de apagado post-transcripcional, específico de un gen a través de genes mediante moléculas de ARNdh es referido como interferencia con ARN (ARNi). Este término fue desarrollado originalmente por Fire y colaboradores para describir el bloqueo de la expresión génica observado por la liberación de moléculas de ARNdh para el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1999). Con posterioridad, también se pudo mostrar ARNi en plantas, protozoos, insectos (Kasschau y Carrington 1998) y recientemente también en células de mamífero (Caplen et al., 2001; Elbashir et al., 2001). El mecanismo por medio del cual el ARNi suprime la expresión génica todavía no se conoce completamente. Los estudios de células no de mamífero han demostrado que las moléculas de ARNdh son transformadas en pequeñas moléculas de ARN de interferencia (moléculas ARNip) por ribonucleasas endógenas (Bernstein et al., 2001; Grishok et al., 2001; Hamilton y Baulcombe, 1999; Knight y Bass, 2001; Zamore et al., 2000).

La región de doble hebra incluye de 21 a 23 nucleótidos, puesto que para la inhibición específica de un gen diana, es suficiente que el oligorribonucleótido de doble hebra muestre una secuencia de 21 a 23 nucleótidos (pares de bases) de longitud idénticos al gen diana; véase, p. ej., Elbashir et al., *Methods* 26 (2002), 199-213 y Martínez et al., *Cell* 110 (2002), 563-574. Los medios y métodos generales para los análisis basados en células para identificar secuencias de ácido nucleico que modulan la función de una célula, mediante el uso del silenciamiento de genes post-transcripcional incluyendo definiciones, métodos para la preparación de ARNdh, vectores, marcadores seleccionables, composiciones, medios de detección, etc., y que se pueden adaptar de acuerdo con la ilustración de la presente invención se describen en la solicitud de Patente Europea EP 1 229 134 A2.

En contraste con la bibliografía citada en la que se describe el uso de ARNip y otras moléculas basadas en el ARN solamente para el cultivo celular, los experimentos realizados de acuerdo con la presente invención demuestran sorprendentemente que las moléculas de ARNdh de una longitud de 21 a 23 nucleótidos son capaces, después de su aplicación sistémica, por ejemplo mediante inyección intravenosa, de cruzar la barrera hemato-retiniana, y específicamente inactivar genes diana en los tejidos de la parte posterior del ojo. Esta superación de la barrera hemato-retiniana es aún más notable, debido a que ningún experimento ha podido demostrar la superación de la barrera hemato-encefálica por el ARNdh, hasta el momento. Los métodos y usos de la invención, explicados más abajo por medio de ejemplos, son de este modo adecuados para la provisión de modelos animales con los cuales se pueden identificar y validar dianas, cuya función restringida ocasiona enfermedades en el ojo. Esos métodos son por otra parte adecuados para la intervención específica en enfermedades oculares a nivel molecular, sin necesitar la aplicación directa en el lugar, por ejemplo de las células o el tejido afectados. La especificidad del ARNi para la inhibición de los genes expresados específicamente en las células diana minimiza el riesgo de efectos secundarios no deseados.

El régimen de dosificación de las composiciones farmacéuticas en todos los métodos y usos anteriormente descritos de la presente invención será determinado por el médico a cargo y por los factores clínicos. Como es bien sabido en las técnicas médicas, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo el

tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto concreto que se vaya a administrar, el sexo, el momento y la ruta de administración, la salud general, y otros fármacos que estén siendo administrados conjuntamente. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 µg a 10 mg (o de ácido nucleico para la expresión o para la inhibición de la expresión en este intervalo); sin embargo, se prevén dosis por debajo o por encima de este intervalo ilustrativo, considerando especialmente los factores anteriormente mencionados. Generalmente, el régimen, como administración regular de la composición farmacéutica, debe estar en el intervalo de unidades de 0,01 µg a 10 mg por día. Si el régimen es una infusión continua, también debe estar en el intervalo de unidades de 0,01 µg a 10 mg por kilogramo de peso corporal por minuto, respectivamente. El progreso se puede controlar mediante una evaluación periódica. Las dosificaciones variarán, pero una dosificación preferida para la administración intravenosa de ácidos nucleicos es de aproximadamente 10^6 a 10^{12} copias de la molécula de ácido nucleico.

Las composiciones terapéuticas o de diagnóstico de la invención se administran a un individuo a una dosis eficaz suficiente para tratar o diagnosticar trastornos en los cuales está indicada la modulación de un gen o producto génico diana. La cantidad eficaz puede variar de acuerdo con una variedad de factores tales como el estado, el peso, el sexo y la edad del individuo. Otros factores incluyen el modo de administración. Las composiciones farmacéuticas se pueden proporcionar al individuo mediante una variedad de rutas tales como la ruta intracoronaria, intraperitoneal, subcutánea, intravenosa, transdérmica, intrasinoval, intramuscular u oral. Además, puede ser deseable la administración simultánea o sucesiva de otros agentes.

Una dosis terapéuticamente eficaz hace referencia a la cantidad de compuestos descritos de acuerdo con la presente invención necesarios para aliviar los síntomas o la afección. La eficacia terapéutica y la toxicidad de tales compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en 50% de la población) y la DL50 (la dosis letal para 50% de la población). La proporción de la dosis entre los efectos terapéuticos y los efectos tóxicos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la proporción, DL50/DE50.

La bibliografía adicional concerniente a uno cualquiera de los materiales, métodos, usos y compuestos que se van a emplear de acuerdo con la presente invención se puede recuperar de bibliotecas y bases de datos públicas, utilizando por ejemplo dispositivos electrónicos. Por ejemplo se puede utilizar la base de datos pública "Medline", que está a cargo del National Center for Biotechnology Information y/o la National Library of Medicine at the National Institutes of Health. Otras bases de datos y direcciones de la red, tales como las del European Bioinformatics Institute (EBI), que es parte del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) son conocidas por los expertos en la técnica y también se pueden obtener utilizando buscadores de internet. Una visión global de la información de patentes en biotecnología y una inspección de las fuentes relevantes de la información de patentes útil para la búsqueda retrospectiva y para la sensibilización actual se proporcionan en Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364.

La descripción anterior describe generalmente la presente invención. Se puede obtener un conocimiento más completo mediante la referencia a los siguientes ejemplos específicos y a la figura que se proporcionan en la presente memoria con fines ilustrativos solamente y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otro modo, mecanismos convencionales de la biología celular, el cultivo de células, la biología molecular, la biología de los transgénicos, la microbiología, el ADN recombinante, y la inmunología, que están dentro del conocimiento práctico de la técnica. Tales mecanismos se explican por completo en la bibliografía; véanse, por ejemplo, DNA Cloning, Volúmenes I y II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. Patente de los Estados Unidos Núm. 4.683.195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); el tratado, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 y 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986).

Las descripciones detalladas de los métodos convencionales, tales como los empleados en la construcción de vectores y plásmidos, la inserción de genes que codifican polipéptidos en tales vectores y plásmidos, la introducción de plásmidos en células anfitrionas, y su expresión y determinación de los genes y productos génicos se pueden obtener a partir de numerosas publicaciones, incluyendo Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

La figura muestra:

Figura 1: expresión de eGFP en retina y epitelio pigmentado retiniano (EPR) de ratones FVB.CG-TG(GFPU)5NAGY tratados sistémicamente con ARNdh. La figura muestra la expresión de eGFP en secciones en parafina de ojo de ratones FVB.Cg-Tg(GFPU)5Nagy tratados con ARNdh. La expresión en retina y epitelio pigmentado retiniano (EPR) de ratones FVB.CG-TG(GFPU)5NAGY tratados sistémicamente con ARNdh es máxima en el control con tampón, disminuye ligeramente en ratones tratados con ARNdh no silenciador y disminuye claramente en ratones tratados

con ARNd específico de eGFP (control con tampón > 200 µg/kg PC con ARNd no silenciador > 100 µg/kg PC de ARNd específico de eGFP > 200 µg/kg PC de ARNd específico de eGFP).

Ejemplos

Ejemplo 1 Aislamiento de células epiteliales del pigmento retiniano porcino primario (células de EPR).

- 5 El siguiente ejemplo describe ilustrativamente el aislamiento de células de EPR porcino primario que se lleva a cabo en condiciones estériles. El aislamiento de las células de EPR de cerdo, humanas y de ganado vacuno es en principio el mismo.

Se obtuvieron ojos de cerdo de un matadero local. Después de retirar los restos de músculo ocular de los ojos, se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato enfriada con hielo estéril, (1xPBS: 1,15 g/l de Na₂HPO₄, 0,20 g/l de KH₂PO₄ x H₂O, 8,00 g/l de NaCl, 0,20 g/l de KCl, 0,10 g/l de MgCl₂, 0,10 g/l de CaCl₂) que contenía penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 µg/ml). Los ojos se cortaron en torno a la ora serrata y se retiraron el cristalino del ojo y el cuerpo vítreo. De las copas ópticas se separaron cuidadosamente las retinas con un gancho y se desprendieron después de cortar el nervio óptico. Las retinas se utilizaron para el aislamiento de los segmentos exteriores de los bastones como se describe en el ejemplo 2. La copa óptica restante se cubrió con 1xPBS de 1 ml para lavar las células. La disolución se descartó y las células se incubaron en 1 a 1,5 ml de una disolución de tripsina/EDTA (0,25%/0,02%) durante 15 minutos a 37°C. La disolución se descartó y las copas se volvieron a cubrir con 1 ml de la disolución de tripsina/EDTA durante 1 hora a 37°C. Las células del EPR se retiraron cuidadosamente pipeteando arriba y abajo y las células de seis ojos se diluyeron en 20 ml de medio de cultivo celular (DMEM F12 (Bio Whittaker) con suero de ternera fetal al 10% (FCS), penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 µg/ml), glutamina 2 mM, bicarbonato de sodio 1,5 g/ml). Las células se centrifugaron durante 5 minutos con 120xg a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con el medio de cultivo celular. Por matraz de cultivo celular T25, se cultivaron en placa las células correspondientes de tres retinas. Para deshacerse de los desechos celulares las células se lavaron con 1xPBS el día siguiente. Durante aproximadamente una semana las células del EPR se cultivaron en medio de cultivo celular que contenía FCS al 10%. Después de que hubieran alcanzado la confluencia el medio de cultivo fue sustituido por un medio que contenía FCS al 2%. Después de una incubación adicional de una semana, las células se dividieron en placas de cultivo celular a la razón 1:2 para su uso experimental adicional.

Ejemplo 2 Aislamiento de segmentos exteriores de bastones (SEB) de ojos de cerdo.

El aislamiento de SEB se realizó en condiciones estériles. Treinta retinas aisladas durante la preparación de células de EPR (véase el ejemplo 1) se transfirieron a 15 ml de un tampón de homogeneización enfriado con hielo (que contenía 20% (p/v) de sacarosa, Tris-acetato 20 mM de pH 7,2, MgCl₂ 2 mM, glucosa 10 mM). La suspensión se agitó suavemente durante 1 minuto, se filtró 3 veces a través de una gasa para eliminar los fragmentos de tejido y se estratificó en 24 ml de un gradiente continuo de sacarosa al 25-60% p/v que contenía Tris acetato 20 mM, pH 7,2, glucosa 10 mM. La centrifugación se llevó a cabo en un rotor Beckman SW-27 a 24.000 rpm durante 1 hora a 4°C. La banda superior de color blanco-amarillo del gradiente se recogió, se diluyó con el mismo volumen de tampón Hepes 10 mM de pH 7,4, NaCl 115 mM, KCl 2,5 mM, DTT 1 mM, MgCl₂ 1 mM, se mezcló cuidadosamente y se centrifugó 10 minutos en una centrífuga Sigma 4K15, 2989xg, 4°C. El sobrenadante se retiró cuidadosamente y el sedimento de SEB se almacenó para su uso posterior a -20°C. De una retina se aislaron aproximadamente 1x10⁷ SEB.

Ejemplo 3 Incubación de células de EPR porcino primario con (concentraciones fisiológicas) de SEB.

- 40 Puesto que la incubación de las células de EPR de cerdo, humanas y de ganado vacuno con SEB es en principio la misma, el siguiente ejemplo se refiere a la incubación de las células de EPR aisladas de ojos de cerdo (véase el ejemplo 2).

El sedimento de SEB almacenado a -20°C se calentó lentamente a temperatura ambiente. De acuerdo con el número de células de EPR primario, se tomó una cantidad de 10 a 100 SEB por célula de la suspensión de SEB. Durante la incubación, el medio de cultivo celular se cambió cada día y se añadió nuevo SEB.

La fagocitosis de SEB por las células de EPR fue controlada en paralelo mediante dos enfoques. El enfoque uno comprende la detección de SEB marcado covalentemente con el colorante fluorescente de longitud de onda dual SNAFL-2 (Molecular Probes, Leiden Netherlands). La forma ácida (pH 5) aparece de color verde-amarillo, mientras que la forma alcalina (pH 9) aparece de color amarillo-naranja. Se añadió SNAFL-2 (10 µg de SNAFL-2 en 1 µl de dimetilformamida) a SEB aislado en 100 µl de tampón de sacarosa (sacarosa al 20%, MgCl₂ 2 mM, glucosa 10 mM, tris acetato 20 mM de pH 8,0) y los SEB se marcaron durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad con agitación suave. Los SEB marcados se diluyeron con el mismo volumen de tampón HEPES de pH 8,0 centrifugado durante 5 minutos a 2000 rpm en una Heraeus Biofuge Pico y se lavaron dos veces con 100 µl del tampón HEPES de pH 8,0. Los SEB marcados se resuspendieron en medio de cultivo celular y se añadieron a las células. Después de un tiempo de incubación de 4 a 8 horas, las células se lavaron y se añadió medio de cultivo celular de pH 9,0 para la microscopía de fluorescencia.

En el enfoque dos las células tratadas con SEB se lavaron en 1xPBS (que contenía Ca^{2+} y Mg^{2+}) y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia para determinar la actividad de autofluorescencia de los SEB internalizados.

Ejemplo 4 Silenciamiento génico post-transcripcional (SGPT) de un gen diana dado.

5 El siguiente ejemplo describe el SGPT de un gen diana dado (factor de crecimiento) X en células primarias aisladas a partir de diferentes organismos (es decir, cerdo, seres humanos, ganado vacuno) o en líneas celulares (es decir ARPE-19).

10 Después de optimizar las condiciones experimentales con respecto a la identidad de ARNdH, su concentración y el reactivo de transfección apropiado, el SGPT se realizó utilizando tres (o cinco) ARNdH homólogos a diferentes regiones del ARNm del gen diana sintetizados por un proveedor comercial (preferentemente ProLigo) o a partir de los oligonucleótidos correspondientes utilizando un kit disponible en el mercado (preferentemente Silencer™ ARNiP Construction Kit, Ambion). Se introdujeron de 1 ng a 100 µg de cada ARNiP en las células mediante reactivos de transfección disponibles comercialmente (preferentemente Gene Eraser/Stratagene, Transmessenger/Qiagen, Oligofectamin/Invitrogen).

15 Hasta cinco días después de la transfección, las células se cosecharon para el análisis del perfil de expresión del ARNm mediante PCR en tiempo real y hasta una semana después de la transfección las células se cosecharon para el análisis de expresión de proteínas mediante análisis de transferencia Western o ELISA.

Ejemplo 5 Síntesis y purificación de A2-E.

20 Se sintetizó A2-E a partir de todo-trans-retinal y etanolamina como describen Parish et al. (1998) (Parish CA, M Hashimoto, K Nakanishi, J Dillon, J. Sparrow: Isolation and one-step preparation of A2E and iso-A2E, fluorophores from human retinal pigment epithelium. Proc Natl Acad Sci USA. 8 de Diciembre de 1998; 95 (25): 14609-13) y se purificó mediante cromatografía en 60 placas de cromatografía en capa fina de gel de sílice utilizando el sistema de desarrollo primario de Eldred y Katz (1988) (Eldred GE, Katz ML.: Fluorophores of the human retinal pigment epithelium: separation and spectral characterization. Exp Eye Res. Julio de 1988; 47(1): 71-86). Se disolvieron 50-150 mg de retina en 1,5-5,5 ml de etanol. Se añadieron 5-15 µl de etanolamina y se agitó. Mientras se agitaba se añadieron lentamente 5-15 µl de ácido acético. La mezcla se envolvió en papel de aluminio, y se agitó durante dos días a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se distribuyó 4 veces en cuatro tubos Eppendorf y se concentró hasta sequedad en un concentrador Speedvac durante la noche. El contenido de dos tubos de reacción Eppendorf se disolvió en un total de 200-600 µl de "sistema de desarrollo primario" (14,5 ml de heptano, 8,8 ml de hexano, 9,8 ml de cloroformo, 3 ml de éter, 3 ml de acetona, 14,8 ml de isopropanol, 27 ml de etanol, 2,5 ml de metanol, 0,4 ml de ácido acético, 7,4 ml de H_2O). A continuación se aplicaron 5-15 alícuotas, que contenían 20-60 µl cada una, de esta disolución a una placa de cromatografía de sílice que se desarrolló con el "sistema de desarrollo primario" durante aproximadamente 2 horas. Se detectó A2-E en las placas por su fluorescencia tras la iluminación con luz de 366 nm. Se raspó el material que contenía A2-E (A2-E: aplicación superior; iso-A2-E: aplicación inferior) y se eluyó 2-3 veces con cloroformo/metanol/agua mediante vórtice. Los sobrenadantes se combinaron y se secaron en un Speedvac durante unas pocas horas. El material seco se recogió en 200-600 µl "sistema de desarrollo primario" y se volvió a someter a cromatografía. También se repitieron la extracción y el secado. El material seco se recogió como una disolución de partida de A2-E en aproximadamente 1 ml de Me_2SO o etanol y se almacenó a -20°C en la oscuridad. Se cuantificó A2-E total diluido en Me_2SO o etanol utilizando un coeficiente de extinción molar de 36.900 a 439 nm (Parish CA, M Hashimoto, K Nakanishi, J Dillon, J. Sparrow: Isolation and one-step preparation of A2E and iso-A2E, fluorophores from human retinal pigment epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Dic 8; 95(25):14609-13).

35

40

Ejemplo 6 Incubación de células del EPR con A2-E y análisis de acumulación de A2-E.

45 Se diluyó A2-E en el medio de cultivo de células de EPR a una concentración de 1 a 100 µM de A2-E y Me_2SO al 0,5% o etanol. Con el objetivo de encontrar concentraciones sub-apoptóticas de A2E, se realizaron incubaciones de control con Me_2SO al 0,5% o etanol en ausencia de A2-E como control negativo y con estaurosporina de 1 a 200 µM como un control de la apoptosis. La incubación se llevó a cabo a 37°C con 5% de CO_2 durante 24 a 144 h en la oscuridad (envuelto en papel de aluminio) una vez cada día. Las células también pueden colocarse bajo una fuente de luz y exponerse a luz de 390 a 550 nm de diferentes tiempos hasta 144 horas. Se realizaron los controles también con el medio solo. Para determinar la autofluorescencia media por población de EPR se evaluó la fluorescencia intracelular mediante un microscopio de fluorescencia (Nikon; excitación 450-490 nm, emisión > 510 nm) y Safire (Tecan; excitación 456 nm, emisión 610 nm) en diversos momentos después de la alimentación.

50

Ejemplo 7 Análisis de apoptosis.

55 El siguiente ejemplo describe el análisis de la inducción de la apoptosis con el ELISA Plus de Detección de la Muerte Celular (Roche) (Wyllie AH, JF Kerr, AR Currie: Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol. 1980; 68:251-306. Revisión). El análisis se basaba en un principio de inmunoanálisis enzimático cuantitativo sándwich usando anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra ADN histonas, respectivamente. Esto permite la determinación específica de mono- y oligonucleosomas que se liberan en el citoplasma de las células que mueren por apoptosis. La muestra (producto lisado celular, suero, sobrenadante de cultivo etc.) se colocó en una microplaca recubierta con

estreptavidina. Posteriormente, se añadió una mezcla de anti-histona-biotina y anti-ADN-POD, y se incubó durante 2 horas. Durante el período de incubación, el anticuerpo anti-histona se une al componente histona de los nucleosomas y simultáneamente fija el inmunocomplejo a la microplaca recubierta con estreptavidina a través de su biotilación. Adicionalmente, el anticuerpo anti-ADN-POD reacciona con el componente ADN de los nucleosomas. Después de la eliminación de los anticuerpos no unidos mediante una etapa de lavado, la cantidad de nucleosomas se cuantificó por el POD retenido en el inmunocomplejo. POD se determinó fotométricamente con ABTS (2,2'-Azino-di [3-etil-benz-tiazolin-sulfonato]) como sustrato.

Ejemplo 8 Inducción de la hipoxia

Las células de EPR se incubaron en una incubadora (Heracell, Kendro) mantenida a 37°C y 95% de aire, 5% de CO₂ por vol (condiciones normóxicas) a 100% de confluencia (aproximadamente 10⁷ células/placa de 100 mm). Las células se sometieron a continuación a condiciones de hipoxia colocándolas en una incubadora automática con CO₂/O₂ (B 5061 EC/O₂, Kendro) mantenida a 37°C y niveles de O₂ que oscilan de 0 a 8%, CO₂ al 5%, N₂ de 95 a 87% (N₂ para equilibrar) durante 1 h a 7 días. Las células no inducidas se mantuvieron en condiciones normóxicas. Se midieron el PO₂ y PCO₂ del medio en un analizador de gases en sangre (Corning modelo 178). Los valores normóxicos fueron los siguientes: pH = 7,2 +/- 0,1, PO₂= 39,3 +/- 0,6 mmHg y PCO₂= 131,5 +/- 0,9 mmHg. Los valores hipóxicos fueron los siguientes: pH = 7,2 +/- 0,1, PO₂= 7 a 35 +/- 1,1 mmHg y PCO₂= 14,9 +/- 1,2 mmHg (Liu et al., 1995; Palmer et al., 1998) (Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S.: Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. Circ Res. 1995 Sep; 77(3):638-43; Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH, Johns RA.: Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. Am J Physiol. 1998 Feb; 274(2 Pt 1):L212-9).

Ejemplo 9 Limitación de factores esenciales

El siguiente ejemplo describe el cultivo de las células de EPR en el medio de Eagle modificado por Dulbecco modificado (alto contenido de glucosa, Life Technologies, Inc.) para inducir estrés en las células de EPR por carecer de factores esenciales. En el cultivo celular de EPR normal las células crecen en un medio de Eagle modificado por Dulbecco modificado (alto contenido de glucosa, Life Technologies, Inc.) con un suplemento de suero de ternera fetal inactivado por calor al 2% (Roche), 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 1 x aminoácidos no esenciales, L-glutamina 2 mM, y piruvato sódico 1 mM (todos de Life Technologies, Inc.) en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂ a 37°C. El medio de cultivo celular normal contiene diferentes sales inorgánicas y se añade con vitaminas, aminoácidos, glucosa, nucleótidos y otras muchas sustancias. La mayoría de las células necesitan para crecer suero sanguíneo, tal como suero de ternera fetal. El suero aporta un suplemento de proteínas, hormonas, factores de crecimiento y productos intermedios. Para limitar estos factores esenciales las células se cultivaron en un medio libre de suero. Además, se utilizó un medio de Eagle modificado por Dulbecco modificado. El medio no tenía sales inorgánicas (por ejemplo, KCl, NaCl), aminoácidos (por ejemplo, L-glutamina, L-prolina), vitaminas (por ejemplo, biotina, riboflavina, ácido fólico) u otras sustancias (por ejemplo, glucosa, ácido lipoico, nucleótidos).

Ejemplo 10 Inducción de la acidosis metabólica

El siguiente ejemplo describe la inducción de una acidosis metabólica pH < 7,2 +/- 0,1) en células de EPR cultivadas cambiando el valor de pH. Al igual que in vivo, los cultivos celulares de mamíferos necesitan un pH óptimo que oscila de pH 7,2 a 7,4. Las células en crecimiento provocarán una disminución del valor de pH debido a la producción de lactato. El valor de pH del medio se mide en un analizador de gases en sangre (Corning modelo 178). Se utilizaron dos vías para inducir una acidosis metabólica: Cambio de la presión de CO₂ (de 5% a 0%) combinado con pérdida de HCO₃⁻ en el medio de cultivo (Palmer et al., 1998) (Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH, Johns RA: Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. Am J Physiol. 1998 Feb; 274(2 Pt 1):L212-9) y el uso de un medio de Eagle modificado por Dulbecco modificado que contenía tampón Hepes 20 mM. Se puede utilizar un medio de tampón Hepes para el estrés por pH de las células puesto que un medio tamponado con Hepes se acidula en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂ a 37°C.

Ejemplo 11 Preparación de ARN a partir de células de EPR de cultivos primarios.

El ARN preparado a partir de células de EPR primarios sirvieron como material de partida para los análisis de expresión tanto para la PCR en tiempo real como con micromatrices de ADN. Después de su exposición a estrés (como condiciones de cultivo hipóxicas, deficiencias de nutrientes y/o de factores de crecimiento o cambios de pH) las células de EPR se lavaron una vez con PBS antes de la lisis celular. Se lisaron aproximadamente 1x10⁶ células (por ejemplo, un pocillo de una placa de cultivo celular de seis pocillos) con 800 µl de β-mercaptoetanol que contenía tampón RLT (RNeasy Mini Kit de Qiagen Alemania) sacudiendo suavemente la placa. Los productos lisados se congelaron inmediatamente a -80°C. Después de descongelar durante 15 min a 37°C los productos lisados se procesaron para el aislamiento del ARN total de acuerdo con el protocolo del fabricante (RNeasy Mini Kit, Qiagen). El ARN sobre la matriz de una columna (de acuerdo con 1x10⁶ células) se eluyó con un volumen adecuado (10-100 µl) de agua sin ARNasa. El ARN de las células cultivadas de forma idéntica se agrupó para obtener ARN uniforme a partir de una condición de cultivo.

Ejemplo 12 Digestión con ADNasa I de ADN genómico contaminante.

Para el posterior análisis de ARN se debe tener cuidado de eliminar el ADN genómico contaminante. Por lo tanto, se puede realizar la digestión del ADN genómico mediante restricción enzimática con ADN polimerasa I (ARNasa libre de ADNasa I). En resumen un volumen de reacción de 100 µl contenía hasta 50 µg de ARN junto con 20 µl de MgSO₄ 25 mM (conc. final 5 mM), 3,4 µl de NaAc 3M de pH 4,7 (conc. final 100 mM) y 20 U de ADNasa I (2 µl de una provisión de 10 U/µl p. ej. de Roche Diagnostics). La digestión se realizó durante 1 hora a 37°C. La posterior purificación de ARN a partir de ADNasa y fragmentos de ADN restringidos se llevó a cabo de nuevo utilizando el RNeasy Mini Kit (Qiagen) de acuerdo con las recomendaciones del proveedor.

Ejemplo 13 Síntesis de ADNc para el análisis de expresión a través de PCR en tiempo real.

La síntesis de ADNc a partir del ARN total es un requisito previo para el análisis de expresión tanto por PCR en tiempo real como con la técnica de micromatrices. Para permitir la comparación de la expresión génica entre los ARNm derivados de diferentes condiciones de cultivo, se sometió a transcripción inversa la misma cantidad de ARN total (aquí: por ejemplo, 2 µg por ARN diferente) a ADNc mediante lo siguiente: 1 µl de cebador oligo-dT (500 µg/ml, Qiagen Operon, Núm. 55000142), 2 µg de ARN de células de EPR porcinas, 1 µl de mezcla de dNTP 10 mM (Invitrogen) y ARNasa libre de agua (Qiagen) hasta 12 µl en total. La mezcla se incubó a 65°C durante 5 min seguido de 2 min en hielo. Después de una breve centrifugación se añadieron los siguientes componentes del kit (Invitrogen, Núm. 18064-014): 4 µl de 5x tampón First Strand, 2 µl de DTT 0,1 M y 1 µl RNasin (40 U/µl, Promega, Núm. N2511). Después de mezclar pipeteando arriba y abajo la reacción se incubó durante 2 min a 42°C en un baño de agua. A continuación se añadió 1 µl de transcriptasa inversa (Superscript II, kit Invitrogen véase más arriba) y se mezcló pipeteando arriba y abajo. La reacción se incubó durante 50 min a 42°C en un baño de agua y posteriormente se detuvo cambiando el tubo de reacción durante 15 min a un bloque térmico a 70°C. Después de una corta incubación en hielo el ADNc recién sintetizado se centrifugó y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Ejemplo 14 PCR en tiempo real.

Las concentraciones de ADNc usado como molde en la PCR en tiempo real variaron entre 100 pg y 100 ng (refiriéndose al ARN original). Para cada gen de interés y los genes de control se pueden diseñar sondas TaqMan™ específicas (que contienen un colorante fluorescente y una molécula extintora). Alternativamente, se puede utilizar el colorante SYBR®-Green, que se intercala en todas las moléculas de ADN de doble hebra, lo que permite la medición en proceso de los productos de PCR que aparecen. Los oligonucleótidos para la amplificación por PCR (PCR en tiempo real y análisis de micromatrices) se diseñaron para lograr fragmentos de PCR usualmente de un tamaño de 150 a 600 pares de bases (pb). Junto con el gen o los genes de interés se crearon sondas de PCR por duplicado o triplicado junto con genes de control o constitutivos como el de la beta-actina (ACTB), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPD) o hipoxantina fosforribosiltransferasa (HPRT1). Una reacción típica de PCR de 25 µl estuvo compuesta como la siguiente: ADNc molde (100 pg - 100 ng), 0,5 U/µl de polimerasa Taq HotStart (p. ej. Invitrogen), 1 x tampón de reacción de polimerasa, 0,2 mM de cada dNTP (p. ej. Invitrogen), MgCl₂ 1,5 a 7 mM (p. ej. Invitrogen), oligonucleótidos en el intervalo de entre 50 y 300 nM (p. ej. Qiagen-Operon, Alemania) y SYBR®-Green (p. ej. Bio Whittaker Molecular Applications, Núm. 50512, 10.000 x conc.) 0,1 a 0,5 x (diluidos a partir de la provisión de partida). Las condiciones de PCR típicas para la PCR en tiempo real fueron: etapa de activación de 5-15 min a 95°C, 45 ciclos con cada 30 s de desnaturalización a 94°C, recocido de los cebadores (temperatura dependiendo de la temperatura de fusión de los cebadores) durante 30 s y elongación de los cebadores a 72°C hasta durante 1 min. Después de cada ciclo se determinó el aumento de la fluorescencia de la sonda durante la amplificación mediante PCR por la unidad óptica del dispositivo de PCR en tiempo real (por ejemplo iCycler de BioRad). Los datos de PCR en tiempo real generados a partir del control frente a la muestra tratada produjeron una información profunda sobre los cambios en la expresión del ARNm.

Ejemplo 15 Amplificación mediante PCR de los genes diana para la aplicación sobre portas de micromatrices.

De todos los genes diana seleccionados se amplificaron fragmentos de PCR de 150 a 600 pb a partir de ADNc específicos de EPR/retina o hígado (como moldes) de acuerdo con el siguiente protocolo: las reacciones de PCR se establecieron típicamente en un total de 50 µl. Contenían usualmente 1 x tampón de reacción de polimerasa (por ejemplo, Invitrogen), MgCl₂ de 1,5 a 4 mM (concentración final) (p. ej. Invitrogen), 0,2 mM de cada nucleótido (provisión de partida de dNTP 10 mM, p. ej. Invitrogen), hasta 1 µM de cebador directo e inverso específico del gen (Qiagen Operon), 0,025 - 1U de polimerasa Taq (p. ej. Invitrogen), una cantidad adecuada de molde de ADNc (1-10 µl, dependiendo de la calidad del ADNc) y agua libre de nucleasas a un volumen final de 50 µl. Las condiciones típicas para la PCR fueron: una única etapa de desnaturalización de 5 min a 95°C, 30 ciclos con cada 30 s de desnaturalización a 94°C, hibridación de los cebadores (normalmente entre 45°- 65°C, dependiendo la temperatura de la temperatura de fusión de los cebadores) durante 30 s y la elongación de los cebadores a 72°C durante un máximo de 1 min.

Ejemplo 16 Purificación mediante PCR.

La purificación mediante PCR se realizó mediante la utilización del Kit de Purificación QiaQuick (Qiagen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Ejemplo 17 Aplicación de productos de PCR sobre portas de vidrio recubiertos.

El ADN de los productos de PCR se dispuso en matrices con agujas divididas (Telechem) en portaobjetos recubiertos CMT GAPS (Corning) con un aplicador de muestras Genepak (Genetix) con 50% de DMSO como tampón de aplicación. Los portas con las aplicaciones se almacenaron durante un máximo de 6 meses.

5 Ejemplo 18 Marcaje de ARN para la hibridación.

Para cada reacción de marcaje se recomiendan 5 µg de ARN (al menos 300 ng/µl, $DO_{260/280}$ entre 1,8 y 2,0). El marcaje directo del ARN de control (de las células de control/no tratadas) y del ARN de ensayo (de células sometidas a estrés/tratadas) con Cy3 y Cy5 (suministrados por Amersham Biosciences o Perkin Elmer) se realizó con el kit Qiagen 'Label Star' de acuerdo con el protocolo del proveedor.

10 Ejemplo 19 Hibridación de los ARN con micromatrices.

La hibridación de los ARN mixtos con el ADN aplicado sobre las micromatrices se realizó a 42°C durante la noche en una estación de hibridación automática Lucidea SlidePro (Amersham Biosciences) en condiciones de hibridación y condiciones de lavado bien definidas: El tampón de hibridación estaba compuesto de 25% de formamida, 5x SSC y SDS al 0,1%.

15 Ejemplo 20 Procesamiento de imágenes y análisis de datos de las matrices

Después de la hibridación, se escanearon las señales en las micromatrices con un escáner láser (ScanArray 4000, Perkin Elmer) para producir los datos de imagen sin procesar. Para extraer la información de la señal anterior se aplicaron las imágenes generadas en la pestaña delimitada herramientas del programa archivos de texto de tipo ScanAlyze (Mike Eisen, Universidad de Stanford, CA., <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>). La normalización de los datos se realizó mediante la aplicación de Microsoft Excel y los programas Access (parte de los paquetes de Microsoft Office). Tales datos preparados se analizaron con programas informáticos como GeneSpring de Silicon Genetics, que permiten p. ej. el análisis de agrupaciones complejas para encontrar los genes expresados diferencialmente.

25 Ejemplo 21 Inhibición de la expresión de la proteína verde fluorescente (eGFP) en el epitelio pigmentario retiniano (EPR) y la retina de ratones transgénicos por moléculas de ARNdh.

Este ejemplo describe el *silenciamiento génico post-transcripcional* específico por ARNdh del gen diana de la eGFP en el modelo animal de ratón, durante el cual se va a determinar la concentración óptima ARNdh para el *silenciamiento génico post-transcripcional* en la aplicación sistémica (procedimiento experimental 1, véanse los resultados en la figura 1). El procedimiento implica el tratamiento *in vivo* de ratones transgénicos (FVB.Cg-Tg(GFP)5Nagy, The Jackson Laboratory), que expresan la forma *mejorada* de la proteína fluorescente verde (EGFP) en sus células corporales, mediante la aplicación sistémica de moléculas de oligoribonucleótidos de ARNdh contra el gen diana de eGFP. Los animales de control también son tratados sistémicamente con moléculas no silenciadoras de ARNdh. Con el propósito del *silenciamiento génico post-transcripcional*, los animales que no están bajo la influencia de analgésico o anestésico recibieron inyecciones diarias i.v. en la vena de la cola (1^{er} día de tratamiento: día 0, último día de tratamiento: día 20) de 100 o 200 µg de ARNdh específico de eGFP/kg de peso corporal (PC) y el grupo de control de 200 µg de ARNdh no silenciador/kg de PC. También se mantuvo un grupo de control de animales tratados con tampón (inyección diaria i.v. de 0,1 ml de tampón en la vena de la cola). Cada grupo de animales experimentales consiste en 8 animales, siendo el de volumen máximo de inyección/inyección 0,1 ml. El día 21, los animales son sacrificados mediante inhalación de CO₂.

40 La expresión de la proteína verde fluorescente en el ojo de los ratones se examina inmunohistológicamente (fluorescencia espontánea de eGFP:evaluación microscópica de la fluorescencia; tinción de inmunofluorescencia específica de eGFP:evaluación microscópica de la fluorescencia).

Constructos y plásmidos de ARNdh:

Para el diseño de las moléculas de ARNdh, se seleccionaron secuencias del tipo AA(N19)TT (donde N representa cualquier nucleótido) de la secuencia del ARNm diana, con el fin de obtener hebras efectoras y antisentido de 21 nucleótidos (nt) de longitud con salientes 3' simétricos de dos nucleótidos de longitud. En los salientes 3', se utiliza 2'-desoxi-timidina en lugar de uridina. Con el fin de asegurar que las moléculas de ARNdh se dirigen exclusivamente contra el gen diana, las secuencias de ARNdh elegidas se someten a ensayo contra el genoma del ratón en un análisis BLAST. Las moléculas de ARN de 21 nt se sintetizan químicamente y se purifican. Para la formación de dúplex, se mezclan 100 µg de cada uno de los oligoribonucleótidos efectoras y antisentido en Tris 10 mM/HCl, NaCl 20 mM (pH 7,0) y se calientan a 95°C y se enfrían a temperatura ambiente durante un período de 18 horas. Las moléculas de ARNdh se precipitan en etanol y se resuspenden en tampón estéril (acetato de potasio 100 mM, HEPES-KOH 30 mM, acetato de magnesio 2 mM, pH 7,4). La integridad y el carácter de doble hebra del ARNdh se verifican mediante electroforesis en gel. Alternativamente, las moléculas de ARNdh se obtienen de proveedores comerciales. Las secuencias de los genes diana y las correspondientes moléculas de ARNdh son las siguientes:

ARNdh de GFP

secuencia diana de ADN: 5 'G CAA GCT GAC CCT GTT GAA CA (SEQ ID NO 5)
 Región codificante, 121-141 con respecto al primer nucleótido del codón de inicio (Núm. de Acc. U55761)

ARNdh (efector) 5 'r (GCA AGC UGA UGA CCC AGU U) (SEQ ID NO 6)

ARNdh (antisentido) 5 'r (AA CUU CAG CAG GGU CUU GC) (SEQ ID NO 7)

ARNdh no silenciador, control

Secuencia de ADN diana: 5 'AATTCTCCGAACGTGTCACGT (SEQ ID NO 8)

ARNdh (efector) 5 'r (UUCUCCGAACGUGUCACGU) d (TT) (SEQ ID NO 9)

ARNdh (antisentido) 5 'r (ACGUGACACGUUCGGAGAA) d (TT) (SEQ ID NO 10)

Analgesia y anestesia de los ratones:

5 Para la aplicación sistémica, los animales se inmovilizan y los ARNdh se inyectan i.v. en la vena de la cola (volumen de inyección máximo: 0,1 ml), donde no se realizan analgesia o anestesia, ya que esto podría añadir más estrés a los animales que la propia inyección i.v. Para la inyección retrobulbar (volumen de inyección máximo: 0,005 ml) los animales son sometidos sin embargo a anestesia mediante una breve inhalación isoflurano y se les provee de Metamizol sódico con fines analgésicos. Los animales se mantienen a continuación en sus entornos acostumbrados de jaulas para animales. Después de completar el diagnóstico *in vivo* (el final de cada experimento con animales se establece, respectivamente, en el ejemplo 1 - 5) los animales se sacrifican mediante inhalación de CO₂, se enuclean y los ojos se estudian histológicamente (inmunohistología).

Estudio de la expresión de eGFP en el epitelio pigmentario retiniano y la retina:

15 Después de la extirpación, los ojos se fijan en una disolución de formalina/PBS al 4% durante 24 horas. Usando métodos convencionales, las muestras fijadas son deshidratadas con posterioridad en una serie creciente de alcohol y embebidas en parafina. Con la ayuda de un microtomo, se producen secciones en serie de 5 a 12 µm convencionales, se estiran en un baño de agua caliente y se transfieren a un cubre revestido con polilisina. Las secciones se secan a continuación en una incubadora durante 2 horas a una temperatura de 52°C. Las secciones secas se desparafinan en xilol, se transfieren a una serie decreciente de alcohol seguido de Tris/HCl de pH 7,4. Después del bloqueo, las secciones se incuban durante 2 horas con un antisuero anti-eGFP primario (antisuero policlonal de cabra anti-eGFP, Santa Cruz Núm. sc-5384). La detección se produce por medio de la tinción de inmunofluorescencia utilizando anti-IgG de cabra de conejo conjugado con Cy2 (Dianova, Núm. 305-225-045). Las muestras se embeben y a continuación se montan para microscopía con un microscopio Eclipse TE-2000-S (Nikon), equipado con un objetivo 20x y 40x/1.3. La fluorescencia específica de eGFP espontánea, en las secciones desparafinadas, no tratadas se analizan usando un microscopio de fluorescencia.

25 Procedimiento experimental: Aplicación sistémica de ARNip. Determinación de la concentración óptima de ARNdh para el *silenciamiento génico post-transcripcional*.

Grupo	Sustancia	Número de animales
Animales de control	Tampón	8
Control negativo 200 µg ARNdh/kg de peso corporal	ARNdh no silenciador	8
200 g ARNdh/kg de peso corporal	ARNdh específico de eGFP	8
100 g ARNdh/kg de peso corporal	ARNdh específico de eGFP	8
Animales por experimento		32

Para los resultados véase la figura 1

Nombre del gen	Núm. de acceso	marcador para	CDS	Descripción	Símbolos alternativos	Cita
BAX	NM_138761	apoptosis	53 .. 631	proteína X asociada a BCL2 (BAX), variante del transcrito alfa	desconocido	Martindale et al. J Physiol Cell. 2002 Jul; 192 (1) :1-15.
BBC3	NM_014417	apoptosis	1 .. 582	componente 3 de unión a BCL2 (BBC3)	JFY1, PUMA, PUMA/JFY1	Martindale et al. J Physiol Cell. 2002 Jul; 192 (1) :1-15.
BCL2	NM_000633	apoptosis	32 .. 751	CLL/linfoma de células B 2 (BCL2), variante del transcrito alfa	desconocido	Nicotera. Toxicol Lett. 2002 Feb 28; 127 (1-3) :189-95.
BIRC2	NM_001166	apoptosis	1160 .. 3016	que contiene 2 repeticiones de IAP baculoviral (BIRC2)	API1, MIHB, cIAP1, HIAP2	Martindale et al. J Physiol Cell. 2002 Jul; 192 (1) :1-15.
BIRC3	NM_001165	apoptosis	725 .. 2539	que contiene 3 repeticiones de IAP baculoviral (BIRC3)	API2, MIHC, cIAP2, HAIP1, HIAP1	Martindale et al. J Physiol Cell. 2002 Jul; 192 (1) :1-15.
BIRC4	NM_001167	apoptosis	34 .. 1527	que contiene 4 repeticiones de IAP baculoviral (BIRC4)	ILP, API3, ILP1, MIHA, XIAP, XIAP, hILP, ILP-1	Martindale et al. J Physiol Cell. 2002 Jul; 192 (1) :1-15.
CDKN1A	NM_078467	apoptosis	236 .. 730	inhibidor 1A de quinasa dependiente de ciclina (p21, Cip1) (CDKN1A), variante 2 del transcrito	P21, CIP1, SDI1, WAF1, CAP20, CDKN1, MDA-6	Almond & Cohen. Leucemia. 2002 Apr; 16 (4) :433-43.
EndoG	NM_004435	apoptosis	167 .. 1060	endonucleasa G (ENDO G)	desconocido	Almond & Cohen. Leucemia. 2002 Apr; 16 (4) :433-43.
HSPD1	NM_002156	apoptosis	25 .. 1746	proteína 1 de choque térmico de 60 kDa (chaperonina) (HSPD1)	GroEL, SPG13, HSP60,	Martindale et al. J Physiol Cell. 2002 Jul; 192 (1) :1-15.
HSPE1	NM_002157	apoptosis	42 .. 350	proteína 1 de choque térmico de 10 kDa (chaperonina 10) (HSPE1)	Cpn10, HSP10, GROES,	Ravagnan et al. J Physiol Cell. Agosto de 2002; 192 (2) :131-7.
LRDD	NM_145886	apoptosis	144 .. 2876	dominio rico en leucina y muerte que contiene (LRDD), variante 1 del transcrito	PIDD, MGC16925	Martindale et al. J Physiol Cell. 2002 Jul; 192 (1) :1-15.

ES 2 397 060 T3

Nombre del gen	Núm. de acceso	marcador para	CDS	Descripción	Símbolos alternativos	Cita
MCL1	NM_021960	apoptosis	64 .. 1116	secuencia 1 de la leucemia de células mieloides (relacionado con BCL2) (MCL1)	EAT	Bae et al. J. Biol. Chem. 275: 25255-25261, 2000.
P53AIP1	AB045830	apoptosis	211 .. 585	para p53AIP1, cds completo	desconocido	Martindale et al. J Physiol Cell. 2002 Jul; 192 (1) :1-15.
PMAIP1	NM_021127	apoptosis	174 .. 338	proteína 1 inducida por forbol-12-miristato-13-acetato (PMAIP1)	APR, NOXA	Martindale et al. J Physiol Cell. 2002 Jul; 192 (1) :1-15.
TNFRSF10B	NM_147187	apoptosis	286 .. 1521	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 10b (TNFRSF10B), variante 2 del transcrito	DR5, KILLER, TRICK2, TRICKB, ZTNFR9, TRAILR2, TRICK2A, TRICK2B, TRAIL-R2, KILLER/DR5	Martindale et al. J Physiol Cell. 2002 Jul; 192 (1) :1-15.
TNFRSF6	NM_000043	apoptosis	347 .. 1354	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 6 (TNFRSF6), variante 1 del transcrito	FAS, APT1, CD95, APO-1, FASTM	Hueber. Naturaleza Cell Biol. 2: E23-E25, 2000.
TOP2B	NM_001068	apoptosis	1 .. 4866	topoisomerasa (ADN) II beta 180kDa (TOP2B)	TOPIIB	Solovyan et al. J Biol Chem. 2002 Jun 14; 277 (24) :21458-67.
TP53	NM_000546	apoptosis	252 .. 1433	proteína tumoral p53 (síndrome de Li-Fraumeni) (TP53),	P53, p53, Trp53	Almond & Cohen. Leucemia. 2002 Apr; 16 (4) :433-43.
EPO	NM_000799	hipóxico cult.cond	182 .. 763	eritropoyetina (EPO),	EP	Grimm et al. Nature Med.. 8: 718-724, 2002.
FGF2	NM_002006	hipóxico cult.cond	302 .. 934	factor 2 de crecimiento de fibroblastos (básico) (FGF2),	BFGF, FGFb, HBGH-2	Grimm et al. Nature Med.. 8: 718-724, 2002.
LDHA	NM_005566	hipóxico cult.cond	98 .. 1096	lactato deshidrogenasa A	desconocido	Semenza et al. J Biol Chem. 1996 Dec 20, 271 (51) :32529-37.
NGB	NM_021257	hipóxico cult.cond	376 .. 831	neuroglobina (NGB),	desconocido	Burmester et al. Naturaleza 407 (6803), 520-523 (2000)

Nombre del gen	Núm. de acceso	marcador para	CDS	Descripción	Símbolos alternativos	Cita
FEAG	NM_003376	hipóxico cult.cond	702 .. 1277	factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF),	VEGFA	Grimm et al. Nature Med.. 8: 718-724, 2002.
AVEN	NM_020371	estrés oxidativo	53 .. 1141	apoptosis, inhibidor de la activación de caspasa (AVEN),	PDCD12	Martindale et al. J Physiol Cell. 2002 Jul; 192 (1) :1-15.
BCL2A1	NM_004049	estrés oxidativo	184 .. 711	proteína A1 relacionada con BCL2 (BCL2A1),	GRS, BFL1, HBPA1, BCL2L5	Martindale et al. J Physiol Cell. 2002 Jul; 192 (1) :1-15.
TAO	NM_001752	estrés oxidativo	69 .. 1652	catalasa (CAT),	desconocido	Cai et al. Prog Retin Eye Res. 2000 Mar; 19 (2) :205-21.
DUSP1	NM_004417	estrés oxidativo	249 .. 1352	fosfatasa 1 de especificidad dual (DUSP1),	HVH1, CL100, MKP-1, PTPN10	Wu et al. J Biol Chem. 2002 Nov 15; 277 (46) :44208-13.
GADD45	NM_001924	estrés oxidativo	296 .. 793	detención del crecimiento y daño al ADN inducible, alfa (GADD45A),.	DDIT1, GADD45	Martindale et al. J Physiol Cell. 2002 Jul; 192 (1) :1-15.
HMOX1	NM_002133	estrés oxidativo	81 .. 947	hemooxigenasa 1 (descicladora) (HMOX1),	HO-1, bK286B10	Martindale et al. J Physiol Cell. 2002 Jul; 192 (1) :1-15.
IL6	NM_000600	estrés oxidativo	63 .. 701	interleuquina 6 (interferón beta 2) (IL6)	HGF, HSF, BSF2, IL-6, IFNB2	Martindale et al. J Physiol Cell. 2002 Jul; 192 (1) :1-15.
MAP2K6	NM_002758	estrés oxidativo	341 .. 1345	proteína quinasa 6 activada por mitógeno (MAP2K6), variante 1 del transcrito	MEK6, MKK6, MAPKK6, PRKMK6, SAPKK3	Seger y Krebs. FASEB J. 9: 726-735, 1995.
MAPK8	NM_139049	estrés oxidativo	18 .. 1301	proteína quinasa 8 activada por mitógeno (MAPK8), variante 1 del transcrito 1	JNK, JNK1, PRKMB,, SAPK1, JNK1A2, JNK21B1/2	Almond & Cohen. Leucemia. 2002 Apr; 16 (4) :433-43.
MAPK9	NM_002752	estrés oxidativo	50 .. 1324	proteína quinasa 9 activada por mitógeno (MAPK9), variante 1 del transcrito	JNK2, JNK2A, JNK2B, PRKM9, JNK-55, JNK2BETA, P54ASAPK, p54aSAPK, JNK2ALPHA	Martindale et al. J Physiol Cell. 2002 Jul; 192 (1) :1-15.

Nombre del gen	Núm. de acceso	marcador para	CDS	Descripción	Símbolos alternativos	Cita
NFKB2	NM_002502	estrés oxidativo	164 .. 2965	factor nuclear 2 del polipéptido ligero kappa potenciador de genes en células B (p49/p100) (NFKB2).	LYT10, LYT-10	Martindale et al. J Physiol Cell. 2002 Jul; 192 (1) :1-15.
PRDX2	NM_005809	estrés oxidativo	90 .. 686	peroxirredoxina 2 (PRDX2),.	PRP, TSA, NKEFB, TDPX1	Fujii y Ikeda. Redox Rep. 2002; 7 (3) :123-30. Revisar.
SFN	NM_006142	estrés oxidativo	166 .. 912	estratifina (SFN),	desconocido	Martindale et al. J Physiol Cell. 2002 Jul; 192 (1) :1-15.
SHC1	NM_003029	estrés oxidativo	195 .. 1946	proteína transformante SHC 1 (homología con Src que contiene 2 dominios (SHC1),	SHC, SHCA	Martindale et al. J Physiol Cell. 2002 Jul; 192 (1) :1-15.
SOD1	NM_000454	estrés oxidativo	1 .. 465	superóxido dismutasa 1, soluble (esclerosis lateral amiotrófica 1 (adulto)) (SOD1),	ALS, ALS1, PAI	Martindale et al. J Physiol Cell. 2002 Jul; 192 (1) :1-15.
SOD2	NM_000636	estrés oxidativo	5 .. 673	superóxido dismutasa 2, mitocondrial (SOD2),	IPO-B, MnSOD	Martindale et al. J Physiol Cell. 2002 Jul; 192 (1) :1-15.
TNFAIP3	NM_006290	estrés oxidativo	67 .. 2439	proteína 3 inducida por el factor de necrosis tumoral, alfa (TNFAIP3),	A20, TNFA1P2	Martindale et al. J Physiol Cell. 2002 Jul; 192 (1) :1-15.
TRAF1	NM_005658	estrés oxidativo	79 .. 1329	factor 1 asociado al receptor de TNF (TRAF1),	EBI6, MGC: 10353	Martindale et al. J Physiol Cell. 2002 Jul; 192 (1) :1-15.
TRAF2	NM_021138	estrés oxidativo	58 .. 1563	factor 2 asociado al receptor de TNF (TRAF2), variante 1 del transcrito,	TRAP, TRAP3, MGC: 45012	Martindale et al. J Physiol Cell. 2002 Jul; 192 (1) :1-15.

Referencias

- Banks CN, Hutton WK. Blindness in New South Wales: an estimate of the prevalence and some of the contributing causes. *Aust J Ophthalmol* 9:285-288 (1981).
- 5 Bohler C, Nielsen PE, Orgel LE. Template switching between PNA and RNA oligonucleotides. *Nature*. 376(6541):578-81 (1995).
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409(6818):363-6 (2001).
- Bressler NM. Early detection and treatment of neovascular age-related macular degeneration. *J Am Board Fam Pract.* 15:142-152 (2002).
- 10 Bressler NM, Bressler SB. Preventative ophthalmology. Age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 102:1206-121 (1995).
- Bressler NM, Bressler SB, Fine SL. Age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 32:375-413 (1988).
- Bressler SB, Bressler NM, Fine SL, Hillis A, Murphy RP, Olk RJ, Patz A. Natural course of choroidal neovascular membranes within the foveal avascular zone in senile macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 93:157-163 (1982).
- 15 Campochiaro PA, Soloway P, Ryan SJ, Miller JW. The pathogenesis of choroidal neovascularization in patients with age-related macular degeneration. *Mol Vis.* 5:34 (1999).
- Caplen N.J., Parrish S., Imani F., Fire A., and Morgan RA. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 09:9742-9747 (2001).
- Davis LG, Kuehl M, Kuehl MW, Battey JF. *Basic methods in molecular biology*. Sec. Ed. Elsevier (1990).
- 20 Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., and Tuschel T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498 (2001).
- Feeney L. Lipofuscin and melanin of human retinal pigment epithelium. Fluorescence, enzyme cytochemical, and ultrastructural studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17:583-600 (1978).
- 25 Feeney-Burns L, Ellersieck MR. Age-related changes in the ultrastructure of Bruch's membrane. *Am J Ophthalmol* 100:686-697(1985).
- Finn PJ, Gibson NJ, Fallon R, Hamilton A, Brown T. Synthesis and properties of DNA-PNA chimeric oligomers. *Nucleic Acids Res.* 24: 3357-3363 (1996).
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., and Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Coenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811 (1998).
- 30 Fischer SG, Lerman LS. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80(6):1579-83 (1983).
- Gass JD. Drusen and disciform macular detachment and degeneration. *Arch Ophthalmol* 90:206-217 (1973).
- Gass JD. Pathogenesis of disciform detachment of the neuroepithelium. *Am J Ophthalmol* 63: Supl:1-139(1967).
- 35 Ghafour IM, Allan D, Foulds WS. Common causes of blindness and visual handicap in the west of Scotland. *Br J Ophthalmol* 67: 209-213 (1983).
- Gossen M, Bonin AL, Freundlieb S, Bujard H. Inducible gene expression systems for higher eukaryotic cells. *Curr Opin Biotechnol.* 5(5):516-20 (1994).
- Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(12):5547-5551 (1992).
- 40 Gotoh M, Hasebe M, Ohira T, Tosu M. [Gene diagnosis with an affinity sensor, BIACORE principle and applications]. *Rinsho Byori.* 45(3):224-8 (1997). Japanese.
- Green WR, McDonnell PJ, Yeo JH. Pathologic features of senile macular degeneration. *Ophthalmology* 92:615-27 (1985).
- Grey RH, Bums-Cox CJ, Hughes A. Blind and partial sight registration in Avon. *Br J Ophthalmol* 73:88-94(1989).
- 45 Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC. Genes and

- mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106(1):23-34 (2001).
- Hamilton AJ and Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-952(1999).
- 5 Heiba IM, Elston RC, Klein BE, Klein R. Sibling correlations and segregation analysis of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Genet Epidemiol* 11:51-67 (1994).
- Hogan MJ, Alvarado J. Studies on the human macula. IV. Aging changes in Bruch's membrane. *Arch Ophthalmol* 77:410-420(1967).
- 10 Hyman LG, Lillienfeld AM, Ferris FL, Fine SL. Senile macular degeneration: a case-control study. *Am J Epidemiol* 118:213-227 (1983).
- Hyman L. Epidemiology of eye disease in the elderly. *Eye* 1: 330-341 (1987).
- Jalkanen M, Nguyen H, Rapraeger A, Kurn N, Bernfield M. Heparan sulfate proteoglycans from mouse mammary epithelial cells: localization on the cell surface with a monoclonal antibody. *J Cell Biol.* 101(3):976-984 (1985).
- 15 Jalkanen M, Rapraeger A, Saunders S, Bernfield M. Cell surface proteoglycan of mouse mammary epithelial cells is shed by cleavage of its matrix-binding ectodomain from its membrane-associated domain. *J Cell Biol.* 105:3087-96 (1987).
- Jensen KK, Orum H, Nielsen PE, Norden B. Kinetics for hybridization of peptide nucleic acids (PNA) with DNA and RNA studied with the BIAcore technique. *Biochemistry* 36(16):5072-5077 (1997).
- Joyner A. *Gene Targeting, A Practical Approach*, Second edition, Oxford University Press (1999).
- 20 Kasschau KD and Carrington JC. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95:461-470(1998).
- Klein R, Klein BE, Franke T. The relationship of cardiovascular disease and its risk factors to age-related maculopathy. *The Beaver Dam Eye Study. Ophthalmology* 100:406-414 (1993).
- 25 Knight SW and Bass BL. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2: 2269-2271(2001).
- Koch T, Hansen HF, Andersen P, Larsen T, Batz HG, Otteson K, Orum H. Improvements in automated PNA synthesis using Boc/Z monomers. *J Pept Res.* 49(1):80-8 (1997).
- Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256(5517):495-497 (1975).
- 30 Leibowitz HM, Krueger DE, Maunder LR, Milton RC, Kini MM, Kahn HA, Nickerson RJ, Pool J, Colton TL, Ganley JP, Loewenstein JI, Dawber TR. The Framingham Eye Study monograph: An ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults, 1973-1975. *Surv Ophthalmol* 24(Supl): 335-610 (1980).
- 35 Le Mouellic H, Lallemand Y, Brulet P. Targeted replacement of the homeobox gene *Hox-3.1* by the *Escherichia coli lacZ* in mouse chimeric embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(12):4712-4716 (1990).
- Maguire P, Vine AK. Geographic atrophy of the retinal pigment epithelium. *Am J Ophthalmol* 102:621-625 (1986).
- Mantero G, Zonaro A, Albertini A, Bertolo P, Primi D. DNA enzyme immunoassay: general method for detecting products of polymerase chain reaction. *Clin Chem.* 37(3):422-429 (1991).
- 40 Mayer RJ, Walker JH, eds. *Immunochemical methods in cell and molecular biology*. Academic Press, Londres (1987).
- Melani C, Rivoltini L, Parmiani G, Calabretta B, Colombo MP. Inhibition of proliferation by c-myc antisense oligodeoxynucleotides in colon adenocarcinoma cell lines that express c-myc. *Cancer Res.* 51:2897-2901 (1991)
- Meyers SM, Zachary AA. Monozygotic twins with age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 106:651-653 (1988).
- 45 Paetkau ME, Boyd TA, Grace M, Bach-Mills J, Winship B. Senile disciform macular degeneration and smoking. *Can J Ophthalmol* 13:67-71 (1978).
- Pauleikhoff D, Harper CA, Marshall J, Bird AC. Aging changes in Bruch's membrane. A histochemical and

- morphologic study. *Ophthalmology* 97:171-178(1990).
- Piguet B, Wells JA, Palmvang IB, Wormald R, Chisholm IH, Bird AC. Age-related Bruch's membrane change: a clinical study of the relative role of heredity and environment. *Br J Ophthalmol* 77:400-403 (1993).
- 5 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2^a edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sarks SH. Ageing and degeneration in the macular region: a clinico-pathological study. *Br J Ophthalmol* 60:324-341 (1976).
- Schuler GD. Pieces of the puzzle: expressed sequence tags and the catalog of human genes. *J Mol Med.* 75(10):694-8 (1997)
- 10 Seddon JM, Ajani UA, Mitchel BD. Familial aggregation of age-related maculopathy. *Am J Ophthalmol* 123: 199-206 (1997).
- Smith and Johnson. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67:31-40 (1988)
- 15 Silvestri G, Johnston PB, Hughes AE. Is genetic predisposition an important risk factor in age-related macular degeneration? *Eye* 8:564-568 (1994).
- Sobol RE, Astarita RW, Chisari FV, Griffiths JC, Royston I. Use of immunoglobulin light chain analysis to detect bone marrow involvement in B-cell neoplasms. *Clin Immunol Immunopathol.* 24(1):139-144 (1982).
- Sobol RE, Dillman RO, Collins H, Griffiths JC, Green MR, Royston I. Applications and limitations of peripheral blood lymphocyte immunoglobulin light chain analysis in the evaluation of non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer* 56(8):2005-2010 (1985).
- 20 Sperduto RD, Hiller R. Systemic hypertension and age-related maculopathy in the Framingham Study. *Arch Ophthalmol* 104:216-219 (1986).
- Steinecke, Ribozymes, *Methods in Cell Biology* 50, Galbraith et al. eds Academic Press, Inc.: 449-460 (1995).
- 25 The Eye Disease Case-Control Study Group. Risk factors for neovascular age-related macular. *Arch Ophthalmol* 110:1701-1708 (1992).
- Tijssen P.; Burden, RH and von Knippenburg (Eds). *Practice and theory of enzyme immunoassays*. Elsevier, Amsterdam, Vol. 15 (1985).
- Verma R.S.; Babu A. *Human chromosomes; Manual of basic techniques*. Nueva York, Pergamon Press (1989).
- 30 Veselkov AG, Demidov W, Frank-Kamenetskii MD, Nielsen PE. PNA as a rare genome-cutter. *Nature.* 379(6562):214 (1996).
- Wahl RL, Parker CW, Philpott GW. Improved radioimaging and tumor localization with monoclonal F(ab')₂. *J Nucl Med.* 24(4):316-25 (1983).
- Weiler J, Gausepohl H, Hauser N, Jensen ON, Hoheisel JD. Hybridisation based DNA screening on peptide nucleic acid (PNA) oligomer arrays. *Nucleic Acids Res.* 25(14):2792-9 (1997).
- 35 Yap M, Weatherill J. Causes of blindness and partial sight in the Bradford Metropolitan District from 1980 to 1985. *Ophthalmic Physiol Opt* 9:289-292 (1989).
- Yuzawa M, Isomae T, Mori R, Shimada H, Utsunomiya I. Surgical excision versus laser photocoagulation for subfoveal choroidal neovascular membrane with age-related macular degeneration: comparison of visual outcomes. *Jpn J Ophthalmol.* 45(2):192-8 (2001).
- 40 Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101: 25-33(2000).

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Lynkeus Biotech GmbH
- <120> Medios y Métodos para la Modulación Específica de Genes Diana en el SNC y el Ojo y Métodos para Su Identificación
- 5 <130> LY01A04/P-WO
 - <150> EP02008761.5
 - <151> 2002-04-18
 - <150> US 60/431,173
 - <151> 2002-12-05
- 10 <160> 10
 - <170> PatentIn versión 3.1
 - <210> 1
 - <211> 2500
 - <212> ADN
- 15 <213> homo sapiens
 - <220>
 - <221> CDS
 - <222> (25)..(2097)
 - <223> Canal alfa 1 regulado por nucleótidos cíclicos de Homo sapiens
- 20 <400> 1

```
tatattactt aaacaaccaa agat atg aaa cta tcc atg aag aac aat att      51
                Met Lys Leu Ser Met Lys Asn Asn Ile
                1                5
```

```
atc aat aca cag cag tct ttt gta acc atg ccc aat gtg att gta cca      99
Ile Asn Thr Gln Gln Ser Phe Val Thr Met Pro Asn Val Ile Val Pro
10                15                20                25
```

gat att gaa aag gaa ata cga agg atg gaa aat gga gca tgc agc tcc Asp Ile Glu Lys Glu Ile Arg Arg Met Glu Asn Gly Ala Cys Ser Ser 30 35 40	147
ttt tct gag gat gat gac agt gcc tat aca tct gaa gaa tca gag aat Phe Ser Glu Asp Asp Asp Ser Ala Tyr Thr Ser Glu Glu Ser Glu Asn 45 50 55	195
gaa aac cct cat gca agg ggt tcc ttt agt tat aag tca ctc aga aag Glu Asn Pro His Ala Arg Gly Ser Phe Ser Tyr Lys Ser Leu Arg Lys 60 65 70	243
gga gga cca tca cag agg gag cag tac ctg cct ggt gcc att gcc att Gly Gly Pro Ser Gln Arg Glu Gln Tyr Leu Pro Gly Ala Ile Ala Ile 75 80 85	291
ttt aat gtg aac aac agc agc aat aag gac cag gaa cca gag gaa aaa Phe Asn Val Asn Asn Ser Ser Asn Lys Asp Gln Glu Pro Glu Glu Lys 90 95 100 105	339
aag aaa aag aaa aaa gaa aag aag agc aag tca gat gat aaa aac gaa Lys Lys Lys Lys Lys Glu Lys Lys Ser Lys Ser Asp Asp Lys Asn Glu 110 115 120	387
aat aaa aac gac cca gag aag aaa aag aag aaa aag gac aaa gag aag Asn Lys Asn Asp Pro Glu Lys Lys Lys Lys Lys Lys Asp Lys Glu Lys 125 130 135	435
aaa aag aaa gag gag aaa agc aaa gat aag aaa gaa cac cac aag aaa Lys Lys Lys Glu Glu Lys Ser Lys Asp Lys Lys Glu His His Lys Lys 140 145 150	483
gaa gtt gtg gtt att gat ccc tcg gga aac aca tat tac aac tgg ctg Glu Val Val Val Ile Asp Pro Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Trp Leu 155 160 165	531
ttt tgc atc aca tta cct gtt atg tac aac tgg aca atg gtt att gcc Phe Cys Ile Thr Leu Pro Val Met Tyr Asn Trp Thr Met Val Ile Ala 170 175 180 185	579
aga gca tgt ttt gat gaa ctt caa tct gat tac cta gaa tat tgg ctc Arg Ala Cys Phe Asp Glu Leu Gln Ser Asp Tyr Leu Glu Tyr Trp Leu 190 195 200	627
att ttg gat tac gta tca gac ata gtc tat tta atc gat atg ttt gta Ile Leu Asp Tyr Val Ser Asp Ile Val Tyr Leu Ile Asp Met Phe Val 205 210 215	675
cga aca agg aca ggt tac cta gaa caa gga ctg ctg gta aag gaa gaa Arg Thr Arg Thr Gly Tyr Leu Glu Gln Gly Leu Leu Val Lys Glu Glu 220 225 230	723
ctt aaa ctc ata aat aaa tat aaa tcc aac ttg caa ttt aaa ctt gat Leu Lys Leu Ile Asn Lys Tyr Lys Ser Asn Leu Gln Phe Lys Leu Asp 235 240 245	771
gtt ctg tca ctg ata cca act gat ttg ctg tat ttt aag tta ggg tgg Val Leu Ser Leu Ile Pro Thr Asp Leu Leu Tyr Phe Lys Leu Gly Trp 250 255 260 265	819
aac tat cca gaa att aga tta aac agg ttg tta cgg ttc tct cgt atg Asn Tyr Pro Glu Ile Arg Leu Asn Arg Leu Leu Arg Phe Ser Arg Met 270 275 280	867

ttt gag ttc ttc cag aga aca gaa aca agg aca aac tat cca aac atc	915
Phe Glu Phe Phe Gln Arg Thr Glu Thr Arg Thr Asn Tyr Pro Asn Ile	
285 290 295	
ttc agg att tcc aac ctt gtt atg tat atc gtc atc att atc cac tgg	963
Phe Arg Ile Ser Asn Leu Val Met Tyr Ile Val Ile Ile Ile His Trp	
300 305 310	
aat gca tgt gtg ttc tac tct att tct aaa gct att gga ttt gga aat	1011
Asn Ala Cys Val Phe Tyr Ser Ile Ser Lys Ala Ile Gly Phe Gly Asn	
315 320 325	
gat aca tgg gtc tac cct gat att aat gat cct gaa ttt ggc cgt ttg	1059
Asp Thr Trp Val Tyr Pro Asp Ile Asn Asp Pro Glu Phe Gly Arg Leu	
330 335 340 345	
gct aga aaa tac gta tac agc ctt tac tgg tct aca ctg act ttg act	1107
Ala Arg Lys Tyr Val Tyr Ser Leu Tyr Trp Ser Thr Leu Thr Leu Thr	
350 355 360	
acc att ggt gaa aca ccc cct ccc gtg agg gat tct gag tat gtc ttt	1155
Thr Ile Gly Glu Thr Pro Pro Pro Val Arg Asp Ser Glu Tyr Val Phe	
365 370 375	
gtg gtg gtt gat ttc cta att gga gtg tta att ttt gct acc atc gtt	1203
Val Val Val Asp Phe Leu Ile Gly Val Leu Ile Phe Ala Thr Ile Val	
380 385 390	
ggt aac ata ggt tct atg att tcc aac atg aat gca gcc aga gca gaa	1251
Gly Asn Ile Gly Ser Met Ile Ser Asn Met Asn Ala Ala Arg Ala Glu	
395 400 405	
ttt caa gca aga att gat gct atc aag caa tat atg cat ttt cga aat	1299
Phe Gln Ala Arg Ile Asp Ala Ile Lys Gln Tyr Met His Phe Arg Asn	
410 415 420 425	
gta agc aaa gat atg gaa aag agg gtt att aaa tgg ttt gac tac ctg	1347
Val Ser Lys Asp Met Glu Lys Arg Val Ile Lys Trp Phe Asp Tyr Leu	
430 435 440	
tgg acc aac aaa aaa aca gtt gat gag aaa gaa gtc tta aag tat cta	1395
Trp Thr Asn Lys Lys Thr Val Asp Glu Lys Glu Val Leu Lys Tyr Leu	
445 450 455	
cct gat aaa cta aga gca gaa att gcc atc aac gtt cac tta gac aca	1443
Pro Asp Lys Leu Arg Ala Glu Ile Ala Ile Asn Val His Leu Asp Thr	
460 465 470	
tta aaa aag gta cgc att ttt gct gat tgt gaa gct ggt ctg ttg gtg	1491
Leu Lys Lys Val Arg Ile Phe Ala Asp Cys Glu Ala Gly Leu Leu Val	
475 480 485	
gag ttg gtc ttg aaa ttg caa ccc caa gtc tac agt cct gga gat tat	1539
Glu Leu Val Leu Lys Leu Gln Pro Gln Val Tyr Ser Pro Gly Asp Tyr	
490 495 500 505	
att tgc aag aaa ggg gat atc gga cga gag atg tac att atc aag gaa	1587
Ile Cys Lys Lys Gly Asp Ile Gly Arg Glu Met Tyr Ile Ile Lys Glu	
510 515 520	
ggc aaa ctc gct gtg gtg gca gat gat gga gtc act cag ttt gtg gta	1635
Gly Lys Leu Ala Val Val Ala Asp Asp Gly Val Thr Gln Phe Val Val	

ES 2 397 060 T3

	525		530		535		
ttg agc gat ggc agc acc ttc ggt gag atc agc att ctt aac att aaa							1683
Leu Ser Asp Gly Ser Thr Phe Gly Glu Ile Ser Ile Leu Asn Ile Lys							
	540		545		550		
ggg agc aaa gct ggc aat cga aga acg gcc aat att aaa agt att ggc							1731
Gly Ser Lys Ala Gly Asn Arg Arg Thr Ala Asn Ile Lys Ser Ile Gly							
	555		560		565		
tac tca gac ctg ttc tgt ctc tca aaa gat gac ctc atg gaa gct cta							1779
Tyr Ser Asp Leu Phe Cys Leu Ser Lys Asp Asp Leu Met Glu Ala Leu							
	570		575		580		585
act gag tac cca gat gcc aaa act atg cta gaa gaa aaa ggg aag caa							1827
Thr Glu Tyr Pro Asp Ala Lys Thr Met Leu Glu Glu Lys Gly Lys Gln							
	590		595		600		
att tta atg aaa gat ggt cta ctg gat cta aac att gca aat gct ggc							1875
Ile Leu Met Lys Asp Gly Leu Leu Asp Leu Asn Ile Ala Asn Ala Gly							
	605		610		615		
agt gat cct aaa gat ctt gaa gag aag gtt act cga atg gag ggg tca							1923
Ser Asp Pro Lys Asp Leu Glu Glu Lys Val Thr Arg Met Glu Gly Ser							
	620		625		630		
gta gac ctc ctg caa acc agg ttt gcc cga atc ttg gct gag tat gag							1971
Val Asp Leu Leu Gln Thr Arg Phe Ala Arg Ile Leu Ala Glu Tyr Glu							
	635		640		645		
tcc atg cag cag aaa ctg aaa caa aga tta acc aag gtt gag aaa ttt							2019
Ser Met Gln Gln Lys Leu Lys Gln Arg Leu Thr Lys Val Glu Lys Phe							
	650		655		660		665
ctg aaa ccg ctt att gac aca gaa ttt tca agt att gag gga cct tgg							2067
Leu Lys Pro Leu Ile Asp Thr Glu Phe Ser Ser Ile Glu Gly Pro Trp							
	670		675		680		
agc gaa agt ggg ccc atc gac tct aca tag aaccgaaaag ctggtcatta							2117
Ser Glu Ser Gly Pro Ile Asp Ser Thr							
	685		690				
acagggacat gcctcatgat ccttttgatc ctatgactga catcaactaa aatttaaaag							2177
aagaggaaga ctgagttggg aaatthttcc atgaggaaaa tgtgctttgg tgcaaggtac							2237
agccacacacc tctctgagag atactatgat taaaaaagct ttatatctgg gattttcac							2297
aactgataat gtgcaaagat ataaactgat taacttgca gtgtctgtat tttctgattt							2357
tttcacatac gctcatttta tgtaatatc ttcataaaaa tgaataagta gccctcactt							2417
tcatgccatt tccattggtg agtgaagcgt atttgaagta actgagaatt accatgtaca							2477
tcatatttgg gataacattt tta							2500

<210> 2
 <211> 690
 <212> PRT
 5 <213> homo sapiens
 <400> 2

Met Lys Leu Ser Met Lys Asn Asn Ile Ile Asn Thr Gln Gln Ser Phe
1 5 10 15

Val Thr Met Pro Asn Val Ile Val Pro Asp Ile Glu Lys Glu Ile Arg
20 25 30

Arg Met Glu Asn Gly Ala Cys Ser Ser Phe Ser Glu Asp Asp Asp Ser
35 40 45

Ala Tyr Thr Ser Glu Glu Ser Glu Asn Glu Asn Pro His Ala Arg Gly
50 55 60

Ser Phe Ser Tyr Lys Ser Leu Arg Lys Gly Gly Pro Ser Gln Arg Glu
65 70 75 80

Gln Tyr Leu Pro Gly Ala Ile Ala Ile Phe Asn Val Asn Asn Ser Ser
85 90 95

Asn Lys Asp Gln Glu Pro Glu Glu Lys Lys Lys Lys Lys Lys Glu Lys
100 105 110

Lys Ser Lys Ser Asp Asp Lys Asn Glu Asn Lys Asn Asp Pro Glu Lys
115 120 125

Lys Lys Lys Lys Lys Asp Lys Glu Lys Lys Lys Lys Glu Glu Lys Ser
130 135 140

Lys Asp Lys Lys Glu His His Lys Lys Glu Val Val Val Ile Asp Pro
145 150 155 160

Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Trp Leu Phe Cys Ile Thr Leu Pro Val
165 170 175

Met Tyr Asn Trp Thr Met Val Ile Ala Arg Ala Cys Phe Asp Glu Leu
180 185 190

Gln Ser Asp Tyr Leu Glu Tyr Trp Leu Ile Leu Asp Tyr Val Ser Asp
195 200 205

Ile Val Tyr Leu Ile Asp Met Phe Val Arg Thr Arg Thr Gly Tyr Leu
210 215 220

Glu Gln Gly Leu Leu Val Lys Glu Glu Leu Lys Leu Ile Asn Lys Tyr

Ala Asp Cys Glu Ala Gly Leu Leu Val Glu Leu Val Leu Lys Leu Gln
 485 490 495

Pro Gln Val Tyr Ser Pro Gly Asp Tyr Ile Cys Lys Lys Gly Asp Ile
 500 505 510

Gly Arg Glu Met Tyr Ile Ile Lys Glu Gly Lys Leu Ala Val Val Ala
 515 520 525

Asp Asp Gly Val Thr Gln Phe Val Val Leu Ser Asp Gly Ser Thr Phe
 530 535 540

Gly Glu Ile Ser Ile Leu Asn Ile Lys Gly Ser Lys Ala Gly Asn Arg
 545 550 555 560

Arg Thr Ala Asn Ile Lys Ser Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Phe Cys Leu
 565 570 575

Ser Lys Asp Asp Leu Met Glu Ala Leu Thr Glu Tyr Pro Asp Ala Lys
 580 585 590

Thr Met Leu Glu Glu Lys Gly Lys Gln Ile Leu Met Lys Asp Gly Leu
 595 600 605

Leu Asp Leu Asn Ile Ala Asn Ala Gly Ser Asp Pro Lys Asp Leu Glu
 610 615 620

Glu Lys Val Thr Arg Met Glu Gly Ser Val Asp Leu Leu Gln Thr Arg
 625 630 635 640

Phe Ala Arg Ile Leu Ala Glu Tyr Glu Ser Met Gln Gln Lys Leu Lys
 645 650 655

Gln Arg Leu Thr Lys Val Glu Lys Phe Leu Lys Pro Leu Ile Asp Thr
 660 665 670

Glu Phe Ser Ser Ile Glu Gly Pro Trp Ser Glu Ser Gly Pro Ile Asp
 675 680 685

Ser Thr
 690

<210> 3
 <211> 3231
 <212> ADN
 <213> homo sapiens

5

<220>
 <221> CDS

<222> (22)..(2586)

<223> Fosfodiesterasa 6B de Homo sapiens, específica de cGMP, bastón, beta (ceguera nocturna estacionaria congénita 3, dominante autosómica)

<400> 3

ctccagggac aggcagccac c atg agc ctc agt gag gag cag gcc cgg agc	51
Met Ser Leu Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ser	
1 5 10	
ttt ctg gac cag aac ccc gat ttt gcc cgc cag tac ttt ggg aag aaa	99
Phe Leu Asp Gln Asn Pro Asp Phe Ala Arg Gln Tyr Phe Gly Lys Lys	
15 20 25	
ctg agc cct gag aat gtt ggc cgc ggc tgc gag gac ggg tgc ccg ccg	147
Leu Ser Pro Glu Asn Val Gly Arg Gly Cys Glu Asp Gly Cys Pro Pro	
30 35 40	
gac tgc gac agc ctc cgg gac ctc tgc cag gtg gag gag agc acg gcg	195
Asp Cys Asp Ser Leu Arg Asp Leu Cys Gln Val Glu Glu Ser Thr Ala	
45 50 55	
ctg ctg gag ctg gtg cag gat atg cag gag agc atc aac atg gag cgc	243
Leu Leu Glu Leu Val Gln Asp Met Gln Glu Ser Ile Asn Met Glu Arg	
60 65 70	
gtg gtc ttc aag gtc ctg cgg cgc ctc tgc acc ctc ctg cag gcc gac	291
Val Val Phe Lys Val Leu Arg Arg Leu Cys Thr Leu Leu Gln Ala Asp	
75 80 85 90	
cgc tgc agc ctc ttc atg tac cgc cag cgc aac ggc gtg gcc gag ctg	339
Arg Cys Ser Leu Phe Met Tyr Arg Gln Arg Asn Gly Val Ala Glu Leu	
95 100 105	
gcc acc agg ctt ttc agc gtg cag ccg gac agc gtc ctg gag gac tgc	387
Ala Thr Arg Leu Phe Ser Val Gln Pro Asp Ser Val Leu Glu Asp Cys	
110 115 120	
ctg gtg ccc ccc gac tcc gag atc gtc ttc cca ctg gac atc ggg gtc	435
Leu Val Pro Pro Asp Ser Glu Ile Val Phe Pro Leu Asp Ile Gly Val	
125 130 135	
gtg ggc cac gtg gct cag acc aaa aag atg gtg aac gtc gag gac gtg	483
Val Gly His Val Ala Gln Thr Lys Lys Met Val Asn Val Glu Asp Val	
140 145 150	
gcc gag tgc cct cac ttc agc tca ttt gct gac gag ctc act gac tac	531
Ala Glu Cys Pro His Phe Ser Ser Phe Ala Asp Glu Leu Thr Asp Tyr	
155 160 165 170	
aag aca aag aat atg ctg gcc aca ccc atc atg aat ggc aaa gac gtc	579
Lys Thr Lys Asn Met Leu Ala Thr Pro Ile Met Asn Gly Lys Asp Val	
175 180 185	

gtg gcg gtg atc atg gca gtg aac aag ctc aac ggc cca ttc ttc acc	627
Val Ala Val Ile Met Ala Val Asn Lys Leu Asn Gly Pro Phe Phe Thr	
190 195 200	
agc gaa gac gaa gat gtg ttc ttg aag tac ctg aat ttt gcc acg ttg	675
Ser Glu Asp Glu Asp Val Phe Leu Lys Tyr Leu Asn Phe Ala Thr Leu	
205 210 215	
tac ctg aag atc tat cac ctg agc tac ctc cac aac tgc gag acg cgc	723
Tyr Leu Lys Ile Tyr His Leu Ser Tyr Leu His Asn Cys Glu Thr Arg	
220 225 230	
cgc ggc cag gtg ctg ctg tgg tcg gcc aac aag gtg ttt gag gag ctg	771
Arg Gly Gln Val Leu Leu Trp Ser Ala Asn Lys Val Phe Glu Glu Leu	
235 240 245 250	
acg gac atc gag agg cag ttc cac aag gcc ttc tac acg gtg cgg gcc	819
Thr Asp Ile Glu Arg Gln Phe His Lys Ala Phe Tyr Thr Val Arg Ala	
255 260 265	
tac ctc aac tgc gag cgg tac tcc gtg ggc ctc ctg gac atg acc aag	867
Tyr Leu Asn Cys Glu Arg Tyr Ser Val Gly Leu Leu Asp Met Thr Lys	
270 275 280	
gag aag gaa ttt ttt gac gtg tgg tct gtg ctg atg gga gag tcc cag	915
Glu Lys Glu Phe Phe Asp Val Trp Ser Val Leu Met Gly Glu Ser Gln	
285 290 295	
ccg tac tcg ggc cca cgc acg cct gat ggc cgg gaa att gtc ttc tac	963
Pro Tyr Ser Gly Pro Arg Thr Pro Asp Gly Arg Glu Ile Val Phe Tyr	
300 305 310	
aaa gtg atc gac tac atc ctc cac ggc aag gag gag atc aag gtc att	1011
Lys Val Ile Asp Tyr Ile Leu His Gly Lys Glu Glu Ile Lys Val Ile	
315 320 325 330	
ccc aca ccc tca gcc gat cac tgg gcc ctg gcc agc ggc ctt cca agc	1059
Pro Thr Pro Ser Ala Asp His Trp Ala Leu Ala Ser Gly Leu Pro Ser	
335 340 345	
tac gtg gca gaa agc ggc ttt att tgt aac atc atg aat gct tcc gct	1107
Tyr Val Ala Glu Ser Gly Phe Ile Cys Asn Ile Met Asn Ala Ser Ala	
350 355 360	
gac gaa atg ttc aaa ttt cag gaa ggg gcc ctg gac gac tcc ggg tgg	1155
Asp Glu Met Phe Lys Phe Gln Glu Gly Ala Leu Asp Asp Ser Gly Trp	
365 370 375	
ctc atc aag aat gtg ctg tcc atg ccc atc gtc aac aag aag gag gag	1203
Leu Ile Lys Asn Val Leu Ser Met Pro Ile Val Asn Lys Lys Glu Glu	
380 385 390	
att gtg gga gtc gcc aca ttt tac aac agg aaa gac ggg aag ccc ttt	1251
Ile Val Gly Val Ala Thr Phe Tyr Asn Arg Lys Asp Gly Lys Pro Phe	
395 400 405 410	
gac gaa cag gac gag gtt ctc atg gag tcc ctg aca cag ttc ctg ggc	1299
Asp Glu Gln Asp Glu Val Leu Met Glu Ser Leu Thr Gln Phe Leu Gly	
415 420 425	
tgg tca gtg atg aac acc gac acc tac gac aag atg aac aag ctg gag	1347
Trp Ser Val Met Asn Thr Asp Thr Tyr Asp Lys Met Asn Lys Leu Glu	
430 435 440	

aac cgc aag gac atc gca cag gac atg gtc ctt tac cac gtg aag tgc Asn Arg Lys Asp Ile Ala Gln Asp Met Val Leu Tyr His Val Lys Cys 445 450 455	1395
gac agg gac gag atc cag ctc atc ctg cca acc aga gcg cgc ctg ggg Asp Arg Asp Glu Ile Gln Leu Ile Leu Pro Thr Arg Ala Arg Leu Gly 460 465 470	1443
aag gag cct gct gac tgc gat gag gac gag ctg ggc gaa atc ctg aag Lys Glu Pro Ala Asp Cys Asp Glu Asp Glu Leu Gly Glu Ile Leu Lys 475 480 485 490	1491
gag gag ctg cca ggg ccc acc aca ttt gac atc tac gaa ttc cac ttc Glu Glu Leu Pro Gly Pro Thr Thr Phe Asp Ile Tyr Glu Phe His Phe 495 500 505	1539
tct gac ctg gag tgc acc gaa ctg gac ctg gtc aaa tgt ggc atc cag Ser Asp Leu Glu Cys Thr Glu Leu Asp Leu Val Lys Cys Gly Ile Gln 510 515 520	1587
atg tac tac gag ctg ggc gtg gtc cga aag ttc cag atc ccc cag gag Met Tyr Tyr Glu Leu Gly Val Val Arg Lys Phe Gln Ile Pro Gln Glu 525 530 535	1635
gtc ctg gtg cgg ttc ctg ttc tcc atc agc aaa ggg tac cgg aga atc Val Leu Val Arg Phe Leu Phe Ser Ile Ser Lys Gly Tyr Arg Arg Ile 540 545 550	1683
acc tac cac aac tgg cgc cac ggc ttc aac gtg gcc cag acg atg ttc Thr Tyr His Asn Trp Arg His Gly Phe Asn Val Ala Gln Thr Met Phe 555 560 565 570	1731
acg ctg ctc atg acc ggc aaa ctg aag agc tac tac acg gac ctg gag Thr Leu Leu Met Thr Gly Lys Leu Lys Ser Tyr Tyr Thr Asp Leu Glu 575 580 585	1779
gcc ttc gcc atg gtg aca gcc ggc ctg tgc cat gac atc gac cac cgc Ala Phe Ala Met Val Thr Ala Gly Leu Cys His Asp Ile Asp His Arg 590 595 600	1827
ggc acc aac aac ctg tac cag atg aag tcc cag aac ccc ttg gct aag Gly Thr Asn Asn Leu Tyr Gln Met Lys Ser Gln Asn Pro Leu Ala Lys 605 610 615	1875
ctc cac ggc tcc tcg att ttg gag cgg cac cac ctg gag ttt ggg aag Leu His Gly Ser Ser Ile Leu Glu Arg His His Leu Glu Phe Gly Lys 620 625 630	1923
ttc ctg ctc tcg gag gag acc ctg aac atc tac cag aac ctg aac cgg Phe Leu Leu Ser Glu Glu Thr Leu Asn Ile Tyr Gln Asn Leu Asn Arg 635 640 645 650	1971
cgg cag cac gag cac gtg atc cac ctg atg gac atc gcc atc atc gcc Arg Gln His Glu His Val Ile His Leu Met Asp Ile Ala Ile Ile Ala 655 660 665	2019
acg gac ctg gcc ctg tac ttc aag aag aga gcg atg ttt cag aag atc Thr Asp Leu Ala Leu Tyr Phe Lys Lys Arg Ala Met Phe Gln Lys Ile 670 675 680	2067
gtg gat gag tcc aag aac tac cag gac aag aag agc tgg gtg gag tac Val Asp Glu Ser Lys Asn Tyr Gln Asp Lys Lys Ser Trp Val Glu Tyr 685 690 695	2115

ES 2 397 060 T3

<210> 4
 <211> 854
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

5 <400> 4

Met Ser Leu Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ser Phe Leu Asp Gln Asn Pro
 1 5 10 15

Asp Phe Ala Arg Gln Tyr Phe Gly Lys Lys Leu Ser Pro Glu Asn Val
 20 25 30

Gly Arg Gly Cys Glu Asp Gly Cys Pro Pro Asp Cys Asp Ser Leu Arg
 35 40 45

Asp Leu Cys Gln Val Glu Glu Ser Thr Ala Leu Leu Glu Leu Val Gln
 50 55 60

Asp Met Gln Glu Ser Ile Asn Met Glu Arg Val Val Phe Lys Val Leu
 65 70 75 80

Arg Arg Leu Cys Thr Leu Leu Gln Ala Asp Arg Cys Ser Leu Phe Met
 85 90 95

Tyr Arg Gln Arg Asn Gly Val Ala Glu Leu Ala Thr Arg Leu Phe Ser
 100 105 110

Val Gln Pro Asp Ser Val Leu Glu Asp Cys Leu Val Pro Pro Asp Ser
 115 120 125

Glu Ile Val Phe Pro Leu Asp Ile Gly Val Val Gly His Val Ala Gln
 130 135 140

Thr Lys Lys Met Val Asn Val Glu Asp Val Ala Glu Cys Pro His Phe
 145 150 155 160

Ser Ser Phe Ala Asp Glu Leu Thr Asp Tyr Lys Thr Lys Asn Met Leu
 165 170 175

Ala Thr Pro Ile Met Asn Gly Lys Asp Val Val Ala Val Ile Met Ala
 180 185 190

Val Asn Lys Leu Asn Gly Pro Phe Phe Thr Ser Glu Asp Glu Asp Val

195					200					205					
Phe	Leu	Lys	Tyr	Leu	Asn	Phe	Ala	Thr	Leu	Tyr	Leu	Lys	Ile	Tyr	His
210						215					220				
Leu	Ser	Tyr	Leu	His	Asn	Cys	Glu	Thr	Arg	Arg	Gly	Gln	Val	Leu	Leu
225					230					235					240
Trp	Ser	Ala	Asn	Lys	Val	Phe	Glu	Glu	Leu	Thr	Asp	Ile	Glu	Arg	Gln
				245					250					255	
Phe	His	Lys	Ala	Phe	Tyr	Thr	Val	Arg	Ala	Tyr	Leu	Asn	Cys	Glu	Arg
			260					265					270		
Tyr	Ser	Val	Gly	Leu	Leu	Asp	Met	Thr	Lys	Glu	Lys	Glu	Phe	Phe	Asp
		275					280					285			
Val	Trp	Ser	Val	Leu	Met	Gly	Glu	Ser	Gln	Pro	Tyr	Ser	Gly	Pro	Arg
	290					295					300				
Thr	Pro	Asp	Gly	Arg	Glu	Ile	Val	Phe	Tyr	Lys	Val	Ile	Asp	Tyr	Ile
305					310					315					320
Leu	His	Gly	Lys	Glu	Glu	Ile	Lys	Val	Ile	Pro	Thr	Pro	Ser	Ala	Asp
				325					330					335	
His	Trp	Ala	Leu	Ala	Ser	Gly	Leu	Pro	Ser	Tyr	Val	Ala	Glu	Ser	Gly
			340					345					350		
Phe	Ile	Cys	Asn	Ile	Met	Asn	Ala	Ser	Ala	Asp	Glu	Met	Phe	Lys	Phe
		355					360					365			
Gln	Glu	Gly	Ala	Leu	Asp	Asp	Ser	Gly	Trp	Leu	Ile	Lys	Asn	Val	Leu
	370					375					380				
Ser	Met	Pro	Ile	Val	Asn	Lys	Lys	Glu	Glu	Ile	Val	Gly	Val	Ala	Thr
385					390					395					400
Phe	Tyr	Asn	Arg	Lys	Asp	Gly	Lys	Pro	Phe	Asp	Glu	Gln	Asp	Glu	Val
				405					410					415	
Leu	Met	Glu	Ser	Leu	Thr	Gln	Phe	Leu	Gly	Trp	Ser	Val	Met	Asn	Thr
			420					425					430		
Asp	Thr	Tyr	Asp	Lys	Met	Asn	Lys	Leu	Glu	Asn	Arg	Lys	Asp	Ile	Ala
		435					440					445			

Gln Asp Met Val Leu Tyr His Val Lys Cys Asp Arg Asp Glu Ile Gln
 450 455 460

Leu Ile Leu Pro Thr Arg Ala Arg Leu Gly Lys Glu Pro Ala Asp Cys
 465 470 475 480

Asp Glu Asp Glu Leu Gly Glu Ile Leu Lys Glu Glu Leu Pro Gly Pro
 485 490 495

Thr Thr Phe Asp Ile Tyr Glu Phe His Phe Ser Asp Leu Glu Cys Thr
 500 505 510

Glu Leu Asp Leu Val Lys Cys Gly Ile Gln Met Tyr Tyr Glu Leu Gly
 515 520 525

Val Val Arg Lys Phe Gln Ile Pro Gln Glu Val Leu Val Arg Phe Leu
 530 535 540

Phe Ser Ile Ser Lys Gly Tyr Arg Arg Ile Thr Tyr His Asn Trp Arg
 545 550 555 560

His Gly Phe Asn Val Ala Gln Thr Met Phe Thr Leu Leu Met Thr Gly
 565 570 575

Lys Leu Lys Ser Tyr Tyr Thr Asp Leu Glu Ala Phe Ala Met Val Thr
 580 585 590

Ala Gly Leu Cys His Asp Ile Asp His Arg Gly Thr Asn Asn Leu Tyr
 595 600 605

Gln Met Lys Ser Gln Asn Pro Leu Ala Lys Leu His Gly Ser Ser Ile
 610 615 620

Leu Glu Arg His His Leu Glu Phe Gly Lys Phe Leu Leu Ser Glu Glu
 625 630 635 640

Thr Leu Asn Ile Tyr Gln Asn Leu Asn Arg Arg Gln His Glu His Val
 645 650 655

Ile His Leu Met Asp Ile Ala Ile Ile Ala Thr Asp Leu Ala Leu Tyr
 660 665 670

Phe Lys Lys Arg Ala Met Phe Gln Lys Ile Val Asp Glu Ser Lys Asn
 675 680 685

Tyr Gln Asp Lys Lys Ser Trp Val Glu Tyr Leu Ser Leu Glu Thr Thr
 690 695 700

Arg Lys Glu Ile Val Met Ala Met Met Met Thr Ala Cys Asp Leu Ser
705 710 715 720

Ala Ile Thr Lys Pro Trp Glu Val Gln Ser Lys Val Ala Leu Leu Val
725 730 735

Ala Ala Glu Phe Trp Glu Gln Gly Asp Leu Glu Arg Thr Val Leu Asp
740 745 750

Gln Gln Pro Ile Pro Met Met Asp Arg Asn Lys Ala Ala Glu Leu Pro
755 760 765

Lys Leu Gln Val Gly Phe Ile Asp Phe Val Cys Thr Phe Val Tyr Lys
770 775 780

Glu Phe Ser Arg Phe His Glu Glu Ile Leu Pro Met Phe Asp Arg Leu
785 790 795 800

Gln Asn Asn Arg Lys Glu Trp Lys Ala Leu Ala Asp Glu Tyr Glu Ala
805 810 815

Lys Val Lys Ala Leu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Glu Arg Val Ala Ala
820 825 830

Lys Lys Val Gly Thr Glu Ile Cys Asn Gly Gly Pro Ala Pro Lys Ser
835 840 845

Ser Thr Cys Cys Ile Leu
850

<210> 5

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<400> 5

gcaagctgac cctgaagttc a 21

<210> 6

<211> 19

10 <212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<400> 6

gcaagcugac ccugaaguu 19

<210> 7

15 <211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<400> 7

aacuucaggg ucagcuugc 19

<210> 8

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<400> 8

aattctccga acgtgtcacg t 21

<210> 9

<211> 21

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<400> 9

uucuccgaac gugucacgut t 21

<210> 10

15 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

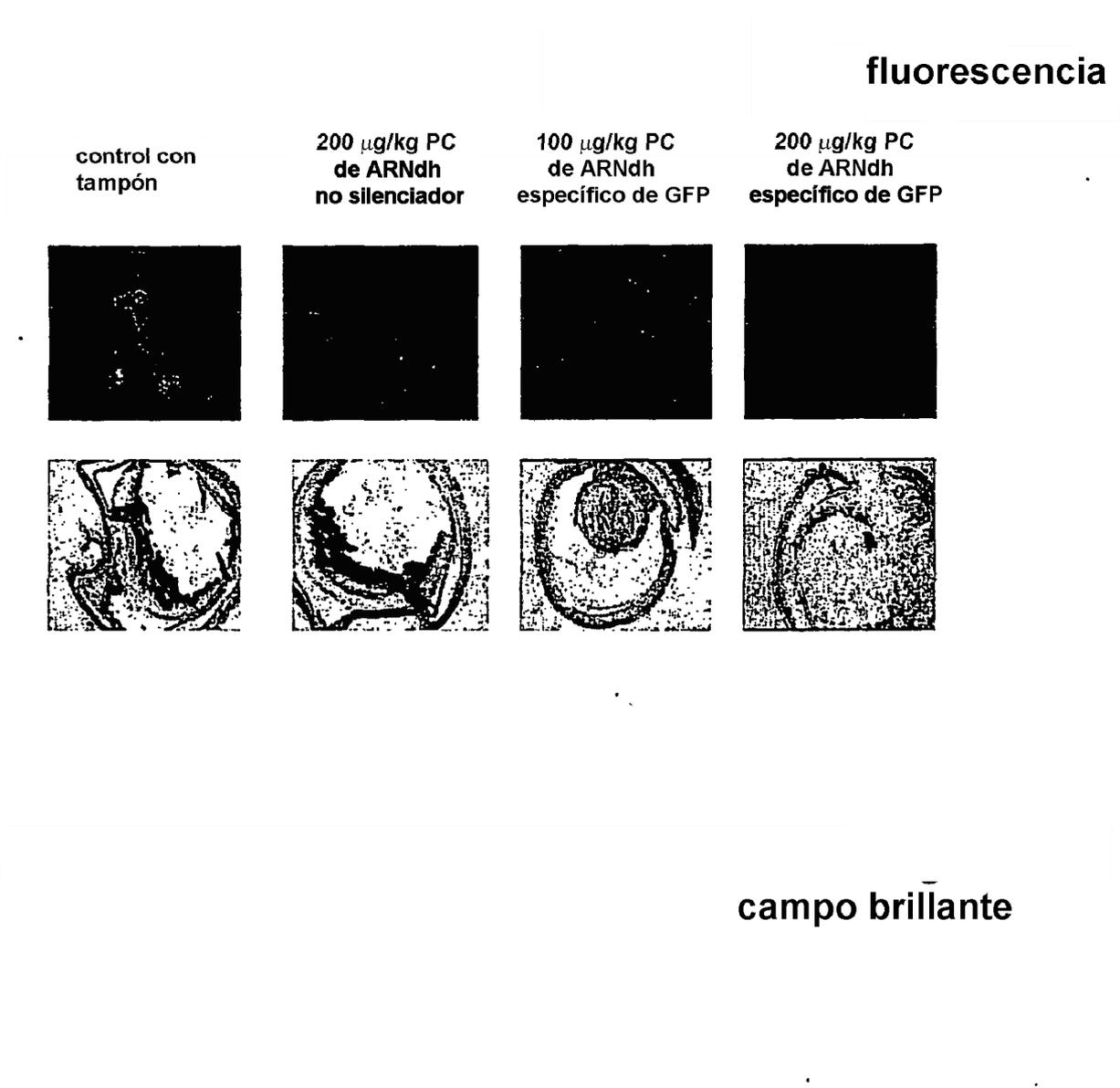
<400> 10

acgugacacg uucggagaat t 21

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de un oligorribonucleótido de doble hebra (ARNdh) de entre 21 y 23 nucleótidos de longitud que es capaz de inhibir la expresión de un gen implicado en un trastorno del ojo a través de la interferencia con ARN para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno del ojo mediante la aplicación fuera de la barrera hemato-retiniana mediante administración intravenosa, administración retrobulbar o administración de gotas oculares, en donde dicho trastorno está relacionado con el epitelio pigmentado retiniano (EPR), la retina neurosensorial y/o la coroidea.
- 10 2. El uso de la reivindicación 1, en donde el trastorno del ojo es uno o más de coriorretinitis, retinitis por herpes, desprendimiento de retina primario (ablatio retinae), retinoblastoma, astrocitoma retiniano (Bourneville-Pringle), angiomatosis retinae (Hippel-Lindau), enfermedad de Coat (retinitis exudativa), enfermedad de Eale, retinopatía serosa central, albinismo ocular, retinitis pigmentosa, retinitis punctata albescens, síndrome de Usher, amaurosis congénita de Leber, distrofia de conos, degeneración macular viteliforme (enfermedad de Best), retinosquiasis juvenil, distrofia macular de Carolina del Norte, distrofia del fundus de Sorsby, distrofia retiniana en panal de abeja de Doyne (Malattia Leventinese), enfermedad de Stargardt, degeneración vitreoretiniana de Wagner, degeneración macular asociada con la edad (DMAE), Morbus Best y/o Morbus Stargardt.
- 15 3. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el trastorno es la degeneración macular asociada con la edad húmeda (DMAE) o la retinopatía diabética.
4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la composición farmacéutica se diseña para que sea eficaz en el segmento interno del globo ocular.
- 20 5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la composición es una forma diseñada para ser aplicada en el exterior de la región retiniana de la barrera hemato-retiniana.
6. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la molécula de ARNdh contiene un grupo 3'-hidroxilo terminal.
- 25 7. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la composición está en una forma diseñada para ser introducida en las células o tejido del ojo por medio de un portador adecuado, caracterizado porque la aplicación se produce en el exterior de la barrera hemato-retiniana.
8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la composición se diseña para la aplicación retrobulbar o en forma de gotas oculares.
- 30 9. Una composición que comprende un oligorribonucleótido de doble hebra (ARNdh) de entre 21 y 23 nucleótidos de longitud que es capaz de inhibir la expresión de un gen implicado en un trastorno del ojo a través de la interferencia con ARN en una cantidad terapéuticamente eficaz, para su uso en el tratamiento de un trastorno del ojo mediante la aplicación fuera de la barrera hemato-retiniana mediante administración intravenosa, administración retrobulbar o administración de gotas oculares, en donde dicho trastorno está relacionado con el epitelio pigmentado retiniano (EPR), la retina neurosensorial y/o la coroidea.
- 35 10. La composición de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el trastorno del ojo se define en una cualquiera de las Reivindicaciones 2 a 3.
- 40 11. Una composición farmacéutica diseñada para ser aplicada fuera de barrera hemato-retiniana, para su uso en el tratamiento de un trastorno del ojo como se define en una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 mediante la aplicación fuera de la barrera hemato-retiniana mediante administración intravenosa, administración retrobulbar o administración de gotas oculares, que comprende uno o más oligorribonucleótidos de doble hebra (ARNdh) de entre 21 y 23 nucleótidos de longitud, que median una interferencia con ARN del ARNm correspondiente de una o más moléculas de ácido nucleico implicadas en el trastorno del ojo, y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable, en donde dicho trastorno está relacionado con el epitelio pigmentado retiniano (EPR), la retina neurosensorial y/o la coroidea.



campo brillante

Figura 1