

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 892**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

A61K 31/711 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2004 E 04707324 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 1591127**

54 Título: **Regeneración y neogénesis de célula visual de la retina con el gen Otx2**

30 Prioridad:

03.02.2003 JP 2003026353

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

12.11.2013

73 Titular/es:

**JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY
(100.0%)**

**1-8, Honcho 4-chome Kawaguchi-shi
Saitama 332-0012, JP**

72 Inventor/es:

FURUKAWA, TAKAHISA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 428 892 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

Regeneración y neogénesis de célula visual de la retina con el gen Otx2

Campo técnico

La presente invención se refiere al uso de un agente que comprende una proteína Otx2 o una sal de la misma, o a un ADN o un ARN que codifica para una proteína Otx2 para inducir la diferenciación ex vivo en células fotorreceptoras de la retina, al uso de una proteína Otx2, o una sal de la misma, o un ADN o un ARN que codifica para una proteína Otx2, para la preparación de un agente para la prevención/tratamiento/supresión de la progresión de una enfermedad de la retina seleccionada de entre el grupo que consiste en retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad, retinitis pigmentosa y degeneración macular, y al uso de un anticuerpo de una proteína Otx2, o una sal de la misma, o un ADN o un ARN que codifica para una proteína Otx2, o un polinucleótido antisentido que comprende una secuencia complementaria a una secuencia de nucleótidos de dicho ADN o ARN in vitro como un agente de diagnóstico para una enfermedad de la retina seleccionada de entre el grupo que consiste en retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad, retinitis pigmentosa y degeneración macular.

Antecedentes de la técnica

El documento WO 99/55838 A1 divulga procedimientos para la generación de células progenitoras de la retina que pueden ser usadas, de manera ventajosa, para un trasplante de retina en pacientes que sufren trastornos degenerativos de la retina. El documento WO 99/25721 A1 describe un gen CRX que codifica para una proteína activadora de la transcripción específica de la retina y procedimientos para la detección de una mutación en CRX, y para la prevención y el tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina, influenciadas por el gen CRX. El patrón de expresión de un gen Otx2 durante la diferenciación neural se describe en Journal of Neuroscience, vol 17, nº 11, 1997, páginas 4.243-4.252. Además de una expresión de Otx2 en diversas células durante la diferenciación neural, la expresión se encuentra también durante la regeneración en el caso de retina nueva (Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular and Integrative Physiology, vol 130A, nº 4, 2001, página 874 y Zoological Sciences, vol 18, nº Suppl, 2001, página 64). Además, se ha sugerido que la localización subcelular de la proteína Otx2 es específica del tipo celular y es regulada en el desarrollo (Molecular Brain Research, vol 78, no 1-2, 2000, páginas 26-37). Además, se ha informado de que la expresión de Otx2 altera el movimiento celular de progenitores epidérmicos para especificar un destino retiniano (Developmental Biology, nº 1, vol 240, 2001, páginas 77-91). Con relación a los patrones de expresión génica, se ha informado además de que la proteína Otx2 se une a un elemento de ADN necesario para la expresión del gen de la proteína de unión a interfotorreceptores retinoides (Mechanisms of Development, vol 82, no 1-2, 1999, páginas 165-169) y se ha sugerido también que regula los genes diana específicos del epitelio pigmentario de la retina (Biochemical and Biophysical Research Communications, vol 300, 2003, páginas 908-914).

Se ha descrito que una mutación del gen Otx2 conduce a anomalías de la retina (Development Growth and Differentiation, Nagoya, vol 43, nº Suppl, 2001, página S78) y malformación consistente y profunda del epitelio pigmentario de la retina y la retina neural (Development, vol 128, nº 11, 2001, páginas 2.019-2.030). Se ha informado además de que la falta de la función Otx2 altera las células del epitelio pigmentario de la retina y la se inhibe la formación de la estructura de la capa retiniana característica, incluyendo células ganglionares, amacrinas, bipolares y horizontales (Pigment Cell Research, Munksgaard International Publishers, Cambridge, MA, DK, vol 15, nº Supl 9, 2002, páginas 73-74).

Las células fotorreceptoras de la retina son sólo un fotosensor en un mamífero, y anteriormente han sido estudiadas intensamente, fisiológica, bioquímica, anatómica y clínicamente (JP-A-2002-325571). Sin embargo, el mecanismo de desarrollo y diferenciación en las células fotorreceptoras de la retina ha sido completamente desconocido. Como un locus causante de la degeneración genética de retina humana que es una enfermedad que resulta de anomalías de las células fotorreceptoras de la retina, se conocen al menos 145 loci, pero todavía no se ha presentado un procedimiento establecido de tratamiento de la enfermedad, y los pacientes sufren de graves trastornos de la visión. Por lo tanto, se desea dilucidar las causas y establecer un procedimiento terapéutico para la degeneración de la retina que conduce a una pérdida de la vista o un grave trastorno de la visión. Además, debido a que se observa degeneración o discrasia de las células fotorreceptoras de la retina en muchas enfermedades de la retina, no solo en la retinitis pigmentosa, sino también en retinopatía diabética y degeneración macular, es muy importante dilucidar el mecanismo molecular del desarrollo y la diferenciación de las células fotorreceptoras de la retina, con el fin de permitir la degeneración o la neogénesis de las células fotorreceptoras de la retina.

Divulgación de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones. Un objeto de la presente invención es el uso de una proteína Otx2, o una sal de la misma, o un ADN o un ARN que codifica para una proteína Otx2, para la preparación de un agente para la prevención, el tratamiento o la supresión de la progresión de una enfermedad de la retina seleccionada de entre el grupo que consiste en retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad, retinitis pigmentosa y

degeneración macular. Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la selección (o cribado) de un compuesto útil como medicamento. Un objeto adicional de la presente invención es el uso de un anticuerpo para una proteína Otx2, o una sal de la misma, o un ADN o un ARN que codifica para una proteína Otx2, o un polinucleótido antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos de dicho ADN o ARN in vitro como un agente de diagnóstico para una enfermedad de la retina seleccionada de entre el grupo que consiste en retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad, retinitis pigmentosa y degeneración macular, o un procedimiento in vitro para el diagnóstico de una enfermedad de la retina seleccionada de entre el grupo que consiste en retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad, retinitis pigmentosa y degeneración macular. Todavía otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento no terapéutico para inducir la diferenciación, o el uso de un agente que comprende una proteína Otx 2 o una sal de la misma, o un ADN o un ARN que codifica para una proteína Otx 2 para inducir la diferenciación en células fotorreceptoras de la retina ex vivo, que son adecuados para un trasplante en la retina de los pacientes que sufren de enfermedades de la retina.

Los presentes inventores han enfocado su atención sobre una proteína Otx2 que pertenece a la misma familia de genes que la familia de un factor de transcripción Crx que ha sido analizado previamente como una clave de la diferenciación en las células fotorreceptoras de la retina, y analizaron el papel de una proteína Otx2 en la determinación del destino de una célula fotorreceptora de la retina. Como resultado del análisis a un nivel de un cuerpo de ratón vivo, los presentes inventores han encontrado que una proteína Otx2 es muy importante en la determinación del destino de una célula fotorreceptora de la retina. Es decir, cuando se incorporó un gen Otx2 en un vector vírico para infectar una célula madre no diferenciada de retina de ratón con el vector recombinante, y para expresar una proteína Otx2 en una célula madre no diferenciada de retina de ratón, la mayoría de las células madre no diferenciadas de la retina se diferenciaron en células fotorreceptoras de la retina. En base a dicho descubrimiento, los presentes inventores han realizado estudios adicionales para completar la presente invención.

En la presente memoria se describen:

- (1) un agente para la prevención, el tratamiento o la supresión de la progresión de una enfermedad de la retina, que comprende una proteína Otx2 o su péptido parcial, o una sal de la misma,
- (2) el agente según el punto (1) anterior, en el que la proteína Otx2 es una proteína que comprende la misma secuencia de aminoácidos, o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos, que una secuencia de aminoácidos representada por las SECS ID N°: 1, SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 5, (3)
- (3) un agente para la prevención, el tratamiento o la supresión de la progresión de una enfermedad de la retina, que comprende un ADN o un ARN que codifica para una proteína Otx2 o su péptido parcial,
- (4) el agente según el punto (3) anterior, en el que el ADN comprende una secuencia de nucleótidos representada por las SECS ID N°: 2, SEC ID N°: 4 o SEC ID N°: 6, o una secuencia de nucleótidos que se hibrida con dicha secuencia bajo condiciones altamente rigurosas,
- (5) el agente según el punto (3) anterior, que comprende un vector recombinante que contiene un ADN o un ARN que codifica para una proteína Otx2 o su péptido parcial,
- (6) un agente para inducir la diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina, que comprende una proteína Otx2 o su péptido parcial, o una sal de la misma,
- (7) un agente para inducir la diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina, que comprende un ADN o un ARN que codifica para una proteína Otx2 o su péptido parcial,
- (8) un procedimiento para inducir la diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina, que comprende expresar una proteína Otx2, o aumentar una cantidad de expresión de una proteína Otx2,
- (9) el procedimiento para inducir la diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina según el punto (8) anterior, que comprende expresar una proteína Otx2, o aumentar una cantidad de expresión de una proteína Otx2 en una célula derivada de tejido del globo ocular, una célula madre embrionaria, una célula madre neural o una célula precursora neural, con la condición de que las células no sean células madre embrionarias humanas,
- (10) el procedimiento para inducir la diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina según el punto (8) anterior, en el que un ADN o un ARN que codifica para una proteína Otx2 o su péptido parcial es introducido en una célula derivada de tejido del globo ocular, una célula madre embrionaria, una célula madre neural o una célula precursora neural, y la célula resultante es cultivada, con la condición de que las células no sean células madre embrionarias humanas,
- (11) un procedimiento para la prevención, el tratamiento o la supresión de la progresión de una enfermedad de la

retina, que comprende administrar una cantidad eficaz de proteína Otx2 o su péptido parcial, o una sal de la misma a un mamífero,

- 5 (12) un procedimiento para la prevención, el tratamiento o la supresión de la progresión de una enfermedad de la retina, que comprende administrar una cantidad eficaz de un ADN o un ARN que codifica para una proteína Otx2 o su péptido parcial a un mamífero,
- (13) un procedimiento para la regeneración de la retina, que comprende el trasplante de una célula fotorreceptora de la retina o una célula precursora de la misma que es inducida a la diferenciación por una proteína Otx2, en la retina,
- 10 (14) uso de una proteína Otx2 o su péptido parcial, o una sal de la misma, para la preparación de un agente para la prevención, el tratamiento o la supresión de la progresión de una enfermedad de la retina,
- (15) uso de un ADN o un ARN que codifica para una proteína Otx2 o su péptido parcial para la preparación de un agente para la prevención, el tratamiento o la supresión de la progresión de una enfermedad de la retina.
- (16) un agente de diagnóstico para una enfermedad de la retina, que comprende un anticuerpo para una proteína Otx2 o su péptido parcial, o una sal de la misma,
- 15 (17) un procedimiento para el diagnóstico de una enfermedad de la retina, que comprende el uso de un anticuerpo para una proteína Otx2 o su péptido parcial, o una sal de la misma,
- (18) un procedimiento para el diagnóstico de una enfermedad de la retina, que comprende la detección de una cantidad de expresión o una mutación de una proteína Otx2 o su péptido parcial,
- 20 (19) un agente de diagnóstico para una enfermedad de la retina, que comprende (a) un ADN o un ARN que codifica para una proteína Otx2 o un péptido parcial, o (b) un polinucleótido antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria o sustancialmente complementaria a una secuencia de nucleótidos de dicho ADN o ARN,
- (20) un procedimiento para el diagnóstico de una enfermedad de la retina, que comprende el uso de (a) un ADN o un ARN que codifica para una proteína Otx2 o su péptido parcial, o (b) un polinucleótido antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria o sustancialmente complementaria a una secuencia de nucleótidos de dicho ADN o ARN,
- 25 (21) un procedimiento para la selección de un compuesto que tiene una acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina, o una sal de la misma, que comprende usar, como un índice, una expresión de, o un aumento en una cantidad de expresión de una proteína Otx2 o su péptido parcial,
- 30 (22) el procedimiento de selección según el punto (21) anterior, en el que se usa una célula que tiene la capacidad de expresar una proteína Otx2 o su péptido parcial,
- (23) un kit para la selección de un compuesto que tiene una acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina, o una sal de la misma, que comprende una célula que tiene la capacidad de expresar una proteína Otx2 o su péptido parcial,
- 35 (24) un compuesto que tiene una acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina, o una sal de la misma, que es obtenible usando un procedimiento de selección tal como se ha definido en los puntos (21) o (22) anteriores, o un kit de detección tal como se ha definido en el punto (23) anterior, y
- (25) un medicamento que comprende un compuesto tal como se ha definido en el punto (24) anterior o una sal del mismo.

40 Usando la proteína descrita en la presente memoria o el ADN descrito en la presente memoria, una célula derivada de tejido del globo ocular, una célula madre embrionaria, una célula madre neural o una célula precursora neural pueden diferenciarse en una célula fotorreceptora de la retina. Por lo tanto, mediante la regeneración o la producción de una célula fotorreceptora de la retina usando la proteína descrita en la presente memoria o el ADN descrito en la presente memoria, pueden prevenirse o tratarse enfermedades de la retina, tales como retinitis pigmentosa, degeneración macular senil, retinopatía diabética, desprendimiento de retina, glaucoma y oclusión de vasos retinianos, o puede suprimirse la progresión de dichas enfermedades. Además, debido a que las células fotorreceptoras de la retina experimentan anomalías estructurales o funcionales debido a una anomalía de un gen Otx2, el diagnóstico de dichas enfermedades de la retina puede ser realizado mediante la detección de una anomalía de un gen Otx2, o la degeneración o la reducción en la expresión de una proteína Otx2.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una vista que muestra la estructura de un vector de virus de control y un vector de virus Otx2. En la figura, AP representa un gen de fosfatasa alcalina derivado de placenta, y LTR representa un promotor de virus. Cuando el vector de virus Otx2 tiene una secuencia IRES entre Otx2 y AP, el vector permite la expresión simultánea de ambos genes (Otx2 y AP). La secuencia IRES es un gen derivado de virus.

La Fig. 2 es una vista que muestra un resumen de un ensayo de infección por virus. En la figura, "Retina" representa retina, "Epitelio pigmentario" representa el epitelio pigmentario de la retina, "virus" representa un rango infectado con un virus, "Eliminar Retina" representa la extracción de retina, "Fijar y teñir" representa la fijación y tinción del tejido, y "Seccionar y analizar el clon" representa una sección congelada y su análisis.

La Fig. 3 es una vista que muestra un ejemplo de una imagen de una sección de retina congelada después de la tinción con fosfatasa alcalina. En la figura, "Bi" representa una célula bipolar, "A" representa una célula amacrina, "R" representa una célula fotorreceptora de la retina, "M" representa una célula glial de Müller, "R+Bi" representa una célula fotorreceptora de la retina y una célula glial de Müller y "A+Bi" representa una célula amacrina y una célula bipolar.

La Fig. 4 es una vista que muestra una relación de existencia de cada una de las células diferenciadas a partir de una célula madre de la retina infectada con un vector de virus de control (LIA) o un vector de virus Otx2 (Otx2/LIA), con relación a un número total de células en un campo microscópico.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

Los ejemplos de proteínas Otx2 usadas en la presente invención incluyen una proteína que contiene la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que una secuencia de aminoácidos representada por las SECS ID N°: 1, 3 ó 5, como se define en las reivindicaciones. En la presente divulgación, las proteínas Otx2 no se limitan a una proteína Otx2 derivada de ser humano que tiene una secuencia de aminoácidos representada por las SECS ID N°: 1 ó 3, y una proteína Otx2 derivada de rata que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N° : 5, sino que puede tener una secuencia de aminoácidos derivada de otros animales, particularmente, un animal de sangre caliente (por ejemplo, cobaya, ratón, pollo, conejo, cerdo, oveja, vaca, mono, etc.), o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que dicha secuencia.

Entre otras cosas, es preferente que la actividad de transcripción, y la acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina sean equivalentes a las de una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos representada por las SECS ID N°: 1, 3 ó 5 (por ejemplo, aproximadamente de 0,01 a 100 veces, preferentemente, de aproximadamente 0,5 a 20 veces, más preferentemente, de aproximadamente 0,5 a 2 veces), y la extensión de dicha actividad o elementos cuantitativos, tales como el peso molecular de las proteínas, pueden ser diferentes. La medición de la acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina puede realizarse según el procedimiento conocido, por ejemplo, dicha acción puede ser medida según un procedimiento de selección descrito más adelante. La medición de la actividad de transcripción puede realizarse usando el procedimiento conocido, como el ensayo de indicador y RT-PCR.

Específicamente, como una proteína Otx2 usada en la presente invención, se usa una proteína que consiste en (a) una secuencia de aminoácidos en la que se suprime un aminoácido en una secuencia de aminoácidos representada por las SECS ID N°: 1, 3 ó 5, (b) una secuencia de aminoácidos en la que se añade un aminoácido a una secuencia de aminoácidos representada por las SECS ID N°: 1, 3 ó 5, o (c) una secuencia de aminoácidos en la que un aminoácido en una secuencia de aminoácidos representada por las SECS ID N°: 1, 3 ó 5 está sustituido con otro aminoácido. El aminoácido que se añade en (b), y el aminoácido que está sustituido en (c) pueden ser un aminoácido no natural diferente de los 20 tipos de aminoácidos codificados por un gen. La proteína descrita en (a) a (c) tiene una acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina.

En las proteínas Otx2 a las que se hace referencia en la presente invención, el extremo C-terminal puede ser uno cualquiera de entre un grupo carboxilo (-COOH), carboxilato (-COO⁻), amida (-CONH₂) y éster (-COOR). Aquí, como R en el grupo éster, se usan un grupo alquilo C₁₋₆, tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y n-butilo; un grupo cicloalquilo C₃₋₈, tal como ciclopentilo y ciclohexilo; un grupo arilo C₆₋₁₂, tal como fenilo y α-naftilo, y un grupo aralquilo C₇₋₁₄, tal como un grupo fenil-alquilo C₁₋₂ (por ejemplo, bencilo y fenetilo) y un grupo α-naftil-alquilo C₁₋₂ (por ejemplo, α-naftilmetilo); y, además, un grupo pivaloiloximetilo que se usa generalmente como un éster oral. Cuando la proteína Otx2 indicada en la presente invención tiene un grupo carboxilo (o carboxilato) en una posición distinta del C-terminal, la proteína en la que un grupo carboxilo está amidado o esterificado está incluida también en la proteína Otx2 a la que se hace referencia en la presente invención. En este caso, como el éster, por ejemplo, se usa el éster C-terminal indicado anteriormente. Además, la proteína Otx2 a la que se hace referencia en la presente invención incluye una proteína en la que el grupo amino del residuo metionina N-terminal está protegido con un grupo protector (por ejemplo, un grupo acilo C₁₋₆ tal como un grupo alcanilo C₂₋₆, incluyendo, por ejemplo, formilo y acetilo), una proteína en la que un grupo glutamilo producido por escisión en el extremo N-terminal en un cuerpo vivo es convertido en ácido

piroglutámico, una proteína en que un grupo sustituible (por ejemplo, -OH, -SH, grupo amino, grupo imidazol, grupo indol, grupo guanidina, etc.) en una cadena lateral de un aminoácido en la molécula está protegido con un grupo protector apropiado (por ejemplo, un grupo acilo C_{1-6} , tal como un grupo alcanóilo C_{2-6} , incluyendo, por ejemplo, grupo formilo y acetilo), y una denominada proteína conjugada, tal como la glicoproteína, a la que está unida una cadena de azúcar.

Como un péptido parcial de las proteínas Otx2 usadas en la presente invención (en adelante, en la presente memoria, abreviado como péptido parcial en algunos casos), puede usarse uno cualquiera siempre que sea un péptido parcial de la proteína Otx2. En relación al número de aminoácidos de dicho péptido parcial descrito en la presente memoria, un péptido que contiene una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente no menos de 20, preferentemente de aproximadamente no menos de 50 o, más preferentemente, de aproximadamente no menos de 100 aminoácidos entre una secuencia de aminoácidos constitucional de la proteína Otx2 es preferente.

En un péptido parcial descrito en la presente memoria, el extremo C-terminal puede ser uno cualquiera de entre un grupo carboxilo (-COOH), carboxilato (-COO-), amida (-CONH₂) y éster (-COOR). Además, el péptido parcial descrito en la presente memoria incluye, al igual que la proteína Otx2 a la que se hace referencia en la presente invención, un péptido parcial en el que el grupo amino del residuo de metionina en el extremo N-terminal está protegido con un grupo protector, un péptido parcial en el que Gln producido por escisión del lado N-terminal en un cuerpo vivo es convertido en ácido piroglutámico, un péptido parcial en el que un sustituyente en la cadena lateral de un aminoácido en la molécula está protegido con un grupo protector apropiado, y un péptido conjugado, tal como el denominado glicopéptido, al cual está unida una cadena de azúcar.

Los ejemplos de una sal de la proteína Otx2 a la que se hace referencia en la presente invención o un péptido parcial de la misma incluyen sales fisiológicamente aceptables con un ácido o una base. Entre otras cosas, las sales de adición de ácido fisiológicamente aceptables son preferentes. Los ejemplos de dichas sales incluyen sales con ácidos inorgánicos (ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico), o con ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido metanosulfónico, ácido benceno sulfónico).

La proteína Otx2 a la que se hace referencia en la presente invención o una sal de la misma puede prepararse a partir de una célula o un tejido de un animal, preferentemente, un animal de sangre caliente, más preferentemente, un ser humano o una rata, más preferentemente, un ser humano, de manera particularmente preferente, una neurona de cerebro humano, una célula epitelial pigmentaria de la retina ocular o una célula fotorreceptora de la retina, mediante el procedimiento conocido de purificación de una proteína, o puede ser preparada también mediante el cultivo de un transformante que contiene un ADN o un ARN que codifica para la proteína Otx2 a la que se hace referencia en la presente invención que se describe más adelante. De manera alternativa, dicha proteína puede ser preparada también de la misma manera o similar a un procedimiento de síntesis de proteínas que se describe más adelante. Cuando la proteína es preparada a partir de tejidos o células de animales, los tejidos o células animales se homogenizan, se extraen con un ácido y el extracto puede ser purificado y aislado combinando cromatografías, tales como la cromatografía de fase inversa y la cromatografía de intercambio iónico.

Para la síntesis de una proteína Otx2 a la que se hace referencia en la presente invención o un péptido parcial de la misma o una sal de la misma o una amida de la misma, puede usarse, normalmente, una resina de síntesis de proteínas disponible en el mercado. Los ejemplos de dicha resina incluyen una resina de clorometilo, una resina de hidroximetilo, una resina de benzhidrilamina, una resina de aminometilo, una resina de alcohol 4-benciloxibencilico, una resina de 4-metilbenzhidrilamina, una resina de PAM, una resina 4-hidroximetil metilfenilacetamido metilo, una resina de poli(acrilamida), una resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-hidroximetil)fenoxi y una resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminoetil)fenoxi. Usando dicha resina, aminoácidos en los que un grupo α -amino y un grupo funcional de cadena lateral están protegidos apropiadamente, son condensados en el orden de la secuencia de las proteínas deseadas en una resina por medio de los diversos procedimientos de condensación conocidos. Al final de la reacción, la proteína es escindida de la resina y, al mismo tiempo, se eliminan diversos grupos protectores y, además, se lleva a cabo una reacción de formación de enlace disulfuro intramolecular en una solución altamente diluida, para obtener, de esta manera, una proteína deseada o una amida de la misma. Con respecto a la condensación indicada anteriormente de los aminoácidos protegidos, pueden usarse diversos reactivos de activación que pueden ser usados en la síntesis de proteínas. Con respecto a un reactivo de activación, las carbodiimidas son particularmente preferentes. Como las carbodiimidas usadas, pueden citarse DCC, N,N'-diisopropilcarbodiimida, N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida. En la activación por medio de estos reactivos, el aminoácido protegido puede ser añadido a una resina después de realizar previamente la activación de un aminoácido protegido mediante la adición de un aminoácido protegido directamente a una resina junto con un aditivo de supresión de racemización (por ejemplo, HOBt, HOObt), o mediante la conversión de un aminoácido protegido en anhídrido de ácido simétrico o éster de HOBt o éster de HOObt.

Un disolvente usado en la activación de un aminoácido protegido o en la condensación con una resina, puede ser seleccionado apropiadamente de entre los disolventes que son conocidos por ser utilizables en una reacción de

condensación de proteínas. Dichos disolventes incluyen, por ejemplo, amidas de ácido, tales como N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida y N-metilpirrolidona; hidrocarburos halogenados, tales como cloruro de metileno, y cloroformo; alcoholes, tales como trifluoroetanol; sulfóxidos, tales como sulfóxido de dimetilo; éteres, tales como piridina, dioxano y tetrahidrofurano; nitrilos, tales como acetonitrilo y propionitrilo; ésteres, tales como acetato de metilo y acetato de etilo, y una mezcla apropiada de los mismos. La temperatura de reacción se selecciona apropiadamente de un intervalo que es conocido por ser utilizable en una formación de enlaces de proteína y, normalmente es seleccionada, de manera apropiada, de entre un intervalo comprendido entre -20°C y 50°C. Un derivado de aminoácido activado se usa, normalmente, en una cantidad en exceso de 1,5 a 4 veces. Cuando se encuentra que la condensación es insuficiente como resultado de un ensayo usando una reacción de ninhidrina, se puede conseguir una condensación suficiente mediante la repetición de una reacción de condensación sin la eliminación de los grupos protectores. Cuando no se consigue una condensación suficiente incluso después de reacciones repetidas, los aminoácidos que no han reaccionado pueden ser acetilados usando anhídrido acético o acetilimidazol.

Los ejemplos de grupos protectores usados para un grupo amino de un material crudo incluyen, por ejemplo, Z, Boc, t-pentiloxicarbonilo, isoborniloxicarbonilo, 4-metoxibenciloxicarbonilo, Cl-Z, Br-Z, adamantiloxicarbonilo, trifluoroacetilo, ftaloilo, formilo, 2-nitrofenilsulfenilo, difenilfosfinotioilo y Fmoc. Un grupo carboxilo puede ser protegido, por ejemplo, mediante esterificación de alquilo (por ejemplo, esterificación de alquilo lineal, ramificado o cíclico, tal como metilo, etilo, propilo, butilo, t-butilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo y ésteres de 2-adamantilo), esterificación de aralquilo (por ejemplo, éster de bencilo, éster de 4-nitrobencilo, éster de 4-metoxibencilo, éster de 4-clorobencilo, éster de benzhidrido), esterificación de fenacilo, formación de hidrazida de benciloxicarbonilo, formación de hidrazida de t-butoxicarbonilo o formación de hidrazida de tritilo. El grupo hidroxilo de la serina puede ser protegido, por ejemplo, mediante esterificación o eterificación. Como un grupo adecuado para esta esterificación, por ejemplo, se usan un grupo alcanilo inferior tal como un grupo acetilo, un grupo aroilo, tal como un grupo benzoilo, y un grupo derivado de ácido carbónico tal como un grupo benciloxicarbonilo y un grupo etoxicarbonilo. Además, un grupo adecuado para la eterificación es, por ejemplo, un grupo bencilo, un grupo tetrahidropiranoilo o un grupo t-butilo. Como un grupo protector para el grupo hidroxilo fenólico de tirosina, por ejemplo, se usan Bzl, Cl₂-Bz1, 2-nitrobencilo, Br-Z y t-butilo. Como un grupo protector para el imidazol de la histidina, por ejemplo, se usan Tos, 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo, DNP, benciloximetilo, Bum, Boc, Trt y Fmoc.

Como un grupo carboxilo activado de un material crudo, por ejemplo, se usan el correspondiente anhídrido de ácido, azida y éster activo [éster con alcohol (por ejemplo, pentaclorofenol, 2,4,5-triclorofenol, 2,4-dinitrofenol, alcohol cianometílico, p-nitrofenol, HONB, N-hidroxisuccinimida, N-hidroxitálumida, HOBt)]. Como un grupo amino activado de un material crudo, por ejemplo, se usa la correspondiente amida de ácido fosfórico. Como un procedimiento de eliminación (desprotección) de un grupo protector, se usan, por ejemplo, (a) reducción catalítica en una corriente de hidrógeno en presencia de un catalizador tal como Pd-negro o Pd-carbono, (b) tratamiento ácido con fluoruro de hidrógeno anhidro, ácido metanosulfónico, ácido trifluorometanosulfónico, ácido trifluoroacético o una solución mixta de los mismos, (c) tratamiento básico con diisopropiletilamina, trietilamina, piperidina, o piperazina, o (d) reducción con sodio en amoníaco líquido. La desprotección mediante el tratamiento ácido indicado anteriormente se realiza, generalmente, a una temperatura de aproximadamente -20°C a 40°C, pero en dicho tratamiento ácido, es eficaz añadir un captador de cationes, tal como anisol, fenol, tioanisol, m-cresol, p-cresol, sulfuro de dimetilo, 1,4-butanoditilo y 1,2-etanoditilo. El grupo 2,4-dinitrofenilo usado como un grupo protector para el imidazol de la histidina es eliminado mediante un tratamiento con tiofenol. El grupo formilo usado como grupo protector para el indol de triptófano puede ser eliminado también mediante un tratamiento alcalino con una solución diluida de hidróxido sódico, amoníaco diluido o similar, además de la desprotección mediante un tratamiento ácido en presencia de 1,2-etanoditilo o 1,4-butanoditilo.

La protección de los grupos funcionales, que no deberían verse implicados en la reacción de los materiales crudos, y sus grupos protectores, y la desprotección de dichos grupos protectores, y la activación de los grupos funcionales implicados en la reacción pueden seleccionarse apropiadamente de entre los grupos conocidos o los medios conocidos. Como un procedimiento alternativo de obtención de amidas de proteínas, por ejemplo, en primer lugar, un grupo α-carboxilo de aminoácido carboxilo terminal es protegido mediante amidación, una cadena peptídica (proteína) es extendida en el lado del grupo amino a una longitud de cadena deseada, se preparan una proteína en la que sólo se elimina un grupo protector para un grupo α-amino en el extremo N-terminal de la cadena peptídica, y una proteína en la que sólo se elimina un grupo protector para el grupo carboxilo en el extremo C-terminal, y estas dos proteínas se condensan en el disolvente mixto indicado anteriormente. Los detalles de la reacción de condensación son los mismos que los descritos anteriormente. Después de purificar la proteína protegida obtenida mediante condensación, todos los grupos protectores pueden ser eliminados mediante el procedimiento indicado anteriormente para obtener la proteína cruda deseada. Esta proteína cruda se purifica usando diversos medios de purificación conocidos, y las fracciones principales se liofilizan, para proporcionar una amida de proteína deseada. Para obtener una entidad éster de proteínas, un grupo α-carboxilo de los aminoácidos carboxilo terminales se condensa con un alcohol deseado para obtener un éster de aminoácido y, a continuación, puede obtenerse un éster deseado de proteínas de manera similar según el procedimiento de preparación de amidas de proteínas. Cuando una proteína obtenida mediante el procedimiento indicado anteriormente es un compuesto libre, esta puede ser convertida en una sal apropiada mediante

el procedimiento conocido y, por el contrario, cuando la proteína se obtiene como una sal, puede ser convertida en un compuesto libre mediante el procedimiento conocido.

Un péptido parcial o una sal de la proteína Otx2 a la que se hace referencia en la presente invención pueden prepararse según el procedimiento conocido de síntesis peptídica, o mediante escisión de la proteína Otx2 a la que se hace referencia en la presente invención con una peptidasa apropiada. Como un procedimiento de síntesis de un péptido, por ejemplo, puede usarse uno cualquiera de entre un procedimiento de síntesis en fase sólida y un procedimiento de síntesis en fase líquida. Es decir, puede prepararse un péptido deseado mediante condensación de un péptido parcial o un aminoácido que puede constituir la proteína Otx2 a la que se hace referencia en la presente invención, con una parte restante, y mediante la eliminación del grupo protector cuando el producto tiene un grupo protector. Los ejemplos del procedimiento de condensación y desprotección de grupos protectores conocidos incluyen los procedimientos descritos, por ejemplo, en los puntos (a) a (e) siguientes: (a) M. Bodanszky y M. A. Ondetti, *Peptide Synthesis*, Interscience Publishers, New York (1966), (b) Schroeder y Luebke, *The Peptide*, Academic Press, New York (1965), (c) Nobuo Izumiya et al., *Base and experiment of peptide synthesis*, Maruzen (1975), (d) Haruaki Yajima y Shunpei Sakakibara, *Biochemistry Experimental Course 1, Chemistry of Protein IV*, 205, (1977), y (e) *Development of Medicines*, vol.14, *Sequel, Peptide Synthesis*, supervisado por Haruaki Yajima, Hirokawashoten.

Además, después de la reacción, el péptido parcial descrito en la presente memoria puede ser purificado y aislado mediante un procedimiento de purificación convencional, por ejemplo, con una combinación de extracción de disolvente/destilación/cromatografía en columna/cromatografía líquida/recristalización. Cuando el péptido parcial obtenido mediante el procedimiento indicado anteriormente es un compuesto libre, este puede ser convertido en una sal apropiada mediante el procedimiento conocido y, por el contrario, cuando se obtiene como una sal, puede ser convertida en un compuesto libre mediante el procedimiento conocido.

Como un ADN que codifica para una proteína Otx2 usada en la presente invención, puede usarse uno cualquiera de entre un ADN genómico, una biblioteca de ADN genómico, un ADNc derivado de las células/los tejidos indicados anteriormente, una biblioteca de ADNc derivada de las células/los tejidos indicados anteriormente, y un ADN sintético. Un vector usado en una biblioteca puede ser uno cualquiera de entre un bacteriófago, un plásmido, un cósmido y un fagómido. Además, un ADN también puede ser amplificado directamente mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (en adelante, en la presente memoria, abreviado como procedimiento de RT-PCR) usando un ARN total o una fracción de ARNm preparada a partir de las células/los tejidos indicados anteriormente. Específicamente, los ejemplos de un ADN que codifica para una proteína Otx2 incluyen (a) un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos representada por las SECS ID N°: 2, 4 ó 6, y (b) un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que se hibrida con una secuencia de nucleótidos representada por las SECS ID N°: 2, 4 ó 6 bajo condiciones altamente estrictas, y que codifica para una proteína Otx2 que tiene sustancialmente la misma calidad de actividad (por ejemplo, actividad de transcripción, acción inductora de diferenciación a célula fotorreceptora de retina, etc.) que la de la proteína Otx2 a la que se hace referencia en la presente invención. Las SECS ID N°: 2 y 4 son un ADN que codifica para una proteína Otx2 humana (Kastury, K., et al., "Chromosome locations of human EMX and OTX genes", *Genomics* 22 (1), 41-45 (1994)) y la SEC ID N°: 6 es un ADN que codifica para una proteína Otx2 de ratón (Simeone, A., et al., "Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain", *Nature* 358 (6388), 687-690 (1992)). Como un ADN que puede hibridar con una secuencia de nucleótidos representada por las SECS ID N°: 2, 4 ó 6, por ejemplo, se usa un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene aproximadamente no menos del 70% de homología, preferentemente, aproximadamente no menos del 80% de homología, más preferentemente, aproximadamente no menos del 90% de homología, más preferentemente, aproximadamente no menos del 95% de homología, con una secuencia de nucleótidos representada por las SECS ID N°: 2, 4 ó 6. La hibridación puede realizarse según el procedimiento conocido o un procedimiento similar al mismo, por ejemplo, el procedimiento descrito en *Molecular cloning* 2nd J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989). Además, cuando se usa una biblioteca disponible comercialmente, la hibridación puede realizarse según el procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto a la misma. En la presente invención, la hibridación se realiza según condiciones altamente estrictas. Las condiciones altamente estrictas indican, por ejemplo, condiciones de una concentración de sodio de aproximadamente 19 a 40 mM, preferentemente, de aproximadamente 19 a 20 mM, y una temperatura de aproximadamente 50 a 70°C, preferentemente, de aproximadamente 60 a 65°C. En particular, las condiciones más preferentes son que la concentración de sodio sea de aproximadamente 19 mM y la temperatura sea de aproximadamente 65°C.

Como un ADN que codifica para un péptido parcial usado en la presente divulgación, puede usarse cualquier ADN que comprenda una secuencia de nucleótidos que codifica para el péptido parcial indicado anteriormente, descrito en la presente memoria. De manera alternativa, puede usarse uno cualquiera de entre un ADN genómico, una biblioteca de ADN genómico, un ADNc derivado de las células/los tejidos indicados anteriormente, una biblioteca de ADNc derivada de las células/los tejidos indicados anteriormente y un ADN sintético. Un vector usado en una biblioteca puede ser uno cualquiera de entre un bacteriófago, un plásmido, un cósmido y un fagómido. Además, un ADN puede ser amplificado directamente mediante una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (en adelante, en la presente memoria, abreviado como procedimiento RT-PCR) usando una fracción de ARNm preparada a partir de las células/los

tejidos indicados anteriormente. Específicamente, como un ADN que codifica para un péptido parcial de la presente divulgación, por ejemplo, dicho ADN a usar incluye, por ejemplo, (a) un ADN que contiene una secuencia parcial de nucleótidos de un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos representada por las SECS ID N°: 2, 4 ó 6, (b) un ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que se hibrida con un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos representada por las SECS ID N°: 2, 4 ó 6 bajo condiciones altamente estrictas, y que codifica para una proteína que tiene sustancialmente la misma calidad de actividad (por ejemplo, actividad de transcripción, acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina, etc.) que la de la proteína Otx2 a la que se hace referencia en la presente invención, y un ADN que contiene una secuencia de nucleótidos parcial de entre (a) o (b).

Aunque un ARN que codifica para una proteína Otx2 usada en la presente invención o su péptido parcial descrito también en la presente memoria no está particularmente limitado siempre que pueda expresar una proteína Otx2 o su péptido parcial mediante una transcriptasa, puede ser obtenido mediante los medios conocidos.

Como un medio para la clonación de un ADN que codifica completamente para una proteína Otx2 a la que se hace referencia en la presente invención o un péptido parcial de la misma (en adelante, en la presente memoria, abreviado como presente proteína en algunos casos), el ADN puede ser amplificado usando un cebador de ADN sintético que contiene una secuencia de nucleótidos parcial de una proteína a la que se hace referencia en la presente invención mediante un procedimiento de PCR, o puede ser seleccionado de entre un ADN incorporado en un vector apropiado, mediante hibridación usando un fragmento de ADN o un ADN sintético que codifica para una parte o una región entera de la presente proteína marcada. Puede realizarse un procedimiento de hibridación según el procedimiento descrito, por ejemplo, en Molecular Cloning 2^o J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Pulse, 1989. Además, cuando se usa una biblioteca disponible comercialmente, la hibridación puede realizarse según el procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto a la misma.

La sustitución de una secuencia de nucleótidos de un ADN puede realizarse usando PCR o el kit conocido, por ejemplo, MutanTM-SuperExpress Km (Takara Shuzo Co., LTD.), o MutanTM-K (Takara Shuzo Co., LTD.) mediante el procedimiento conocido, tal como el procedimiento AOD-LAPCR, el procedimiento de mutagénesis dirigida al sitio con muesca bicatenaria ("gapped dúplex") y el procedimiento de Kunkel, o un procedimiento similar a los mismos. El ADN clonado que codifica para una proteína a la que se hace referencia en la presente invención puede ser usado tal como es, dependiendo del propósito, o puede usarse, si se desea, mediante la digestión con una enzima de restricción o mediante la adición de un enlazador. El ADN tiene ATG como codón de iniciación de la traducción en el extremo 5', y tiene TAA, TGA o TAG como codón de terminación de la traducción en el extremo 3'. Este codón de iniciación de la traducción y este codón de terminación de la traducción pueden ser añadidos usando un adaptador de ADN sintético apropiado.

Un ADN o un ARN que codifica para la proteína a la que se hace referencia en la presente invención (en adelante, en la presente memoria, abreviado como presente ADN, en algunos casos) puede ser modificado en base a la estrategia siguiente, es decir, para estabilizar adicionalmente el presente ADN en una célula, para mejorar la permeabilidad celular del presente ADN, y para reducir la toxicidad del presente ADN, en su caso. Muchas modificaciones similares a estas son conocidas en la técnica, y se divulgan, por ejemplo, en J. Kawakami et al, Pharm Tech Japan, Vol.8, pp.247, 1992; Vol.8. pp.395, 1992; S. T. Crooke et al. ed. Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993. El presente ADN puede ser usado en una forma especial en la que el ADN está encapsulado en un liposoma o una microesfera. Además, otras sustancias distintas de una base pueden añadirse al presente ADN. Los ejemplos de otras sustancias que incluyen un azúcar, un ácido o una base; un compuesto polication tal como polilisina que actúa para neutralizar una carga de un núcleo de fosfato; y una sustancia hidrófoba, tal como lípido (por ejemplo fosfolípido, colesterol, etc.), que permite mejorar la interacción con una membrana celular, o aumentar la captación de ácidos nucleicos. Los ejemplos de lípidos preferentes a ser añadidos incluyen colesterol y un derivado del mismo (por ejemplo, cloroformiato de colesterol, ácido cólico, etc.). Otra sustancia descrita anteriormente puede ser fijada al extremo 5' o al extremo 3' de los ácidos nucleicos, y puede ser fijado a través de una base, un azúcar o un enlace nucleósido intramolecular. El presente ADN puede ser modificado químicamente en el extremo terminal. Los ejemplos de grupos para dicha modificación terminal incluyen un grupo para proteger los ácidos nucleicos dispuestos específicamente en el extremo 3' o en el extremo 5', lo que suprime la degradación debida a una nucleasa, tal como la exonucleasa, y RNasa. Los ejemplos de dichos grupos para la protección incluyen un grupo protector hidroxilo conocido en la técnica, incluyendo glicoles tales como polietilenglicol y tetraetilenglicol, aunque no se limitan a los mismos.

Como un vector recombinante que contiene un ADN o ARN que codifica para la proteína Otx2 usada en la presente invención o su péptido parcial descrito también en la presente memoria, un vector de expresión capaz de expresar una proteína Otx2 o su péptido parcial es preferente.

Un vector de expresión de la proteína a la que se hace referencia en la presente invención puede prepararse (i) escindiendo un fragmento de ADN que contiene un ADN que codifica para la presente proteína, por ejemplo, ADNc y (ii) ligando dicho fragmento de ADN en la dirección aguas abajo de un promotor en un vector de expresión apropiado.

Como el vector de expresión anterior, se usan plásmido derivado de Escherichia coli (por ejemplo, pCR4, pCR2.1,

pBR322, pBR325, pUC12, pUC13), plásmido derivado de *Bacillus subtilis* (por ejemplo, pUB110, pTP5, pC194), plásmido derivado de levadura (por ejemplo, pSH19, pSH15), bacteriófagos tales como el fago λ , virus tales como retrovirus, adenovirus, lentivirus, virus de vacuna, y baculovirus y, adicionalmente, PA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV y pcDNAI/Neo. Entre otras cosas, como un vector usado en la presente invención, un virus es preferente, y retrovirus, adenovirus y lentivirus son más preferentes.

Como el promotor descrito anteriormente, puede usarse cualquier promotor siempre que sea un promotor apropiado que corresponda a un huésped usado en la expresión del gen. Por ejemplo, cuando se usa una célula animal como huésped, los ejemplos de dichos promotores incluyen el promotor SR α , el promotor SV40, el promotor LTR, el promotor CMV y el promotor HSV-TK. Entre ellos, es preferente el uso del promotor LTR, el promotor CMV o el promotor SR α . Cuando un huésped es una bacteria del género *Escherichia*, son preferentes el promotor trp, el promotor lac, el promotor recA, el promotor λ P_L y el promotor lpp. Cuando un huésped es una bacteria del género *Bacillus*, son preferentes el promotor SPO1, el promotor SPO2 y el promotor penP. Cuando un huésped es una levadura, son preferentes el promotor PHO5, el promotor PGK, el promotor GAP y el promotor ADH. Cuando un huésped es una célula de insecto, son preferentes el promotor de polihedrina y el promotor P10.

Como un vector de expresión, pueden usarse vectores de expresión que contienen opcionalmente, además de los elementos anteriores, un potenciador, una señal de corte y empalme, una señal de adición de poli A, una estructura de protección, una señal de iniciación de síntesis de proteína, un marcador seleccionable, un marcador etiquetado y un origen de replicación de SV40.

Los ejemplos del marcador seleccionable incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (en adelante, en la presente memoria, abreviado como dhfr en algunos casos) [resistencia a metotrexato (MTX)], el gen resistente a la ampicilina (en adelante, en la presente memoria, abreviado como Amp^r en algunos casos), y el gen resistente a la neomicina (en adelante, en la presente memoria, abreviado como Neo^r en algunos casos, resistencia a G418). En particular, cuando se emplea un gen dhfr como marcador seleccionable usando células CHO de hámster chino con deficiencia del gen dhfr, puede seleccionarse un gen objetivo en un medio que no contiene timidina.

Como el marcador etiquetado, puede usarse, preferentemente, un gen de fosfatasa alcalina (en adelante, en la presente memoria, abreviado como AP en algunos casos), y el gen de la proteína fluorescente verde (GFP).

Además, una secuencia señal adecuada para un huésped puede ser añadida opcionalmente a un vector de expresión. Cuando un huésped es una bacteria del género *Escherichia*, pueden usarse una secuencia de señal PhoA y una secuencia de señal OmpA. Cuando un huésped es una bacteria del género *Bacillus*, pueden usarse una secuencia de señal α -amilasa y una secuencia de señal subtilisina. Cuando un huésped es una levadura, pueden usarse una secuencia de señal MF α y una secuencia de señal SUC2. Cuando un huésped es una célula animal, pueden usarse una secuencia de señal de insulina, una secuencia de señal de α -interferón y una secuencia de señal de molécula de anticuerpo.

Cuando un virus es usado como un vector, con el fin de mejorar el mecanismo de traducción, es preferente disponer una secuencia IRES (sitio interior de unión al ribosoma) como una señal de iniciación de síntesis de proteína.

Mediante la introducción en un huésped del vector de expresión construido de esta manera, que contiene un ADN que codifica para la proteína a la que se hace referencia en la presente invención, puede prepararse un transformante.

Como huésped, por ejemplo, se usan bacterias *Escherichia*, bacterias *Bacillus*, levaduras, células de insectos, insectos y células de animales. Como una realización de bacterias *Escherichia*, se usan *Escherichia coli* K12/DH1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.60, 160 (1968)), JM103 (Nucleic acids Research, vol. 9, 309 (1981)), JA221 (Journal of Molecular Biology vol. 120, 517 (1978)), HB101 (Journal of Molecular Biology, vol.41, 459 (1969)), C600 (Genetics, vol.39, 440 (1954)), DH5 α (Inoue, H., Nojima, H. y Okayama, H., Gene, 96, 23-28 (1990)), y DH10B (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.87, 4645-4649(1990)). Como bacterias *Bacillus*, por ejemplo, se usan *Bacillus subtilis* MI114 (Gene, vol.24, 255 (1983)) y 207-21 (Journal of Biochemistry, Vol 95, 87 (1984)). Como levadura, por ejemplo, se usan *Saccharomyces cerevisiae* AH22, AH22R-, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, *Schizosaccharomyces pombe* NCYC1913, NCYC2036 y *Pichia pastoris*.

Como una célula de insecto, por ejemplo, cuando un virus es AcNPV, se usan células establecidas derivadas de larva de gusano soldado (células de *Spodoptera frugiperda*, célula Sf), célula MG1 derivada de *Trichoplusia ni* del intestino medio, célula High FiveTM derivada de *Trichoplusia ni* de huevo, célula derivada de *Mamestrabrassicae* y célula derivada de *Estigmene acrea*. Cuando un virus es BmNPV, se usa una célula establecida derivada de gusano de seda (*Bombyx mori* N; célula BMN). Como dicha célula Sf, por ejemplo, se usan células Sf9 (ATCC CRL1711) y células Sf21 (Vaughn, J. L. et al, In Vivo, 13, 213-217, (1977)). Como un insecto, por ejemplo, se usan larvas de gusano de seda (Maeda et al., Nature, vol. 315, 592 (1985)). Como una célula animal, por ejemplo, se usan células de mono (COS-7, Vero, célula CHO de hámster chino (en adelante, en la presente memoria, abreviada como célula CHO), células CHO de hámster chino con deficiencia en el gen dhfr (en adelante, en la presente memoria, abreviada como célula CHO

(dhfr)), células L de ratón, células AtT-20 de ratón, células de mieloma de ratón, células GH3 de rata y células FL de ser humano.

Para transformar las bacterias *Escherichia*, la transformación puede ser formada previamente según el procedimiento descrito, por ejemplo, en Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 69, 2110 (1972) o Gene, vol. 17, 107 (1982). Con el fin de transformar las bacterias *Bacillus*, la transformación puede ser realizada según el procedimiento descrito, por ejemplo, en Molecular & General Genetics, vol. 168, 111 (1979). Con el fin de transformar la levadura, la transformación puede ser realizada previamente según el procedimiento descrito, por ejemplo, en Methods in Enzymology, vol. 194, 182-187 (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 75, 1929 (1978). Con el fin de transformar las células de insectos o insectos, la transformación puede ser realizada según el procedimiento descrito, por ejemplo, en Bio/Technology, vol. 6, 47-55(1988). Con el fin de transformar las células animales, la transformación puede ser formada previamente según el procedimiento descrito, por ejemplo, en Cell Technology volumen separado 8 New Cell Technology Experimental Protocol, 263-267 (1995) (publicado por Shujunsha), Virology, vol.52, 456 (1973). De esta manera, se obtiene un transformante transformado con un vector de expresión que contiene un ADN que codifica para una proteína a la que se hace referencia en la presente invención. Cuando se cultiva un transformante cuyo huésped es una bacteria *Escherichia* o una bacteria *Bacillus*, un medio líquido es adecuado para un medio de cultivo, y una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una sustancia inorgánica y otros aditivos necesarios para hacer crecer un transformante están contenidos en el mismo. Los ejemplos de la fuente de carbono incluyen glucosa, dextrina, almidón soluble y sacarosa, los ejemplos de la fuente de nitrógeno incluyen sustancias inorgánicas u orgánicas tales como sales de amonio, sales de nitrato, licor de maíz fermentado, peptona, caseína, extracto de carne, harina de soja y extracto de patata, y los ejemplos de sustancias inorgánicas incluyen cloruro de calcio, dihidrógeno fosfato de sodio y cloruro de magnesio. Además, pueden añadirse extracto de levadura, vitaminas y factor promotor del crecimiento. es de Idealmente, el pH del medio aproximadamente 5 a 8.

Como un medio en el que cultivar las bacterias *Escherichia*, por ejemplo, es preferente el medio M9 que contiene glucosa y ácido casamino (Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1972). Aquí, con el fin de hacer que un promotor actúe eficazmente, por ejemplo, puede añadirse un fármaco tal como ácido 3 β -indolilacrílico, si es necesario. Cuando un huésped es una bacteria *Escherichia*, el cultivo se realiza, normalmente, aproximadamente a entre 15°C y 43°C durante aproximadamente 3 a 24 horas y, si es necesario, puede realizarse una aireación o agitación. Cuando un huésped es una bacteria *Bacillus*, el cultivo se realiza, normalmente, aproximadamente a entre 30 y 40°C durante 6 a 24 horas y, si es necesario, puede realizarse una aireación o agitación. Cuando se cultiva un transformante cuyo huésped es una levadura, los ejemplos de un medio incluyen medio mínimo de Burkholder (Bostian, K. L. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.77, 4505 (1980)), y un medio SD que contiene el 0,5% de ácido casamino (Bitter, G.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 81, 5330 (1984)). Es preferente ajustar el pH del medio a aproximadamente entre 5 y 8. El cultivo se realiza normalmente a entre 20°C y 35°C durante aproximadamente 24 a 72 horas y, si es necesario, puede realizarse opcionalmente una aireación o agitación.

Cuando se cultiva un transformante cuyo huésped es una célula de insecto o un insecto, se usa, como medio, un medio en el que se añade apropiadamente un aditivo tal como suero bovino inmovilizado al 10% a un medio de insecto de Grace (Grace T. C. C. , Nature, vol.195, 788 (1962)). Es preferente ajustar el pH del medio a entre aproximadamente 6,2 y 6,4. El cultivo se realiza, normalmente, a aproximadamente 27°C durante aproximadamente 3 a 5 días y, si es necesario, puede realizarse opcionalmente una aireación o agitación. Cuando se cultiva un transformante cuyo huésped es una célula animal, se usan como medio, por ejemplo, medio MEM que contiene entre aproximadamente 5 y 20% de suero bovino fetal (Science, vol.122, 501 (1952)), medio DMEM (Virology, vol.8, 396 (1959)), medio RPMI 1640 (The Journal of the American Medical Association, vol. 199, 519 (1967)) y medio 199 (Proceeding of the Society for the Biological Medicine, vol.73, 1 (1950)). Es preferente que el pH sea de entre aproximadamente 6 y 8. El cultivo se realiza, generalmente, a entre 30°C y 40°C durante aproximadamente 15 a 60 horas y, si es necesario, puede realizarse una aireación o agitación. Como se ha descrito anteriormente, la proteína a la que se hace referencia en la presente invención puede ser producida en una célula, en una membrana celular o fuera de una célula de un transformante.

Con el fin de separar y purificar la proteína a la que se hace referencia en la presente invención a partir del caldo de cultivo, por ejemplo, pueden realizarse una separación y una purificación mediante el procedimiento siguiente. Cuando la proteína a la que se hace referencia en la presente invención es extraída desde células bacterianas cultivadas o células, se emplea apropiadamente un procedimiento de recogida de células bacterianas o células mediante el procedimiento conocido después del cultivo, suspendiendo estas células en un tampón apropiado, rompiendo las células en suspensión mediante ultrasonidos, lisozima y/o congelación/fusión, y obteniendo el extracto crudo de la proteína mediante centrifugación o filtración, y procedimientos similares. Un agente de degeneración de proteínas, tal como urea y clorhidrato de guanidina, o un tensioactivo tal como Triton X-100TM puede estar contenido en un tampón. Cuando una proteína es secretada en una solución de cultivo, después de la finalización del cultivo, las células o células bacterianas y el sobrenadante de cultivo se separan mediante el procedimiento conocido, y se recoge el sobrenadante del cultivo. La purificación de una proteína contenida en el extracto resultante o el sobrenadante del

cultivo puede ser realizada mediante una combinación apropiada con los procedimientos de separación/purificación conocidos. Como el procedimiento de separación o de purificación conocido, se usa un procedimiento que hace uso de la solubilidad, tal como precipitación por incremento de fuerza iónica y procedimiento de precipitación de disolvente, un procedimiento que hace uso principalmente de las diferencias en un peso molecular de un procedimiento de diálisis, un procedimiento de ultrafiltración, un procedimiento de filtración en gel y un procedimiento de electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, un procedimiento que hace uso de diferencias en la carga, tal como cromatografía de intercambio iónico, un procedimiento que hace uso de la afinidad específica tal como cromatografía de afinidad; un procedimiento que hace uso de las diferencias en hidrofobicidad tal como cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa; un procedimiento que hace uso de las diferencias en el punto isoelectrico tal como el procedimiento de electroforesis de punto isoelectrico.

Cuando la proteína obtenida de esta manera es producida como una forma libre, puede ser convertida en una sal mediante el procedimiento conocido o un procedimiento similar y, por el contrario, cuando la proteína se obtiene como una sal, puede ser convertida en una forma libre u otra sal mediante el procedimiento conocido o un procedimiento similar. Mediante la actuación de una enzima modificadora de proteínas apropiada sobre una proteína producida por un transformante antes de la purificación y después de la purificación, puede realizarse una modificación arbitraria, o puede eliminarse parcialmente un polipéptido. Como una enzima modificadora de proteínas, se usan tripsina, quimotripsina, arginil endopeptidasa, proteína quinasa y glicosidasa.

Mediante la expresión de una proteína Otx2, o mediante el aumento de una cantidad de expresión de una proteína Otx2, puede inducirse la diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina. Específicamente, por ejemplo, en una célula derivada de tejido de globo ocular, una célula madre embrionaria, una célula madre neural o una célula precursora neural, siempre que las células no sean células madre embrionarias humanas, las células indicadas anteriormente pueden ser inducidas a diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina mediante la expresión de una proteína Otx2, o mediante el aumento de una cantidad de expresión de una proteína Otx2. Por esta razón, (a) una proteína Otx2 o su péptido parcial, o una sal de la misma, o (b) un ADN o un ARN que codifica para una proteína Otx2 o su péptido parcial pueden ser usados como un agente para inducir la diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina.

La "inducción de la diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina" puede producirse in vivo o ex vivo. Es decir, un agente para inducir la diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina al que se hace referencia en la presente invención puede ser administrado a un cuerpo vivo para inducir la diferenciación in vivo en una célula fotorreceptora de la retina. De manera alternativa, un agente para inducir la diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina al que se hace referencia en la presente invención puede ser aplicado ex vivo, por ejemplo, a una célula derivada de tejido de globo ocular, una célula madre embrionaria, una célula madre neural o una célula precursora neural, siempre que las células no sean células madre embrionarias humanas, y las células indicadas anteriormente pueden ser inducidas a la diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina. Más específicamente, un ADN al que se hace referencia en la presente invención es introducido en una célula derivada de tejido de globo ocular, una célula madre embrionaria, una célula madre neural, una célula precursora neural, siempre que las células no sean células madre embrionarias humanas, y la célula resultante es cultivada, de manera que se induce la diferenciación de la célula en una célula fotorreceptora de la retina. Tras la introducción del presente ADN, puede introducirse otro gen de manera conjunta. Los ejemplos de otro gen incluyen un gen homeobox específico de la retina. Los ejemplos de un gen homeobox específico de retina incluyen un gen que tiene un patrón de expresión específico en la región del ojo, y regula la formación de patrones específicos de región, y un gen implicado en la expresión de un carácter diferenciado en un proceso de desarrollo. Los ejemplos específicos incluyen Crx, Chx10, Pax6 y Rax.

Los ejemplos preferentes del "tejido del globo ocular" incluyen tejido de la capa interna de la copa óptica. Dicho tejido puede ser derivado de un adulto, o puede ser derivado de un individuo en una etapa embrionaria. Los ejemplos de la "célula derivada de tejido de globo ocular" incluyen una retina neural fetal, una célula del cuerpo ciliar tal como una célula del epitelio pigmentario del cuerpo ciliar o una célula del epitelio pigmentario de la retina, una célula epitelial del cuerpo ciliar y una célula del iris, siempre que las células no sean células madre embrionarias humanas.

La célula derivada de tejido de globo ocular puede ser recogida, por ejemplo, tratando un tejido aislado por medio de un medio apropiado con Dispasa o EDTA, tratando posteriormente el tejido con tripsina para separar una célula individual, cultivando adicionalmente las células en un medio apropiado a confluencia, y sometiendo la célula obtenida a un tratamiento con tripsina y colagenasa. En la presente memoria, cuando se realiza el cultivo para la recogida de las células, es posible usar medios tales como un medio que contiene factor de crecimiento de fibroblastos básico, un medio que contiene factor de crecimiento de células epiteliales y un medio que contiene ILF (factor inhibidor de migración de leucocitos). Los ejemplos del medio que contiene factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) incluyen un medio libre de suero que contiene bFGF, más específicamente, DMEM/F12 que contiene suplementos de N_2 . El contenido del bFGF en dicho medio no es menor de aproximadamente 10 ng/ml, preferentemente, no es menor de aproximadamente 20 ng/ml, más preferentemente, no es menor de aproximadamente 40 ng/ml. Los ejemplos de suplementos de N_2 incluyen aproximadamente 5 μ g/ml de insulina, aproximadamente 100 μ g/ml de transferrina,

aproximadamente 20 nM de progesterona, aproximadamente 100 μ M de células de cultivo en un medio apropiado a confluencia, y aproximadamente 30 nM de selenato de sodio. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, la concentración de oxígeno y la concentración de dióxido de carbono pueden ser ajustadas apropiadamente, dependiendo de las células.

- 5 Una célula madre neural o una célula precursora neural pueden ser derivadas a partir de una célula derivada de tejido del globo ocular, o una célula madre embrionaria o pueden ser derivadas a partir de otra célula o tejido, siempre que las células no sean células madre embrionarias humanas. Los ejemplos específicos incluyen una célula madre neural derivada de retina fetal, una célula madre de retina de adulto derivada del cuerpo ciliar, una célula madre de la retina derivada del iris, una célula madre neural derivada del cerebro, una célula precursora de la retina y una célula precursora neural derivada del iris, siempre que las células no sea células madre embrionarias humanas.

- 10 Un procedimiento para inducir una célula madre neural o una célula precursora neural a partir de una célula derivada de tejido de globo ocular o una célula madre embrionaria u otra célula o tejido puede realizarse según el procedimiento conocido. Por ejemplo, los ejemplos de un procedimiento para inducir una célula madre neural o una célula precursora neural a partir de una célula madre embrionaria incluyen el procedimiento descrito, por ejemplo, en la referencia de Kawasaki, Sasai et al. (Kawasaki, H., Y. Sasai, Neuron, 2000 Oct; 28 (1):31-40). En cuanto a las condiciones para el cultivo y el mantenimiento de una célula madre embrionaria, por ejemplo, puede hacerse referencia a "Molecular Biology Protocol". La célula madre neural o la célula precursora neural se obtiene como una esfera neural que contiene esta en algunos casos, pero en la presente invención, dicha esfera neural puede ser sometida al procedimiento siguiente.

- 20 Un procedimiento de introducción del ADN al que se hace referencia en la presente invención y otro gen opcional en una célula derivada de tejido de globo ocular, una célula madre embrionaria, una célula madre neural o una célula precursora neural, preferentemente, la célula madre neural o la célula precursora neural, no está particularmente limitado, siempre que las células no sean células madre embrionarias humanas, pero puede usarse el procedimiento conocido, y los ejemplos de dicho procedimiento incluyen un procedimiento para la introducción de un gen con el uso de un vector de adenovirus, un procedimiento de introducción de un gen con el uso de un vector de retrovirus, un procedimiento de introducción de un gen con el uso de un virus adeno-asociado, lipofección y electroporación. Desde un punto de vista de la eficiencia de la introducción, preferentemente, un procedimiento de introducción de un gen con el uso de un vector de adenovirus y un procedimiento de introducción de un gen con el uso de un vector de retrovirus son deseables.

- 30 Una célula con un gen introducido en la misma es cultivada bajo condiciones inductoras de diferenciación adecuadas para la diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina. Debido a que la condición inductora de la diferenciación es diferente dependiendo de un tipo de una célula con un gen introducido en la misma, la condición no puede ser establecida de manera primaria y puede ser seleccionada apropiadamente. Por ejemplo, los ejemplos de las condiciones inductoras de la diferenciación incluyen un cultivo en presencia de ácido retinoico y suero. Aquí, los ejemplos de un medio que puede ser usado en el cultivo incluyen el medio DMEM/F12 indicado anteriormente que contiene suplementos de N_2 . Es deseable que una cantidad del ácido retinoico a usar no sea menor de aproximadamente 0,1 μ M, preferentemente no menor de aproximadamente 0,5 μ M, y no mayor de aproximadamente 10 μ M, preferentemente, no mayor de aproximadamente 5 μ M. Además, es deseable que una cantidad del suero a usar sea de aproximadamente el 1% en la inducción de diferenciación. Además, las condiciones tales como la temperatura, la concentración de oxígeno durante el cultivo y la concentración de dióxido de carbono pueden establecerse apropiadamente dependiendo de una célula con un gen introducido en la misma.

- 40 Una célula fotorreceptora de la retina obtenida mediante el procedimiento de inducción de diferenciación indicado anteriormente de la presente invención puede ser aplicado como un trasplante de células para un paciente con una enfermedad degenerativa de la retina, tal como retinitis pigmentosa, degeneración macular senil, desprendimiento de retina, glaucoma y oclusión de vasos retinianos. El trasplante de células puede ser no sólo una célula que ha sido completamente diferenciada en una célula fotorreceptora de la retina, sino también una célula precursora antes de la diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina.

- 45 Una proteína Otx2 o su péptido parcial, o una sal de la misma o un ADN o un ARN que codifica para una proteína Otx2 o su péptido parcial de la misma pueden ser usados como un medicamento, tal como un agente para la prevención, el tratamiento o la supresión de la progresión de enfermedades de la retina. Los ejemplos de las "enfermedades de la retina" incluyen trastornos de los vasos de la retina y lesiones inflamatorias y degenerativas de la retina derivadas de enfermedades sistémicas tales como diabetes, hipertensión, esclerosis arterial, anemia, leucemia, lupus eritematoso sistémico, y enfermedades del tejido conectivo, tales como esclerodermia; y error innato del metabolismo, tal como enfermedad de Tay-Sacks y enfermedad de Vogt-Spielmeyer, así como enfermedades locales de la retina, incluyendo trastornos de los vasos retinianos tales como retinopatía de la prematuridad, oclusión venosa retiniana, oclusión arterial retiniana y periflebitis retiniana; inflamación y degeneración de la retina derivada de trauma y desprendimiento de retina; enfermedades retinianas degenerativas relacionadas con la edad tales como degeneración macular disciforme

senil; y enfermedad degenerativa retiniana congénita. En particular, un agente para la prevención, el tratamiento o la supresión de la progresión de enfermedades de la retina al que se hace referencia en la presente invención puede ser usado de manera particularmente eficaz en la enfermedad degenerativa congénita de la retina, retinitis pigmentosa, degeneración macular, retinopatía diabética, desprendimiento de retina, glaucoma u oclusión de vasos retinianos.

5 Cuando la proteína a la que se hace referencia en la presente invención es usada como un agente para la prevención/tratamiento/supresión de la progresión de las enfermedades de la retina indicadas anteriormente, dicha proteína puede ser formulada en una preparación mediante medios convencionales. Por otro lado, cuando el ADN al que se hace referencia en la presente invención es usado como un agente para la prevención/tratamiento/supresión de la progresión de las enfermedades de la retina, dicho ADN al que se hace referencia en la presente invención
10 individualmente o después de que el ADN haya sido insertado en un vector apropiado tal como un vector de retrovirus, un vector de adenovirus, un vector de lentivirus y un vector de virus asociado a adenovirus, puede ser formulado en una preparación según unos medios convencionales. El presente ADN puede ser administrado como tal o junto con un adyuvante promotor de captación con una pistola génica o un catéter, tal como un catéter de hidrogel.

15 Por ejemplo, la presente proteína o el presente ADN pueden ser administrados por vía oral como un comprimido opcionalmente revestido con un azúcar, una cápsula, un elixir o una microcápsula, o pueden ser administrados por vía parenteral en la forma de una inyección, tal como un solución estéril o una suspensión con agua u otro líquido farmacéuticamente aceptable. La preparación descrita en la presente memoria puede ser preparada, por ejemplo, mezclando la presente proteína o el presente ADN con el portador, aroma, excipiente, vehículo, antiséptico, estabilizador o aglutinante conocido, fisiológicamente aceptable.

20 Los ejemplos del aditivo que pueden ser mezclados en un comprimido o una cápsula incluyen aglutinantes tales como gelatina, almidón de maíz, tragacanto y goma arábiga; excipientes tales como celulosa cristalina; agentes de hinchamiento tales como almidón de maíz, gelatina y ácido algínico; lubricantes tales como estearato de magnesio; edulcorantes tales como sacarosa, lactosa y sacarina; aromas tales como menta, aceite de akamono (*Gaultheria adenothrix*) y cereza. En el caso de una cápsula, ésta puede contener además un vehículo líquido tal como un aceite y
25 grasa. Una composición estéril para inyección puede ser formulada según el procedimiento de una formulación convencional, tal como la formación de una disolución o suspensión de un ingrediente activo en una solución acuosa o una solución oleosa para inyección. Como una solución acuosa para inyección, por ejemplo, se usan una solución isotónica que contiene solución salina fisiológica, glucosa y otros agentes auxiliares (por ejemplo, D-sorbitol, D-manitol, cloruro de sodio, etc.), y pueden usarse conjuntamente un solubilizante apropiado, tal como un alcohol (por ejemplo etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), y un tensioactivo no iónico (por ejemplo, polisorbato 80 (marca comercial), HCO-50). Como una solución oleosa, por ejemplo, se usan un aceite de sésamo y un aceite de soja, y pueden usarse conjuntamente benzoato de bencilo y alcohol bencílico, que son solubilizantes. Además, la composición estéril puede contener, por ejemplo, un tampón (por ejemplo, tampón de fosfato, tampón de acetato de sodio), un agente calmante (por ejemplo cloruro de benzalconio, clorhidrato de procaína), un estabilizador (albúmina de suero humano, polietilenglicol), un conservante (por ejemplo, alcohol bencílico, fenol) y un antioxidante. Normalmente,
35 la composición estéril preparada se llena en una ampolla apropiada y se proporciona como una inyección.

Debido a que la preparación obtenida de esta manera es segura y de baja toxicidad, puede ser administrada, por ejemplo, a un mamífero (por ejemplo, ser humano, rata, ratón, conejo, oveja, cerdo, vaca, gato, perro, mono, etc.). Debido a que una dosis de la presente proteína o el presente ADN varía dependiendo de los motivos de la
40 administración, los órganos objetivo, los síntomas y las vías de administración, no puede generalizarse, pero en el caso de la administración parenteral, la dosis es aproximadamente de 0,01 a 10 mg/kg, preferentemente, aproximadamente de 0,05 a 5 mg/kg, por día.

Es preferente que el agente para la prevención/tratamiento/supresión de la progresión de enfermedades de la retina descrito en la presente memoria sea administrado por vía tópica a los ojos. Los ejemplos de una forma de dosificación de dicha preparación para la administración tópica a los ojos incluyen gotas para los ojos, ungüentos oftálmicos, polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas e inyecciones. En particular, es conveniente que la forma de dosificación sea en forma de gotas para los ojos (por ejemplo, gotas acuosas para los ojos, suspensión acuosa de gotas para los ojos, gotas no acuosas para los ojos o suspensión no acuosa de gotas para los ojos), ungüentos oftálmicos e inyecciones. Dichas preparaciones pueden ser preparadas según la manera convencional.

50 Los ejemplos de diluyentes para las soluciones o suspensiones acuosas usadas en la preparación de gotas para los ojos incluyen agua destilada y solución salina fisiológica. Además, los ejemplos de diluyentes para soluciones o suspensiones no acuosas son aceite vegetal, parafina líquida, aceite mineral, propilenglicol y p-octildodecanol. Además, diversos aditivos tales como tampones, isotónicos, conservantes, espesantes, estabilizantes, antioxidantes, agentes de ajuste del pH y agentes quelantes, que son capaces de ser mezclados generalmente en gotas para los
55 ojos, pueden ser mezclados de manera apropiada en las gotas para los ojos descritas la presente invención. La preparación de dichas gotas para los ojos se realiza mediante un procedimiento aséptico o mediante un tratamiento de esterilización en una etapa apropiada.

El tampón anterior se añade con el propósito de mantener el pH constante, por ejemplo, a aproximadamente entre 5,0 y 8,0. Por ejemplo, se usan un tampón de borato, un tampón de citrato, un tampón de tartrato, un tampón de fosfato y un tampón de acetato. Estos tampones se añaden con el propósito de añadir los tampones, es decir, se añaden en tal rango que el pH se mantiene constante, por ejemplo, dentro del intervalo indicado anteriormente. El agente isotónico se
 5 añade con el propósito de convertirlo en isotónico con una lágrima, y los ejemplos de dichos agentes isotónicos incluyen sacáridos tales como glucosa, manitol y sorbitol; alcoholes polihídricos tales como glicerina, polietilenglicol y propilenglicol; y sales tales como cloruro de sodio y citrato de sodio. Estos agentes isotónicos se añaden en una cantidad tal que una presión osmótica de las gotas para los ojos se vuelve equivalente a la de una lágrima. Además, como el conservante, por ejemplo, se usan cloruro de benzalconio, parabenos y clorobutanol. Los ejemplos del
 10 espesante anterior incluyen glicerina, carboximetilcelulosa y polímero de carboxivinilo. Los ejemplos de los estabilizadores anteriores incluyen sulfito de sodio y propilenglicol, los ejemplos del antioxidante anterior incluyen ácido ascórbico, ascorbato de sodio, tocoferol y tiosulfato de sodio, los ejemplos del agente de ajuste de pH anterior incluyen ácido clorhídrico, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido tartárico, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, carbonato de sodio y bicarbonato de sodio, y los ejemplos del agente quelante anterior incluyen edetato de sodio y citrato de sodio. Además, las gotas para los ojos pueden ser liofilizadas en una forma que es usada mediante
 15 disolución en agua destilada para su uso mediante inyección.

Los ungüentos oftálmicos pueden prepararse bajo condiciones estériles mezclando un ingrediente activo en una base usada normalmente para ungüentos oftálmicos, seguido por una formulación según el procedimiento convencional. Los
 20 ejemplos de la base para ungüentos oftálmicos incluyen vaselina, zelen 50, plastibase y Macrogol y, además, con el propósito de mejorar la hidrofiliidad, puede añadirse un agente tensioactivo. Además, con relación a los ungüentos oftálmicos, pueden mezclarse también los aditivos indicados anteriormente, tales como conservantes, si es necesario.

Además, una preparación para la administración oftálmica tópica puede ser formulada en una preparación de liberación sostenida, una preparación DDS (administración de fármacos), o una preparación de implante intraocular usando una
 25 sustancia de control de liberación que puede controlar la liberación de una proteína Otx2 o su péptido parcial, o un ADN que codifica para cada uno de ellos, en los ojos. Los ejemplos de la sustancia de control de liberación incluyen un polímero, copolímero, o una mezcla de los mismos, conocidos en sí mismos, que se sintetizan mediante una policondensación con deshidratación sin catalizador a partir de uno o más tipos de ácidos α -hidroxicarboxílicos (por ejemplo, ácido glicólico, ácido láctico, ácido hidroxibutírico, etc.), ácidos hidroxidicarboxílicos (por ejemplo, ácido málico, etc.), y ácidos hidroxitricarboxílicos (por ejemplo, ácido cítrico, etc.), así como sustancias poliméricas biodegradables
 30 tales como éster de ácido poli- α -cianoacrílico, ácido poliamino (por ejemplo, ácido poli- γ -bencil-L-glutámico, etc.), y copolímero basado en anhídrido maleico (por ejemplo, copolímero de ácido maleico-estireno, etc.).

No es posible sugerir, en general, una dosis y una frecuencia de administración de la preparación para la administración oftálmica tópica descrita en la presente memoria, ya que varían en función de los sujetos objeto de la
 35 administración, los síntomas, las formas de dosificación y los períodos terapéuticos. Normalmente, en el caso de gotas para los ojos, una preparación que contiene del 0,001 al 10,0% p/v, preferentemente del 0,01 al 1,0% p/v, de la presente proteína o el presente ADN puede ser administrada a un adulto varias veces al día, preferentemente, de 1 a 6 veces al día, por cada ojo, en unas pocas gotas, preferentemente, de 1 a 4 gotas por aplicación. En el caso de un ungüento oftálmico, una preparación que contiene del 0,001 al 10,0% p/p, preferentemente, del 0,01 al 1,0% p/p de la
 40 presente proteína o el presente ADN puede ser aplicada a un adulto varias veces, preferentemente, de 1 a 6 veces por día.

En la presente invención, el diagnóstico de enfermedades de la retina puede ser realizado mediante la detección de una proteína Otx2 o su péptido parcial, o una sal de la misma (en adelante, en la presente memoria, abreviada como presente proteína en algunos casos) en una solución de ensayo, o midiendo una cantidad de los mismos. Por ejemplo, cuando se detecta una reducción en una concentración de la presente proteína, puede diagnosticarse, por ejemplo,
 45 que existe una alta probabilidad de que una persona esté sufriendo una enfermedad de la retina, o sufrirá una enfermedad de la retina en el futuro. Debido a que un anticuerpo para una proteína Otx2 o su péptido parcial, o una sal de la misma (en adelante, en la presente memoria, abreviado como presente anticuerpo en algunos casos) puede reconocer específicamente la presente proteína, puede usarse en la detección y la cuantificación de la presente proteína en una solución de ensayo. Es decir, el presente anticuerpo puede ser usado como un agente de diagnóstico
 50 para enfermedades de la retina. En el agente de diagnóstico, puede usarse también una propia molécula de anticuerpo, o una fracción $F(ab')_2$, Fab' o Fab de una molécula de anticuerpo. De manera alternativa, la presente proteína puede ser detectada en una solución de ensayo mediante tinción de tejidos.

El presente anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal siempre que sea un anticuerpo capaz de reconocer la presente proteína. El presente anticuerpo puede ser preparado usando la presente proteína
 55 como un antígeno según el procedimiento conocido para la preparación de un anticuerpo o un anti-suero.

A continuación, se describirá un ejemplo del procedimiento de preparación de un anticuerpo monoclonal para la presente proteína.

(i) En primer lugar, se describirá la preparación de una célula que produce un anticuerpo monoclonal. La presente proteína en sí misma o junto con un vehículo o un diluyente es administrada a un mamífero en un sitio donde puede producirse un anticuerpo. Con el fin de mejorar la capacidad de producción de anticuerpos tras la administración, pueden administrarse adyuvante completo de Freund o adyuvante incompleto de Freund. Normalmente, la administración se realiza una vez cada entre 2 y 6 semanas, en un total de entre 2 y 10 veces. Los ejemplos de un mamífero a usar incluyen mono, conejo, perro, cobaya, ratón, rata, oveja y cabra y, preferentemente, se usan ratón o rata. Tras la preparación de una célula que produce un anticuerpo monoclonal, puede prepararse un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal mediante la selección de un individuo para el que se reconoce un nivel de anticuerpos a partir de un animal de sangre caliente, por ejemplo, un ratón inmunizado con un antígeno, recogiendo el bazo o de los ganglios linfáticos entre 2 y 5 días después de la inmunización final, y fusionando una célula productora de anticuerpos contenida en los mismos con una célula de mieloma. La medición de un nivel de anticuerpos en el suero de anticuerpos puede realizarse, por ejemplo, haciendo reaccionar una proteína marcada descrita más adelante con un anti-suero, y midiendo la actividad de un agente de marcado unido a un anticuerpo. El procedimiento de fusión puede realizarse según el procedimiento conocido, por ejemplo, el procedimiento de Kohler y Milstein (Nature, Vol 256, p.495 (1975)). Los ejemplos de un promotor de fusión incluyen polietilenglicol (PEG) y el virus de Sendai. Preferentemente, se usa PEG. Los ejemplos de una célula de mieloma incluyen NS-1, P3U1 y SP2/0, y entre ellos, preferentemente, se usa P3U1. Una relación preferente del número de células productoras de anticuerpo (células de bazo) y el número de células de mieloma usadas es de aproximadamente 1:1 a 20:1, y PEG (preferentemente, PEG 1000 a PEG 6000) se añade a una concentración de aproximadamente el 10 al 80%, y la incubación se realiza aproximadamente entre 20 y 40°C, preferentemente, aproximadamente entre 30 y 37°C durante aproximadamente 1 a 10 minutos, para preparar, de esta manera, células fusionadas de manera eficaz.

Para la selección de un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal, pueden usarse diversos procedimientos, incluyendo (a) un procedimiento de adición de un sobrenadante de cultivo de hibridoma a una fase sólida (por ejemplo, una microplaca) sobre el que un antígeno, tal como la presente proteína, es adsorbido directamente o junto con un vehículo, añadiendo posteriormente un anticuerpo anti-inmunoglobulina (cuando una célula usada en la fusión celular es de ratón, se usa un anticuerpo inmunoglobulina anti-ratón) o proteína A marcada con una sustancia radiactiva o una enzima, y detectando un anticuerpo monoclonal unido a la fase sólida, y (b) un procedimiento de adición de un sobrenadante de cultivo de hibridoma a una fase sólida sobre la que es absorbido un anticuerpo anti-inmunoglobulina o la proteína A, añadiendo la presente proteína marcada con una sustancia radiactiva o una enzima, y detectando un anticuerpo monoclonal unido a la fase sólida. La selección de un anticuerpo monoclonal puede realizarse según el procedimiento conocido o un procedimiento similar y, normalmente, dicha selección puede realizarse en un medio para una célula animal al que se añade HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Como un medio para la selección y el cultivo, puede usarse cualquier medio siempre que se pueda cultivar un hibridoma. Por ejemplo, pueden usarse un medio RPMI 1640 que contiene aproximadamente del 1 al 20%, preferentemente, de aproximadamente el 10 al 20% de suero fetal bovino, medio GIT que contiene aproximadamente del 1 al 10% de suero bovino fetal (fabricado por Wako Pure Chemical Industries Co., Ltd.) y un medio libre de suero para el cultivo de hibridoma (SFM-101, fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.). Normalmente, la temperatura de cultivo es de aproximadamente 20 a 40°C, preferentemente, de aproximadamente 37°C. Normalmente, el tiempo de cultivo es de aproximadamente 5 días a 3 semanas, preferentemente, de aproximadamente 1 semana a 2 semanas. Normalmente, el cultivo puede ser realizado bajo dióxido de carbono al 5%. Un nivel de anticuerpos de un sobrenadante de cultivo de hibridoma puede ser medido como en la medición de un nivel de anticuerpos en el antisuero anterior.

(ii) A continuación, se separa y purifica un anticuerpo monoclonal. La separación y purificación de un anticuerpo monoclonal pueden realizarse según un procedimiento de separación y purificación de inmunoglobulina (por ejemplo, un procedimiento de precipitación por incremento de fuerza iónica, un procedimiento de precipitación de alcohol, un procedimiento de precipitación isoelectrónico, un procedimiento de electroforesis, un procedimiento de adsorción y desorción con intercambiador de iones (por ejemplo, DEAE), un procedimiento de ultracentrifugación, un procedimiento de filtración en gel y un procedimiento de purificación específico que recoge sólo un anticuerpo con un antígeno que se une a una fase sólida o un agente adsorbente activo tal como Proteína A o Proteína G, y liberando la unión para obtener un anticuerpo) como en la separación y purificación convencionales de un anticuerpo policlonal.

A continuación, se describirá un ejemplo de un procedimiento de preparación de un anticuerpo policlonal a la presente proteína (en adelante, en la presente memoria, abreviado como " presente anticuerpo policlonal" en algunos casos).

El anticuerpo policlonal preestablecido puede ser preparado según el procedimiento conocido o un procedimiento similar al mismo. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser preparado mediante la formación de un complejo de un antígeno inmunológico (presente proteína, etc.) y una proteína portadora, inmunizando un mamífero como en el procedimiento indicado anteriormente para la preparación de un anticuerpo monoclonal, recogiendo una composición que contiene anticuerpos contra la presente proteína a partir del animal inmunizado, y separando y purificando un anticuerpo. Con

relación a un complejo de un antígeno inmunológico con una proteína portadora usado para inmunizar un mamífero, el tipo de una proteína portadora, y la proporción de la mezcla de un portador y un hapteno no está particularmente limitada, siempre que pueda producirse de manera eficaz contra un hapteno inmunizado mediante reticulación con un vehículo. Por ejemplo, se usan un procedimiento de acoplamiento de albúmina de suero bovino, tiroglobulina bovina, hemocianina de lapa californiana en una relación en peso de aproximadamente 0,1 a 20, preferentemente, aproximadamente de 1 a 5 con relación a un hapteno. Además, para acoplar un hapteno con un vehículo, pueden usarse diversos agentes de condensación, incluyendo glutaraldehído, una carbodiimida, un éster de maleimida activo y un reactivo de éster activo que contiene un grupo tiol o un grupo ditiopiridilo. Un producto de condensación de un hapteno y un vehículo en sí mismo o junto con un vehículo y un diluyente se administra a un animal de sangre caliente en un sitio donde puede producirse un anticuerpo. Con el fin de mejorar la productividad de anticuerpos tras la administración, pueden administrarse adyuvante completo de Freund o adyuvante incompleto de Freund. Normalmente, la administración puede ser realizada una vez por cada aproximadamente 2 a 6 semanas en un total de aproximadamente 3 a 10 veces. Un anticuerpo policlonal puede ser recogido de la sangre o líquido ascítico, preferentemente sangre de un mamífero inmunizado mediante el procedimiento indicado anteriormente. Un nivel de anticuerpos policlonales en un anti-suero puede ser medido como en la medición de un nivel de anticuerpos en un anti-suero, indicada anteriormente. La separación y purificación de un anticuerpo policlonal pueden realizarse según un procedimiento de separación y purificación de inmunoglobulina similar a la separación y purificación de un anticuerpo monoclonal, indicadas anteriormente.

Un procedimiento de cuantificación de la presente proteína usando un anticuerpo descrito en la presente memoria no está particularmente limitado, pero los ejemplos de dichos procedimientos incluyen un procedimiento de detección de una cantidad de un anticuerpo, un antígeno o un complejo anticuerpo-antígeno que corresponde a una cantidad de un antígeno (cantidad de la presente proteína, etc.) en una solución de ensayo mediante medios químicos o físicos, y el cálculo de una cantidad de un antígeno en una solución de ensayo en base a una curva estándar producida usando una solución estándar que contiene la cantidad conocida de un antígeno a partir de un valor detectado. Por ejemplo, se usan preferentemente, nefrometría, un procedimiento de competición, un procedimiento inmunométrico y un procedimiento de tipo sándwich, pero desde un punto de vista de la sensibilidad y la especificidad, es particularmente preferente usar un procedimiento de tipo sándwich descrito más adelante. Un agente de marcado usado en un procedimiento de cuantificación usando una sustancia marcadora incluye, por ejemplo, un elemento isótopo radioactivo, una enzima, una sustancia fluorescente y una sustancia emisora de luz. Como el elemento isótopo radiactivo, se usan, por ejemplo, (^{125}I), (^{131}I), (^3H) y (^{14}C). Como la enzima, son preferentes las que son estables y tienen gran actividad específica y se usan, por ejemplo, β -galactosidasa, β -glucosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa y malato deshidrogenasa. Como la sustancia fluorescente se usan, por ejemplo, fluorescamina e isotiocianato de fluoresceína. Como la sustancia emisora de luz, se usan luminol, derivados de luminol, luciferina y lucigenina. Además, puede usarse un sistema biotina-avidina para unir un anticuerpo o un antígeno con un agente de marcado.

Cuando un antígeno o un anticuerpo es insolubilizado en el procedimiento de cuantificación indicado anteriormente, puede usarse adsorción física, o unión química que se usa normalmente para la insolubilizar/inmovilizar una proteína o una enzima. Como un vehículo se usan, por ejemplo, polisacáridos insolubles tales como agarosa, dextrano y celulosa; resinas sintéticas tales como poliestireno, poliácridamina y silicona; y vidrio. En un procedimiento de tipo sándwich, una cantidad de la presente proteína en una solución de ensayo puede ser cuantificada haciendo reaccionar el presente anticuerpo monoclonal insolubilizado con una solución de ensayo (reacción primaria), haciendo reaccionar adicionalmente el presente anticuerpo monoclonal marcado (reacción secundaria), y midiendo la actividad de un agente de marcado sobre un vehículo insolubilizado. La reacción primaria y la reacción secundaria pueden realizarse en un orden inverso, o pueden ser realizadas al mismo tiempo. El agente de marcado y el procedimiento de insolubilización son los mismos que los descritos anteriormente. Además, en un procedimiento de cuantificación inmunológica mediante un procedimiento de tipo sándwich, un anticuerpo usado en un anticuerpo de fase sólida o un anticuerpo marcador no es necesariamente un tipo, y puede usarse una mezcla de dos o más tipos de anticuerpos con el propósito de mejorar la sensibilidad de la medición. En un procedimiento de cuantificación de la presente proteína mediante un procedimiento de tipo sándwich, como los presentes anticuerpos monoclonales usados en una reacción primaria y una reacción secundaria, es preferente usar anticuerpos que tienen diferentes sitios para unirse con la presente proteína. Es decir, los anticuerpos usados en una reacción primaria y una reacción secundaria son tales que, por ejemplo, cuando un anticuerpo usado en una reacción secundaria reconoce una parte C-terminal de la presente proteína, preferentemente se usa un anticuerpo que reconoce una parte diferente a la parte C-terminal, por ejemplo, una parte N-terminal, usada en una reacción primaria.

El presente anticuerpo monoclonal puede usarse también en un procedimiento de cuantificación diferente a un procedimiento de tipo sándwich, tal como un procedimiento de competición, un procedimiento inmunométrico y nefrometría. En el procedimiento de competición, un antígeno y un antígeno marcado en una solución de ensayo se hacen reaccionar competitivamente a un anticuerpo, un antígeno marcado sin reaccionar (F) y un antígeno marcado (B) unido con un anticuerpo son separados (separación B/F), se mide una cantidad marcada B o F, y se cuantifica una cantidad de un antígeno en una solución de ensayo. Específicamente, los ejemplos del presente procedimiento incluyen (a) un procedimiento en fase líquida en el que se usa un anticuerpo soluble como un anticuerpo, y la

separación B/F se realiza usando polietilenglicol y un segundo anticuerpo para el anticuerpo, y (b) un procedimiento en fase sólida que usa un anticuerpo en fase sólida como un primer anticuerpo, o usa un anticuerpo soluble como un primer anticuerpo, y un anticuerpo en fase sólida como un segundo anticuerpo. En el procedimiento inmunométrico, después de que un antígeno en una solución de ensayo y un antígeno en fase sólida se hacen reaccionar competitivamente contra una cantidad constante de un anticuerpo marcado, la fase sólida y la fase líquida se separan, o un antígeno en una solución de ensayo y una cantidad en exceso de un anticuerpo marcado se hacen reaccionar, a continuación, se añade un antígeno en fase sólida para unir un anticuerpo marcado sin reaccionar a una fase sólida, y la fase sólida y la fase líquida se separan. A continuación, se mide la cantidad de un anticuerpo marcado en cualquiera de las fases para cuantificar la cantidad de un antígeno en una solución de ensayo. Además, en nefrometría, se mide una cantidad de un precipitado insoluble producido como resultado de una reacción antígeno anticuerpo en un gel o en una solución. Cuando una cantidad de un antígeno en una solución de ensayo es pequeña, y sólo se obtiene una pequeña cantidad de precipitado, preferentemente, se usa nefrometría láser utilizando dispersión de luz láser.

Quando estos procedimientos individuales de cuantificación inmunológica se aplican a la presente invención, puede añadirse la consideración técnica normal de una persona con conocimientos en la materia a un procedimiento de operación según las condiciones convencionales en cada procedimiento. Para más información acerca de estos medios técnicos generales, puede hacerse referencia a revisiones y libros (por ejemplo, véase "Radioimmunoassay" editado por Hiroshi Irie (Kodansha, publicado en 1974); Separate Volume 'Radioimmunoassay' editado por Hiroshi Irie (Kodansha, publicado en 1979); "Enzyme Immunoassay" editado por Eiji Ishikawa et al. (Igakushoin, publicado en 1978); "Enzyme Immunoassay" editado por Eiji Ishikawa (segunda edición) (Igakushoin, publicado en 1982); "Enzyme immunoassay" editado por Eiji Ishikawa et al. (tercera edición) (Igakushoin, publicado en 1987); "Methods in ENZYMOLOGY", Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A)); ibid Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B)); ibid Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C)); ibid Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays)); ibid Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal antibodies and General Immunoassay Methods)); ibid Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (todos ellos publicados por Academic Press).

El presente anticuerpo puede ser usado también para preparar una columna de anticuerpo usada para purificar la presente proteína, detectar la presente proteína en cada fracción en la purificación, o análisis del comportamiento de la presente proteína en una célula de ensayo.

Debido a que el presente ADN, o un polinucleótido antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria o sustancialmente complementaria a una secuencia de nucleótidos del presente ADN, pueden ser usados como una sonda y, de esta manera, pueden detectar una anomalía (anomalía del gen) de un ADN o un ARNm que codifica para la presente proteína o su péptido parcial en un cuerpo vivo, en particular, en un cuerpo vivo de un mamífero (por ejemplo, ser humano, rata, ratón, conejo, oveja, cerdo, vaca, gato, perro, mono, etc.) , son útiles, por ejemplo, como un agente para el diagnóstico genético de daños del ADN o del ARNm, o mutación, o reducción en la expresión. El diagnóstico genético usando el presente ADN o polinucleótido antisentido puede realizarse, por ejemplo, mediante la hibridación Northern conocida o un procedimiento PCR-SSCP (Genomics, vol. 5, p.874-879 (1989), Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, vol. 86, p.2766-2770 (1989)). Por ejemplo, cuando se detecta, mediante hibridación Northern, una reducción en la expresión de un ARNm que codifica para la presente proteína o su péptido parcial, puede diagnosticarse que hay una alta probabilidad de que un sujeto esté sufriendo de una enfermedad de la retina, o sufrirá una enfermedad de la retina en el futuro.

El "polinucleótido antisentido" al que se hace referencia en la presente invención es un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos del presente ADN. Los ejemplos del polinucleótido antisentido incluyen otro tipo de polinucleótidos distinto de los polinucleótidos indicados anteriormente, tales como un polidesoxinucleótido que contiene 2-desoxi-D-ribosa, un polinucleótido que contiene D-ribosa y una entidad que contiene N-glicósido de una base de purina o pirimidina; otros polímeros que tienen un esqueleto no nucleótido (por ejemplo, ácido nucleico de proteína disponible comercialmente, y un polímero de ácido nucleico que tiene una secuencia sintética específica); y otros polímeros que tienen un enlace especial (siempre que el polímero contenga un nucleótido que tenga una disposición que permita el emparejamiento de bases o la adición de bases encontradas en un ADN o un ARN). Estos pueden ser un ADN de doble cadena, un ADN monocatenario, un ARN de doble cadena, un ARN monocatenario, o un ADN/ARN híbrido, y puede ser un polinucleótido no modificado (u oligonucleótido no modificado), o un polinucleótido modificado conocido (u oligonucleótido modificado) al que se añade una modificación. Los ejemplos de un polinucleótido modificado incluyen un polinucleótido que tiene una marca conocida en la técnica, un polinucleótido con una protección, un polinucleótido metilado, un polinucleótido en el que uno o más nucleótidos naturales están sustituidos con análogos, un polinucleótido intramolecular con nucleótidos modificados, un polinucleótido que tiene un enlace sin carga (por ejemplo, metilfosfonato, fosfotriéster, fosforamidoato, carbamato, etc.), un polinucleótido con un enlace que tiene una carga o un enlace que contiene azufre (por ejemplo, fosforotioato, fosforoditioato), un polinucleótido que tiene, como grupo lateral, una proteína (nucleasa, inhibidor de la nucleasa, toxina, anticuerpo, péptido de señal, poli-L-lisina) o un sacárido (por ejemplo monosacárido), un polinucleótido que tiene un compuesto intercalado (por ejemplo, acridina, solarene, etc.), un polinucleótido que contiene

un compuesto quelante (por ejemplo, metal, metal radiactivo, boro, metal oxidativo, etc.), un polinucleótido que contiene un agente alquilante, y un polinucleótido que tiene un enlace modificado (por ejemplo, ácido nucleico de tipo α -anómero). En la presente memoria, "nucleósido", "nucleótido" y "ácido nucleico" puede contener no sólo una base de purina y pirimidina, sino también otra base heterocíclica modificada. Estas entidades modificadas pueden contener purina metilada y pirimidina metilada, purina acilada y pirimidina acilada u otros heterociclos. Un polinucleótido modificado que tiene un sacárido como un grupo de cadena lateral puede ser tal que una parte azúcar de una cadena lateral es modificada adicionalmente, por ejemplo, uno o más grupos hidroxilo de un sacárido están sustituidos con un halógeno o un grupo alifático, o se convierten en un grupo funcional, tal como éter y amina.

Es decir, el polinucleótido antisentido usado en la presente invención es un ARN, un ADN o un ácido nucleico (ARN, ADN) modificado. Los ejemplos del ácido nucleico modificado incluyen un derivado de azufre y un derivado de tiofosfato de ácido nucleico, y un ácido nucleico que es resistente a la degradación de amida de polinucleótido o amida de oligonucleósido, que no se limitan a los mismos.

Usando la expresión o un aumento en una cantidad de expresión de una proteína Otx2 o su péptido parcial como un índice, puede seleccionarse un compuesto que tiene una acción de inducción de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina o una sal de la misma. La selección puede realizarse, por ejemplo, usando una célula que tiene una capacidad de expresar una proteína Otx2 o su péptido parcial.

Específicamente, los ejemplos de dicha selección incluyen un procedimiento para seleccionar un compuesto que tiene una acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina o una sal de la misma, caracterizado por el hecho de que una célula que tiene la capacidad de expresar una proteína Otx2 o su péptido parcial es cultivada en presencia de un compuesto de ensayo, y se detecta la expresión de una proteína Otx2 o un péptido parcial de la misma, o se mide una cantidad de expresión de los mismos. Los ejemplos de la "célula que tiene la capacidad de expresar una proteína Otx2 o su péptido parcial" incluyen una célula transformante que tiene el presente ADN indicado anteriormente. De manera alternativa, la célula puede ser una célula que tiene originalmente una capacidad de expresar una proteína Otx2 o su péptido parcial sin el uso de una técnica genética recombinante. Una cantidad de expresión de la presente proteína puede ser medida usando el procedimiento de cuantificación de la presente proteína, indicado anteriormente, mediante separación y purificación de la presente proteína a partir de una célula cultivada mediante el procedimiento indicado anteriormente.

Además, otro aspecto de la presente procedimiento de selección incluye un procedimiento de selección de un compuesto que tiene una acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina o un listón de la misma, caracterizado por el hecho de que una célula que tiene la capacidad de expresar una proteína Otx2 o su péptido parcial de la misma es cultivada en presencia de un compuesto de ensayo, y una cantidad de un ARNm que codifica para una proteína Otx2 (en adelante, en la presente memoria, abreviada como ARNm Otx2 en algunos casos) es medida usando un ADN que codifica para la presente proteína o un ADN complementario de la misma, o un ADN parcial de la misma. Más específicamente, se proporciona un procedimiento de selección de un compuesto que tiene una acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina o una sal de la misma, caracterizado por que se realiza una comparación entre (a) una cantidad de expresión de un ARNm Otx2 cuando se cultiva una célula que tiene la capacidad de expresar una proteína Otx2 o su péptido parcial, y (b) una cantidad de un ARN Otx2m cuando se cultiva una célula que tiene la capacidad de expresar una proteína Otx2 o su péptido parcial en presencia de un compuesto de ensayo.

Con el fin de realizar la comparación de cantidades de expresión de un ARNm mediante un procedimiento de hibridación, dicha comparación puede realizarse según el procedimiento conocido o un procedimiento similar al mismo, por ejemplo, el procedimiento descrito en Molecular Cloning, 2nd, J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. Específicamente, la medición de una cantidad de un ARNm que codifica para una proteína Otx2 se realiza poniendo en contacto un ARNm extraído de una célula según el procedimiento conocido con un ADN que codifica para la presente proteína o un ADN complementario del mismo, o un ADN parcial de los mismos, y midiendo una cantidad de un ARNm unido a un ADN que codifica para la presente proteína o un ADN complementario del mismo, o un ADN parcial de los mismos. Una cantidad de un ARNm Otx2 unido a un ADN que codifica para la presente proteína o un ADN complementario del mismo, o un ADN parcial de los mismos puede medirse fácilmente mediante el marcado de un ADN que codifica para la presente proteína o su ADN complementario o un ADN parcial de los mismos, por ejemplo, con un elemento isótopo radioactivo o un pigmento. Como el elemento isótopo radioactivo, se usan, por ejemplo, ^{32}P y ^3H y, como pigmento, se usan pigmentos fluorescentes tales como fluoresceína, FAM (fabricado por PE Biosystems), JOE (fabricado por PE Biosystems), TAMRA (fabricado por PE Biosystems), ROX (fabricado por PE Biosystems), Cy5 (fabricado por Amershan) y Cy3 (fabricado por Amershan). De manera alternativa, una cantidad de un ARN Otx2m puede medirse también mediante la conversión de un ARN extraído de una célula en un ADNc con una transcriptasa inversa, y midiendo una cantidad de un ADNc que ha sido amplificado mediante PCR usando, como cebador, un ADN que codifica para la presente proteína o su ADN complementario o un ADN parcial de los mismos.

Se proporciona un procedimiento de selección de un compuesto que tiene una acción de controlar la actividad de un

promotor o un potenciador de un ADN que codifica para una proteína Otx2 o una sal de la misma, además, un procedimiento para la selección de un compuesto que tiene una acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina o una sal de la misma, caracterizado por que la región promotora o potenciadora conocida del ADN que codifica para una proteína Otx2 es clonada a partir de un ADN de genoma, una célula transformada con un ADN recombinante ligado aguas arriba de un gen informador apropiado cultivado en presencia de un compuesto de ensayo, y se detecta la expresión de un gen informador en lugar de la expresión de una proteína Otx2. Como un gen informador, se usa un gen marcador de tinción, tal como lacZ (gen de β -galactosidasa). Mediante la medición de una cantidad de un producto del gen informador (por ejemplo, ARNm, proteína) usando el procedimiento conocido, un compuesto de ensayo con una cantidad creciente de un producto del gen informador puede ser seleccionado como un compuesto que tiene una acción promotora de la actividad de un promotor o un potenciador de un gen Otx2, es decir, un compuesto que tiene una actividad promotora de la expresión de una proteína Otx2 o su péptido parcial.

Los ejemplos de un compuesto de ensayo en el presente procedimiento de selección indicado anteriormente incluyen un péptido, una proteína, un compuesto no peptídico, un compuesto sintético, un producto de fermentación, un extracto celular, un extracto de planta y un extracto de tejido animal, y estos compuestos pueden ser un compuesto nuevo o el compuesto conocido.

Para realizar el procedimiento de selección indicado anteriormente, el presente kit de selección contiene (a) una célula que tiene la capacidad de expresar una proteína Otx2 o su péptido parcial, (b) un ADN que codifica para la presente proteína o un ADN complementario del mismo o un ADN parcial del mismo, o (c) una célula transformada con un ADN en el que un promotor o un potenciador de un ADN que codifica para una proteína Otx2 está ligado a un gen informador.

Un compuesto obtenido mediante el uso del presente procedimiento de selección o kit de selección, o una sal del mismo es útil como un fármaco, tal como el agente indicado anteriormente para la prevención, el tratamiento o la supresión de la progresión de una enfermedad de la retina, y un agente para inducir la diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina. El compuesto o una sal del mismo, un agente para la prevención, el tratamiento o la supresión de la progresión de una enfermedad de la retina que lo contiene, o un agente para inducir la diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina que lo contiene puede ser realizado como en la presente proteína o ADN.

Ejemplos

Como se muestra en la Fig. 1, un ADNc Otx2 de ratón se incorporó en un vector LIA, que es un vector de retrovirus. Un gen de la fosfatasa alcalina derivada de placenta humana se incorpora en un vector LIA (vector de virus de control), y una célula infectada con un virus derivado de este vector expresa la fosfatasa alcalina como un marcador. Una célula infectada con un virus derivado de un vector LIA con un gen Otx2 incorporado en el mismo (vector de virus Otx2) expresa una proteína Otx2 y, al mismo tiempo, coexpresa fosfatasa alcalina como un marcador.

Usando una célula cultivada (línea celular Phoenix) para la producción de un retrovirus, se prepararon un vector de virus de control y un vector de virus Otx2, respectivamente, los virus resultantes se concentraron mediante ultracentrifugación (rotor oscilante, 21.000 rpm, 4°C durante 2 horas) para preparar una solución de virus que tenía una eficacia de infección de 1×10^7 ufp (unidad formadora de placa)/ml, respectivamente.

A continuación, como se muestra en la Fig. 2, una rata lactante inmediatamente después del nacimiento (0 días después del nacimiento) fue sometida a anestesia a baja temperatura, y la piel que cubría una parte ocular se cortó con unas tijeras de operación. Se inyectaron 5 μ l de la solución de virus de un vector de virus de control o un vector de virus Otx2 bajo una retina de una rata lactante usando una aguja de inyección (fabricada por Hamilton). Tras la inyección, una rata lactante fue calentada a 37°C durante 20 minutos para recuperar la temperatura corporal, fue devuelta a una jaula de cría de una rata madre y, posteriormente, fue criada durante 4 a 6 semanas.

Una rata crecida adulta fue sometida a eutanasia mediante la administración de pentobarbital sódico. Los ojos fueron aislados de la rata y la retina se retiró. La retina se fijó durante la noche a 4°C con una solución de paraformaldehído al 4%. Una solución de paraformaldehído al 4% se intercambió con PBS (tampón fosfato salino), y se lavó una retina fija. Esta operación de fijación/lavado se repitió tres veces. A continuación, la retina fijada con una solución de paraformaldehído al 4% se trató térmicamente a 65°C, y se inactivó la fosfatasa alcalina endógena. La retina tratada térmicamente se tintó con una solución de tinción de fosfatasa alcalina (temperatura ambiente, 3 horas) para tinter en azul púrpura sólo una célula de retina infectada con el virus indicado anteriormente. Esta retina tintada se fijó de nuevo durante la noche con una solución de paraformaldehído al 4%, se lavó con PBS, a continuación, se sumergió durante la noche en una solución de sacarosa/PBS al 30%, se transfirió a un líquido de compuesto OTS (Sakura Finetek) y se preparó un bloque congelado de retina en hielo seco. Se preparó una sección congelada de aproximadamente 30 μ m a partir de un bloque congelado usando un aparato de preparación de secciones congeladas (Karl Zeiss), y esta se observó bajo el microscopio óptico (Karl Zeiss).

Un tipo de cada célula de la retina fue identificado por su forma y posición (véase la Fig. 3). Esto se realizó tres veces

mediante un ensayo independiente. Una tasa de existencia de cada célula con relación al número total de células observadas en un campo se muestra en la Fig. 4. Cuando un vector de virus Otx2 se introdujo en una célula madre de la retina (o célula precursora de la retina), el número de células fotorreceptoras de la retina aumentó en aproximadamente el 10% en comparación con el caso en el que se introdujo un vector de virus de control. A partir de esto, se observó que, mediante la expresión de un gen Otx2, la diferenciación a partir de una célula madre de la retina en una célula bipolar, una célula amacrina y una célula glial de Müller fue fuertemente suprimida, y casi todas las células madre de la retina se diferencian en células fotorreceptoras de la retina.

A partir del resultado anterior, se confirmó que, mediante la introducción de un gen Otx2 en una célula madre no diferenciada de la retina, y mediante la expresión de un gen Otx2 en la célula, es posible diferenciar eficazmente una célula madre no diferenciada de la retina de una rata en una célula fotorreceptora de la retina.

Aplicabilidad industrial

La presente proteína o el presente ADN pueden ser utilizados en un fármaco para el propósito de prevenir, tratar o suprimir la progresión de enfermedades de la retina, tales como retinitis pigmentosa, degeneración macular senil, retinopatía diabética, desprendimiento de retina, glaucoma y oclusión de vasos retinianos. Además, debido a que una anomalía de un gen Otx2 conduce a una anomalía estructural o funcional de una célula fotorreceptora de la retina, mediante la detección de una anomalía de un gen Otx2 o una degeneración o reducción en la expresión de una proteína Otx2, esto puede ser utilizado en el diagnóstico de la enfermedad indicada anteriormente.

Listado de secuencias

<110> Japan Science and Technology Agency

<110> Osaka Bioscience Institute

<120> Regeneración y neogénesis de célula fotorreceptora de la retina usando el gen homeobox Otx2

<130> 008F1292

<160> 6

<210> 1

<211> 297

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Met Ser Tyr Leu Lys Gln Pro Pro Tyr Ala Val Asn Gly Leu Ser

1 5 10 15

Leu Thr Thr Ser Gly Met Asp Leu Leu His Pro Ser Val Gly Tyr Pro

20 25 30

Gly Pro Trp Ala Ser Cys Pro Ala Ala Thr Pro Arg Lys Gln Arg Arg

35 40 45

Glu Arg Thr Thr Phe Thr Arg Ala Gln Leu Asp Val Leu Glu Ala Leu

50 55 60

Phe Ala Lys Thr Arg Tyr Pro Asp Ile Phe Met Arg Glu Glu Val Ala

65 70 75 80

Leu Lys Ile Asn Leu Pro Glu Ser Arg Val Gln Val Trp Phe Lys Asn

85 90 95

Arg Arg Ala Lys Cys Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Asn Gly Gly

100 105 110

Gln Asn Lys Val Arg Pro Ala Lys Lys Lys Thr Ser Pro Ala Arg Glu

115 120 125

Val Ser Ser Glu Ser Gly Thr Ser Gly Gln Phe Thr Pro Pro Ser Ser

130 135 140

Thr Ser Val Pro Thr Ile Ala Ser Ser Ser Ala Pro Val Ser Ile Trp

145 150 155 160

Ser Pro Ala Ser Ile Ser Pro Leu Ser Asp Pro Leu Ser Thr Ser Ser

165 170 175

Ser Cys Met Gln Arg Ser Tyr Pro Met Thr Tyr Thr Gln Ala Ser Gly

180 185 190

Tyr Ser Gln Gly Tyr Ala Gly Ser Thr Ser Tyr Phe Gly Gly Met Asp

195 200 205

Cys Gly Ser Tyr Leu Thr Pro Met His His Gln Leu Pro Gly Pro Gly
210 215 220

5 Ala Thr Leu Ser Pro Met Gly Thr Asn Ala Val Thr Ser His Leu Asn
225 230 235 240

10 Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Thr Gln Gly Tyr Gly Ala Ser Ser Leu
245 250 255

Gly Phe Asn Ser Thr Thr Asp Cys Leu Asp Tyr Lys Asp Gln Thr Ala
260 265 270

15 Ser Trp Lys Leu Asn Phe Asn Ala Asp Cys Leu Asp Tyr Lys Asp Gln
275 280 285

20 Thr Ser Ser Trp Lys Phe Gln Val Leu

<210> 2

<211> 2209

<212> ADN

25 <213> Homo sapiens

<400> 2

30 gagagcggga cggcctcag ctccaacaca gcctccactg tgattaaaaa taaaaatgc 60
tagagcagcc ctacatcgcc acatctactt tgatagctgg ctattiggaa tttaaaggat 120
attigacttt ttctaaccct ccatgaggct gtaagttcca ctgctccaaa cccaccacc 180
aaggactctg aacctgtcca ccccgggcgc atcaagatct tccagctggg tacccccgat 240
ttgggccgac ttigcacctc caaacaacct tagcatgatg tcttatctta agcaaccgcc 300

ttacgcagtc aatgggc tga gtcgaccac ttcgggtatg gacttgctgc accctccgt 360
 gggctaccg gggccctggg ctcttgctc cgcagccacc ccccggaac agcgccggga 420
 gaggacgacg ttcactcggg cgcagctaga tgtgctggaa gcactgtttg ccaagaccg 480
 gtaccagac atcttcacgc gagaggaggt ggcactgaaa atcaactgc ccgagtcgag 540
 ggtgcaggta tggtttaaga atcgaagagc taagtgcgc caacaacagc aacaacagca 600
 gaatggaggt caaaacaaag tgagacctgc caaaaagaag acatctccag ctggggaagt 660
 gaggtcagag agtgggaaca gtggccaatt cactccccc tctagcacct cagtcccgac 720
 cattgccagc agcagtgctc ctggtctat ctggagccca gcttccatct cccactgtc 780
 agatcccttg tccacctct ctctctgcat gcagaggctc tatccatga cctatactca 840
 ggcttcaggt tatagicaag gatatgctgg ctcaacttc tacittgggg gcatggactg 900
 tggatcatat ttgacccct tgcattacca gcttcccgga ccaggggcca cactcagtc 960
 catgggiacc aatgcagica ccagccatct caatcagtc ccagcttctc ttccacca 1020
 gggatagga gcttcaagct tgggttttaa ctcaaccact gatigcttgg attataagga 1080
 ccaaactgcc tcttgaagc ttaacticaa tgcigactgc ttgattata aagatcagac 1140
 atctctgtgg aaattccagg ttttgtgaag acctgtagaa cctctttttg tgggtgatt 1200
 ttaaataac tgggtcggac attccagtt tagccaggca ttggttaaaa gatttagatg 1260
 ggatgatgct cagactcact tgaacaaagt tccgagaggc atagaaggaa aaacgaagg 1320
 ccttagaggg gcctacaaac cagcaaatg aaatggacaa accaatctgc ttaagatct 1380
 gtcattagtt tagatcatg gttatctga ttgcaaagt gatcaaaagc attctagcca 1440
 tgtgcaacca aacaccacca aaaataaaat caaacaacaa taagtgtga aggaaggag 1500
 ggaaggcat agccttctta agcagagggt tccatigtt ttagccaatc ctgtgtgaa 1560
 tcttaggaat gaacagtgc tcaagctcat tcacgttca tgaccaactg gtagttggca 1620
 ctgaaaaaac tttcagggc tgtgtgaatt ggtgactga ttgtctaga tgcactact 1680
 taittaaaaa ataatgtca taaggagica atatgtagtt taagagacaa tcagtgtgtg 1740
 tcttataaat ggtacatctg tggtttttaa tctgtgctag acttcaaac tgtgatctcc 1800
 tgttatigta tgcaacctg aacccacct ctgcaggggt tctctgtga ttaaataggt 1860

tataattata agcaaaattc agagcaactg agtactgac taaaaagatt accittggct 1920
ggaggtgagc tgcactigaaa ctttacgaca aaatgtctct ggacaaagag agtcagagaa 1980
gagaagcaaa aggacactaa ttcatctgta atttactgtt ggtaagccta gcagtaaaga 2040
5 gacattggtc aattgtctctg accctgaiga attattaaac tgagatcatt gtcgtttatg 2100
cttgcagatg ttaaatggaa aagttatata tgcataaacc tttcttctt ggatttggca 2160
gatatgiata atiatattaa aatggttcta gcacaaaaaa aaaaaaaaaa 2209

<210> 3

<211> 289

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Met Ser Tyr Leu Lys Gln Pro Pro Tyr Ala Val Asn Gly Leu Ser
1 5 10 15
Leu Thr Thr Ser Gly Met Asp Leu Leu His Pro Ser Val Gly Tyr Pro
20 25 30
Ala Thr Pro Arg Lys Gln Arg Arg Glu Arg Thr Thr Phe Thr Arg Ala
35 40 45
Gln Leu Asp Val Leu Glu Ala Leu Phe Ala Lys Thr Arg Tyr Pro Asp
50 55 60
Ile Phe Met Arg Glu Glu Val Ala Leu Lys Ile Asn Leu Pro Glu Ser
65 70 75 80

Arg Val Gln Val Trp Phe Lys Asn Arg Arg Ala Lys Cys Arg Gln Gln			
	85	90	95
Gln Gln Gln Gln Gln Asn Gly Gly Gln Asn Lys Val Arg Pro Ala Lys			
	100	105	110
Lys Lys Thr Ser Pro Ala Arg Glu Val Ser Ser Glu Ser Gly Thr Ser			
	115	120	125
Gly Gln Phe Thr Pro Pro Ser Ser Thr Ser Val Pro Thr Ile Ala Ser			
	130	135	140
Ser Ser Ala Pro Val Ser Ile Trp Ser Pro Ala Ser Ile Ser Pro Leu			
	145	150	155
Ser Asp Pro Leu Ser Thr Ser Ser Ser Cys Met Gln Arg Ser Tyr Pro			
	165	170	175
Met Thr Tyr Thr Gln Ala Ser Gly Tyr Ser Gln Gly Tyr Ala Gly Ser			
	180	185	190
Thr Ser Tyr Phe Gly Gly Met Asp Cys Gly Ser Tyr Leu Thr Pro Met			
	195	200	205
His His Gln Leu Pro Gly Pro Gly Ala Thr Leu Ser Pro Met Gly Thr			
	210	215	220

Asn Ala Val Thr Ser His Leu Asn Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Thr
225 230 235 240

5 Gln Gly Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gly Phe Asn Ser Thr Thr Asp Cys
245 250 255

10 Leu Asp Tyr Lys Asp Gln Thr Ala Ser Trp Lys Leu Asn Phe Asn Ala
260 265 270

Asp Cys Leu Asp Tyr Lys Asp Gln Thr Ser Ser Trp Lys Phe Gln Val
275 280 285

15 Leu

<210> 4

<211> 2082

20 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

25 cctccgaagc agtaaaccag cccctcigt tgtttgtttg ctttgccctt agttccacig 60
ctccaaaccc accaccaag gactctgaac ctgtccaccc cgggcgcac aagaatcttc 120
agctgggtac ccccgatttg ggccgacttt gcacctccaa acaaccttag calgatgtct 180
tactttaagc aaccgcctta cgcagtcaat gggctgagtc tgaccacttc gggtaiggac 240
ttgtgcacc cctccgtggg ctaccggcc acccccgga aacagcgccg ggagaggacg 300
acgttcactc gggcgcagct agatgtgcig gaagcactgt ttgccaagac ccggtaccca 360
gacatcttca tgcgagagga ggtggcacig aaaatcaact tgcgcgagtc gagggtcgag 420
glatggttta agaatcgaag agctaagtc cgccaacaac agcaacaaca gcagaatgga 480
ggtcaaaaca aagtgaagac tgccaaaaag aagacatctc cagctcgga agtgagtcca 540

gagagtggaa caagtggcca attcactccc cctctagca cctcagtc ccgacattgcc 600
 agcagcagtg ctcctgtgic taticggagc ccagcttcca tctcccact gtcagatccc 660
 ttgtccacct cctcttccig catgcagagg tctatccca tgacctatac tcaggcttca 720
 ggittatagtc aaggataigc tggctcaact tctactitg ggggcatgga ctgtggatca 780
 tatttgaccc ctatgcatca ccagcttccc ggaccagggg ccacactcag tcccatgggt 840
 accaatgcag tcaccagcca tctcaatcag tccccagctt cctttccac ccagggatat 900
 ggagcttcaa gcttgggttt taactcaacc actgattgct tggattataa ggaccaaact 960
 gcctcttga agcttaactt caatgctgac tgcctggatt alaaagatca gacatcctcg 1020
 tggaaattcc aggtttgtg aagaccigia gaacctcttt ttgtgggiga tttttaata 1080
 tactgggctg gacattccag ttttagccag gcattgggtt aaagagttag atgggatgat 1140
 gctcagactc atctgatcaa agttccgaga ggcatagaag gaaaaacgaa gggccitaga 1200
 ggggctaca aaccagcaac atgaaatgga caaaccaatc tgccttaagt cctgtcatag 1260
 ttttagatca ttggttatcc tgatttgcaa agtgatcaaa agcatcttag ccatgtgcaa 1320
 ccaaacacca ccaaaaataa aatcaaacaa aactaagtig tgaaggaagg gagggaaggt 1380
 catagccttc ttaagcagag gtgttccatt gtttagcca atccttgggt gaatcttagg 1440
 aatgaacagt gtctcaagct cattcacgtt tcatgaccaa ctggtagttg gcactgaaaa 1500
 aacttttcag ggctgtgtga attgtgtgac tgattgtcct agatgacta ctittattaa 1560
 aaaataatgt tcataaggag tcaatatgta gtttaagaga caatcagigt gtgtcttata 1620
 aatggtacat ctgtgggttt taatctgtgc tagacttcaa aactgtgac tccgtttatt 1680
 gtatgcaacc ttgaactcca cctctgcagg ggttctctg tgattaaata ggittataat 1740
 ataagcaaaa ttcagagcaa ctgagtagt atctaaaaag attacctttg gctggaggtg 1800
 agctgcactg aaactttacg acaaaatgtc tctggacaaa gagagtcaga gaagagaagc 1860
 aaaaggacac taaticatct glaatttact gtggtaagc ctagcagtaa agagacattg 1920
 gtcaatigct ctgacctga tgaattatta aactgagatc attgtcgttt atgcttcag 1980
 atgttaaatg gaaaagtta atatgcataa acctttctt cctggatttg gcagatatgt 2040
 ataattatat taaaatgggt ctagcacaaa aaaaaaaaaa aa 2082

<210> 5

<211> 289

<212> PRT

<213> Mus musculus

5 <400> 5

```

Met Met Ser Tyr Leu Lys Gln Pro Pro Tyr Ala Val Asn Gly Leu Ser
  1              5              10              15

Leu Thr Thr Ser Gly Met Asp Leu Leu His Pro Ser Val Gly Tyr Pro
              20              25              30

Ala Thr Pro Arg Lys Gln Arg Arg Glu Arg Thr Thr Phe Thr Arg Ala
              35              40              45

Gln Leu Asp Val Leu Glu Ala Leu Phe Ala Lys Thr Arg Tyr Pro Asp
              50              55              60

Ile Phe Met Arg Glu Glu Val Ala Leu Lys Ile Asn Leu Pro Glu Ser
              65              70              75              80

Arg Val Gln Val Trp Phe Lys Asn Arg Arg Ala Lys Cys Arg Gln Gln
              85              90              95

Gln Gln Gln Gln Gln Asn Gly Gly Gln Asn Lys Val Arg Pro Ala Lys
              100             105             110

Lys Lys Ser Ser Pro Ala Arg Glu Val Ser Ser Glu Ser Gly Thr Ser
              115             120             125

```

Gly Gln Phe Ser Pro Pro Ser Ser Thr Ser Val Pro Thr Ile Ala Ser
130 135 140

Ser Ser Ala Pro Val Ser Ile Trp Ser Pro Ala Ser Ile Ser Pro Leu
145 150 155 160

Ser Asp Pro Leu Ser Thr Ser Ser Ser Cys Met Gln Arg Ser Tyr Pro
165 170 175

Met Thr Tyr Thr Gln Ala Ser Gly Tyr Ser Gln Gly Tyr Ala Gly Ser
180 185 190

Thr Ser Tyr Phe Gly Gly Met Asp Cys Gly Ser Tyr Leu Thr Pro Met
195 200 205

His His Gln Leu Pro Gly Pro Gly Ala Thr Leu Ser Pro Met Gly Thr
210 215 220

Asn Ala Val Thr Ser His Leu Asn Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Thr
225 230 235 240

Gln Gly Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gly Phe Asn Ser Thr Thr Asp Cys
245 250 255

Leu Asp Tyr Lys Asp Gln Thr Ala Ser Trp Lys Leu Asn Phe Asn Ala
260 265 270

Asp Cys Leu Asp Tyr Lys Asp Gln Thr Ser Ser Trp Lys Phe Gln Val

275

280

285

5

Leu

<210> 6

<211> 1737

<212> ADN

10

<213> Mus musculus

<400> 6

```

caggtttatac tgggtctact ccataccctc tagtttigga gctgctgggg ggtggggggg      60
acggcgggggg tgggggacgc atctgcaact cctttaaag cctgtgccc gctctcccg      120
ggttcttttt agttagtgt ggaacgtgga ggaagctgt cctccgaag cagtaaacca      180
gcatttctgt ttgtttgtt gctttgccct tagttccgt actccaaatc taccaccaa      240
ggaccctgac ccgtccact ccaggcgaat cgagaccgtc cggctgggtc ccccaattt      300
gggccgactt tgcgcctcca aacaacctta gcatgatgc ttatctaaag caaccgcctt      360
acgcagtcaa tgggctgagt ctgaccactt cgggtatgga ctgtctgcat cctccgtgg      420
gtacccccgc cccccccgg aaacagcgaa gggagaggac gacatttact agggcacagc      480
tcgacgttct ggaagctctg ttgccaaga cccggtaccc agacatcttc atgagggaag      540
aggtggcact gaaaatcaac ttgccagaat ccagggtgca ggtatggttt aagaatcgaa      600
gagctaagtg ccgccaacag cagcagcagc agcagaatgg aggtcagaac aaagtgggc      660
ctgccaagaa gaagagctct ccagctcggg aagtgagttc agagagtggg acaagtgcc      720
agttcagtcc cccctctagt acctcagtcc caaccatgc cagcagcagt gctccagtgt      780
ctatctggag cccagcgtcc atctcccac tgtctgacce ctgtccact tctctcct      840
gcatgcagag gtcttatccc atgacctata ctgagcttc aggttatagt caaggctatg      900
ctggctcaac ttctacttt gggggcatgg actgtggaic ttatttgacc cctatgcatc      960
accagcttcc tggaccaggg gccacactca gtcccatggg taccaatgct gtaccagcc      1020
atctcaatca gtccccagct tctctttcca cccagggata tggagcttca agcttgggtt      1080

```

ttaactcaac cactgattgc ttggattata aggaccaaac tgccctcttg aagctiaact	1140
tcaatgctga ctgcttggat tataaagatc agacgtcctc atggaaattc caggttttgt	1200
gaagacctgt agaagctatt ttgtgggtg atttttaaat atgctgggct gaacattcca	1260
gttttagcca ggcatitggit aaaaaagita gatggaacga tgcctcaga ctctgatca	1320
aagttaccga gaggcataga aggaaaaagg aaggggcctt agaagggtcc atcaaccage	1380
aacctgaaat ggacaaacca atctacttaa gattcigtta tagttctaga tcatitgttt	1440
cctgatttgc aaatgattga tcaaatatat tctagcgaca tgcaaccaa taccactcaa	1500
aacaaaaatc cagcaaaact gattgtgag ggaagggagg gaaggatg gccttcaaag	1560
cagaggigat ccggtgtttt agccaatcct tggttgaatc itaggaatgg acaatgtccc	1620
aggctcattc acgtttcatg accaacaggt agttggcact gaaaaacttt tcagggtgt	1680
gtggattgtg cgactgattg tcctagatgc actactttat ttaaaaaaaaa aaaaaaa	1737

REIVINDICACIONES

1. Uso de un agente que comprende una proteína Otx2 o una sal de la misma para la inducción de la diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina ex vivo, en el que la proteína es Otx2

5 (1) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5; o

(2) una proteína que consiste en

(i) una secuencia de aminoácidos en la que se suprime 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5,

10 (ii) una secuencia de aminoácidos en la que se añade 1 aminoácido a la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5, o

(iii) una secuencia de aminoácidos en la que 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5 es sustituido con otro aminoácido,

y que tiene una acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina.

15 2. Uso según la reivindicación 1, en el que la proteína Otx2 consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5.

3. Uso de un agente que comprende un ADN o un ARN que codifica para una proteína Otx2 para inducir la diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina ex vivo, en el que el ADN comprende

(i) la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, o

20 (ii) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6 bajo condiciones altamente rigurosas y codifica para una proteína que tiene una acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina.

4. Uso según la reivindicación 3, en el que el ADN consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6.

25 5. Procedimiento no terapéutico para la inducción de la diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina, que comprende expresar una proteína Otx2, o aumentar una cantidad de expresión de una proteína Otx2, en el que la proteína Otx2 es

(1) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5, o

(2) una proteína que consiste en

30 (i) una secuencia de aminoácidos en la que se suprime 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5,

(ii) una secuencia de aminoácidos en la que se añade 1 aminoácido a la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5, o

35 (iii) una secuencia de aminoácidos en la que 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5 está sustituido con otro aminoácido,

y que tiene una acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina.

6. Procedimiento no terapéutico según la reivindicación 5, en el que la proteína Otx2 consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5.

40 7. Procedimiento no terapéutico para la inducción de la diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina según la reivindicación 5, que comprende expresar la proteína Otx2, o aumentar una cantidad de expresión de la proteína Otx2 en una célula derivada de tejido de globo ocular, una célula madre embrionaria, una célula madre neural o una célula precursora neural, siempre que las células no sean células madre embrionarias humanas.

45 8. Procedimiento no terapéutico para la inducción de la diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina según la reivindicación 5, en el que un ADN o un ARN que codifica para la proteína Otx2 es introducido en una célula derivada de tejido de globo ocular, una célula madre embrionaria, una célula madre neural o una célula precursora neural y la

célula resultante es cultivada, siempre que las células no sean células madre embrionarias humanas, en el que el ADN comprende

(i) la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, o

5 (ii) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6 bajo condiciones altamente rigurosas y codifica para una proteína que tiene una acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina.

9. Procedimiento no terapéutico según la reivindicación 8, en el que el ADN consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6.

10. Uso de una proteína Otx2, o una sal de la misma para la preparación de un agente para la prevención, el tratamiento o la supresión de la progresión de una enfermedad de la retina seleccionada de entre el grupo que consiste en retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad, retinitis pigmentosa y degeneración macular, en el que la proteína Otx2 es

(1) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5, o

15 (2) una proteína que consiste en

(i) una secuencia de aminoácidos en la que se suprime 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5,

(ii) una secuencia de aminoácidos en la que se añade 1 aminoácido a la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5, o

20 (iii) una secuencia de aminoácidos en la que 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5 está sustituido con otro aminoácido,

y que tiene una acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina.

11. Uso según la reivindicación 10, en el que la proteína Otx2 consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5.

25 12. Uso de un ADN o un ARN que codifica para una proteína Otx2 para la preparación de un agente para la prevención, el tratamiento o la supresión de la progresión de una enfermedad de la retina seleccionada de entre el grupo que consiste en retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad, retinitis pigmentosa y degeneración macular, en el que el ADN comprende

(i) la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, o

30 (ii) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6 bajo condiciones altamente rigurosas, y codifica para una proteína que tiene una acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina.

13. Uso según la reivindicación 12, en el que el ADN consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6.

35 14. Uso de un anticuerpo para una proteína Otx2, o una sal del mismo in vitro como un agente de diagnóstico para una enfermedad de la retina seleccionada de entre el grupo que consiste en retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad, retinitis pigmentosa y degeneración macular, en la que la proteína es Otx2

(1) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5, o

40 (2) una proteína que consiste en

(i) una secuencia de aminoácidos en la que se suprime 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5,

(ii) una secuencia de aminoácidos en la que se añade 1 aminoácido a la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5, o

45 (iii) una secuencia de aminoácidos en la que 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5 está sustituido con otro aminoácido,

y que tiene una acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina.

15. Uso según la reivindicación 14, en el que la proteína Otx2 consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5.

5 16. Procedimiento in vitro para el diagnóstico de una enfermedad de la retina seleccionada de entre el grupo que consiste en retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad, retinitis pigmentosa y degeneración macular, que comprende el uso de un anticuerpo para una proteína Otx2, o una sal del mismo, en el que la proteína Otx2 es

(1) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5, o

(2) una proteína que consiste en

10 (i) una secuencia de aminoácidos en la que se suprime 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N° 5,

(ii) una secuencia de aminoácidos en la que se añade 1 aminoácido a la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N° 5, o

15 (iii) una secuencia de aminoácidos en la que 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5 está sustituido con otro aminoácido,

y que tiene una acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina.

17. Procedimiento in vitro según la reivindicación 16, en el que la proteína Otx2 consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N° 5.

20 18. Procedimiento in vitro para el diagnóstico de una enfermedad de la retina seleccionada de entre el grupo que consiste en retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad, retinitis pigmentosa y degeneración macular, que comprende detectar una cantidad de expresión o una mutación de una proteína Otx2, en el que la proteína Otx2 es

(1) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N° 5, o

(2) una proteína que consiste en

25 (i) una secuencia de aminoácidos en la que se suprime 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5,

(ii) una secuencia de aminoácidos en la que se añade 1 aminoácido a la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N° 5, o

30 (iii) una secuencia de aminoácidos en la que 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5 está sustituido con otro aminoácido,

y que tiene una acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina.

19. Procedimiento in vitro según la reivindicación 18, en el que la proteína Otx2 consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N° 5.

35 20. Uso de (a) un ADN o un ARN que codifica para una proteína Otx2, o (b) un polinucleótido antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos de dicho ADN o ARN in vitro como un agente de diagnóstico para una enfermedad de la retina seleccionada de entre el grupo que consiste en retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad, retinitis pigmentosa y degeneración macular, en el que el ADN comprende

(i) la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, o

40 (ii) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6 bajo condiciones altamente rigurosas y codifica para una proteína que tiene una acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina.

21. Uso según la reivindicación 20, en el que el ADN consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6.

45 22. Procedimiento in vitro para el diagnóstico de una enfermedad de la retina seleccionada de entre el grupo que

consiste en retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad, retinitis pigmentosa y degeneración macular, que comprende el uso de (a) un ADN o un ARN que codifica para una proteína Otx2, o (b) un polinucleótido antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos de dicho ADN o ARN, en el que el ADN comprende

- 5 (i) la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, o
(ii) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6 bajo condiciones altamente rigurosas y codifica para una proteína que tiene una acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina.
- 10 23. Procedimiento in vitro según la reivindicación 22, en el que el ADN consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6.
24. Procedimiento de selección de un compuesto que tiene una acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina, o una sal del mismo, que comprende el uso, como un índice, de una expresión de, o un aumento de la cantidad de expresión de una proteína Otx2, en el que la proteína Otx2 es
15 (1) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N° 5, o
(2) una proteína que consiste en
(i) una secuencia de aminoácidos en la que se suprime 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5,
(ii) una secuencia de aminoácidos en la que se añade 1 aminoácido a la secuencia de aminoácidos
20 representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N° 5, o
(iii) una secuencia de aminoácidos en la que 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5 está sustituido con otro aminoácido,
y que tiene una acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina.
- 25 25. Procedimiento de selección según la reivindicación 24, en el que la proteína Otx2 consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N° 5.
26. Procedimiento de selección según la reivindicación 24, en el que se usa una célula que tiene la capacidad de expresar la proteína Otx2.
27. Procedimiento de selección según la reivindicación 26, en el que la célula es un transformante con un ADN, en el que el ADN comprende
30 (i) la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, o
(ii) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6 bajo condiciones altamente rigurosas, y codifica para una proteína que tiene una acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina.
- 35 28. Procedimiento de selección según la reivindicación 27, en el que el ADN consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6.
29. Uso de un kit que comprende una célula que tiene una capacidad de expresar una proteína Otx2 para la selección de un compuesto que tiene una acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina, o una sal del mismo, en el que la proteína Otx2 es
40 (1) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N° 5, o
(2) una proteína que consiste en
(i) una secuencia de aminoácidos en la que se suprime 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5,
(ii) una secuencia de aminoácidos en la que se añade 1 aminoácido a la secuencia de aminoácidos
45 representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N° 5, o

(iii) una secuencia de aminoácidos en la que 1 aminoácido en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 3 o la SEC ID N°: 5 está sustituido con otro aminoácido,

y que tiene una acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina.

30. Uso según la reivindicación 29, en el que la célula es

5 (1) un transformante con un ADN que comprende

(i) la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6, o

(ii) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6 bajo condiciones altamente rigurosas, y codifica para una proteína que tiene una acción inductora de diferenciación en una célula fotorreceptora de la retina; o

10 (2) una célula que originalmente tiene una capacidad de expresar el ADN que comprende la secuencia de nucleótidos como se define en (i) o (ii).

31. Uso según la reivindicación 30, en el que el ADN consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID N°: 2, la SEC ID N°: 4 o la SEC ID N°: 6.

15

Fig. 1



Fig. 2

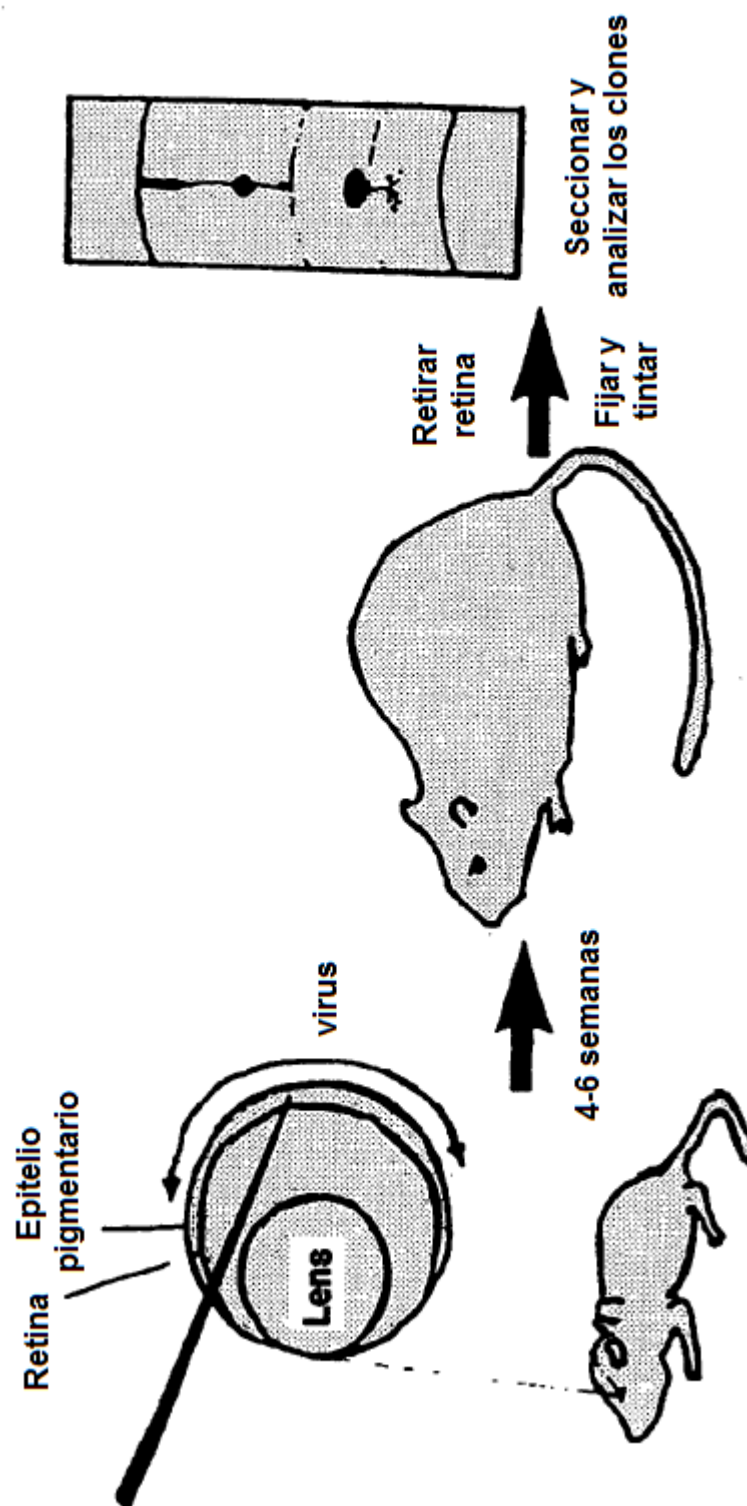


Fig. 3

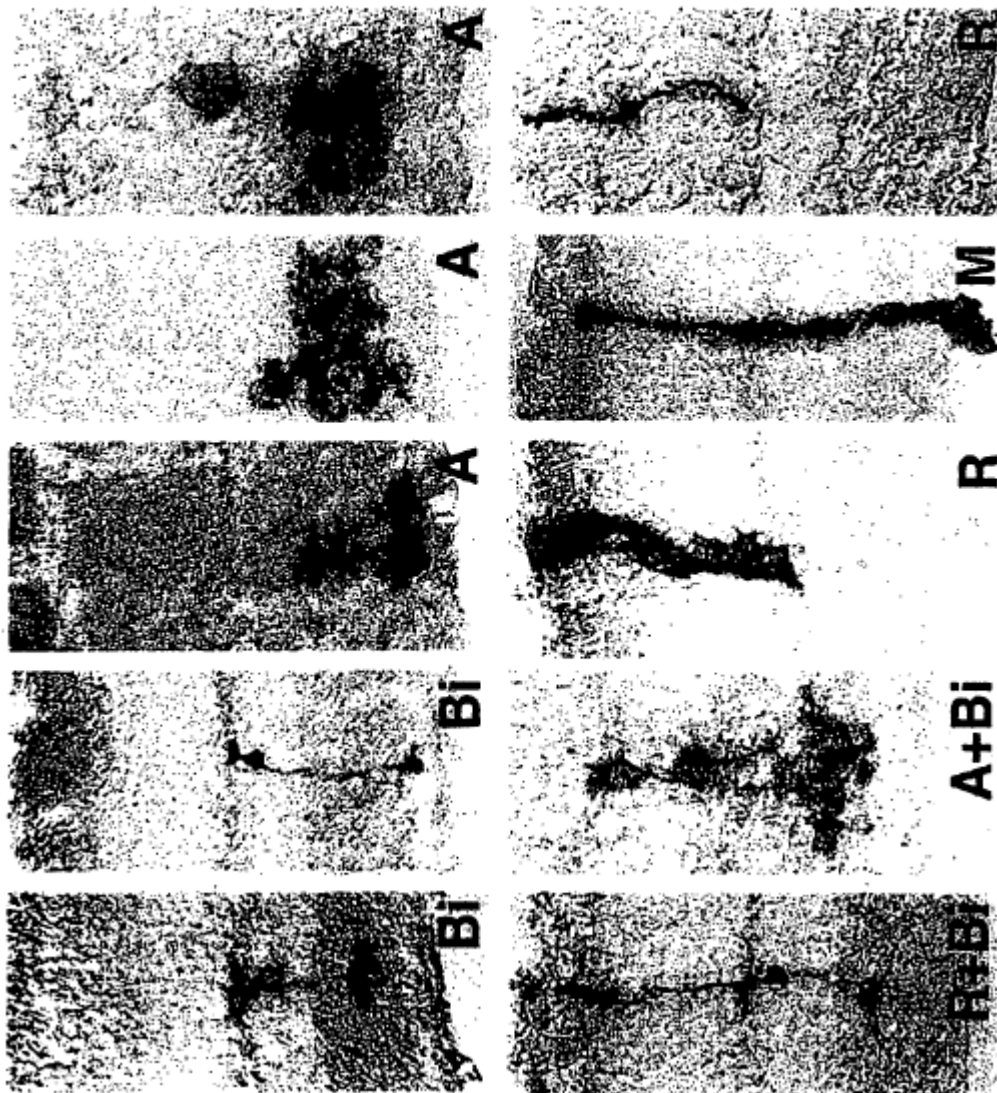


Fig. 4

