

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 980**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2009 E 09782880 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015 EP 2328917**

54 Título: **Factor de viabilidad neuronal y uso del mismo**

30 Prioridad:

10.09.2008 EP 08305541

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.10.2015

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE (100.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**LEVEILLARD, THIERRY;
JAILLARD, CÉLINE y
SAHEL, JOSÉ-ALAIN**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 548 980 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

Factor de viabilidad neuronal y uso del mismo

5 Sector de la técnica

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para la detección y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. En particular, la invención se refiere a polipéptidos que pueden proteger frente a la degeneración neuronal, a moléculas de ácido nucleico que codifican dichos polipéptidos y a anticuerpos que reconocen dichos polipéptidos.

Estado de la técnica

La expresión "trastorno neurodegenerativo" abarca una serie de afecciones gravemente debilitantes que se caracterizan por degeneración neuronal.

Como ejemplo de dicho trastorno neurodegenerativo, la retinitis pigmentosa (RP) es una degeneración de la retina genéticamente heterogénea caracterizada por la degeneración secuencial de una población de neuronas que corresponden a los fotorreceptores de los conos y los bastones.

Los fotorreceptores son una subserie especializada de neuronas de la retina que son responsables de la visión. Los fotorreceptores consisten en bastones y conos que son las células fotosensibles de la retina. Cada bastón y cono elabora un cilio especializado, denominado segmento externo, que alberga la maquinaria de la fototransducción. Los batones contienen un pigmento visual absorbente de luz específico, la rodopsina. Hay tres clases de conos en los seres humanos, caracterizados por la expresión de distintos pigmentos visuales: los pigmentos de los conos azules, de los conos verdes y de los conos rojos. Cada tipo de proteína de pigmento visual está adaptado para absorber luz de forma máxima a diferentes longitudes de onda. La rodopsina de los bastones media la visión escotópica (en luz débil), mientras que los pigmentos de los conos son responsables de la visión fotópica (en luz brillante). Los pigmentos rojos, azules y verdes también constituyen la base de la visión de los colores en los seres humanos. Los pigmentos visuales presentes en los bastones y en los conos responden a la luz y generan un potencial de acción en las células de salida, las neuronas bipolares de los bastones, que después se transmite por las neuronas ganglionares de la retina para producir un estímulo visual en la corteza visual.

En los seres humanos, varias enfermedades de la retina implican una degeneración progresiva y finalmente la muerte de los fotorreceptores, que conduce inexorablemente a la ceguera. La degeneración de los fotorreceptores, tal como la producida por distrofias hereditarias de la retina (por ejemplo, trastornos degenerativos de la retina), degeneración macular relacionada con la edad y otras maculopatías, o desprendimiento de retina, se caracteriza por una atrofia progresiva y pérdida de función de los segmentos externos de los fotorreceptores. Además, la muerte de los fotorreceptores o la pérdida de la función de los fotorreceptores dan como resultado una diferenciación parcial de neuronas retinianas de segundo orden (células bipolares de los bastones y células horizontales) en pacientes con distrofias de la retina, reduciéndose de esta manera la eficacia global de la propagación de la señal eléctrica generada por los fotorreceptores. Los cambios secundarios en el epitelio pigmentado y en la glía ocasionados por la degeneración de los fotorreceptores producen cambios vasculares que conducen a isquemia y gliosis.

Los factores tróficos que son capaces de rescatar a los fotorreceptores de la muerte celular y/o de restaurar la función de los fotorreceptores disfuncionales (atróficos o distróficos) pueden representar terapias útiles para el tratamiento de dichas afecciones. Por ejemplo, el documento WO02081513 ha descrito el uso de los factores de viabilidad de conos derivado de bastones 1 y 2 (RdCVF1 y RdCVF2) para el tratamiento de trastornos degenerativos de la retina. El gen RdCVF, también denominado tioredoxina de tipo 6 (Txnl6) y, más recientemente, Nucleoredoxina (Nxn1), codifica la proteína Q8VC33 UniProt, que tiene una similitud limitada con la superfamilia de la tioredoxina y que ejerce actividad trófica sobre los fotorreceptores de los conos (LEVEILLARD *et al.*, Nat. Genet. vol. 36(7), p:755-759, 2004).

Sin embargo, existe la necesidad de identificar factores tróficos de neuronas, en particular fotorreceptores de conos que refuercen el tratamiento y el diagnóstico de trastornos degenerativos, en particular trastornos degenerativos de la retina.

Objeto de la invención

Los inventores han identificado ahora una nueva isoforma del polipéptido RdCVF2 (denominado "RdCVF2v") descrito en la solicitud de patente internacional WO02081513.

La presente invención se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 4.

La presente invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica dicho polipéptido.

La presente invención también se refiere al tratamiento de un trastorno neurodegenerativo.

Descripción detallada de la invención

5 **Definiciones**

Como se usa en el presente documento, el término "RdCVF2" se refiere a cualquier isoforma del factor de viabilidad de conos derivado de bastones 2.

10 Como se usa en el presente documento, el término "RdCVF2v" se refiere a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 4.

15 (MVDVLGGRRLVTREGTVVEAEVALQNQVVALYFAAGRCSPSRDFTPLLCDFYTEL
VSEARRPAPFEVVFVSADGSAEEMLDFMRELHGSLALPFHDPYRQSQCPIPPN
LGFSIHGAPVCQRFLPFTIGVSGIHMSQEPQDCCELKKRYEITAIPKLVVIKQNGAVITN
KGRKQIRERGLACFQNWVEAADVFQNFSG)

La SEC ID N° 4 consiste en las siguientes secuencias, desde el extremo N al extremo C:

20 - la secuencia de aminoácidos que es común tanto para la isoforma larga como para la isoforma corta de RdCVF2 como se describe en el documento WO02081513:

25 MVDVLGGRRLVTREGTVVEAEVALQNKVVVALYFAAGRCSPSRDFTPL
LCDFYTELVSEARRPAPFEVVFVSADGSAEEMLDFMRELHGSLALP
FHDPYR (SEC ID N° 1);

- una secuencia de aminoácidos que es única para esta isoforma variante:

30 QSQCPIPPNLGFSIHGAPVCQRFLPFTIGVSGIHMSQEPQDC (SEC ID N° 2)

- la secuencia de aminoácidos que está presente es la isoforma larga pero no la isoforma corta de RdCVF2:

35 ELKKRYEITAIPKLVVIKQNGAVITNKGRKQIRERGLACFQNWVEAADV
FQNFSG (SEC ID N° 3).

Se desvela un polipéptido que comprende:

- 40 a) la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 1 o una variante de la misma, donde dicha variante tiene al menos una identidad del 90 % con la SEC ID N° 1 y
- b) la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 2 o una variante de la misma, donde dicha variante tiene al menos un 90 % de identidad con la SEC ID N° 2 y
- c) la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 3 o una variante de la misma, donde dicha variante tiene al menos un 90 % de identidad con la SEC ID N° 3

45 o un fragmento del mismo, donde dicho fragmento comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 2 o una variante de la misma que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEC ID N° 2 y donde dicho fragmento de la misma presenta actividad de rescate de neuronas.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "polipéptido de la invención" se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 4.

55 Como se usa en el presente documento, la expresión "compuesto que se une selectivamente a un polipéptido de la invención" se refiere a un compuesto, tal como un anticuerpo o un aptámero, que se une a un polipéptido de la invención pero no a las otras isoformas de RdCVF. En otros términos, un compuesto que se une selectivamente a un polipéptido de la invención se une, al menos en parte, a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 2 o variante de la misma.

60 Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de ácido nucleico de la invención" se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención.

65 Como se usa en el presente documento, la expresión "variante alélica" se refiere a una secuencia de nucleótidos que existe en un locus dado o a un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos. Como se usan en el presente documento, las expresiones "gen" y "gen recombinante" se refieren a moléculas de ácido nucleico que comprenden una fase de lectura abierta que codifica un polipéptido de la invención.

Como se usa en el presente documento, la expresión "hibrida en condiciones rigurosas" pretende describir

condiciones para hibridación y lavado en las cuales típicamente se mantienen hibridadas entre sí secuencias de nucleótidos con al menos un 60 % (65 %, 70 %, preferentemente 75 %) de identidad. Dichas condiciones rigurosas se conocen por expertos en la materia y pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. En un ejemplo no limitante, las condiciones de hibridación rigurosas son la hibridación en cloruro sódico 6X/citrato sódico (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en SSC 0,1X, SDS al 0,2 % a aproximadamente a 68 °C. Un ejemplo no limitante preferido de condiciones de hibridación rigurosas son la hibridación en SSC6X a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en SSC 0,2X, SDS al 0,1 % a 50-60 °C (es decir, uno o más lavados a 50 °C, 55 °C, 60 °C o 65 °C). Preferentemente, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de la SEC ID N° 5, o un complemento de la misma, corresponde a una molécula de ácido nucleico natural.

La expresión "molécula de ácido nucleico que hibrida selectivamente con una molécula de ácido nucleico que codifica la SEC ID N° 2" se refiere a un ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con un ácido nucleico que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEC ID N° 2 o una variante de la misma que tiene al menos un 90 %, preferentemente un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de identidad con la SEC ID N° 2.

Como se usa en el presente documento, una molécula de ácido nucleico "natural" se refiere a una molécula de ARN o ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que existe en la naturaleza (por ejemplo, codifica una proteína natural).

Por "purificado" y "aislado" se entiende, cuando se hace referencia a un polipéptido o una secuencia de nucleótidos, que la molécula indicada está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. El término "purificado", como se usa en el presente documento, preferentemente significa que está presente al menos un 75 % en peso, más preferentemente al menos un 85 % en peso, aún más preferentemente al menos un 95 % y aún más preferentemente al menos un 98 % en peso de macromoléculas biológicas del mismo tipo. Una molécula de ácido nucleico "aislada" que codifica un polipéptido particular se refiere a una molécula de ácido nucleico que carece sustancialmente de otras moléculas de ácido nucleico que no codifican el polipéptido objeto; sin embargo, la molécula puede incluir algunas bases o restos adicionales que no afectan de forma perjudicial a las características básicas de la composición.

Dos secuencias de aminoácidos o secuencias de ácido nucleico son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando son idénticas en más del 85 %, preferentemente más del 90 % de las secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico, o son similares (funcionalmente idénticas) en más de aproximadamente el 90 %, preferentemente más del 95 %. Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para conseguir una comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse espacios vacíos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para conseguir un alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico). Después se comparan los restos de aminoácido o nucleótido en las posiciones de aminoácido o posiciones de nucleótido correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias. En una realización, las dos secuencias son de la misma longitud. La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede conseguirse usando un algoritmo matemático. Preferentemente, las secuencias similares u homólogas se identifican por alineamiento usando, por ejemplo, el programa Pileup GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Versión 7, Madison, Wisconsin) o cualquier algoritmo de comparación de secuencias tal como BLAST, FASTA, etc.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" tienen el mismo significado y se usan indistintamente en la presente invención. Anticuerpo se refiere a moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une de forma inmuno-específica a un antígeno. Como tal, el término anticuerpo incluye no solo moléculas de anticuerpo entero, sino también fragmentos de anticuerpo así como variantes (incluyendo derivados) de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo. En los anticuerpos naturales, dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces disulfuro y cada cadena pesada está unida a una cadena ligera por un enlace disulfuro. Hay dos tipos de cadena ligera, lambda (λ) y kappa (κ). Hay cinco clases (o isotipos) principales de cadena pesada que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada cadena contiene dominios de secuencia distintos. La cadena ligera incluye dos dominios, un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). La cadena pesada incluye cuatro dominios, un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3, denominados colectivamente CH). Las regiones variables tanto de las cadenas ligeras (VL) como de las cadenas pesadas (VH) determinan el reconocimiento y la especificidad de unión al antígeno. Los dominios de región constante de las cadenas ligera (CL) y pesada (CH) confieren propiedades biológicas importantes tales como la asociación de cadenas de anticuerpo, la secreción, la movilidad transplacentaria, la unión al complemento y la unión a receptores Fc (FcR). El fragmento Fv es la parte N-terminal del fragmento Fab de una inmunoglobulina y consiste en las partes variables de una cadena ligera y una cadena pesada. La especificidad del anticuerpo reside en la complementariedad estructural entre el sitio de combinación del anticuerpo y el determinante antigénico. Los sitios de combinación de anticuerpos están

constituidos por restos que proceden principalmente de las regiones hipervariables o determinantes de complementariedad (CDR). Ocasionalmente, los restos de regiones no hipervariables o marco conservadas (FR) influyen en la estructura global del dominio y, por lo tanto, en el sitio de combinación. Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) se refieren a secuencias de aminoácidos que, conjuntamente, definen la afinidad de unión y la especificidad de la región Fv natural de un sitio de unión de inmunoglobulina nativa. Las cadena ligera y pesada de una inmunoglobulina tienen, cada una, tres CDR, denominadas L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 y H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, respectivamente. Por lo tanto, un sitio de unión a antígeno incluye seis CDR que comprenden el conjunto de CDR de cada una de una región V de cadena pesada y de cadena ligera. Las regiones marco conservadas (FR) se refieren a secuencias de aminoácidos interpuestas entre CDR, es decir, a las partes de regiones variables de cadena ligera y de cadena pesada de inmunoglobulina que están relativamente conservadas entre diferentes inmunoglobulinas en una sola especie, como se define por Kabat, *et al.* (Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991)). Como se usa en el presente documento, una "región marco conservada humana" es una región marco conservada que es sustancialmente idéntica (aproximadamente en un 85 %, o más, en particular en un 90 %, 95 % o 100 %) a la región marco conservada de un anticuerpo humano natural.

La expresión "anticuerpo monoclonal" o "mAb", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de anticuerpo de una sola composición de aminoácidos que se dirige contra un antígeno específico y que se produce por un solo clon de células B o hibridoma.

La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo obtenido por ingeniería genética que comprende un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo procedente de un animal no humano, en asociación con un dominio CH y un dominio CL de otro anticuerpo, en particular, un anticuerpo humano. Como animal no humano puede usarse cualquier animal tal como ratón, rata, hámster, conejo o similares.

La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que las regiones marco conservadas o "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) se han modificado para comprender la CDR de una inmunoglobulina donante de especificidad diferente en comparación con la de la inmunoglobulina parental. En una realización preferida, una CDR de ratón se injerta en la región marco conservada de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado".

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂, diacuerpos y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" comprende todo o parte (preferentemente biológicamente activa) de un polipéptido de la invención unido operativamente a un polipéptido heterólogo (es decir, un polipéptido distinto del mismo polipéptido de la invención). Dentro de la proteína de fusión, la expresión "unido operativamente" pretende indicar que el polipéptido de la invención y el polipéptido heterólogo están fusionados en fase entre sí. El polipéptido heterólogo puede fusionarse al extremo N o al extremo C del polipéptido de la invención.

El término "neurona" se refiere a una célula eléctricamente excitable en el sistema nervioso que puede procesar y transmitir información. Típicamente, una neurona de acuerdo con la invención es una neurona de vertebrado, preferentemente una neurona de mamífero, incluso más preferentemente una neurona humana. El término neurona incluye, pero sin limitación, neuronas cerebrales (por ejemplo, bipolares - pseudounipolares - multipolares - piramidales - Purkinje - granulares - corticales...) fotorreceptores y neuronas sensoriales olfatorias.

La expresión "actividad de rescate de neuronas" se refiere a la capacidad de los polipéptidos de la invención de mantener la supervivencia de una neurona. Típicamente, para evaluar la capacidad de presentar actividad de rescate de neuronas de un polipéptido, el experto puede incubar neuronas (por ejemplo, células de Purkinje, neuronas corticales, fotorreceptores, neuronas sensoriales olfatorias...) con medio acondicionado procedente de células que expresan el polipéptido a evaluar y, posteriormente, evaluar el número de neuronas supervivientes. Típicamente, se considera que un polipéptido presenta actividad de rescate de neuronas si aumenta el número de neuronas viables en al menos uno de los siguientes ensayos, descritos en el Ejemplo mostrado más adelante: actividad de rescate de conos, actividad de rescate de neuronas sensoriales olfatorias, actividad de rescate de células de Purkinje y actividad de rescate de neuronas corticales.

En el contexto de la invención, el término "tratamiento", como se usa en el presente documento, significa la reversión, alivio, inhibición del progreso de o prevención del trastorno o afección al que se aplica dicho término, o de uno o más síntomas de dicho trastorno o afección (por ejemplo, trastornos neurodegenerativos).

Como se usa en el presente documento, la expresión "trastorno neurodegenerativo" se refiere a una enfermedad asociada con la degeneración de neuronas tales como trastornos degenerativos del sistema nervioso central, trastornos degenerativos de la retina o trastornos degenerativos de las neuronas olfatorias. Típicamente, los trastornos degenerativos de acuerdo con la invención incluyen, pero sin limitación, alcoholismo, enfermedad de

Alexander, enfermedad de Alper, enfermedad, de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, Ataxia telangiectasia, enfermedad de Batten (también conocida como enfermedad de Spielmeyer-Vogt-Sjogren-Batten), encefalopatía espongiiforme bovina (EEB), enfermedad de Canavan, síndrome de Cockayne, degeneración Corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Huntington, demencia asociada con el HIV, enfermedad de Kennedy, enfermedad de Krabbe, demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad de Machado-Joseph (ataxia espinocerebelar de tipo 3), esclerosis múltiple, atrofia multisistémica, narcolepsia, neuroborreliosis, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedad de Pick, esclerosis lateral primaria, enfermedades producidas por priones, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Refsum, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Schilder, degeneración combinada subaguda de médula espinal causada por anemia perniciosa, enfermedad de Spielmeyer-Vogt-Sjogren-Batten (también conocida como enfermedad de Batten), ataxia espinocerebelar (múltiples tipos con características variables), atrofia muscular espinal, enfermedad de Steele-Richardson-Olszewski, Tabes dorsalis y trastornos degenerativos de la retina.

La expresión "trastornos degenerativos de la retina" incluye todas las enfermedades asociadas con la degeneración de los conos. Los trastornos degenerativos de la retina incluyen, pero sin limitación, retinitis pigmentosa, degeneración macular relacionada con la edad, síndrome de Bardet-Biedel, síndrome de Bassen-Kornzweig, enfermedad de Best, coroideremia, atrofia girada, amaurosis congénita de Leber, enfermedad de Refsum, enfermedad de Stargardt o síndrome de Usher.

De acuerdo con la invención, la expresión "paciente" o "paciente que lo necesita" se refiere a un mamífero humano o no humano afectado o con probabilidad de estar afectado con trastornos degenerativos de la retina.

La expresión "muestra biológica" significa cualquier muestra biológica derivada de un paciente. Los ejemplos de dichas muestras incluyen fluidos, tejidos, muestras celulares, órganos, biopsias, etc. Son muestras biológicas preferidas sangre entera, suero o plasma.

Polipéptidos de la invención:

Un aspecto de la invención se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 4.

Se desvela un polipéptido que comprende:

- a) la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 1 o una variante de la misma, donde dicha variante tiene al menos un 90 % de identidad con la SEC ID N° 1 y
- b) la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 2 o una variante de la misma, donde dicha variante tiene al menos un 90 % de identidad con la SEC ID N° 2 y
- c) la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 3 o una variante de la misma, donde dicha variante tiene al menos un 90 % de identidad con la SEC ID N° 3

o un fragmento del mismo, donde dicho fragmento comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 2 o una variante del mismo que tienen al menos un 90 % de identidad con la SEC ID N° 2 y donde dicho fragmento presenta actividad de rescate de neuronas.

Se desvela un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 1 o una variante del mismo, donde dicha variante tiene al menos un 91 %, preferentemente un 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de identidad con la SEC ID N° 1.

Se desvela un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 2 o una variante del mismo, donde dicha variante tiene al menos un 91 %, preferentemente un 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de identidad con la SEC ID N° 2.

En una realización, el polipéptido de la invención comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 2 o una variante del mismo, donde dicha variante tiene al menos un 91 %, preferentemente un 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de identidad con la SEC ID N° 2.

Se desvela un polipéptido que comprende variantes de la SEC ID N° 1, SEC ID N° 2 y SEC ID N° 3, donde dichas variantes tienen al menos un 91 %, preferentemente un 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de identidad con la SEC ID N° 1, SEC ID N° 2 y SEC ID N° 3 respectivamente, seleccionándose cada valor de forma independiente.

De acuerdo con un aspecto de la invención, el polipéptido de la invención tiene una longitud que no excede de 500 aminoácidos, preferentemente 400 aminoácidos, preferentemente 350, 300, 290, 280, 270, 260, 250, 240, 230, 220, 210, 200 o 198 aminoácidos.

De acuerdo con un aspecto de la invención, el polipéptido de la invención tiene una longitud que no excede de 150,

preferentemente 145, incluso más preferentemente 143 aminoácidos.

Los polipéptidos de la invención incluyen polipéptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEC ID N° 1, SEC ID N° 2 y SEC ID N° 3. Se desvela un polipéptido o fragmento del mismo como se ha descrito anteriormente, donde dicha secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 1 o variante de la misma está localizada en el extremo N de la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 2 o una variante de la misma, y donde dicha secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 2 o variante de la misma está localizada en el extremo N de la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 3 o una variante de la misma.

Se desvela un polipéptido o fragmento del mismo, como se ha descrito anteriormente, donde dicho polipéptido o fragmento del mismo tiene al menos un 90 % de identidad, preferentemente al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 99,5 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 4 y donde dicho polipéptido o fragmento del mismo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad, preferentemente al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de identidad con la SEC ID N° 2.

Típicamente, el polipéptido de la invención puede consistir en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4 (RdCVF2v).

Típicamente, los polipéptidos de la invención presentan actividad de rescate de neuronas.

En una realización, el polipéptido nativo puede aislarse a partir de células o fuentes de tejido mediante un esquema de purificación apropiado usando técnicas de purificación de proteínas convencionales. En otra realización, los polipéptidos de la invención se producen por técnicas de ADN recombinante. Como alternativa a la expresión recombinante, un polipéptido de la invención puede sintetizarse químicamente usando técnicas de síntesis de péptidos convencionales.

La invención también proporciona proteínas quiméricas o de fusión. Una proteína de fusión útil es una proteína de fusión GST en la que el polipéptido de la invención está fusionado al extremo C de secuencias GST. Dichas proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de un polipéptido recombinante de la invención.

En otra realización, la proteína de fusión contiene una secuencia señal heteróloga en su extremo N. Por ejemplo, la secuencia señal nativa de un polipéptido de la invención puede retirarse y reemplazarse por una secuencia señal de otra proteína. Por ejemplo, la secuencia secretora gp67 de la proteína de la envuelta de baculovirus puede usarse como secuencia señal heteróloga (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, 1992). Otros ejemplos de secuencias señal heterólogas eucarióticas incluyen las secuencias secretoras de la melitina y la fosfatasa alcalina placentaria humana (Stratagene; La Jolla, Calif.). En otro ejemplo, las secuencias señal heterólogas procarióticas útiles incluyen la señal secretora phoA (Sambrook *et al.*, supra) y la señal secretora de la proteína A (Pharmacia Biotech; Piscataway, N.J.).

Las proteínas quiméricas y de fusión de la invención pueden producirse por técnicas de ADN recombinantes convencionales. En otra realización, el gen de fusión puede sintetizarse por técnicas convencionales, incluyendo sintetizadores de ADN automáticos. Como alternativa, la amplificación por PCR de fragmentos génicos puede realizarse usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que posteriormente pueden hibridarse y reamplificarse para generar una secuencia de gen quimérico (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, supra). Además, en el mercado están disponibles muchos vectores de expresión que ya codifican un resto de fusión (por ejemplo un polipéptido GST). Un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención puede clonarse en dicho vector de expresión de tal forma que el resto de fusión esté unido en fase con el polipéptido de la invención.

Puede usarse una secuencia señal para facilitar la secreción y aislamiento de la proteína secretada u otras proteínas de interés. Las secuencias señal típicamente se caracterizan por un núcleo de aminoácidos hidrófobos que generalmente se escinden de la proteína madura durante la secreción en uno o más acontecimientos de escisión. Dichos péptidos señal contienen sitios de procesamiento que permiten la escisión de la secuencia señal de las proteínas maduras según pasan a través de la ruta de secreción. De esta manera, la invención se refiere a los polipéptidos descritos que tienen una secuencia señal, así como a la propia secuencia señal y al polipéptido en ausencia de la secuencia señal (es decir, los productos de escisión). En una realización, una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia señal de la invención puede unirse operativamente en un vector de expresión a una proteína de interés, tal como una proteína que normalmente no se secreta o que es difícil de aislar por otra razón. La secuencia señal dirige la secreción de la proteína, tal como desde un hospedador eucariótico en el que se ha introducido el vector de expresión por transformación, y la secuencia señal se escinde posteriormente o simultáneamente. La proteína después puede purificarse fácilmente del medio extracelular por métodos reconocidos en la técnica. Como alternativa, la secuencia señal puede unirse a la proteína de interés usando una secuencia que facilita la purificación, tal como con un dominio GST.

Típicamente, las variantes de acuerdo con la invención pueden generarse por mutagénesis, por ejemplo, mutación

puntual discreta o truncamiento.

5 Los polipéptidos de la invención pueden presentar modificaciones postraduccionales incluyendo, pero sin limitación, glicosilaciones (por ejemplo, N- u O-glicosilaciones), miristilaciones, palmitilaciones, acetilaciones y fosforilaciones (por ejemplo, serina/treonina o tirosina).

Los polipéptidos de la invención pueden producirse por cualquier técnica conocida per se en este campo, tal como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, sola o en combinación.

10 Conociendo la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada, un experto en la materia puede producir fácilmente dichos polipéptidos mediante técnicas convencionales para la producción de polipéptidos. Por ejemplo, pueden sintetizarse usando métodos en fase sólida bien conocidos, preferentemente usando un aparato de síntesis de péptidos disponible en el mercado (tal como el fabricado por Applied Biosystems, Foster City, California) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

15 Como alternativa, los polipéptidos de la invención pueden sintetizarse por técnicas de ADN recombinante como es bien conocido en la técnica. Por ejemplo, estos fragmentos pueden obtenerse como productos de expresión de ADN después de la incorporación de secuencias de ADN que codifican el polipéptido deseado en vectores de expresión y de la introducción de dichos vectores en hospedadores eucariotas o procariotas adecuados que expresarán el polipéptido deseado, a partir del cual pueden aislarse posteriormente usando técnicas bien conocidas.

Los polipéptidos de la invención pueden usarse en una forma aislada (por ejemplo, purificada) o están incluidos en un vector, tal como una vesícula de membrana o de lípidos (por ejemplo, un liposoma).

25 **Moléculas de ácido nucleico de la invención**

Un aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un polipéptido de la invención, así como a moléculas de ácido nucleico suficientes para usarse como sondas de hibridación para identificar moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de la invención y a fragmentos de dichas moléculas de ácido nucleico adecuados para usarse como cebadores de PCR para la amplificación o mutación de moléculas de ácido nucleico.

La invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de la invención.

35 En una realización particular, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que tiene la secuencia de nucleótidos indicada en la SEC ID N° 5.

40 Una molécula de ácido nucleico de la presente invención puede aislarse usando técnicas de biología molecular convencionales y la información de secuencia proporcionada en el presente documento. Usando todo o una parte de las secuencias de ácido nucleico de la invención como sonda de hibridación, las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden aislarse usando técnicas de hibridación y clonación convencionales (por ejemplo, como se describe en Sambrook *et al.*, eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

45 Una molécula de ácido nucleico de la invención puede amplificarse usando ADNc, ARNm o ADN genómico como molde y cebadores oligonucleotídicos apropiados de acuerdo con... convencionales

50 El ácido nucleico amplificado de esta manera puede clonarse en un vector apropiado y caracterizarse por análisis de la secuencia de ADN. Además, pueden prepararse oligonucleótidos correspondientes a todo o a parte de una molécula de ácido nucleico de la invención por técnicas de síntesis convencionales, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN automático.

55 En otra realización preferida, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención comprende una molécula de ácido nucleico que es un complemento de la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 5. Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de nucleótidos dada es una que es suficientemente complementaria a la secuencia de nucleótidos dada como para hibridar con la secuencia de nucleótidos dada formando de esta manera un dúplex estable.

60 Además, la molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender únicamente una parte de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención, por ejemplo, un fragmento que puede usarse como sonda o cebador o un fragmento que codifica una parte biológicamente activa de un polipéptido de la invención. La secuencia de nucleótidos determinada por la clonación de un gen permite la generación de sondas y cebadores diseñados para usarse en la identificación y/o clonación de homólogos en otros tipos celulares, por ejemplo, procedentes de otros tejidos, así como homólogos de otros mamíferos. La sonda/cebador típicamente comprende 65 oligonucleótidos sustancialmente purificados.

En una realización, el oligonucleótido comprende una región de secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con al menos aproximadamente 12, preferentemente aproximadamente 25, más preferentemente aproximadamente 50 nucleótidos consecutivos de la secuencia con sentido o antisentido de la SEC ID N° 5.

5 Las sondas basadas en la secuencia de una molécula de ácido nucleico de la invención pueden usarse para detectar transcritos o secuencias genómicas que codifican la misma molécula de proteína codificada por una molécula de ácido nucleico seleccionada. La sonda comprende un grupo marcador unido a la misma, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático. Dichas sondas pueden usarse como parte de un kit de ensayo de diagnóstico para identificar células o tejidos que expresan o no la proteína, tal como mediante la medición de los niveles de una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína en una muestra de células de un sujeto, por ejemplo, detectando los niveles de ARNm o determinando si un gen que codifica la proteína se ha mutado o deletado.

15 La invención incluye además moléculas de ácido nucleico que difieren de la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 5 debido a la degeneración del código genético y, por lo tanto, codifican la misma proteína que codifica la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 5.

Además de las secuencias de nucleótidos de la SEC ID N° 5, los expertos en la materia apreciarán que pueden existir dentro de una población polimorfismos de la secuencia de ADN que conducen a cambios en la secuencia de aminoácidos. Dichos polimorfismos genéticos pueden existir entre individuos dentro de una población debido a una variación alélica natural. Un alelo es un grupo de genes que existe de forma alternativa en un locus genético dado. Dichas variaciones alélicas naturales típicamente pueden dar como resultado una variación del 1-5 % en la secuencia de nucleótidos de un gen dado. Los alelos alternativos pueden identificarse por secuenciación del gen de interés en varios individuos diferentes. Esto puede realizarse fácilmente usando sondas de hibridación para identificar el mismo locus genético en una diversidad de individuos. Dentro del alcance de la invención se pretenden incluir todas y cada una de dichas variaciones de nucleótidos y los polimorfismos y variaciones de aminoácidos resultantes que son el resultado de una variación alélica natural y no alteran la actividad funcional.

30 En una realización, se usan polimorfismos que están asociados con un trastorno degenerativo de la retina como marcadores para diagnosticar dicha enfermedad o trastorno.

Además, dentro del alcance de la invención se pretende incluir moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de la invención de otras especies (homólogos), que tienen una secuencia de nucleótidos que difiere de la de la proteína de rata descrita en el presente documento.

35 Las moléculas de ácido nucleico correspondientes a variantes alélicas naturales y homólogos de un ADNc de la invención pueden aislarse basándose en su identidad con la molécula de ácido nucleico humana desvelada en el presente documento usando los ADNc humanos, o una parte de los mismos, como sonda de hibridación de acuerdo con técnicas de hibridación convencionales en condiciones de hibridación rigurosas.

40 Por consiguiente, en otra realización, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención tiene una longitud de al menos 100, 200, 300, 400 o 500 nucleótidos contiguos e hibrida en condiciones rigurosas con la molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos, preferentemente la secuencia codificante, de la SEC ID N° 5 o un complemento de la misma.

45 Además de variantes alélicas naturales de una molécula de ácido nucleico de la secuencia de la invención que puede existir en la población, el experto en la materia apreciará además que pueden introducirse cambios por mutación que conducen a cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada sin alterar la actividad biológica de la proteína. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de nucleótidos que conduzcan a sustituciones de aminoácidos en restos de aminoácidos "no esenciales". Un resto de aminoácido "no esencial" es un resto que puede alterarse con respecto a la secuencia de tipo silvestre sin alterar la actividad biológica, mientras que un resto de aminoácido "esencial" es necesario para la actividad biológica. Por ejemplo, los restos de aminoácido que no están conservados o solo están semiconservados entre homólogos de diversas especies pueden ser no esenciales para la actividad y de esta forma serían dianas probables para la alteración. Como alternativa, pueden ser esenciales para la actividad restos de aminoácidos que están conservados entre los homólogos de diversas especies (por ejemplo, ratón y ser humano) y, por lo tanto, no serían dianas probables para la alteración.

60 Las mutaciones pueden introducirse por técnicas convencionales tales como mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR. Preferentemente, se realizan sustituciones de aminoácidos conservativas en uno o más restos de aminoácidos no esenciales previstos.

65 Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en la que el resto de aminoácido se ha reemplazado por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina,

tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Como alternativa, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante, tal como por mutagénesis de saturación y en los mutantes resultantes pueden explorarse la actividad biológica para identificar mutantes que conserven la actividad.

Después de la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse de forma recombinante y puede determinarse la actividad de la proteína.

En una realización preferida, un polipéptido mutante que es una variante de la invención puede ensayarse con respecto a su capacidad de presentar actividad de rescate de neuronas.

La presente invención incluye moléculas de ácido nucleico antisentido, es decir, moléculas que son complementarias a un ácido nucleico con sentido que codifica un polipéptido de la invención, por ejemplo, complementarias a la cadena codificante de una molécula de ADN bicatenaria o complementarias a una secuencia de ARNm. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a una cadena codificante entera, o solo a una parte de la misma, por ejemplo, todo o parte de la región codificante de la proteína (o fase de lectura abierta). Una molécula de ácido nucleico puede ser antisentido a todo o parte de una región no codificante de la cadena codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la invención. Las regiones no codificantes ("regiones 5' y 3' no traducidas") son las secuencias 5' y 3' que flanquean la región codificante y no se traducen en aminoácidos.

Un oligonucleótido antisentido puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos o más de longitud. Un ácido nucleico antisentido de la invención puede construirse usando reacciones de síntesis química y ligamiento enzimático usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un ácido nucleico antisentido (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido) puede sintetizarse químicamente usando nucleótidos naturales o nucleótidos modificados de diversa forma diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado entre los ácidos nucleicos antisentido y con sentido, por ejemplo, derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. Los ejemplos de nucleótidos modificados que pueden usarse para generar el ácido nucleico antisentido incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w y 2,6-diaminopurina. Como alternativa, el ácido nucleico antisentido puede producirse biológicamente usando un vector de expresión dentro del cual se ha subclonado un ácido nucleico en una orientación antisentido (es decir, el ARN transcrito a partir del ácido nucleico insertado tendrá una orientación antisentido con respecto a un ácido nucleico diana de interés descrito adicionalmente en la siguiente subsección).

Vectores de expresión recombinante y células hospedadoras:

Otro aspecto de la invención se refiere a vectores, preferentemente vectores de expresión que contienen un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención (o una parte del mismo).

Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular al que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, donde pueden ligarse segmentos de ADN adicionales al genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicarse de forma autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) se integran en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora y, por lo tanto, se replican junto con el genoma del hospedador. Además, ciertos vectores, los vectores de expresión, son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante con frecuencia están en forma de plásmidos (vectores). Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus con defectos en la replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que tienen funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula hospedadora. Esto significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas basándose en las células hospedadoras a usar para la expresión, que están unidas operativamente a la secuencia de ácido nucleico a expresar. Dentro de un vector de expresión recombinante, se entiende que "unido operativamente" significa que la

secuencia de nucleótidos de interés está unida a la secuencias o secuencias reguladoras de una manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula hospedadora cuando el vector se introduce en la célula hospedadora).

5 La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en
 10 Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Las secuencias reguladoras incluyen las que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de célula hospedadora y las que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos únicamente en
 15 ciertas células hospedadoras (por ejemplo, secuencias reguladoras con especificidad de tejido). Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel de expresión de proteína deseada, etc. Los vectores de expresión de la invención pueden introducirse en células hospedadoras para producir de esta manera proteínas o péptidos, incluyendo proteínas o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos como se describe en el presente documento.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden diseñarse para la expresión de un polipéptido de la invención en células procariontas (por ejemplo, *E. coli*) o eucariotas (por ejemplo, células de insectos (usando vectores de expresión de baculovirus), células de levadura o células de mamífero). Se describen células
 20 hospedadoras adecuadas adicionalmente en Goeddel, supra. Como alternativa, el vector de expresión recombinante puede transcribirse y traducirse *in vitro*, por ejemplo, usando secuencias reguladoras del promotor de T7 y polimerasa de T7.

La mayoría de las veces, la expresión de proteínas en procariontas se realiza en *E. coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la que dirigen la expresión de proteínas de fusión o de proteínas
 25 que no son de fusión. Los vectores de fusión añaden varios aminoácidos a una proteína codificada en los mismos, normalmente en el extremo amino de la proteína recombinante. Dichos vectores de fusión típicamente tienen tres fines: 1) aumentar la expresión de la proteína recombinante; 2) aumentar la solubilidad de la proteína recombinante; y 3) ayudar a la purificación de la proteína recombinante actuando como un ligando en purificación por afinidad. Con
 30 frecuencia, en los vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión del resto de fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante del resto de fusión después de la purificación de la proteína de fusión. Dichas enzimas, y sus secuencias de reconocimiento afines, incluyen el Factor Xa, la trombina y la enteroquinasa. Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith y Johnson (1988) Gene 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N. J.) que fusionan la glutatión S-transferasa (GST), la proteína de unión a maltosa E, o la proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante diana.

Los ejemplos de vectores de expresión de *E. coli* sin fusión inducibles adecuados incluyen pTrc (Amann *et al.*,
 40 (1988) Gene 69: 301-315) y pET11d (Studier *et al.*, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89). La expresión del gen diana a partir del vector pTrc se basa en la transcripción por la ARN polimerasa del hospedador a partir de un promotor de fusión *trp-lac* híbrido. La expresión del gen diana a partir del vector pET1d se basa en la transcripción a partir de un promotor de fusión *gn10-lac* de T7 mediado por una ARN polimerasa viral coexpresada (*gn1* de T7). Esta polimerasa viral se suministra por cepas
 45 hospedadoras BL21 (DE3) o HMS174 (DE3) a partir de un profago residente que lleva un gen *gn1* de T7 bajo el control transcripcional del promotor de *lacUV5*.

Una estrategia para maximizar la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* es expresar la proteína en una bacteria hospedadora con una alteración en la capacidad de escisión proteolítica de la proteína recombinante
 50 (Gottesman, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 119-128). Otra estrategia es alterar la secuencia de ácido nucleico del ácido nucleico a insertar en un vector de expresión de forma que los codones individuales para cada aminoácido sean los utilizados preferentemente en *E. coli* (Wada *et al.* (1992) Nucleic Acids Res. 20: 2111-2118). Dicha alteración de secuencias de ácido nucleico de la invención puede realizarse por técnicas de síntesis de ADN convencionales.

55 En otra realización, el vector de expresión es un vector de expresión de levadura. Los ejemplos de vectores para la expresión en la levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSec1 (Baldari *et al.* (1987) EMBO J. 6: 229-234), pMFa (Kurjan y Herskowitz, (1982) Cell 30: 933-943), pJRY88 (Schultz *et al.* (1987) Gene 54: 113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.) y pPicZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.).

60 Como alternativa, el vector de expresión es un vector de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto cultivadas (por ejemplo, células Sf9) incluyen la serie pAc (Smith *et al.* (1983) Mol. Cell Biol. 3: 2156-2165) y la serie pVL (Lucklow y Summers (1989) Virology 170: 31-39).

65 En otra realización más, un ácido nucleico de la invención se expresa en células de mamífero usando un vector de expresión de mamífero. Los ejemplos de vectores de expresión de mamífero incluyen pCDM8 (Seed (1987) Nature

329: 840) y pMT2PC (Kaufman *et al.* (1987) EMBO J. 6: 187-195). Cuando se usan en células de mamífero, las funciones de control del vector de expresión con frecuencia se proporcionan por elementos reguladores virales. Por ejemplo, los promotores usados comúnmente proceden de poliovirus, Adenovirus 2, citomegalovirus y Virus de Simio 40. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariotas como para células eucariotas, véanse los capítulos 16 y 17 de Sambrook *et al.*, supra.

En otra realización, el vector de expresión de mamífero recombinante es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico preferentemente en un tipo celular particular (por ejemplo, se usan elementos reguladores específicos de tejido para expresar el ácido nucleico). En la técnica se conocen elementos reguladores específicos de neurona (por ejemplo, el promotor del neurofilamento; Byrne y Ruddle (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5473-5477).

La invención proporciona además un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ADN de la invención clonada en el vector de expresión en una orientación antisentido. Es decir, la molécula de ADN está unida operativamente a una secuencia reguladora de una manera que permite la expresión (por transcripción de la molécula de ADN) de una molécula de ARN que es antisentido con respecto al ARNm que codifica un polipéptido de la invención. Pueden elegirse secuencias reguladoras unidas operativamente a un ácido nucleico clonado en la orientación antisentido que dirigen la expresión continua de la molécula de ARN antisentido en una diversidad de tipos celulares, por ejemplo, promotores y/o potenciadores virales, o pueden elegirse secuencias reguladoras que dirigen la expresión constitutiva, específica de tejido o específica de tipo celular del ARN antisentido. El vector de expresión antisentido puede estar en forma de un plásmido recombinante, fagémido o virus atenuado en el que se producen ácidos nucleicos antisentido bajo el control de una región reguladora de alta eficacia, cuya actividad puede determinarse por el tipo celular en el que se introduce el vector. Véase un análisis de la regulación de la expresión génica usando genes antisentido en Weintraub *et al.* (Reviews-Trends in Genetics, Vol. 1(1) 1986).

Otro aspecto de la invención se refiere a células hospedadoras en las que se ha introducido un vector de expresión recombinante de la invención.

Las expresiones "célula hospedadora" y "célula hospedadora recombinante" se usan indistintamente en el presente documento. Se entiende que dichos términos se refieren no solo a la célula particular, sino a la descendencia o descendencia potencial de dicha célula. Como pueden producirse ciertas modificaciones en las generaciones posteriores debido a mutaciones o a influencias ambientales, dicha descendencia puede no ser, de hecho, idéntica a la célula parental, pero aun así se incluye dentro del alcance de la expresión como se usa en el presente documento.

Una célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota (por ejemplo, *E. coli*) o eucariota (por ejemplo, células de insecto, células de levadura o células de mamífero).

El ADN del vector puede introducirse en células procariotas o eucariotas mediante técnicas convencionales de transformación o transfección. Como se usan en el presente documento, se pretende que los términos "transformación" y "transfección" se refieran a una diversidad de técnicas reconocidas en este campo para introducir ácido nucleico extraño en una célula hospedadora, incluyendo coprecipitación con fosfato cálcico o cloruro cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección o electroporación. Pueden encontrarse métodos adecuados para la transformación o transfección de células hospedadoras en Sambrook, *et al.* (supra), y en otros manuales de laboratorio.

Para la transfección estable de células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y de la técnica de transfección usada, solo una pequeña fracción de células puede integrar el ADN extraño en su genoma. Para identificar y seleccionar estos integrantes, generalmente se introduce un gen que codifica un marcador de selección (por ejemplo, para resistencia a antibióticos) en las células hospedadoras junto con el gen de interés. Los marcadores de selección preferidos incluyen los que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Las células transfectadas de forma estable con el ácido nucleico introducido pueden identificarse por selección de fármacos (por ejemplo, las células que han incorporado el gen marcador de selección sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).

En otra realización, las características de expresión de un gen endógeno dentro de una célula, línea celular o microorganismo pueden modificarse insertando un elemento regulador del ADN heterólogo al gen endógeno de interés en el genoma de una célula, línea celular estable o microorganismo clonado de tal forma que el elemento regulador insertado esté unido operativamente con el gen endógeno y controle, module o active. Por ejemplo, genes endógenos que normalmente son "transcripcionalmente silenciosos", es decir, genes que normalmente no se expresan o se expresan solo a niveles muy bajos en una línea celular o microorganismo, pueden activarse insertando un elemento regulador que sea capaz de promover la expresión de un producto génico expresado normalmente en esa línea celular o microorganismo. Como alternativa, los genes endógenos transcripcionalmente silenciosos pueden activarse por inserción de un elemento regulador promiscuo que funciona en varios tipos celulares.

Un elemento regulador heterólogo puede insertarse en una línea celular estable o microorganismo clonado, de tal

forma que esté unido operativamente con y active la expresión de genes endógenos, usando técnicas, tales como recombinación homóloga dirigida, que son bien conocidas por los expertos en la materia, y se describen, por ejemplo en Chappel, Patente de Estados Unidos N° 5.272.071; publicación PCT N° WO 91/06667, publicado el 16 de mayo de 1991.

5 Para producir un polipéptido de la invención puede usarse una célula hospedadora de la invención, tal como una célula hospedadora procariota o eucariota en cultivo. Por consiguiente, la invención proporciona además métodos para producir un polipéptido de la invención usando las células hospedadoras de la invención. En una realización, el método comprende cultivar la célula hospedadora de la invención (en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica un polipéptido de la invención) en un medio adecuado de tal forma que se produzca el polipéptido. En otra realización, el método comprende además aislar el polipéptido del medio o la célula hospedadora.

15 La presente invención también se refiere a un método para producir una célula hospedadora recombinante que expresa un polipéptido de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho método las etapas que consisten en: (i) introducir *in vitro* o *ex vivo* un ácido nucleico recombinante o un vector como se ha descrito anteriormente en una célula hospedadora competente, (ii) cultivar *in vitro* o *ex vivo* la célula hospedadora recombinante obtenida y (iii), opcionalmente, seleccionar las células que expresan y/o secretan dicho polipéptido. Dichas células hospedadoras recombinantes pueden usarse para la producción de polipéptidos de acuerdo con la presente invención, como se ha descrito previamente.

20 La invención se refiere además a un método para producir un polipéptido de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho método las etapas que consisten en: (i) cultivar una célula hospedadora transformada de acuerdo con la invención en condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicho polipéptido; y (ii) recuperar el polipéptido expresado.

25 Las células hospedadoras de la invención también pueden usarse para producir animales transgénicos no humanos. Por ejemplo, en una realización, una célula hospedadora de la invención es un oocito fertilizado o una célula madre embrionaria en la que se ha introducido una secuencia que codifica un polipéptido de la invención. Después, dichas células hospedadoras pueden usarse para crear animales transgénicos no humanos en los que se han introducido secuencias exógenas que codifican un polipéptido de la invención en su genoma o animales recombinantes homólogos en los que se han alterado secuencias endógenas que codifican un polipéptido de la invención. Dichos animales son útiles para estudiar la función y/o actividad del polipéptido y para identificar y/o evaluar moduladores de la actividad del polipéptido.

30 Como se usa en el presente documento, un "animal transgénico" es un animal no humano, preferentemente un mamífero, más preferentemente un roedor tal como una rata o ratón, en el que una o más de las células del animal incluye un transgén.

35 Otros ejemplos de animales transgénicos incluyen primates no humanos, ovejas, perros, vacas, cabras, pollos, anfibios, etc. Un transgén es ADN exógeno que está integrado en el genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla un animal transgénico y que permanece en el genoma del animal maduro, dirigiendo de esta manera la expresión de un producto génico codificado en uno o más tipos celulares o tejidos del animal transgénico.

40 Como se usa en el presente documento, un "animal recombinante homólogo" es un animal no humano, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ratón, en el que se ha alterado un gen endógeno por recombinación homóloga entre el gen endógeno y una molécula de ADN exógena introducida en una célula del animal, por ejemplo, una célula embrionaria del animal, antes del desarrollo del animal.

45 Un animal transgénico de la invención puede crearse introduciendo un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención en el pronúcleo masculino de un oocito fertilizado, por ejemplo, por microinyección, infección retroviral, y dejando que el oocito se desarrolle en un animal de acogida hembra pseudoembarazada. En el transgén también pueden incluirse secuencias intrónicas y señales de poliadenilación para aumentar la eficacia de la expresión del transgén. Al transgén se le pueden unir operativamente una o más secuencias reguladoras específicas de tejido para dirigir la expresión del polipéptido de la invención en células particulares. Se han hecho convencionales en la técnica métodos para generar animales transgénicos mediante manipulación embrionaria y microinyección, particularmente animales tales como ratones, y se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 4.736.866 y 4.870.009, 4.873.191 y en Hogan, Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986). Se usan métodos similares para la producción de otros animales transgénicos. Un animal de acogida transgénico puede identificarse basándose en la presencia del transgén en su genoma y/o la expresión del ARNm que codifica el transgén en tejidos o células de los animales. Un animal de acogida transgénico después puede usarse para criar animales adicionales que lleven el transgén. Además, los animales transgénicos que llevan el transgén pueden cruzarse adicionalmente con otros animales transgénicos que lleven otros transgenes.

50 Para crear un animal recombinante homólogo, se prepara un vector que contiene al menos una parte de un gen que

codifica un polipéptido de la invención en el que se ha introducido una delección, adición o sustitución para alterar de esta manera, por ejemplo, romper funcionalmente el gen. En una realización preferida, el vector está diseñado de tal forma que, después de recombinación homóloga, el gen endógeno está alterado funcionalmente (es decir, ya no codifica una proteína funcional; también denominado vector "knock out"). Como alternativa, el vector puede diseñarse de tal forma que, después de la recombinación homóloga, el gen endógeno se mute o se altere de otra manera pero siga codificando la proteína funcional (por ejemplo, la región reguladora cadena arriba puede alterarse para alterar de esta manera la expresión de la proteína endógena). En el vector de recombinación homólogo, la parte alterada del gen está flanqueada en sus extremos 5' y 3' por un ácido nucleico adicional del gen para permitir que se produzca la recombinación homóloga entre el gen exógeno llevado por el vector y un gen endógeno en una célula madre embrionaria. Las secuencias de ácido nucleico flanqueantes adicionales tienen una longitud suficiente para la recombinación homóloga satisfactoria con el gen endógeno. Típicamente, en el vector se incluyen varias kilobases de ADN flanqueante (tanto en el extremo 5' como en el extremo 3') (véase, por ejemplo, en Thomas y Capecchi (1987) Cell 51: 503 una descripción de vectores de recombinación homóloga). El vector se introduce en una línea de células madre embrionarias (por ejemplo, por electroporación) y se seleccionan células en las que el gen introducido se ha recombinado de forma homóloga con el gen endógeno (véase, por ejemplo, Li *et al.* (1992) Cell 69: 915). Las células seleccionadas después se inyectan en un blastocisto de un animal (por ejemplo, un ratón) para formar quimeras de agregación (véase, por ejemplo, Bradley en *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987) pág. 113-152). Después puede implantarse un embrión quimérico en un animal de acogida hembra pseudoembarazada adecuada y el embrión puede llevarse a término. La descendencia que lleva el ADN recombinado de forma homóloga en sus células germinales puede usarse para criar animales en los que todas las células del animal contengan el ADN recombinado de forma homóloga por transmisión de la línea germinal del transgén. En Bradley (1991) *Current Opinion in Biotechnology* 2: 823-829 y en las Publicaciones PCT N° WO 90/11354, WO 91/01140, WO 92/0968 y WO 93/04169 se describen adicionalmente métodos para construir vectores de recombinación homóloga y animales recombinantes homólogos.

En otra realización, pueden producirse animales transgénicos no humanos que contienen sistemas seleccionados que permiten la expresión regulada del transgén. Un ejemplo de dicho sistema es el sistema de recombinasa cre/loxP del bacteriófago P1. Para una descripción del sistema de recombinasa cre/loxP véase, por ejemplo, Lakso *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6232-6236. Otro ejemplo de un sistema de recombinasa es el sistema de recombinasa FLP de *Saccharomyces cerevisiae* (O'Gorman *et al.* (1991) *Science* 251: 1351-1355). Si se usa un sistema de recombinasa cre/loxP para regular la expresión del transgén, se requieren animales que contengan transgenes que codifican tanto la recombinasa Cre como una proteína seleccionada. Dichos animales pueden proporcionarse mediante la construcción de animales transgénicos "dobles", por ejemplo, emparejando dos animales transgénicos, conteniendo uno un transgén que codifica una proteína seleccionada y conteniendo el otro un transgén que codifica una recombinasa.

También pueden producirse clones de los animales transgénicos no humanos descritos en el presente documento de acuerdo con los métodos descritos en Wilmut *et al.* (1997) *Nature* 385: 810-813 y en las Publicaciones PCT N° WO 97/07668 y WO 97/07669.

Otro objeto de la invención se refiere a compuestos que se unen selectivamente a un polipéptido de la invención. Dichos compuestos son particularmente útiles para poner en práctica los métodos de la invención. Son ejemplos de compuestos que se unen selectivamente a un polipéptido de la invención anticuerpos y aptámeros.

Anticuerpos de la invención:

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona anticuerpos sustancialmente purificados o fragmentos de los mismos, y anticuerpos no humanos o fragmentos de los mismos, uniéndose dichos anticuerpos o fragmentos específicamente a un polipéptido de la invención.

En diversas realizaciones, los anticuerpos sustancialmente purificados de la invención, o fragmentos de los mismos, puede ser anticuerpos humanos, no humanos, quiméricos y/o humanizados. Dichos anticuerpos no humanos pueden ser anticuerpos de cabra, ratón, oveja, caballo, pollo, conejo o rata. Además, los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos. Los anticuerpos monoclonales pueden ser anticuerpos humanos, humanizados, quiméricos y/o no humanos.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden producirse por cualquier técnica conocida en este campo, tal como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, sola o en combinación.

Los anticuerpos policlonales pueden prepararse inmunizando un sujeto adecuado con un polipéptido de la invención como un inmunógeno. Las composiciones de anticuerpos policlonales preferidas son las que se han seleccionado para anticuerpos dirigidos contra un polipéptido o polipéptidos de la invención. Son preparaciones de anticuerpos policlonales particularmente preferidas las que contienen solo anticuerpos dirigidos contra un polipéptido o polipéptidos de la invención. Son composiciones de inmunógeno particularmente preferidas las que no contienen

ninguna otra proteína humana tales como, por ejemplo, composiciones de inmunógeno obtenidas usando una célula hospedadora no humana para la expresión recombinante de un polipéptido de la invención. De tal manera, el único epítipo o los únicos epítipos humanos reconocidos por las composiciones de anticuerpo resultantes inducidas contra este inmunógeno estarán presentes como parte de uno o más polipéptidos de la invención.

El título de anticuerpo en el sujeto inmunizado puede supervisarse a lo largo del tiempo por técnicas convencionales tales como con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando un polipéptido inmovilizado. Si se desea, las moléculas de anticuerpo pueden aislarse del mamífero (por ejemplo de la sangre) y purificarse adicionalmente por técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de proteína A para obtener la fracción de IgG. Como alternativa, pueden seleccionarse anticuerpos específicos para una proteína o polipéptido de la invención (por ejemplo, purificarse parcialmente) o purificarse por, por ejemplo, cromatografía de afinidad. Por ejemplo, una proteína expresada de forma recombinante y purificada (o purificada parcialmente) de la invención se produce como se describe en el presente documento, y se acopla de forma covalente o no covalente a un soporte sólido tal como, por ejemplo, una columna de cromatografía. La columna después puede usarse para purificar por afinidad anticuerpos específicos para las proteínas de la invención a partir de una muestra que contiene anticuerpos dirigidos contra un gran número de epítipos diferentes, generando de esta forma una composición de anticuerpos sustancialmente purificados, es decir, una que carece sustancialmente de anticuerpos contaminantes. Por composición de anticuerpo sustancialmente purificada se entiende, en este contexto, que la muestra de anticuerpos contiene como máximo solo un 30 % (en peso seco) de anticuerpos contaminantes dirigidos contra epítipos distintos de los presentes en la proteína o polipéptido deseado de la invención, y preferentemente como máximo un 20 %, aún más preferentemente como máximo un 10 %, y aún más preferentemente como máximo un 5 % (en peso seco) de la muestra está constituida por anticuerpos contaminantes. Una composición de anticuerpos purificada significa que al menos el 99 % de los anticuerpos de la composición están dirigidos contra la proteína o polipéptido deseado de la invención.

En un momento apropiado después de la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpo específicos son máximos, pueden obtenerse células productoras de anticuerpos a partir del sujeto y usarse para preparar anticuerpos monoclonales por técnicas convencionales, tales como la técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495-497, la técnica de hibridomas de células B humanas (Kozbor *et al.* (1983) *Immunol. Today* 4: 72), la técnica de hibridoma-EBV (Cole *et al.* (1985), *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pág. 77-96) o técnicas de trioma. La tecnología para producir hibridomas es bien conocida (véase, en general, *Current Protocols in Immunology* (1994) Coligan *et al.* (eds.) John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, N. Y.). Las células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal de la invención se detectan explorando los sobrenadantes de cultivo del hibridoma para detectar los anticuerpos que se unen al polipéptido de interés, por ejemplo, usando un ensayo ELISA convencional.

Como alternativa a la preparación de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales, puede identificarse un anticuerpo monoclonal dirigido contra un polipéptido de la invención y aislarse por exploración de una biblioteca de inmunoglobulinas combinatorias recombinantes (por ejemplo, una biblioteca de presentación de anticuerpos en fagos) con el polipéptido de interés. En el mercado están disponibles kits para generar y explorar bibliotecas de presentación en fagos (por ejemplo, el Sistema de Anticuerpos y Fagos Recombinantes de Pharmacia, N° de Catálogo 27-9400-01; y el Kit de Presentación en Fagos SurfZAP(TM) de Stratagene, N° de Catálogo 240612). Además, pueden encontrarse ejemplos de métodos y reactivos particularmente susceptibles de uso en la generación y exploración de una biblioteca de presentación de anticuerpos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.223.409; la Publicación PCT N° WO 92/18619; la Publicación PCT N° WO 91/17271; la Publicación PCT N° WO 92/20791; la Publicación PCT N° WO 92/15679; la Publicación PCT N° WO 93/01288; la Publicación PCT N° WO 92/01047; la Publicación PCT N° WO 92/09690; la Publicación PCT N° WO 90/02809; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9: 1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3: 81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246: 1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 725-734.

Dentro del alcance de la invención se encuentran adicionalmente anticuerpos recombinantes tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados que comprenden partes tanto humanas como no humanas, que pueden obtenerse usando técnicas de ADN recombinante convencionales. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes proceden de diferentes especies de animales, tales como las que tienen una región variable derivada de un mAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana. (Véase, por ejemplo, Cabilly *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; y Boss *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 4.816.397, que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad). Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la especie no humana y una región marco conservada de una molécula de inmunoglobulina humana. (Véase, por ejemplo, Queen, Patente de Estados Unidos N° 5.585.089, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad). Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden producirse por técnicas de ADN recombinante conocidas en este campo, por ejemplo usando métodos descritos en la Publicación PCT N° WO 87/02671; Solicitud de Patente Europea 184.187; Solicitud de Patente Europea 171.496; Solicitud de Patente Europea 173.494; Publicación PCT N° WO 86/01533; Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Solicitud de Patente Europea 125.023; Better *et al.* (1988) *Science* 240: 1041-1043; Liu *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3439-3443; Liu *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139: 3521-3526; Sun *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 214-

218; Nishimura *et al.* (1987) *Cane. Res.* 47: 999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314: 446-449; y Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80: 1553-1559; Morrison (1985) *Science* 229: 1202-1207; Oi *et al.* (1986) *Bio/Techniques* 4: 214; Patente de Estados Unidos N° 5.225.539; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321: 552-525; Verhoeyan *et al.* (1988) *Science* 239: 1534; y Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141: 4053-4060.

5 Pueden producirse anticuerpos completamente humanos, por ejemplo, usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar genes de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulinas endógenas, pero que pueden expresar genes de cadena pesada y ligera humanas. Los ratones transgénicos se inmunizan de la forma normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o parte de un polipéptido de la invención. Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno usando la tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana portados por el ratón transgénico se transponen durante la diferenciación de células B y posteriormente experimentan un cambio de clase y mutación somática. De esta manera, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA e IgE terapéuticamente útiles. Como revisión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13: 65-93). Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir dichos anticuerpos, véanse, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.625.126; y las Patentes de Estados Unidos N° 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; y 5.545.806. Además, es posible contactar con compañías tales como Abgenix, Inc. (Fremont, Calif.) para que proporcionen anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando una tecnología similar a la descrita anteriormente.

10 Un anticuerpo dirigido contra un polipéptido de la invención (por ejemplo, anticuerpo monoclonal) puede usarse para aislar el polipéptido por técnicas convencionales, tales como cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación. Además, dicho anticuerpo puede usarse para detectar la proteína (por ejemplo, en un lisado celular o sobrenadante celular) para evaluar la abundancia y patrón de expresión del polipéptido. Los anticuerpos también pueden usarse como diagnóstico para supervisar los niveles de proteínas en tejidos como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse acoplando el anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina, y los ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen 125I, 131I, 35S o 3H.

15 La presente invención incluye fragmentos de anticuerpo de los anticuerpos de la invención. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂, diacuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

20 El término "Fab" denota un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión a antígenos, en el que aproximadamente una mitad del lado N-terminal de la cadena H y la cadena L entera, entre los fragmentos obtenidos por tratamiento de IgG con una proteasa, papaína, están unidos entre sí a través de un enlace disulfuro.

25 El término "F(ab')₂" se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 100.000 y actividad de unión a antígenos, que es ligeramente más grande que el Fab unido a través de un enlace disulfuro de la región de bisagra, entre fragmentos obtenidos por tratamiento de IgG con una proteasa, la pepsina.

30 El término "Fab" se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión a antígenos, que se obtiene cortando un enlace disulfuro de la región de bisagra del F(ab')₂.

35 Un polipéptido Fv monocatenario ("scFv") es un heterodímero VH::VL unido covalentemente que normalmente se expresa a partir de una fusión génica que incluye genes codificantes de VH y VL ligados por un enlazador que codifica un péptido. El fragmento scFv humano de la invención incluye CDR que se mantienen en la conformación apropiada, preferentemente mediante el uso de técnicas de recombinación génica. "dsFv" es un heterodímero VH::VL estabilizado por un enlace disulfuro. Los fragmentos de anticuerpo divalentes y multivalentes pueden formarse espontáneamente por asociación de scFv monovalentes, o pueden generarse por acoplamiento de scFv monovalentes por un enlazador peptídico, tal como sc(Fv)₂ divalente.

40 El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno.

Aptámeros de la invención:

En otra realización, la invención se refiere a un aptámero dirigido contra un polipéptido de la invención.

5 Los aptámeros son una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias oligonucleotídicas u oligopeptídicas con la capacidad de reconocer prácticamente cualquier clase de molécula diana con alta afinidad y especificidad. Dichos ligandos pueden aislarse mediante evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias aleatorias, como se describe en Tuerk C. 1997. La biblioteca de secuencias aleatorias se
10 puede obtener por síntesis de química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado químicamente, de una sola secuencia. Se han revisado posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas en Jayasena S. D., 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en regiones variables de anticuerpo conformacionalmente limitadas presentadas por una proteína en plataforma, tal como la Tiorredoxina A de *E. coli*, que se seleccionan a partir de bibliotecas combinatorias por métodos de dos
15 híbridos (Colas *et al.*, 1996).

Métodos de exploración:

20 La invención proporciona un método (también denominado en el presente documento "método de exploración") para identificar moduladores, es decir, compuestos o agentes candidatos o de ensayo (por ejemplo, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas u otros fármacos) que se unen al polipéptido de la invención o tienen una acción estimuladora sobre, por ejemplo, la expresión o actividad de un polipéptido de la invención.

25 En una realización, la invención proporciona ensayos para explorar compuestos candidatos o de ensayo que aumentan la actividad de un polipéptido de la invención o parte biológicamente activa del mismo. Más particularmente, la invención proporciona ensayos para explorar candidatos o compuestos de ensayo que pueden estimular la expresión de los polipéptidos de la invención.

30 Los compuestos candidatos o de ensayo pueden ensayarse con respecto a su capacidad de estimular la expresión de los polipéptidos de la invención. Por ejemplo, puede usarse un ensayo de sistema indicador para medir la expresión del polipéptido de la invención. Para este fin puede usarse una célula hospedadora de la invención. En una realización particular, el vector puede codificar una proteína de fusión que comprende un polipéptido de la invención y una proteína fluorescente. Las proteínas fluorescentes, bioluminiscentes o fosforescentes de forma natural incluyen GFP derivada de *Aequorea Victoria* y un número creciente de variantes de secuencia de GFP con propiedades útiles. La lista también incluye la proteína roja fluorescente (RFP) derivada de *Discosoma*; y la proteína fluorescente kindling (KFP1) derivada de *Anemonia*. Estas proteínas son enzimas autocatalíticas que son capaces
35 todas ellas de generar fluoróforos internos que emiten de forma eficaz, altamente visibles, como resultado de la endociclación de restos de aminoácidos centrales. Otra característica común de las proteínas fluorescentes es que la señal es estable, independiente de la especie y no requieren ningún sustrato o cofactor para la generación de una
40 señal. La detección directa de fluorescencia por observación visual (por ejemplo, con luz UV de amplio espectro) puede usarse para cuantificar la cantidad de la proteína de fusión producida en presencia o ausencia del compuesto candidato o de ensayo.

45 Los compuestos candidatos o de ensayo después pueden ensayarse con respecto a su capacidad de inhibir la degeneración de fotorreceptores de los conos. Para supervisar dichos efectos puede usarse cualquier ensayo adecuado conocido para un experto en la materia (tales como el descrito en el Ejemplo).

50 Los compuestos de ensayo de la presente invención pueden obtenerse usando cualquiera de varias estrategias en métodos de bibliotecas combinatorias conocidas en la técnica, incluyendo: bibliotecas biológicas; bibliotecas en fase sólida o en fase de solución paralelas dirigibles espacialmente; métodos de bibliotecas sintéticas que requieren desconvolución; el método de biblioteca (una perla - un compuesto); y métodos de bibliotecas sintéticas que usan selección por cromatografía de afinidad. La estrategia de bibliotecas biológicas está limitada a bibliotecas de péptidos, mientras que las otras cuatro estrategias son aplicables a péptidos, oligómeros no peptídicos o bibliotecas de compuestos de molécula pequeña.
55

Métodos de diagnóstico de la invención:

60 La presente invención también se refiere a ensayos de diagnóstico, ensayos de pronóstico y ensayos de supervisión.

65 Por consiguiente, un aspecto de la presente invención se refiere a ensayos de diagnóstico para determinar la expresión de un polipéptido o ácido nucleico de la invención y/o la actividad de un polipéptido de la invención, en el contexto de una muestra biológica (por ejemplo, sangre, suero, células, tejidos) para determinar de esta manera si un individuo padece una enfermedad o trastorno, o tiene riesgo de desarrollar un trastorno, asociado con una expresión o actividad aberrante de un polipéptido de la invención (por ejemplo, trastornos neurodegenerativos).

La invención también proporciona ensayos de pronóstico (o predictivos) para determinar si un individuo tiene riesgo de desarrollar un trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante de un polipéptido de la invención (por ejemplo, trastornos neurodegenerativos). Por ejemplo, pueden ensayarse mutaciones en una molécula de ácido nucleico de la invención en una muestra biológica. Dichos ensayos pueden usarse para fines de pronóstico o predictivos para tratar profilácticamente de esta manera a un individuo antes del inicio de un trastorno caracterizado por o asociado con la expresión o actividad aberrante de un polipéptido de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a la supervisión de la influencia de agentes (por ejemplo, fármacos u otros compuestos) sobre la expresión o actividad de un polipéptido de la invención, en ensayos clínicos o tratamientos.

La invención se refiere a un método para detectar la presencia de un polipéptido de la invención en una muestra, que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto la muestra con un compuesto que se une selectivamente a un polipéptido de la invención; y
- b) determinar si el compuesto se une a dicho polipéptido en la muestra.

La invención también se refiere a un método para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico de la invención en una muestra, que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto la muestra con una sonda o cebador de ácido nucleico que hibrida selectivamente con una molécula de ácido nucleico que codifica la SEC ID N°: 2; y
- b) determinar si la sonda o cebador de ácido nucleico se une a dicha molécula de ácido nucleico en la muestra.

Un método ejemplar para detectar la presencia o ausencia de un polipéptido o ácido nucleico de la invención en una muestra biológica implica obtener una muestra biológica de un sujeto de ensayo y poner en contacto la muestra biológica con un compuesto o agente capaz de detectar un polipéptido o ácido nucleico (por ejemplo, ARNm, ADN genómico) de la invención de tal forma que se detecte en la muestra la presencia del polipéptido o ácido nucleico de la invención. Un agente preferido para detectar ARNm o ADN genómico que codifica un polipéptido de la invención es una sonda de ácido nucleico marcada capaz de hibridar con el ARNm o ADN genómico que codifica un polipéptido de la invención. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, el ácido nucleico de la SEC ID N°: 2 o una parte del mismo, tal como un oligonucleótido de al menos 15, 30 o 50 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridar específicamente en condiciones rigurosas con un ARNm o ADN genómico que codifica un polipéptido de la invención. En el presente documento se describen otras sondas adecuadas para su uso en los ensayos de diagnóstico de la invención.

Un agente preferido para detectar un polipéptido de la invención es un anticuerpo capaz de unirse a un polipéptido de la invención, preferentemente un anticuerpo con un marcador detectable. Los anticuerpos pueden prepararse de acuerdo con los métodos descritos anteriormente.

El término "marcado", con respecto a la sonda o anticuerpo, pretende incluir el marcaje directo de la sonda o anticuerpo por acoplamiento (es decir, asociación física) de una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como el marcaje indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad con otro reactivo que esté marcado directamente. Los ejemplos de marcaje indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia y marcaje de extremo de una sonda de ADN con biotina de tal forma que pueda detectarse con estreptavidina marcada con fluorescencia.

El método de detección de la invención puede usarse para detectar ARNm, proteína o ADN genómico en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección de ARNm incluyen hibridaciones de Northern e hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección de un polipéptido de la invención incluyen ensayos de inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), transferencias de Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para la detección de ADN genómico incluyen hibridaciones de Southern. Además, las técnicas *in vivo* para la detección de un polipéptido de la invención incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo marcado dirigido contra el polipéptido. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con un marcador radiactivo cuya presencia y localización en un sujeto pueden detectarse por técnicas de formación de imágenes convencionales.

En otra realización, los métodos además implican obtener una muestra biológica de control a partir de un sujeto de control, poner en contacto la muestra de control con un compuesto o agente capaz de detectar un polipéptido de la invención o ARNm o ADN genómico que codifica un polipéptido de la invención, de tal forma que en la muestra biológica se detecte la presencia del polipéptido o ARNm o ADN genómico que codifica el polipéptido, y comparar la presencia del polipéptido o ARNm o ADN genómico que codifica el polipéptido en la muestra de control con la presencia del polipéptido o ARNm o ADN genómico que codifica el polipéptido en la muestra de ensayo.

La invención también incluye kits para detectar la presencia de un polipéptido o ácido nucleico de la invención en una muestra biológica. Dichos kits pueden usarse para determinar si un sujeto padece o tiene un riesgo aumentado de desarrollar un trastorno asociado con la expresión aberrante de un polipéptido de la invención (por ejemplo,

trastornos degenerativos de la retina). El kit, por ejemplo, puede comprender un compuesto marcado o agente capaz de detectar el polipéptido o ARNm que codifica el polipéptido en una muestra biológica y sirve para determinar la cantidad del polipéptido o ARNm en la muestra (por ejemplo, un anticuerpo que se une al polipéptido o a una sonda oligonucleotídica que se une al ADN o ARNm que codifica el polipéptido). Los kits también pueden incluir instrucciones para observar que el sujeto ensayado padece o tiene riesgo de desarrollar un trastorno asociado con la expresión aberrante del polipéptido si la cantidad del polipéptido o ARNm que codifica el polipéptido está por encima o por debajo de un nivel normal.

El kit puede comprender, por ejemplo: (1) un primer anticuerpo (por ejemplo, unido a un soporte sólido) que se une a un polipéptido de la invención; y, opcionalmente, (2) un segundo anticuerpo diferente que se une al polipéptido o al primer anticuerpo y se conjuga con un agente detectable.

El kit puede comprender, por ejemplo: (1) un oligonucleótido, por ejemplo, un oligonucleótido marcado de forma detectable que hibrida con una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención o (2) un par de cebadores útiles para amplificar una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención.

El kit también puede comprender, por ejemplo, un agente tamponante, un conservante o un agente estabilizador de proteínas. El kit también puede comprender componentes necesarios para detectar el agente detectable (por ejemplo, una enzima o un sustrato). El kit también puede contener una muestra de control o una serie de muestras de control que pueden ensayarse y compararse con la muestra de ensayo contenida. Cada componente del kit normalmente se encierra dentro de un recipiente individual y todos los diversos recipientes se incluyen en un solo envase junto con las instrucciones para observar si el sujeto ensayado padece o tiene riesgo de desarrollar un trastorno asociado con la expresión aberrante del polipéptido.

Los métodos descritos en el presente documento pueden utilizarse además como ensayos de diagnóstico o pronóstico para identificar sujetos que tienen o con riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante de un polipéptido de la invención (por ejemplo, trastornos degenerativos de la retina). Por ejemplo, los ensayos descritos en el presente documento, tales como los ensayos de diagnóstico precedentes o los siguientes ensayos, pueden utilizarse para identificar a un sujeto que tiene o con riesgo de desarrollar un trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante de un polipéptido de la invención. Como alternativa, pueden utilizarse ensayos de pronóstico para identificar a un sujeto que tiene o con riesgo de desarrollar dicha enfermedad o trastorno.

De esta manera, la presente invención proporciona un método en el que se obtiene una muestra de ensayo a partir de un sujeto y se detecta un polipéptido o ácido nucleico (por ejemplo ARNm, ADN genómico) de la invención, donde la presencia del polipéptido o ácido nucleico sirve como diagnóstico de que el sujeto padece o tiene riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante del polipéptido. Como se usa en el presente documento, una "muestra de ensayo" se refiere a una muestra biológica obtenida a partir de un sujeto de interés. Por ejemplo, una muestra de ensayo puede ser un fluido biológico (por ejemplo, suero), muestra de células o tejido.

Además los ensayos de pronóstico descritos en el presente documento pueden usarse para determinar si a un sujeto se le puede administrar un agente (por ejemplo, un agonista, polipéptido, ácido nucleico, molécula pequeña u otro candidato de fármaco) para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante de un polipéptido de la invención (por ejemplo, trastornos degenerativos de la retina). Por ejemplo, dichos métodos pueden usarse para determinar si un sujeto puede tratarse eficazmente con un agente específico o una clase de agentes específica (por ejemplo, agentes de un tipo que aumenta la actividad del polipéptido). De esta manera, la presente invención proporciona métodos para determinar si un sujeto puede tratarse eficazmente con un agente en relación con un trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante de un polipéptido de la invención, en el que se obtiene una muestra de ensayo y se detecta el polipéptido o ácido nucleico que codifica el polipéptido (por ejemplo, donde la ausencia del polipéptido o ácido nucleico sirve como diagnóstico de que al sujeto se le puede administrar el agente para tratar un trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante del polipéptido).

Los métodos de la invención también pueden usarse para detectar lesiones genéticas o mutaciones en un gen de la invención, determinándose de esta manera si un sujeto con el gen lesionado tiene riesgo de padecer un trastorno caracterizado por la expresión o actividad aberrante de un polipéptido de la invención (por ejemplo, trastornos degenerativos de la retina). En realizaciones preferidas, los métodos incluyen detectar, en una muestra de células del sujeto, la presencia o ausencia de una lesión genética o mutación caracterizada por al menos uno de los siguientes casos: una alteración que afecta a la integridad de un gen que codifica el polipéptido de la invención, o la expresión defectuosa del gen que codifica el polipéptido de la invención. Por ejemplo, dichas lesiones genéticas o mutaciones pueden detectarse averiguando la existencia de al menos uno de: 1) una delección de uno o más nucleótidos del gen; 2) una adición de uno o más nucleótidos al gen; 3) una sustitución de uno o más nucleótidos del gen; 4) una transposición cromosómica del gen; 5) una alteración en el nivel de un transcrito de ARN mensajero del gen; 6) una modificación aberrante del gen, tal como del patrón de metilación del ADN genómico; 7) la presencia de un patrón de corte y empalme de tipo no silvestre de un transcrito de ARN mensajero del gen; 8) un nivel de tipo no silvestre de la proteína codificada por el gen; 9) una pérdida alélica del gen; y 10) una modificación postraduccional

inapropiada de la proteína codificada por el gen. Como se describe en el presente documento, hay un gran número de técnicas de ensayo conocidas en este campo que pueden usarse para detectar lesiones en un gen.

En ciertas realizaciones, la detección de la lesión implica el uso de una sonda/cebador en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 4.683.195 y 4.683.202), tal como PCR de anclaje o PCR RACE o, como alternativa, en una reacción de cadena de ligamiento (LCR) (véase, por ejemplo, Landegran *et al.* (1988) *Science* 241:1077-1080; y Nakazawa *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:360-364), el último de los cuales puede ser particularmente útil para detectar mutaciones puntuales en el gen (véase, por ejemplo, Abravaya *et al.* (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:675-682). Este método puede incluir las etapas de recoger una muestra de células de un paciente, aislar el ácido nucleico (por ejemplo, genómico, ARNm o ambos) de las células de la muestra, poner en contacto la muestra de ácido nucleico con uno o más cebadores que hibridan específicamente con el gen seleccionado en condiciones tales que se produzca la hibridación y amplificación del gen (si está presente), y detectar la presencia o ausencia de un producto de amplificación, o detectar el tamaño del producto de amplificación y comparar la longitud con una muestra de control. Se prevé que la PCR y/o LCR pueden ser deseables para usarse como etapa de amplificación preliminar junto con cualquiera de las técnicas usadas para detectar mutaciones descritas en el presente documento.

En una realización alternativa, pueden identificarse mutaciones en un gen seleccionado a partir de una célula de la muestra por alteraciones en los patrones de escisión con enzimas de restricción. Por ejemplo, se aísla ADN de la muestra y de control, se amplifica (opcionalmente), se digiere con una o más endonucleasas de restricción, y se determinan los tamaños de las longitudes de los fragmentos por electroforesis en gel y se comparan. Las diferencias en los tamaños de las longitudes de los fragmentos entre la muestra y el ADN de control indican mutaciones en el ADN de la muestra.

En otra realización, puede usarse cualquiera de una diversidad de reacciones de secuenciación conocidas en este campo para secuenciar directamente el gen seleccionado y detectar mutaciones comparando la secuencia de los ácidos nucleicos de la muestra con la secuencia de tipo silvestre correspondiente (control). Los ejemplos de reacciones de secuenciación incluyen los basados en técnicas desarrolladas por Maxam y Gilbert ((1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:560) o Sanger ((1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463). También se contempla que puede utilizarse cualquiera de una diversidad de procedimientos de secuenciación automática cuando se realizan los ensayos de diagnóstico ((1995) *Bio/Techniques* 19:448), incluyendo la secuenciación por espectrometría de masas (véase, por ejemplo, la publicación PCT N° WO 94/16101; Cohen *et al.* (1996) *Adv. Chromatogr.* 36:127-162; y Griffin *et al.* (1993) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38:147-159).

En otras realizaciones, se usarán alteraciones en la movilidad electroforética para identificar mutaciones en genes. Por ejemplo, pueden usarse polimorfismos de conformación de una sola cadena (SSCP) para detectar diferencias en la movilidad electroforética entre los ácidos nucleicos mutante y de tipo silvestre (Orita *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2766; véase también Cotton (1993) *Mutat. Res.* 285:125-144; Hayashi (1992) *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9:73-79). Se desnaturalizarán y se dejarán renaturalizar fragmentos de ADN monocatenarios de la muestra y ácidos nucleicos de control. La estructura secundaria de los ácidos nucleicos monocatenarios varía de acuerdo con la secuencia, y la alteración resultante en la movilidad electroforética permite la detección de incluso un solo cambio de base. Los fragmentos de ADN pueden marcarse o detectarse son sondas marcadas. La sensibilidad del ensayo puede mejorarse usando ARN (en lugar de ADN), en el que la estructura secundaria es más sensible a un cambio en la secuencia. En una realización preferida, el presente método utiliza análisis de heterodúplex para separar moléculas de heterodúplex bicatenarias basándose en cambios en la movilidad electroforética (Keen *et al.* (1991) *Trends Genet.* 7:5).

En otra realización, el movimiento de fragmentos mutantes o de tipo silvestre en geles de poliacrilamida que contienen un gradiente de desnaturalizante se ensaya usando electroforesis en gel en gradiente desnaturalizante (DGGE) (Myers *et al.* (1985) *Nature* 313:495). Cuando se usa DGGE como método de análisis, el ADN se modificará para asegurarse de que no se desnaturaliza completamente, por ejemplo, añadiendo una pinza GC de aproximadamente 40 pb de ADN rico en GC de alto punto de fusión por PCR. En una realización adicional, se usa un gradiente de temperatura en lugar de un gradiente desnaturalizante para identificar diferencias en la movilidad del ADN de control y de muestra (Rosenbaum y Reissner (1987) *Biophys. Chem.* 265:12753).

Los ejemplos de otras técnicas para detectar mutaciones puntuales incluyen, pero sin limitación, hibridación selectiva de oligonucleótidos, amplificación selectiva o extensión selectiva de cebadores. Por ejemplo, pueden prepararse cebadores oligonucleotídicos en los que la mutación conocida se coloca centralmente y después se hibrida con un ADN diana en condiciones que permiten la hibridación únicamente si se encuentra un acoplamiento perfecto (Saiki *et al.* (1986) *Nature* 324:163); Saiki *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 86:6230). Dichos oligonucleótidos específicos de alelo se hibridan con el ADN diana amplificado por PCR o varias mutaciones diferentes cuando los oligonucleótidos se unen a la membrana de hibridación e hibridan con un ADN diana marcado.

Como alternativa, puede usarse la tecnología de amplificación específica de alelos que depende de la amplificación selectiva por PCR junto con la presente invención. Los oligonucleótidos usados como cebadores para la amplificación específica pueden llevar la mutación de interés en el centro de la molécula (de forma que la

amplificación dependa de la hibridación diferencial) (Gibbs *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:2437-2448) o en el extremo 3' de un cebador donde, en condiciones apropiadas, el desacoplamiento puede prevenir o reducir la extensión de la polimerasa (Prossner (1993) *Tibtech* 11:238). Además, puede ser deseable introducir un nuevo sitio de restricción en la región de la mutación para crear detección basada en la escisión (Gasparini *et al.* (1992) *Mol. Cell Probes* 6: 1). Se prevé que en ciertas realizaciones, la amplificación también puede realizarse usando la ligasa de Taq para amplificación (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189). En dichos casos, solo se producirá ligamiento si hay un acoplamiento perfecto en el extremo 3' de la secuencia 5' que hace posible detectar la presencia de una mutación conocida en un sitio específico buscando la presencia o ausencia de la amplificación.

Los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse, por ejemplo, utilizando kits de diagnóstico pre-ensados que comprenden al menos un ácido nucleico de sonda o reactivo de anticuerpo descrito en el presente documento, que puede usarse convenientemente, por ejemplo, en escenarios clínicos para realizar diagnósticos en pacientes que presentan síntomas o una historia familiar de una enfermedad o malestar en el que está implicado un gen que codifica un polipéptido de la invención.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben considerarse de forma alguna limitantes del alcance de la presente invención.

Métodos terapéuticos y composiciones farmacéuticas:

Los polipéptidos, moléculas de ácido nucleico, vectores y células hospedadoras de la invención pueden ser particularmente adecuados para fines terapéuticos. Por ejemplo, los polipéptido, moléculas de ácido nucleico, vectores y células hospedadoras de la invención pueden ser adecuados para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo.

Como ejemplo de trastornos neurodegenerativos del sistema nervioso central, se puede citar la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad/corea de Huntington.

En una realización particular, el trastorno neurodegenerativo es un trastorno degenerativo de la retina. Típicamente, dicho trastorno degenerativo de la retina se selecciona del grupo que consiste en retinitis pigmentosa, degeneración macular relacionada con la edad, síndrome de Bardet-Biedel, síndrome de Bassen-Kornzweig, enfermedad de Best, coroideremia, atrofia girada, amaurosis congénita de Leber, enfermedad de Refsum, enfermedad de Stargardt o síndrome de Usher. En una realización preferida, dicha enfermedad degenerativa es la retinitis pigmentosa.

En una realización, la invención proporciona un método para tratar trastornos neurodegenerativos que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido o molécula de ácido nucleico de la invención.

Por "cantidad terapéuticamente eficaz" del polipéptido o molécula de ácido nucleico de la invención se entiende una cantidad suficiente de la molécula de ácido nucleico o polipéptido para tratar trastornos neurodegenerativos con una relación razonable de beneficios/riesgos aplicable a cualquier tratamiento médico. Sin embargo, se entenderá que el uso diario total de los polipéptidos o moléculas de ácido nucleico y composiciones de la presente invención se decidirá por el médico a cargo del caso dentro del alcance de un criterio médico razonable. El nivel de dosificación terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente particular dependerá de diversos factores que incluyen el trastorno a tratar y la gravedad del trastorno; la actividad del polipéptido específico empleado; la composición específica empleada, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el momento de administración, vía de administración y velocidad de excreción del polipéptido específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o de forma coincidente con el polipéptido específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, está bien dentro de la experiencia de la técnica iniciar dosis del compuesto a niveles menores que los necesarios para conseguir el efecto terapéutico deseado y para aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado.

Los polipéptidos, moléculas de ácido nucleico, vectores o células hospedadoras de la invención pueden combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

"Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica o indeseada de otra forma cuando se administran a un mamífero, especialmente un ser humano, según sea apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo, no tóxico, sólido, semisólido o líquido.

En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, puede administrarse en una forma de administración unitaria, tal como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas de administración unitarias adecuadas

comprenden formas por vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublinguales y bucales, aerosoles, implantes, formas de administración subcutáneas, transdérmicas, tópicas, intraperitoneales, intramusculares, intravenosas, subdérmicas, transdérmicas, intratecales e intranasales y formas de administración rectales.

5 Preferentemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación que puede inyectarse. Pueden ser, en particular, soluciones salinas isotónicas estériles (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio, magnesio y similares o mezclas de dichas sales) o
10 composiciones secas, especialmente composiciones liofilizadas que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.

15 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser
20 estéril y debe ser fluida hasta tal grado que se pueda administrar fácilmente mediante una jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

25 Las soluciones del polipéptido o molécula de ácido nucleico de la invención como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezclada convenientemente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas
30 de los mismos y en aceites. En las condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

35 Un polipéptido de la invención puede formularse en una composición en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácidos (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos
40 orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden proceder de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

45 El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como
50 lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede producirse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse mediante el uso en las composiciones de agentes
que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

55 Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los polipéptidos activos en la cantidad necesaria en el disolvente apropiado con diversos de los otros ingredientes enumerados anteriormente, cuando se requiera, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes
60 activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución filtrada de forma estéril previamente del mismo.

65 También se contempla la preparación de más soluciones altamente concentradas para inyección directa, cuando se prevé el uso de DMSO como disolvente para dar como resultado una penetración extremadamente rápida, liberándose altas concentraciones de los agentes activos en un área pequeña.

Después de la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en cantidades que sean terapéuticamente eficaces. Las formulaciones se administran fácilmente en una diversidad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero
60 también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármaco y similares.

65 Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe tamponarse de forma conveniente si es necesario y el diluyente líquido primero debe hacerse isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los expertos en la materia conocerán medios acuosos estériles que pueden emplearse a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación podría disolverse en 1 ml de solución isotónica de NaCl y añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermoclasia o inyectarse en el sitio de

infusión propuesto. Se producirá necesariamente alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto a tratar. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis apropiada para el sujeto individual.

5 El polipéptido puede formularse dentro de una mezcla terapéutica para comprender de aproximadamente 0,0001 a 1,0 miligramos, o de aproximadamente de 0,001 a 0,1 miligramos, o de aproximadamente 0,1 a 1,0 o incluso aproximadamente 10 miligramos por dosis o similar. También pueden administrarse múltiples dosis.

10 Además de los polipéptidos formulados para administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otro sólidos para administración oral; formulaciones liposomales; cápsulas de liberación retardada y cualquier otra forma usada actualmente.

15 Un polipéptido, molécula de ácido nucleico o un vector de la invención puede administrarse en un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable, de tal forma que el polipéptido pueda penetrar en las regiones de la córnea y regiones internas del ojo tal como, por ejemplo, en la cámara anterior, cámara posterior, cuerpo vítreo, humor acuoso, humor vítreo, córnea, iris/cuerpo ciliar, cristalino, coroides/retina y esclerótica. El vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, una pomada, aceite vegetal o un material de encapsulación. Como alternativa, puede inyectarse directamente un polipéptido, molécula de ácido nucleico o un vector de la invención directamente en el vítreo, humor acuoso, tejidos o células del cuerpo ciliar y/o músculos extraoculares por medio de electroporación.

20 Un polipéptido, molécula de ácido nucleico o un vector de la invención también puede combinarse con otros compuestos que se sabe que ejercen actividades tróficas en las neuronas. Por ejemplo, los polipéptidos de la invención pueden combinarse con el factor de viabilidad de conos derivado de bastones (RdCVF) para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, especialmente trastornos degenerativos de la retina (por ejemplo, retinitis pigmentosa). Los polipéptidos RdCVF1 y RdCVF2 y sus genes se han descrito en las solicitudes de patente internacional publicadas con los números WO02081513 y WO2005/113586 y en LEVEILLARD *et al.*, Nat. Genet. vol. 36(7), p:755-759, 2004) y en Chalmel *et al.*, BMC Molecular Biology, 2007, 8:74. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un primer compuesto seleccionado del grupo que consiste en los polipéptidos o moléculas de ácido nucleico de la invención y un segundo compuesto seleccionado del grupo que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica RdCVF1 o RdCVF2, y los propios RdCVF1 o RdCVF2.

25 Típicamente, la presente invención también se refiere a una composición para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo, que comprende:

- a) un polipéptido de la invención o un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de la invención, y
- b) un factor de viabilidad de conos derivado de bastones (por ejemplo, RdCVF1 o RdCVF2).

40 La presente invención también se refiere a un kit para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo, que comprende:

- a) un polipéptido de la invención o un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de la invención y
- b) un factor de viabilidad de conos derivado de bastones (por ejemplo, RdCVF1 o RdCVF2).

Típicamente, los dos componentes del kit pueden administrarse por separado al paciente.

Ejemplo:

50 La nueva isoforma RdCVF2v se identificó por secuenciación a gran escala de una biblioteca de ADNc de ratón de retina normalizada. Esta isoforma era muy rara en comparación con las isoformas conocidas de RdCVF2.

Actividad de rescate de neuronas

55 RdCVF2v se ensaya *in vitro* con respecto a su actividad de rescate de neuronas, es decir, su capacidad de prevenir la muerte de las neuronas en cultivos primarios.

60 En resumen, un vector de expresión que codifica RdCVF2v se introduce por transfección en una pluralidad de células (células COS-1). 48 horas después de la transfección, se recoge el medio acondicionado de las células transfectadas y se incuba con un cultivo primario de neuronas (fotorreceptores, neuronas sensibles olfatorias...). Después de un período de cultivo, las neuronas se fijan, se marcan y se cuentan.

1) Actividad de rescate de conos

65 El cultivo primario es un sistema de cultivo celular primario enriquecido con conos procedente de embrión de pollo

(60-80 % de conos) como se describe en Fintz *et al.* (Invest. Ophtamol. Vis. Sci, vol 44(2): 818-825, 2003.)

Después de 7 días de incubación, un periodo durante el cual degeneran estas células post-mitóticas, se evaluó la viabilidad de las células en el cultivo usando el ensayo de vida/muerte (Molecular Probes) y una plataforma de recuento celular como se ha descrito previamente (Leveillard *et al.*, 2004).

La actividad trófica de RdCVF2v (polipéptido de la invención) se comparó con la de otros factores tróficos:

Factor añadido	Ninguna (control)	RdCVF	RdCVF2v	RdCVF2
Número de células vivas	70	133	146	122

El polipéptido de la invención presenta una actividad trófica que es mayor que la de RdCVF y RdCVF2.

2) Actividad de rescate de neuronas sensibles olfatorias

Se sacrifican ratones adultos por decapitación. Se disecciona la parte posterior del tabique nasal para separarla de la cavidad nasal y se pone inmediatamente en DMEM enfriado con hielo que contiene 50 µg/ml de gentamicina (Eurobio; Gibco) y 10 (v/v) de suero bovino fetal (eurobio). Se retira el cartílago del tabique y la mucosa olfatoria se incuba durante 30 min a 37 °C en una solución de 2,4 U/ml de dispasa II (Roche). El epitelio olfatorio se separa cuidadosamente de la lámina propia subyacente bajo el microscopio de disección y se tritura suavemente aproximadamente 20 veces para separar las células. La suspensión celular resultante se transfiere a un tubo cónico de 50 ml y la dispasa se inactiva añadiendo 40 ml de HBSS sin calcio y magnesio. La suspensión celular se centrifuga a 700 rpm durante 5 min, y el sedimento que contiene las células se resuspende en un medio compuesto de DMEM que contiene insulina (10 µg/ml, Sigma), transferina (10 µg/ml, Sigma), selenio (10 µg/ml, Sigma), suero bovino fetal (5 %), ácido ascórbico (200 µM). Las células se cultivan en cubreobjetos de vidrio estériles de 12 mm recubiertos con 5 µg/cm² de colágeno IV humano (Sigma); proporcionando de esta manera un cultivo primario de neuronas sensoriales olfatorias (OSN, por sus siglas en inglés).

Después de 4 días de cultivo con o sin RdCVF2v, las células se fijan y se marcan con tubulina III, y se cuentan.

3) Actividad de rescate de células de Purkinje

Después de la decapitación de ratones en el día 1-3 después del nacimiento, se diseccionan los cerebros en solución salina equilibrada de Grey fría que contiene 5 mg/ml de glucosa, y se retiran las meninges. Se realizan cortes parasagittales cerebelares (35° o 250 µm de espesor) en un triturador de tejido Mellwain y se transfieren a una membrana insertos de cultivo Millipore de 30 mm con un tamaño de poros de 0,4 µm (Millicel; Millipore, Bedford, MA). Los cortes se mantienen en cultivo en placas de 6 pocillos que contienen 3 ml de medio a 35° en una atmósfera de CO₂ al 5 % humidificado. El medio se compone de medio basal al 50 % con sales de Earle (Invitrogen), HBSS al 25 % (Invitrogen), suero de caballo al 25 % (Invitrogen), L-glutamina (1 mM) y glucosa a 5 mg/ml (Stoppini *et al.*, J Neurosci Methods, vol 37(2), p173-82, 1991).

Después de 4 días de cultivo con o sin RdCVF2v, las células se fijan y se marcan con tubulina III, y se cuentan.

4) Actividad de rescate de neuronas corticales

La preparación sin suero de cultivos primarios corticales de ratón se realiza con el ratón en el día 1 después del nacimiento. Después de retirar las meninges, las cortezas cerebrales enteras se disocian mecánicamente con solución salina de glucosa tamponada con fosfato sin cationes divalentes añadidos (NaCl 100 mM, KCl 3 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Na₂HPO₄ 7,9 mM, glucosa 33 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin) y se resuspenden en medio neurobasal (Invitrogen) que contiene suplemento B27 al 2 % (Gibco), glutamina 0,5 mM X; y glutamato 25 µM. Después, las células se cultivan en cubreobjetos recubiertos con poliornitina para producir cultivos altamente enriquecidos en neuronas corticales.

Después de 4 días de cultivo con o sin RdCVF2v, las células se fijan y se marcan con tubulina III, y se cuentan.

Modelos animales de neurodegeneración

La actividad de RdCVF2v se ensaya *in vivo* en modelos animales (ratón rd1, rata transgénica P23H,...) de neurodegeneración después de la liberación de RdCVF2v de virus adenoasociado.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSERM

5 <120> Factor de viabilidad neuronal y uso del mismo

<130> BI006385.01 LEVEILLARD

10 <160> 5

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 1

Met Val Asp Val Leu Gly Gly Arg Arg Leu Val Thr Arg Glu Gly Thr
 1 5 10 15

Val Val Glu Ala Glu Val Ala Leu Gln Asn Lys Val Val Ala Leu Tyr
 20 25 30

Phe Ala Ala Gly Arg Cys Ser Pro Ser Arg Asp Phe Thr Pro Leu Leu
 35 40 45

Cys Asp Phe Tyr Thr Glu Leu Val Ser Glu Ala Arg Arg Pro Ala Pro
 50 55 60

Phe Glu Val Val Phe Val Ser Ala Asp Gly Ser Ala Glu Glu Met Leu
 65 70 75 80

Asp Phe Met Arg Glu Leu His Gly Ser Trp Leu Ala Leu Pro Phe His
 85 90 95

20 Asp Pro Tyr Arg
 100

<210> 2
 <211> 43
 <212> PRT
 25 <213> *Mus musculus*

<400> 2

ES 2 548 980 T3

Gln Ser Gln Cys Gly Pro Ile Pro Pro Asn Leu Gly Phe Ser Ile His
1 5 10 15

Gly Ala Pro Val Cys Gln Arg Phe Leu Pro Phe Thr Ile Gly Val Ser
20 25 30

Gly Ile His Met Ser Gln Glu Pro Gln Asp Cys
35 40

5
<210> 3
<211> 55
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 3

Glu Leu Lys Lys Arg Tyr Glu Ile Thr Ala Ile Pro Lys Leu Val Val
1 5 10 15

Ile Lys Gln Asn Gly Ala Val Ile Thr Asn Lys Gly Arg Lys Gln Ile
20 25 30

Arg Glu Arg Gly Leu Ala Cys Phe Gln Asn Trp Val Glu Ala Ala Asp
35 40 45

10
Val Phe Gln Asn Phe Ser Gly
50 55

15
<210> 4
<211> 198
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 4

ES 2 548 980 T3

Met Val Asp Val Leu Gly Gly Arg Arg Leu Val Thr Arg Glu Gly Thr
 1 5 10 15

Val Val Glu Ala Glu Val Ala Leu Gln Asn Lys Val Val Ala Leu Tyr
 20 25 30

Phe Ala Ala Gly Arg Cys Ser Pro Ser Arg Asp Phe Thr Pro Leu Leu
 35 40 45

Cys Asp Phe Tyr Thr Glu Leu Val Ser Glu Ala Arg Arg Pro Ala Pro
 50 55 60

Phe Glu Val Val Phe Val Ser Ala Asp Gly Ser Ala Glu Glu Met Leu
 65 70 75 80

Asp Phe Met Arg Glu Leu His Gly Ser Trp Leu Ala Leu Pro Phe His
 85 90 95

Asp Pro Tyr Arg Gln Ser Gln Cys Gly Pro Ile Pro Pro Asn Leu Gly
 100 105 110

Phe Ser Ile His Gly Ala Pro Val Cys Gln Arg Phe Leu Pro Phe Thr
 115 120 125

Ile Gly Val Ser Gly Ile His Met Ser Gln Glu Pro Gln Asp Cys Glu
 130 135 140

Leu Lys Lys Arg Tyr Glu Ile Thr Ala Ile Pro Lys Leu Val Val Ile
 145 150 155 160

Lys Gln Asn Gly Ala Val Ile Thr Asn Lys Gly Arg Lys Gln Ile Arg
 165 170 175

Glu Arg Gly Leu Ala Cys Phe Gln Asn Trp Val Glu Ala Ala Asp Val
 180 185 190

Phe Gln Asn Phe Ser Gly
 195

5 <210> 5
 <211> 597
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 5

10

ES 2 548 980 T3

atggtggaag tgctgggagg gcggcgccctg gtgaccgagg agggcacagg ggtggaggcc 60
gaggtggggc tgcagaacaa ggtggttagct ttgtactttg cggcggggccg gtgctcgccc 120
agccgagact tcacgccgct gctctgogac ttctacacgg agctggtgag cgaggcgagg 180
cggcccgcct ccttcgaggt ggttttcgtg tcggcagacg gcagtgcgga ggagatgttg 240
gacttcatgc gcgagctgca cggctcctgg ctggcattgc ccttccacga cccctaccgg 300
caatctcaat gtgggccaat tccccgaat cttggtttca gcatccacgg ggctccggctc 360
tgccagcggt ttctgccttt tacgattgga gtgtcaggaa ttcacatgct tcaggagccc 420
caggactgtg aactgaagaa gaggtacgaa atcaccgcca tccccagct ggtggctatc 480
aagcagaacg gagctgtcat caccaacaaa gggcggaagc agatccgaga gcgcgggcta 540
gcttgctttc agaactgggt ggaagcagcc gatgttttcc aaaacttctc ggggtga 597

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 4.
- 5 2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho polipéptido tiene una longitud no mayor de 250 aminoácidos.
3. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4.
- 10 4. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 15 5. La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 4, donde dicha molécula de ácido nucleico tiene la secuencia de nucleótidos indicada en la SEC ID N° 5.
- 20 6. Un anticuerpo que se une selectivamente a un polipéptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho anticuerpo reconoce un epítipo dentro de la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 2.
- 25 7. Un método para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 4 o 5 en una muestra, que comprende las etapas de:
 - a) poner en contacto la muestra con una sonda o cebador de ácido nucleico que hibrida selectivamente con una molécula de ácido nucleico que codifica la SEC ID N° 2; y
 - b) determinar si la sonda de ácido nucleico o cebador se une a dicha molécula de ácido nucleico en la muestra.
- 30 8. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 4 o 5 para su uso en el tratamiento de una enfermedad degenerativa.
- 35 9. Una composición para su uso en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo, que comprende:
 - a) un polipéptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una molécula de ácido nucleico aislada como se define en la reivindicación 4 o 5 y
 - b) un factor de viabilidad de conos derivado de bastones seleccionado del grupo que consiste en el factor de viabilidad de conos derivado de bastones 1 (RdCVF1) y el factor de viabilidad de conos derivado de bastones 2 (RdCVF2).
- 40 10. El polipéptido o la molécula de ácido nucleico aislada para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, donde dicho trastorno neurodegenerativo es un trastorno degenerativo de la retina.
- 45 11. El polipéptido o la molécula de ácido nucleico aislada para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, donde dicha enfermedad degenerativa de la retina es retinitis pigmentosa.