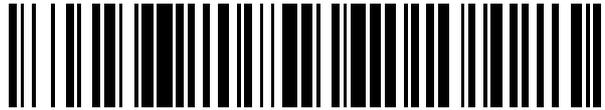


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 559**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2008 E 08857986 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2231177**

54 Título: **Factor trófico para el tratamiento de las enfermedades degenerativas de la retina**

30 Prioridad:

06.12.2007 EP 07301634

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

13.09.2016

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE (100.0%)
101, rue de Tolblac
75654 Paris Cedex 13, FR**

72 Inventor/es:

**LEVEILLARD, THIERRY;
SAHEL, JOSÉ-ALAIN y
FONTAINE, VALÉRIE**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 582 559 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 trófico para el tratamiento de las enfermedades degenerativas de la retina

5 Sector de la técnica

Esta invención se refiere a métodos y composiciones para la detección y tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina. En particular, la invención se refiere a polipéptidos que pueden proteger contra la degeneración de los conos, a las moléculas de ácido nucleico que codifican tales polipéptidos y a los anticuerpos que reconocen dichos polipéptidos.

Estado de la técnica

Los fotorreceptores son un subconjunto especializado 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 cada cono elabora un cilio especializado, denominado segmento externo que alberga la maquinaria de fototransducción. Los bastones contienen un pigmento visual que absorbe específicamente la luz, la rodopsina. Hay tres clases de conos en los seres humanos, que se caracterizan por la expresión de distintos pigmentos visuales: los conos de pigmento azul, verde y rojo. Cada tipo de proteína de pigmento visual está adaptado para absorber la luz en diferentes longitudes de onda máxima. La rodopsina de los bastones media en la visión escotópica (con poca luz), mientras que los pigmentos de los conos son responsables de la visión fotópica (con luz brillante). Los pigmentos rojos, azules y verdes también forman la base de la visión en color en los seres humanos. Los pigmentos visuales en bastones y conos responden a la luz y generan un potencial de acción en las células efectoras, las neuronas bipolares de los bastones, que a continuación se transmite por las neuronas ganglionares de la retina para producir un estímulo visual en la corteza visual.

En los seres humanos, existen una serie de enfermedades de la retina que implican la degeneración progresiva y eventual muerte de los fotorreceptores, lo que lleva inevitablemente a la ceguera. La degeneración de los fotorreceptores, tal como debido a distrofias hereditarias de la retina (por ej., enfermedades degenerativas de la retina), la degeneración macular asociada a la edad y otros maculopatías, o desprendimiento de retina, se caracterizan por la atrofia progresiva y la pérdida de función de los segmentos externos de los fotorreceptores. Además, la muerte de los fotorreceptores o pérdida de función de los fotorreceptores tiene como resultado la diferenciación parcial de neuronas de la retina de segundo orden (células bipolares de los bastones y células horizontales) en pacientes con distrofias retinianas, disminuyendo así la eficiencia global de la propagación de la señal eléctrica generada por los fotorreceptores. Los cambios secundarios en las células de glía y en el pigmento del epitelio secundarios a la degeneración de los fotorreceptores tiene como resultado cambios vasculares que dan lugar a isquemia y gliosis.

Los factores tróficos que son capaces de rescatar a los fotorreceptores de la muerte celular y/o restaurar la función de los fotorreceptores disfuncionales (atróficos o distróficos) pueden representar terapias útiles para el tratamiento de tales dolencias. Por ejemplo, el documento WO02081513 ha descrito el uso del factor de viabilidad de conos derivado de bastones (RdCVF) para el tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina. El gen RdCVF, también denominado similar a tiorredoxina (Txnl6) y más recientemente similar a nucleorredoxina (Nxnll), codifica la proteína Q8VC33 UniProt, que tiene similitud limitada con la superfamilia de la tiorredoxina y que ejerce actividad trófica en los fotorreceptores de los conos (LEVEILLARD et al., Nat. Genet. vol. 36(7), p: 755-759, 2004).

Pott et al., Molecular Brain Research 38 (1996), 109-121, divulga un gen de dedo de cinc y sugiere una función como activador de la transcripción específica de secuencia.

Sin embargo, sigue existiendo una necesidad para identificar otros genes que codifican factores tróficos de los fotorreceptores de los conos que fortalezcan el tratamiento y diagnóstico de enfermedades degenerativas de la retina.

Objeto de la invención

La presente invención se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 3, 4 o 5 o una variante de la misma, en el que dicha variante tiene una identidad de al menos 80 % con la SEQ ID NO: 3, 4 o 5 y dicho polipéptido o variante exhibe actividad de rescate de los conos y dicho polipéptido o variante tiene menos de 100 aminoácidos.

La presente invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica dicho polipéptido o dicha variante del mismo.

La presente invención también se refiere al tratamiento de una enfermedad degenerativa de la retina.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

5 En la presente memoria, las expresiones “polipéptido de la invención” se refieren a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 3, 4 o 5 o una variante de la misma, en la que dicha variante tiene una identidad de al menos 80 % con la SEQ ID NO: 3, 4 o 5 y dicho polipéptido o variante exhibe actividad de rescate y dicho polipéptido o variante tiene menos de 100 aminoácidos.

10 En la presente memoria, las expresiones “molécula de ácido nucleico de la invención” se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención.

15 En la presente memoria, las expresiones “variante alélica” se refiere a una secuencia de nucleótidos que se produce en un locus dado o a un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos. En la presente memoria, las expresiones “gen” y “gen recombinante” se refieren a moléculas de ácido nucleico que comprenden un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido de la invención.

20 En la presente memoria, la expresión “hibrida en condiciones rigurosas” pretende describir condiciones de hibridación y lavado en las cuales las secuencias de nucleótidos al menos 60 % (65 %, 70 %, preferiblemente 75 %) idénticas entre sí permanecen generalmente hibridadas entre sí. Tales condiciones rigurosas son conocidas por los expertos en la técnica y se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. En un ejemplo no limitativo las condiciones de hibridación rigurosas son hibridación en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,1 x SSC, SDS 0,2 % a aproximadamente 68 °C. Un ejemplo no limitativo preferido de condiciones de hibridación rigurosas son hibridación en 6XSSC a aproximadamente 45 °C, seguido por uno o más lavados en 0,2 X SSC, SDS 0,1 % a 50-65 °C (es decir, uno o más lavados a 50 °C, 55 °C, 60 °C o 65 °C). Preferiblemente, una molécula de ácido nucleico aislada que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o un complemento de la misma, corresponde a una molécula de ácido nucleico de origen natural.

30 En la presente memoria, una molécula de ácido nucleico “de origen 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).

35 Por “purificado” y “aislado” se entiende, cuando se hace referencia a un polipéptido o a una secuencia de nucleótidos, que la molécula indicada está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. El término “purificado” tal como se usa en la presente memoria significa que están presentes preferiblemente al menos 75 % en peso, más preferiblemente al menos 85 % en peso, aún más preferiblemente al menos 95 % en peso y lo más preferiblemente al menos 98 % en peso, de macromoléculas biológicas del mismo tipo. Una molécula “aislada” de ácido nucleico que codifica un polipéptido particular se refiere a una molécula de ácido nucleico que está sustancialmente libre 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 perjudicialmente a las características básicas de la composición.

40 Dos secuencias de aminoácidos o secuencias de ácido nucleico son “sustancialmente homólogas” o “sustancialmente similares” cuando más del 80 %, preferiblemente más del 85 %, preferiblemente más del 90 % de las secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico son idénticas, o más de aproximadamente el 90 %, preferiblemente más del 95 %, son similares (funcionalmente idénticas). Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean con el fin de realizar una comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico). A continuación, se comparan los residuos de aminoácidos o de nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo 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 tienen la misma longitud. La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr utilizando un algoritmo matemático. Preferiblemente, las secuencias similares u homólogas se identifican por alineamiento usando, por ejemplo, el programa de agregación GCG (Genetics Computer Group, Manual del Programa para el Paquete GCG, Versión 7, Madison, Wisconsin) o cualquiera de los algoritmos de comparación de secuencias, tales como BLAST, FASTA, etc.

60 Los términos “anticuerpo” e inmunoglobulina” tienen el mismo significado y se utilizan indistintamente en la presente divulgación. Anticuerpo se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se unen inmuno-específicamente a un antígeno. Como tal, el término anticuerpo abarca no sólo las moléculas enteras de anticuerpos, sino también fragmentos de anticuerpo, así como variantes (incluyendo derivados) de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. En los anticuerpos naturales, dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces disulfuro y cada cadena pesada está ligada a una cadena ligera por un enlace disulfuro. Hay dos tipos de cadena

5 ligera lambda (λ) y kappa (κ). Hay cinco clases principales de cadena pesada (o isotipos) 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 conjuntamente como CH). Las regiones variables tanto de la cadena ligera (VL) como de la cadena pesada (VH) determinan el reconocimiento y la especificidad de unión al antígeno. Los dominios de la región constante de las cadenas ligera (CL) y pesada (CH) confieren importantes propiedades biológicas tales como asociación de la cadena del anticuerpo, secreción, movilidad transplacentaria, unión del complemento y unión a receptores Fc (FcR). El fragmento Fv es la parte N-terminal del fragmento Fab de una inmunoglobulina y consiste en las porciones 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 del anticuerpo se componen de residuos que son principalmente de las regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad (CDR). Ocasionalmente, los residuos de las regiones no hipervariables o marco (FR) influyen en la estructura general del dominio y, por lo tanto, el sitio de combinación. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) se refieren a secuencias de aminoácidos que, en conjunto, definen la afinidad de unión y la especificidad de la región Fv natural de un sitio de unión de una inmunoglobulina nativa. Las cadenas ligera y pesada de una inmunoglobulina tienen cada una tres CDR, designados L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 y H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, respectivamente. Por lo tanto, un sitio de unión al antígeno incluye seis CDR, que comprende el conjunto de CDR de cada una de las regiones V de la una cadena pesada y una cadena ligera. Las regiones marco (FR) se refieren a secuencias de aminoácidos interpuestas entre las CDR, es decir, a las partes de las regiones variables de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina y que están relativamente conservadas entre las diferentes inmunoglobulinas en una sola especie, tal como se define por Kabat, et al (Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). En la presente memoria, una "región marco humana" es una región marco que es sustancialmente idéntica (aproximadamente 85 %, o más, en particular, 90 %, 95 %, o 100 %) a la región marco de un anticuerpo humano de origen natural.

30 La expresión "anticuerpo monoclonal" o "mAb" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una molécula de anticuerpo de una sola composición de aminoácidos, que se dirige contra un antígeno específico y que es producida por un único clon de linfocitos B o hibridomas.

35 La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo manipulado que comprende un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo derivado 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, se puede usar cualquier animal tal como ratón, rata, hámster, conejo o similar.

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

45 Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión al antígeno o región variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂, diacuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

50 Tal como se utiliza en la presente memoria, una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" comprende todo o parte (preferiblemente 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 marco entre sí. El polipéptido heterólogo puede fusionarse al extremo N-terminal o C-terminal del polipéptido de la invención.

55 En el contexto de la divulgación, el término "tratar" o "tratamiento", como se usa en la presente memoria, significa invertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir el trastorno o afección al que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de tal trastorno o afección (por ejemplo, las enfermedades degenerativas de la retina).

60 El término "enfermedades degenerativas de la retina" abarca todas las enfermedades asociadas con la degeneración de los conos. La enfermedad degenerativa de la retina incluye, pero no se limita a, retinitis pigmentosa, degeneración macular asociada a 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.

65 De acuerdo con la divulgación, el término "paciente" o la expresión "paciente que lo necesite", está destinado a un mamífero humano o no humano afectado o que pueda verse afectado por enfermedades degenerativas de la retina.

La expresión "muestra biológica" significa cualquier muestra biológica derivada de un paciente. Ejemplos de tales muestras incluyen fluidos, tejidos, muestras celulares, órganos, biopsias, etc. Muestras biológicas preferidas son sangre completa, suero o plasma.

5 Polipéptidos:

Un aspecto de la invención se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como la expuesta en la SEQ ID NO: 3, 4 o 5 o una variante de la misma, en la que dicha variante tiene una identidad de al menos 80 % con la SEQ ID NO: 3, 4 o 5 y dicho polipéptido o variante exhibe actividad de rescate de los conos y dicho polipéptido o variante tiene menos de 100 aminoácidos.

Generalmente, para la evaluación de la capacidad de mostrar actividad de rescate de los conos de un polipéptido, el experto puede incubar las células con medio condicionado a partir de células que expresan el polipéptido a ser evaluado y posteriormente, evaluar el número de células como supervivientes.

Generalmente dicho polipéptido puede consistir en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.

Generalmente dicha variante de acuerdo con la invención tiene una identidad de al menos 85 %, preferiblemente una identidad del 90 o 95 %, o 99 % con la SEQ ID NO: 3, 4 o 5.

Generalmente, un polipéptido de la invención puede tener menos de 100 u 80 aminoácidos

En un aspecto, el polipéptido nativo puede ser aislado de células o fuentes de tejido mediante un esquema de purificación apropiado usando técnicas de purificación de proteínas convencionales. En otro aspecto los polipéptidos de la invención se producen mediante técnicas de ADN recombinante. Como alternativa a la expresión recombinante, un polipéptido de la invención puede sintetizarse químicamente usando técnicas de síntesis de péptidos estándar.

También se divulgan proteínas quiméricas o de fusión. Una proteína de fusión útil es una proteína de fusión GST en la que el polipéptido de la invención se fusiona con el C-terminal de las secuencias de GST. Tales proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de un polipéptido recombinante de la invención.

En otro aspecto, la proteína de fusión contiene una secuencia señal heteróloga en su extremo N-terminal. Por ejemplo, la secuencia señal nativa de un polipéptido de la invención puede ser eliminada y reemplazada con una secuencia señal de otra proteína. Por ejemplo, la secuencia secretora gp67 de la proteína de la envoltura del baculovirus se puede utilizar como una secuencia señal heteróloga (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., Eds., John Wiley & Sons, 1992). Otros ejemplos de secuencias señal heterólogas eucariotas incluyen las secuencias secretoras de melitina y de fosfatasa alcalina de placenta humana (Stratagene; La Jolla, California). En otro ejemplo, las secuencias señal heterólogas procariotas útiles incluyen la señal secretora phoA (Sambrook et al., supra) y la proteína A de señal secretora (Pharmacia Biotech; Piscataway, N.J.).

Las proteínas quiméricas y de fusión se pueden producir por técnicas de ADN recombinante estándar. En otra realización, el gen de fusión puede sintetizarse por técnicas convencionales incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. Como alternativa, la amplificación por PCR de los fragmentos de genes puede llevarse a cabo 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 génica quimérica (véase, por ejemplo, Ausubel et al., supra). Además, muchos vectores de expresión que están comercialmente disponibles ya codifican un resto de fusión (por ejemplo, un polipéptido GST). Un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención puede clonarse en un vector de expresión tal que el resto de fusión está enlazado en marco con el polipéptido de la invención.

Una secuencia señal se puede utilizar para facilitar la secreción y el aislamiento de la proteína secretada u otras proteínas de interés. Las secuencias señal se caracterizan generalmente por un núcleo de aminoácidos hidrófobos que generalmente se escinden de la proteína madura durante la secreción en uno o más acontecimientos de escisión. Tales péptidos señal contienen sitios de procesamiento que permiten la escisión de la secuencia señal de las proteínas maduras a medida que pasan a través de la vía secretora. Por lo tanto, la divulgación 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 divulgación una secuencia de ácido nucleico que codifica para 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 de otro modo es difícil de aislar. La secuencia señal dirige la secreción de la proteína, tal como desde un hospedador eucariota en el que el vector de expresión se transforma y la secuencia señal se escinde posteriormente o al mismo tiempo. La proteína se puede purificar fácilmente del medio extracelular mediante métodos reconocidos en la técnica. Como alternativa, la secuencia señal puede ser ligada a la proteína de interés utilizando una secuencia que facilita la purificación, tal como con un dominio GST.

Generalmente, se pueden generar variantes de acuerdo con la invención por mutagénesis, por ejemplo, mutación puntual discreta o truncamiento.

5 Los polipéptidos divulgados en la presente memoria pueden exhibir modificaciones post-traduccionales, incluyendo, pero sin limitarse a glicosilaciones, (por ejemplo, N-glicosilaciones asociadas al N u O-glicosilaciones), miristilaciones, palmitilaciones, acetilaciones y fosforilaciones (por ejemplo, serina/treonina o tirosina).

10 Los polipéptidos de la invención pueden producirse por cualquier técnica conocida per se en la técnica, tales como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, ya sea sola o en combinación.

15 Conociendo la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada, un experto en la técnica puede fácilmente producir dichos polipéptidos, por técnicas estándar para la producción de polipéptidos. Por ejemplo, pueden sintetizarse utilizando el método de fase sólida bien conocido, preferiblemente usando un aparato de síntesis de péptidos disponible en el mercado (como el fabricado por Applied Biosystems, Foster City, California) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

20 Como alternativa, los polipéptidos de la invención se pueden sintetizar mediante técnicas de ADN recombinante como es ahora bien conocido en la técnica. Por ejemplo, estos fragmentos pueden obtenerse como productos de expresión del ADN después de la incorporación de secuencias de ADN que codifican para el (poli)péptido deseado en vectores de expresión y la introducción de dichos vectores en hospedadores eucariotas o procariotas adecuados que expresarán el polipéptido deseado, del que se podrán aislar posteriormente usando técnicas bien conocidas.

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

30 Moléculas de ácido nucleico: Un aspecto de la divulgación se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican para un polipéptido de la invención, así como a moléculas de ácido nucleico suficientes para su uso como sondas de hibridación para identificar moléculas de ácido nucleico que codifican para un polipéptido de la invención y fragmentos de tales moléculas de ácido nucleico adecuados para su uso como cebadores de PCR para la amplificación o mutación de moléculas de ácido nucleico.

35 En una realización particular, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que tiene la secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

40 Una molécula de ácido nucleico de la presente invención se puede aislar usando técnicas de biología molecular estándar y la información de la secuencia proporcionada en la presente memoria. Usando toda o una porción de las secuencias de ácido nucleico de la invención como sonda de hibridación, las moléculas de ácido nucleico de la invención se pueden aislar utilizando técnicas de hibridación y clonación estándar (por ejemplo, como se describe en Sambrook et al, eds, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989.).

45 Una molécula de ácido nucleico de la invención puede amplificarse usando ADNc, ARNm o ADN genómico como molde y cebadores de oligonucleótidos apropiados según la norma.

50 El ácido nucleico así amplificado se puede clonar en un vector apropiado y caracterizarse por análisis de la secuencia de ADN. Además, los oligonucleótidos correspondientes a la totalidad o una porción de una molécula de ácido nucleico de la invención se pueden preparar mediante técnicas sintéticas estándar, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN automatizado.

55 En otra divulgación, 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 SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. 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 que puede hibridar con la secuencia de nucleótidos dada formando de esta manera un dúplex estable.

60 Por otra parte, una molécula de ácido nucleico de la divulgación puede comprender sólo una porción de una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido de la invención, por ejemplo, un fragmento que puede utilizarse como sonda o cebador o un fragmento que codifica para una porción biológicamente activa de un polipéptido de la invención. La secuencia de nucleótidos determinada a partir de la clonación de un gen permite la generación de sondas y cebadores diseñados para su uso en la identificación y/o clonación de homólogos en otros tipos de células, por ejemplo, de otros tejidos, así como de homólogos de otros mamíferos. La sonda/cebador comprende generalmente un oligonucleótido sustancialmente purificado.

65 En una realización, el oligonucleótido comprende una región de una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con al menos aproximadamente 12, preferiblemente aproximadamente 25, más

preferiblemente aproximadamente 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350 o 400 nucleótidos consecutivos de la secuencia sentido o antisentido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

5 Las sondas basadas en la secuencia de una molécula de ácido nucleico de la invención pueden utilizarse 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 ella, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un cofactor enzimático. Tales sondas se pueden utilizar como parte de un kit de prueba de diagnóstico para identificar células o tejidos que expresan o no la proteína, tales como midiendo los niveles de una molécula de ácido nucleico que codifica para la proteína en una muestra de 10 células de un sujeto, por ejemplo, detectando los niveles de ARNm o determinando si un gen que codifica para la proteína ha sido mutado o suprimido.

15 La divulgación abarca además moléculas de ácido nucleico que difieren de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 debido a la degeneración del código genético y por lo tanto codifican para la misma proteína que la codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2

Además de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, los expertos en la técnica apreciarán que dentro de una población pueden existir polimorfismos de la secuencia de ADN que conducen a cambios en la secuencia de aminoácidos (por ej., la población humana). Tales polimorfismos genéticos pueden existir entre 20 individuos dentro de una población debido a la variación alélica natural. Un alelo es uno de un grupo de genes que ocurren alternativamente en un locus genético dado. Tales variaciones alélicas naturales pueden tener como resultado generalmente del 1-5 % de variación en la secuencia de nucleótidos de un gen dado. Los alelos alternativos se pueden identificar mediante secuenciación del gen de interés en diferentes individuos. Esto se puede llevar a cabo fácilmente utilizando sondas de hibridación para identificar el mismo locus genético en una variedad de 25 individuos. Todas y cada una de tales variaciones de nucleótidos y polimorfismos de aminoácidos resultantes o variaciones que son el resultado de la variación alélica natural y que no alteran la actividad funcional se divulgan en la presente memoria.

30 En un aspecto, los polimorfismos que están asociados con una enfermedad degenerativa de la retina se utilizan como marcadores para diagnosticar dicha enfermedad o trastorno.

35 Por otra parte, se divulgan también moléculas de ácido nucleico que codifican para proteínas de la invención de otras especies (homólogas), que tienen una secuencia de nucleótidos que difiere de la de la proteína de rata descrito en la presente memoria.

Las moléculas de ácido nucleico correspondientes a variantes alélicas naturales y homólogas de un ADNc de la invención pueden aislarse basándose en su identidad con la molécula de ácido nucleico humana divulgada en este documento usando los ADNc humanos, o una porción de los mismos, como una sonda de hibridación de acuerdo con técnicas estándar de hibridación en condiciones de hibridación rigurosas.

40 En consecuencia, en otro aspecto una molécula de ácido nucleico aislada de la divulgación tiene al menos 100, 200, 300, 400 o 500 nucleótidos contiguos de longitud e hibrida en condiciones rigurosas con la molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos, preferiblemente la secuencia codificante, de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o un complemento de la misma.

45 Además de las variantes alélicas de origen natural de una molécula de ácido nucleico de la secuencia de invención que pueden existir en la población, el experto en la técnica apreciará además que pueden introducirse cambios por mutación conduciendo con ello a cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada, sin alterar la actividad biológica de la proteína. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones de nucleótidos que conducen a 50 sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos "no esenciales". Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que puede ser alterado a partir de la secuencia de tipo silvestre sin alterar la actividad biológica, mientras que un residuo de aminoácido "esencial" es requerido para la actividad biológica. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos que no están conservados o están sólo semi- conservados entre los homólogos de diferentes especies pueden ser no esenciales para la actividad y por lo tanto serían posibles objetivos para alteración. Como 55 alternativa, los residuos de aminoácidos que se conservan entre los homólogos de diferentes especies (por ejemplo, ratón y ser humano) pueden ser esenciales para la actividad y por lo tanto no serían posibles objetivos para alteración.

60 Las mutaciones pueden introducirse por técnicas estándar, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Preferiblemente, las sustituciones conservadoras de aminoácidos se hacen en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales predichos.

Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es una en la que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen 65 cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico,

ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (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 los mutantes resultantes se pueden seleccionar en cuanto a la actividad biológica para identificar mutantes que retienen la actividad.

Después de la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse recombinantemente y se puede determinar la actividad de la proteína.

En un aspecto preferido un polipéptido mutante que es una variante de la invención se puede ensayar en cuanto a su capacidad para exhibir actividad de rescate de los conos.

La presente divulgación abarca moléculas de ácido nucleico antisentido, es decir, moléculas que son complementarias con un ácido nucleico sentido que codifica para un polipéptido de la invención, por ejemplo, complementarias con la cadena codificante de una molécula de ADNc de doble cadena o complementarias con una secuencia de ARNm. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario con una cadena codificante entera, o sólo con una parte de la misma, por ejemplo, con toda o parte de la región codificante de la proteína (o marco de lectura abierto). Una molécula de ácido nucleico antisentido puede ser antisentido en toda o parte de una región no codificante de la cadena codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica para 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 tener, por ejemplo, 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 síntesis química y reacciones de ligamiento enzimático utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un ácido nucleico antisentido (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido) se puede sintetizar químicamente utilizando nucleótidos de origen natural o se pueden utilizar nucleótidos modificados de varias maneras diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado entre los ácidos nucleicos antisentido y sentido, por ej., derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. Ejemplos de nucleótidos modificados que pueden utilizarse para generar el ácido nucleico antisentido incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxilmetil)-uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, 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'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutososina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico 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 ser producido biológicamente utilizando un vector de expresión en el que un ácido nucleico se ha subclonado en una orientación antisentido (es decir, el ARN transcrito a partir del ácido nucleico insertado será de una orientación antisentido respecto a un ácido nucleico diana de interés, descrito más detalladamente en la siguiente subsección).

Vectores de expresión recombinantes y células hospedadoras:

Otro aspecto de la invención se refiere a vectores, preferiblemente vectores de expresión, que contienen un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de la invención como se define en las reivindicaciones.

Tal como se utiliza en la presente memoria, 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 en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamíferos) son vectores integrados en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora que de ese modo se replican junto con el genoma del hospedador. Además, ciertos vectores, 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 técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos (vectores). Sin embargo, la invención pretende incluir dichas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y adenovirus asociados), que sirven para funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinante descritos en la presente memoria 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 utilizar para la expresión, que están unidas operativamente a la secuencia de ácido nucleico a expresar. Dentro de un vector de expresión recombinante, "unido operativamente" pretende indicar que la secuencia de nucleótidos de interés está unida a la secuencia(s) reguladora 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).

La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California. (1990). Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de célula hospedadora y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos sólo en ciertas células hospedadoras (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). Los expertos en la técnica 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 la proteína deseado, etc. Los vectores de expresión de la invención pueden introducirse en células hospedadoras para producir así proteínas o péptidos, incluyendo proteínas o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos como se describe en la presente memoria.

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 células eucariotas (por ejemplo, células de insecto (utilizando vectores de expresión de baculovirus), células de levadura o células de mamífero). Las células hospedadoras adecuadas se discuten adicionalmente en Goeddel, supra. Como alternativa, el vector de expresión recombinante puede transcribirse y traducirse in vitro, por ejemplo, utilizando secuencias reguladoras del promotor T7 y la polimerasa T7.

La expresión de proteínas en procariontas se lleva a cabo más frecuentemente en *E. coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas de fusión o no fusión. Los vectores de fusión añaden un número de aminoácidos a una proteína codificada en ellos, normalmente al extremo amino de la proteína recombinante. Tales vectores de fusión sirven generalmente para tres propósitos: 1) incrementar la expresión de la proteína recombinante; 2) incrementar la solubilidad de la proteína recombinante y 3) ayudar a la purificación de la proteína recombinante actuando como ligando en purificación por afinidad. A menudo, en vectores de expresión de fusión, un sitio de escisión proteolítica se introduce en la unión del resto de fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante del resto de fusión posterior a la purificación de la proteína de fusión. Tales enzimas, y sus secuencias de reconocimiento cognadas, incluyen Factor Xa, trombina y 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.

Ejemplos de vectores de expresión en *E. coli* que no son de fusión inducibles adecuados incluyen pTrc (Amann et al, (1988) *Gene* 69:301-315) y pET 11d (Studier et al., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California. (1990) 60-89). La expresión del gen diana a partir del vector pTrc se basa en la transcripción de la ARN polimerasa del hospedador a partir de un promotor de fusión trp-lac híbrido. La expresión del gen diana a partir del vector pET 11d se basa en la transcripción de un promotor de fusión gn10-lac de T7 mediada por una ARN polimerasa viral coexpresada (gn1 de T7). Esta polimerasa viral es suministrada por las cepas hospedadoras BL21 (DE3) o HMS174 (DE3) de un profago residente que alberga un gen gn1 de T7 bajo el control transcripcional del promotor lacUV 5.

Una estrategia para maximizar la expresión de la proteína recombinante en *E. coli* es expresar la proteína en una bacteria hospedadora con una capacidad alterada para escindir proteolíticamente la proteína recombinante (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 modo que los codones individuales para cada aminoácido sean los utilizados preferiblemente en *E. coli* (Wada et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118). Tal alteración de secuencias de ácido nucleico de la invención puede llevarse a cabo mediante técnicas de síntesis de ADN convencionales.

En otro aspecto el vector de expresión es un vector de expresión de levadura. Ejemplos de vectores para la expresión en la levadura *S. cerevisiae* incluyen ((Baldari et al. (1987) *EMBO J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan and 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.).

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 Sf 9) 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).

En otro aspecto un ácido nucleico de la invención se expresa en células de mamífero utilizando un vector de expresión de mamífero. 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 utiliza en células de mamífero, las funciones de control del vector de expresión se proporcionan a menudo por elementos reguladores virales. Por ejemplo, promotores usados comúnmente se derivan de poliovirus, adenovirus 2, citomegalovirus y virus de simio 40. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariotas como eucariotas véanse los capítulos 16 y 17 de Sambrook et al., supra.

En otro aspecto el vector de expresión de mamífero recombinante es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico preferiblemente en un tipo de célula particular (por ejemplo, se utilizan elementos reguladores específicos de tejido para expresar el ácido nucleico). Los elementos reguladores específicos de tejido son conocidos en la técnica. Ejemplos no limitantes de promotores específicos de tejido adecuados incluyen el promotor albúmina (específico del hígado; Pinkert et al. (1987) Genes Dev. 1:268-277), promotores específicos linfoides (Calame y Eaton (1988) Adv. Immunol. 43:235-275), en particular promotores de receptores de linfocitos T (Winoto y Baltimore (1989) EMBO J. 8:729-733) y las inmunoglobulinas (Banerji et al. (1983) Cell 33: 729-740; Queen y Baltimore (1983) Cell 33: 741-748), promotores específicos de neuronas (por ejemplo, el promotor de neurofilamentos; Byrne y Ruddle (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:5473-5477), promotores específicos de páncreas (Edlund et al. (1985) Science 230: 912-916) y promotores específicos de la glándula mamaria (por ejemplo, promotor de lactosuero; patente US-4.873.316 y Solicitud Europea N.º 264.166). También están comprendidos promotores regulados por el desarrollo, por ejemplo los promotores hox de ratón (Kessel y Gruss (1990) Science 249: 374-379) y el promotor de beta-fetoproteína (Campes y Tilghman (1989) Genes Dev. 3: 537-546).

La divulgación proporciona adicionalmente 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 al ARNm que codifica un polipéptido de la invención. Se pueden elegir 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 variedad de tipos de células, por ejemplo, se pueden elegir promotores y/o potenciadores virales o secuencias reguladoras que dirijan la expresión constitutiva directa, específica del tejido o específica del tipo celular del ARN antisentido. El vector de expresión antisentido puede estar en la forma de un plásmido recombinante, fagémido o virus atenuado en el que los ácidos nucleicos antisentido se producen bajo el control de una región reguladora de alta eficiencia, cuya actividad se puede determinar por el tipo de célula en la que el vector es presentado. Para una discusión de la regulación de la expresión génica utilizando genes antisentido véase Weintraub et al. (Reviews-Trends in Genetics, vol. 1(1) 1986).

Otro aspecto de la invención se refiere a células hospedadoras en las cuales se ha introducido un vector de expresión recombinante como se define en las reivindicaciones.

Las expresiones "célula hospedadora" y "célula hospedadora recombinante" se usan indistintamente en la presente memoria. Se entiende que tales términos se refieren no sólo a la célula objeto particular sino a la progenie o progenie potencial de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero todavía se incluyen dentro del alcance del término tal como se usa en la presente memoria.

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

El ADN del vector puede introducirse en células procariotas o eucariotas mediante técnicas de transformación o transfección convencionales. Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "transformación" y "transfección" pretenden referirse a una variedad de técnicas reconocidas en la técnica para introducir ácido nucleico extraño en una célula hospedadora, incluyendo la co-precipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, la transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, o electroporación. Los métodos adecuados para transformar o transfectar células hospedadoras pueden encontrarse en Sambrook, et al. (supra), y 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 utilizada, sólo una pequeña fracción de células puede integrar el ADN extraño en su genoma. Con el fin de identificar y seleccionar estos integrantes, se introduce generalmente en las células hospedadoras junto con el gen de interés un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, para la resistencia a los antibióticos). Los marcadores seleccionables preferidos incluyen aquellos 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 seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).

En otro aspecto, las características de expresión de un gen endógeno dentro de una célula, línea celular o

microorganismo se pueden modificar mediante la inserción de un elemento regulador de ADN heterólogo con el gen endógeno de interés en el genoma de una célula, línea celular estable o microorganismo clonado de tal manera que el elemento regulador insertado está unido operativamente con el gen endógeno y controla, modula o activa. Por ejemplo, los genes endógenos que normalmente son "transcripcionalmente silenciosos", es decir, genes que normalmente no se expresan, o se expresan sólo a niveles muy bajos en una línea celular o microorganismo, pueden ser activados mediante la inserción de un elemento regulador que es capaz de promover la expresión de un producto génico normalmente expresado en esa línea celular o microorganismo. Como alternativa, los genes endógenos, transcripcionalmente silenciosos pueden ser activados por la inserción de un elemento regulador promiscuo que actúa en todos los tipos de células.

Un elemento regulador heterólogo puede insertarse en una línea celular estable o microorganismo clonado, de tal manera que esté unido operativamente con y active la expresión de genes endógenos, utilizando técnicas, tales como la recombinación homóloga dirigida, que son bien conocidas por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Chappel, patente US-5.272.071; publicación PCT N.º WO 91/06667, publicada el 16 de mayo de 1991.

Una célula hospedadora de la invención, tal como una célula hospedadora procariota o eucariota en cultivo, puede utilizarse para producir un polipéptido de la invención. Por consiguiente, la divulgación proporciona además métodos para producir un polipéptido de la invención, utilizando las células hospedadoras de la invención. En un aspecto 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 manera que se produce el polipéptido. En otro aspecto el método comprende además aislar el polipéptido del medio o de la célula hospedadora.

La presente divulgación también se refiere a un método para producir una célula hospedadora recombinante que expresa un polipéptido de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en: (i) introducir in vitro o ex vivo un ácido nucleico recombinante o un vector como se describe 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 segregan dicho polipéptido. Tales células hospedadoras recombinantes se pueden utilizar para la producción de polipéptidos de acuerdo con la presente invención, como se describe anteriormente.

La divulgación se refiere además a un método para producir un polipéptido de acuerdo con la invención, método que comprende 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.

Las células hospedadoras de la invención también se pueden utilizar para producir animales transgénicos no humanos. Por ejemplo, en una divulgación, 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 para un polipéptido de la invención. Tales células hospedadoras pueden usarse a continuación para crear animales transgénicos no humanos en los que se han introducido secuencias exógenas que codifican para un polipéptido de la invención en su genoma o animales recombinantes homólogos en los que se han alterado secuencias endógenas que codifican para un polipéptido de la invención. Tales animales son útiles para estudiar la función y/o actividad del polipéptido y para identificar y/o evaluar moduladores de la actividad del polipéptido.

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

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 que se desarrolla un animal transgénico y que permanece en el genoma del animal maduro, dirigiendo así la expresión de un producto génico codificado en uno o más tipos de células o tejidos del animal transgénico.

Como se usa en la presente memoria, un "animal recombinante homólogo" es un animal no humano, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ratón, en el que un gen endógeno se ha alterado mediante 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.

Un animal transgénico de la divulgación se puede crear mediante la introducción de ácido nucleico que codifica para un polipéptido de la invención en los pronúcleos masculinos de un oocito fertilizado, por ejemplo, mediante microinyección, infección retroviral, y permitiendo que el oocito se desarrolle en un animal de acogida hembra pseudopreñada. Las secuencias intrónicas y señales de poliadenilación también se pueden incluir en el transgén para aumentar la eficacia de la expresión del transgén. Una secuencia reguladora específica de tejido(s) puede estar unida operativamente al transgén para dirigir la expresión del polipéptido de la invención a células particulares. Los métodos para generar animales transgénicos a través de la manipulación de embriones y microinyección,

particularmente animales tales como ratones, se han convertido en convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes US-4.736.866, US-4.870.009, US-4.873.191 y en Hogan, *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986). Métodos similares se utilizan para la producción de otros animales transgénicos. Un animal fundador transgénico puede ser identificado basándose en la presencia del transgén en su genoma y/o expresión del ARNm que codifica el transgén en tejidos o células de los animales. Un animal fundador transgénico puede utilizarse a continuación para criar animales adicionales que llevan el transgén. Además, los animales transgénicos que llevan el transgén pueden ser además criados para dar otros animales transgénicos que llevan otros transgenes.

Para crear un animal recombinante homólogo, se prepara un vector que contiene al menos una porción de un gen que codifica para un polipéptido de la invención en el que se ha introducido una delección, adición o sustitución para alterar de ese modo, por ejemplo, interrumpir funcionalmente el gen. En un aspecto preferido, el vector está diseñado de tal manera que, tras la recombinación homóloga, el gen endógeno se altera funcionalmente (es decir, ya no codifica una proteína funcional; también denominado como un vector "knock out"). Como alternativa, el vector puede ser diseñado de tal manera que, tras la recombinación homóloga, el gen endógeno esté mutado o alterado de otro modo pero todavía codifique para la proteína funcional (por ejemplo, la región reguladora en dirección 5' puede alterarse para alterar con ello la expresión de la proteína endógena). En el vector de recombinación homóloga, la porción alterada del gen está flanqueada en sus extremos 5' y 3' por ácido nucleico adicional del gen para permitir que se produzca la recombinación homóloga entre el gen exógeno portado por el vector y un gen endógeno en una célula madre embrionaria. Las secuencias de ácido nucleico flanqueantes adicionales son de longitud suficiente para una recombinación homóloga con éxito con el gen endógeno. Generalmente, se incluyen en el vector varias kilobases de ADN flanqueante (tanto en el extremo 5' como 3') (véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi (1987) *Cell* 51:503 para una descripción de vectores de recombinación homóloga). El vector se introduce en una línea de células madre embrionaria (por ejemplo, por electroporación) y se seleccionan las células en las que el gen introducido se ha recombinado homológamente con el gen endógeno (véase, por ejemplo, Li et al. (1992) *Cell* 69:915). Las células seleccionadas se inyectan a continuación 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) pp. 113-152). A continuación se puede implantar un embrión quimérico en un animal de acogida hembra pseudopreñada adecuada y llevar el embrión a término. La progenie que alberga el ADN recombinado homológamente en sus células germinales se puede utilizar para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado homológamente por transmisión en la línea germinal del transgén. Los métodos para construir vectores de recombinación homóloga y animales recombinantes homólogos se describen adicionalmente en Bradley (1991) *Current Opinion in Biotechnology* 2:823-829 y en la publicación PCT números WO 90/11354, WO 91/01140, WO 92/0968 y WO 93/04169.

En otro aspecto, pueden producirse animales no humanos transgénicos que contengan sistemas seleccionados que permitan la expresión regulada del transgén. Un ejemplo de tal sistema es el sistema de recombinasa cre/loxP del bacteriófago P1. Para una descripción del sistema 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 recombinasa FLP de *Saccharomyces cerevisiae* (O'Gorman et al. (1991) *Science* 251:1351-1355. Si se usa un sistema recombinasa cre/loxP para regular la expresión del transgén, se requieren animales que contengan transgenes que codifiquen tanto para la recombinasa Cre como para una proteína seleccionada. Dichos animales pueden proporcionarse mediante la construcción de animales transgénicos "dobles", por ejemplo, apareando dos animales transgénicos, uno que contiene un transgén que codifica para una proteína seleccionada y el otro que contiene un transgén que codifica para una recombinasa.

Los clones de los animales transgénicos no humanos descritos en la presente memoria también pueden ser producidos de acuerdo con los métodos descritos en Wilmut et al. (1997) *Nature* 385: 810-813 y en las publicaciones PCT números WO 97/07668 y WO 97/07669.

Ejemplos de compuestos que se unen selectivamente a un polipéptido de la invención son anticuerpos y aptámeros:

Anticuerpos:

En consecuencia, en un aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos sustancialmente purificados o fragmentos de los mismos y anticuerpos no humanos o fragmentos de los mismos, anticuerpos o fragmentos que se unen específicamente a un polipéptido de la invención.

En diversos aspectos los anticuerpos sustancialmente purificados de la divulgación o fragmentos de los mismos, pueden ser anticuerpos humanos, no humanos, quiméricos y/o humanizados. Estos anticuerpos no humanos pueden ser anticuerpos de cabra, ratón, oveja, caballo, pollo, conejo o rata. Además, los anticuerpos de la divulgación pueden ser anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales.

En otro aspecto adicional, la divulgación 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 la técnica, tales como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, ya sea sola o en combinación.

Los anticuerpos policlonales se pueden preparar mediante la inmunización de un sujeto adecuado con un polipéptido de la invención como un inmunógeno. Las composiciones de anticuerpos policlonales preferidas son las que han sido seleccionadas para anticuerpos dirigidos contra un polipéptido o polipéptidos de la invención. Particularmente las preparaciones de anticuerpos policlonales preferidas son las que contienen solamente anticuerpos dirigidos contra un polipéptido o polipéptidos de la invención. Composiciones de inmunógeno particularmente preferidas son aquellas que no contienen otras proteínas humanas tales como, por ejemplo, composiciones de inmunógeno fabricadas utilizando una célula hospedadora no humana para la expresión recombinante de un polipéptido de la invención. De esta manera, el único epítipo humano o epítipos reconocidos por las composiciones de anticuerpos resultantes generadas contra este inmunógeno estarán presentes como parte de un polipéptido o polipéptidos de la invención.

El título de anticuerpos en el sujeto inmunizado se puede controlar a lo largo del tiempo mediante técnicas estándar, tales como con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utilizando el polipéptido inmovilizado. Si se desea, las moléculas de anticuerpo se pueden aislar del mamífero (por ejemplo, de la sangre) y purificarse adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de proteína A para obtener la fracción IgG. Como alternativa, los anticuerpos específicos para una proteína o polipéptido de la invención se pueden seleccionar para (por ejemplo, purificar parcialmente) o purificar por, por ejemplo, cromatografía de afinidad. Por ejemplo, una proteína recombinantemente expresada y purificada (o parcialmente purificada) de la invención se produce como se describe en la presente memoria y se une de forma covalente o no covalentemente a un soporte sólido tal como, por ejemplo, una columna de cromatografía. La columna puede utilizarse a continuación 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 ese modo una composición de anticuerpo sustancialmente purificada, es decir, una que está sustancialmente libre de anticuerpos contaminantes. Por una composición de anticuerpos sustancialmente purificada se entiende, en este contexto, que la muestra de anticuerpo contiene a lo sumo solamente 30 % (en peso seco) de anticuerpos contaminantes dirigidos contra epítipos distintos de aquellos que están en la proteína o polipéptido deseados de la invención y preferiblemente a lo sumo 20 %, aún más preferiblemente a lo sumo 10 % y lo más preferiblemente a lo sumo 5 % (en peso seco) de la muestra es de anticuerpos contaminantes. Una composición de anticuerpo purificado significa que al menos 99 % de los anticuerpos en la composición están dirigidos contra la proteína o polipéptido deseados de la invención.

En un momento apropiado después de la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpos específicos son más altos, las células productoras de anticuerpos pueden obtenerse del sujeto y utilizarse para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas estándar, tales como la técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497, la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor et al. (1983) *Immunol. Today* 4:72), la técnica del hibridoma del EBV (Cole et al. (1985), *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) o las técnicas del 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 mediante el cribado de los sobrenadantes del cultivo de hibridoma para anticuerpos que se unen al polipéptido de interés, por ejemplo, usando un ensayo ELISA estándar.

Como alternativa a la preparación de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales, un anticuerpo monoclonal dirigido contra un polipéptido de la invención puede ser identificado y aislado mediante cribado de una biblioteca combinatoria recombinante de inmunoglobulinas (por ejemplo, una biblioteca de presentación de fagos de anticuerpos) con el polipéptido de interés. Los kits para generar y cribar bibliotecas de presentación de fagos están disponibles comercialmente (por ejemplo, el Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, número de catálogo 27-9400-01 y el Stratagene SurfZAP (TM) Phage Display Kit, número de catálogo 240612). Además, ejemplos de métodos y reactivos particularmente susceptibles para su uso en la generación y cribado de bibliotecas de presentación de anticuerpos se pueden encontrar en, por ejemplo, la patente US-5.223.409; la publicación PCT N.º WO 92/18619; la publicación PCT N.º WO 91/17271; la publicación PCT N.º WO 92/20791; la publicación PCT N.º WO 92/15679; la publicación PCT N.º WO 93/01288; la publicación PCT N.º WO 92/01047; la publicación PCT N.º WO 92/09690; la publicación PCT N.º 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.

Adicionalmente, los anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden tanto porciones humanas como no humanas, que se pueden producir utilizando técnicas de ADN recombinante convencionales, están dentro del alcance de la invención. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como los que tienen una región variable derivada de un mAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana. (Véase, por ejemplo, Cabilly et al., patente US-4.816.567 y Boss et al., patente US-4.816.397). Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las especies no humanas y una región marco de una molécula de inmunoglobulina

humana. (Véase, por ejemplo, Queen, Patente US-5.585.089). Tales anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden ser producidos por técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo, utilizando métodos descritos en la publicación PCT N.º WO 87/02671; Solicitud de Patente Europea 184.187; Solicitud de Patente Europea 171.496; Solicitud de Patente Europea 173.494; la publicación PCT N.º WO 86/01533; Patente US-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) *Canc. 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 US-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.

Los anticuerpos completamente humanos se pueden producir, por ejemplo, utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar los genes de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas endógenas, pero que pueden expresar genes de cadena pesada y ligera humanas. Los ratones transgénicos se inmunizan de la manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, con todo o con una porción de un polipéptido de la invención. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden obtenerse usando tecnología del hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de los linfocitos B y posteriormente sufren un cambio de clase y mutación somática. Por lo tanto, usando una técnica de este tipo, es posible producir anticuerpos terapéuticamente útiles IgG, IgA e IgE. Para una visión 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 tales anticuerpos, véase, por ejemplo, la patente US-5.625.126; patentes US-5.633.425; US-5.569.825; US-5.661.016 y US-5.545.806. Además, empresas como Abgenix, Inc. (Fremont, Calif.) pueden proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando tecnología similar a la descrita anteriormente.

Un anticuerpo dirigido contra un polipéptido de la invención (por ejemplo, anticuerpo monoclonal) se puede utilizar para aislar el polipéptido mediante técnicas estándar, tales como cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación. Además, un anticuerpo de este tipo puede ser utilizado para detectar la proteína (por ejemplo, en un lisado celular o sobrenadante celular) con el fin de evaluar la abundancia y patrón de expresión del polipéptido. Los anticuerpos también se pueden utilizar para diagnóstico para controlar los niveles de proteína en tejido como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse por acoplamiento del anticuerpo a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; 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; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina, y ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{31}S o ^3H .

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

El término "Fab" indica un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión al antígeno, en el que aproximadamente una mitad del lado N-terminal de la cadena H y toda la cadena L, entre los fragmentos obtenidos tratando IgG con una proteasa, papaína, están unidas a través de un enlace disulfuro.

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 al antígeno, que es ligeramente mayor que la del Fab unido a través de un enlace disulfuro de la región bisagra, entre los fragmentos obtenidos tratando IgG con una proteasa, pepsina.

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

Un polipéptido de cadena sencilla Fv ("scFv") es un heterodímero VH::VL unido covalentemente que se expresa habitualmente a partir de una fusión de genes que incluyen los genes que codifican para VH y VL unidos por un enlazador que codifica para el péptido. El fragmento scFv humano de la invención incluye CDR que se mantienen en conformación apropiada, preferiblemente 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 se pueden formar ya sea espontáneamente por asociación de scFv monovalentes, o se pueden generar mediante el acoplamiento de los scFv monovalentes por un enlazador peptídico, tales como sc(Fv)₂ divalente.

El término “diacuerpos” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, cuyos fragmentos comprenden 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 son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno.

Aptámeros:

En otro aspecto la divulgación se refiere a un aptámero dirigido contra un polipéptido de la invención.

Los aptámeros son una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos o de oligopéptidos con la capacidad de reconocer virtualmente cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Tales ligandos pueden ser aislados a través del sistema Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX) de una biblioteca de secuencia aleatoria, como se describe en Tuerk C. 1997. La biblioteca de secuencia aleatoria puede obtenerse mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente químicamente modificado, de una secuencia única. Posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas han sido revisados en Jayasena S.D., 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en las regiones variables de anticuerpos conformacionalmente restringidos mostrados por una proteína plataforma, tales como tiorredoxina A de *E. coli*, que se seleccionan a partir de bibliotecas combinatorias mediante dos métodos híbridos (Colas et al., 1996).

Métodos terapéuticos y composiciones farmacéuticas:

Los polipéptidos, moléculas de ácidos nucleicos, vectores, células hospedadoras, anticuerpos y aptámeros de la invención pueden ser particularmente adecuados para fines terapéuticos. Por ejemplo, los polipéptidos, moléculas de ácido nucleico, vectores, células hospedadoras de la invención pueden ser adecuados para el tratamiento de una enfermedad degenerativa de la retina.

Generalmente dicha enfermedad degenerativa de la retina se selecciona del grupo que consiste en retinitis pigmentosa, degeneración macular asociada a 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 un aspecto, la invención proporciona un método para el tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de polipéptido o ácido nucleico de la invención.

Por una “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 el tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina en una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de los polipéptidos o moléculas de ácido nucleico y las composiciones de la presente invención será decidido por el médico dentro del alcance del juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores incluyendo el trastorno a tratar y la gravedad del trastorno; actividad del polipéptido específico empleado; la composición específica empleada, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, vía de administración y velocidad de excreción del polipéptido específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos utilizados en combinación o coincidental con el polipéptido específico empleado y factores como bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, está bien dentro de la experiencia de la técnica comenzar con dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado.

Los polipéptidos o moléculas de ácido nucleico 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 u otra reacción no deseada cuando se administra a un mamífero, especialmente un ser humano, según sea apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga sólida, semisólida o líquida no tóxica, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo.

En las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación para la administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, el principio activo, solo o en combinación con otro principio

activo, se pueden administrar en una forma unitaria de administración, como una mezcla con el apoyo farmacéutico convencional, a los animales y los seres humanos. Formas de administración unitarias adecuadas comprenden formas para administración por vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y formas de administración rectal.

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

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 estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Soluciones del polipéptido o molécula de ácido nucleico de la invención como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezclada de forma adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

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

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, por el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede conseguirse con 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 de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser conseguirse mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los polipéptidos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y técnicas de liofilización que producen un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

También se contempla la preparación de soluciones más o altamente concentradas para la inyección directa, donde se prevé el uso de DMSO como disolvente para obtener una penetración extremadamente rápida, la administración de altas concentraciones de los principios activos a una pequeña área.

Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas farmacéuticas, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, aunque también se pueden emplear las cápsulas de liberación de fármaco y similares.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe estar adecuadamente tamponada si es necesario y el diluyente líquido debe hacerse primero isotónico con solución salina o glucosa suficiente. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos por los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación

puede disolverse en 1 ml de solución isotónica de NaCl y añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermoclasia o inyectarse en el sitio propuesto de infusión. Algunas variaciones en la dosificación ocurrirán necesariamente dependiendo de la afección del sujeto que está siendo tratado. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis apropiada para el sujeto individual.

5 El polipéptido se puede formular dentro de una mezcla terapéutica para comprender aproximadamente 0,0001 a 1,0 miligramos, o aproximadamente 0,001 a 0,1 miligramos, o aproximadamente 0,1 a 1,0 o incluso aproximadamente 10 miligramos por dosis más o menos. Las dosis múltiples pueden administrarse también.

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

15 Un polipéptido, molécula de ácido nucleico o un vector de la invención se pueden suministrar en un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable, de tal modo que el polipéptido puede penetrar en las regiones corneales e internas del ojo, como por ejemplo 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, por ejemplo, ser una pomada, aceite vegetal o un material encapsulante. Como alternativa, un polipéptido, molécula de ácido nucleico o un vector de la invención pueden inyectarse directamente en el humor vítreo, humor acuoso, tejido(s) del cuerpo ciliar o células y/o músculos extraoculares por medio de electroporación.

20 Un polipéptido, molécula de ácido nucleico o un vector de la invención también se pueden combinar con otros compuestos conocidos por ejercer actividades tróficas sobre los fotorreceptores del cono. Por ejemplo, los polipéptidos de la invención pueden combinarse con el factor de viabilidad de conos derivado de bastones (RdCVF) para el tratamiento de la retinitis pigmentosa. Los polipéptidos y genes RdCVF1 y RdCVF2 han sido descritos en las solicitudes internacionales de patente 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. De acuerdo con ello, la presente divulgación se refiere también a composiciones farmacéuticas que comprenden un primer compuesto seleccionado del grupo que consiste en los polipéptidos o las moléculas de ácido nucleico de la invención y un segundo compuesto seleccionado del grupo que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica para RdCVF o el propio RdCVF.

25 Generalmente, la presente invención también se refiere a una composición para el tratamiento de una enfermedad degenerativa de la retina que comprende:

- a) un polipéptido de la invención o un ácido nucleico aislado que codifica para un polipéptido de la invención y
- b) 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 una enfermedad degenerativa de la retina que comprende:

- a) un polipéptido o variante del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o una molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, y
- 45 b) un factor de viabilidad de conos derivado de bastones (por ejemplo, RdCVF1 o RdCVF2).

Los 2 componentes del kit pueden administrarse por separado al paciente.

Métodos de selección:

50 La divulgación proporciona un método (también denominado aquí como un "método de selección") 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 actividad estimuladora sobre, por ejemplo, la expresión o actividad de un polipéptido de la invención.

55 En un aspecto, la divulgación proporciona ensayos para seleccionar compuestos candidatos o de ensayo que aumentan la actividad de un polipéptido de la invención o una porción biológicamente activa del mismo. Más particularmente, la divulgación proporciona ensayos para seleccionar candidatos o compuestos de ensayo que pueden estimular la expresión de los polipéptidos de la invención.

60 Los compuestos candidatos o de ensayo pueden ensayarse por su capacidad para estimular la expresión de los polipéptidos de la invención. Por ejemplo, se puede usar un ensayo de sistema de información para medir la expresión del polipéptido de la invención. Una célula hospedadora de la invención puede ser utilizada con ese fin. En un aspecto particular, el vector puede codificar para 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 deriva de *Aequorea victoria* y un número cada vez mayor de variantes de secuencia de GFP

65

5 con propiedades útiles. La lista también incluye la proteína fluorescente roja (RFP) derivada de *Discosoma* y la proteína fluorescente fotoactivable (KFP1) deriva de *Anemonia*. Estas proteínas son enzimas autocatalíticas que son todos capaces de generar fluoróforos internos muy visibles y de gran eficacia emisora como resultado de la endociclación de residuos de aminoácidos básicos. Otra característica común de las proteínas fluorescentes es que la señal es estable, independiente de la especie y no requiere ningún sustrato o cofactor para la generación de una señal. La detección directa de la fluorescencia por observación visual (por ejemplo, bajo luz UV de amplio espectro) puede ser la utilizada para cuantificar la cantidad de la proteína de fusión producida en virtud de la presencia o ausencia de los compuestos candidatos o de ensayo.

10 Los compuestos candidatos o de ensayo se pueden ensayar posteriormente en cuanto a su capacidad para inhibir la degeneración de los fotorreceptores de los conos. Cualquier ensayo adecuado conocido para un experto en la técnica puede ser usado para controlar tales efectos (como el descrito en el ejemplo).

15 Los compuestos de ensayo de la presente divulgación se pueden obtener utilizando cualquiera de los numerosos enfoques en los métodos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica, incluyendo: bibliotecas biológicas; bibliotecas en fase de solución o en fase sólida paralelas espacialmente direccionables; 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. El enfoque de biblioteca biológica se limita a bibliotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables a péptidos, oligómeros no peptídicos o bibliotecas de moléculas pequeñas de compuestos.

Métodos de diagnóstico:

25 La presente divulgación también se refiere a ensayos de diagnóstico, ensayos de pronóstico y ensayos de control.

En consecuencia, un aspecto de la presente divulgación 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, tejido) para determinar de ese modo si un individuo está afectado con una enfermedad o trastorno, o está en riesgo de desarrollar un trastorno, asociado con la expresión o actividad aberrante de un polipéptido de la invención (por ejemplo, enfermedades degenerativas de la retina).

35 La divulgación también proporciona ensayos de pronóstico (o predictivos) para determinar si un individuo está en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante de un polipéptido de la invención (por ejemplo, enfermedades degenerativas de la retina). Por ejemplo, las mutaciones en un gen de la invención se pueden ensayar en una muestra biológica. Tales ensayos pueden usarse con fines de pronóstico o predictivo para tratar así profilácticamente un individuo antes de la aparición de un trastorno caracterizado por o asociado con la expresión o actividad aberrante de un polipéptido de la invención.

40 Sin embargo, otro aspecto de la divulgación se refiere a la vigilancia 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.

45 Un ejemplo de método 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 prueba y poner en contacto la muestra biológica con un compuesto o un agente capaz de detectar un polipéptido o ácido nucleico (por ejemplo, ARNm, ADN genómico) de la invención de tal manera que la presencia de un polipéptido o ácido nucleico de la invención se detecta en la muestra biológica. Un agente preferido para detectar ARNm o ADN genómico que codifica para un polipéptido de la invención es una sonda de ácido nucleico marcada capaz de hibridar con ARNm o ADN genómico que codifica para un polipéptido de la invención. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, el ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o una porción del mismo, tal como un oligonucleótido de al menos 15, 30, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridar específicamente en condiciones rigurosas con un ARNm o ADN genómico que codifica para un polipéptido de la invención. Otras sondas adecuadas para su uso en los ensayos de diagnóstico de la invención se describen en la presente memoria.

55 Un agente preferido para detectar un polipéptido de la invención es un anticuerpo capaz de unirse a un polipéptido de la invención, preferiblemente un anticuerpo con un marcador detectable. Los anticuerpos se pueden preparar de acuerdo con los métodos como se describe anteriormente.

60 El término “marcado”, con respecto a la sonda o anticuerpo, pretende abarcar el etiquetado directo de la sonda o anticuerpo por acoplamiento (es decir, unión física) de una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como marcaje indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad con otro reactivo que está marcado directamente. Ejemplos de marcaje indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente y marcaje terminal de una sonda de ADN con biotina de manera que puede ser detectada con estreptavidina marcada fluorescentemente.

65

La expresión "muestra biológica" se pretende que incluya tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro de un sujeto.

5 El método de detección de la divulgación se puede utilizar 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 Northern e hibridaciones in situ. Las técnicas in vitro para la detección de un polipéptido de la invención incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), transferencias Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Las técnicas in vitro para la detección de ADN genómico incluyen hibridaciones Southern. Además, las técnicas in vivo para la detección de un polipéptido de la invención incluyen la introducción en un sujeto de un anticuerpo marcado dirigido contra el polipéptido. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con un marcador radiactivo cuya presencia y localización en un sujeto puede detectarse mediante técnicas de imagen estándar.

15 En un aspecto, la muestra biológica contiene moléculas de proteína del sujeto de ensayo. Como alternativa, la muestra biológica puede contener moléculas de ARNm del sujeto de ensayo o moléculas de ADN genómico del sujeto de ensayo.

20 En otro aspecto, los métodos implican además obtener una muestra biológica de control 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 para un polipéptido de la invención, de tal modo que la presencia del polipéptido o ARNm o ADN genómico que codifica el polipéptido se detecta en la muestra biológica y comparar la presencia del polipéptido o ARNm o ADN genómico que codifica para el polipéptido en la muestra de control con la presencia del polipéptido o ARNm o ADN genómico que codifica para el polipéptido en la muestra de ensayo.

25 La invención también abarca un kit como se define en las reivindicaciones que se puede utilizar para detectar la presencia de un polipéptido o ácido nucleico de la invención en una muestra biológica (una muestra de ensayo). Tales kits se pueden utilizar para determinar si un sujeto padece o está en mayor riesgo de desarrollar un trastorno asociado con la expresión aberrante de un polipéptido de la invención (por ejemplo, enfermedades degenerativas de la retina). El kit, por ejemplo, puede comprender un compuesto o agente marcado capaz de detectar el polipéptido o ARNm que codifica para el polipéptido en una muestra biológica y medios para determinar la cantidad del polipéptido o ARNm en la muestra (por ejemplo, un anticuerpo que se une al polipéptido o una sonda de oligonucleótidos que se une a ADN o ARNm que codifica para el polipéptido). Los kits también pueden incluir instrucciones para observar que el sujeto ensayado padece o está en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con la expresión aberrante del polipéptido si la cantidad del polipéptido o ARNm que codifica para el polipéptido está por encima o por debajo de un nivel normal.

35 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 o bien al polipéptido o al primer anticuerpo y que está conjugado con un agente detectable.

40 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 para un polipéptido de la invención o (2) un par de cebadores útiles para amplificar una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido de la invención.

45 El kit también puede comprender, por ejemplo, un agente tampón, un conservante, o un agente estabilizante 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 está generalmente encerrado dentro de un envase individual y todos los diversos envases están dentro de un solo paquete junto con las instrucciones para observar si el sujeto ensayado padece o está en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con la expresión aberrante del polipéptido

50 Los métodos descritos en la presente memoria además pueden ser utilizados como ensayos de diagnóstico o pronóstico para identificar sujetos que tienen o están en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante de un polipéptido de la invención (por ejemplo, enfermedades degenerativas de la retina). Por ejemplo, los ensayos descritos en la presente memoria, tales como los ensayos de diagnóstico precedentes o los siguientes ensayos, se pueden utilizar para identificar un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante de un polipéptido de la invención. Como alternativa, los ensayos de pronóstico pueden utilizarse para identificar un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno.

60 Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un método en el que se obtiene una muestra de ensayo de un sujeto y se detecta un polipéptido o ácido nucleico (por ejemplo, ARNm, ADN genómico) de la invención, en el que la presencia del polipéptido o ácido nucleico es diagnóstica de que un sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante del polipéptido. Como se usa en la presente

memoria, una "muestra de ensayo" se refiere a una muestra biológica obtenida de un sujeto de interés. Por ejemplo, una muestra de ensayo puede ser un fluido biológico (por ejemplo, suero), muestra celular, o tejido.

Además, los ensayos de pronóstico descritos en la presente memoria se pueden utilizar para determinar si a un sujeto se le puede administrar un agente (por ejemplo, un agonista, polipéptido, ácido nucleico, molécula pequeña, u otro fármaco candidato) para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión aberrante o la actividad de un polipéptido de la invención (por ejemplo, enfermedades degenerativas de la retina). Por ejemplo, tales métodos se pueden utilizar para determinar si un sujeto puede tratarse eficazmente con un agente o clase de agentes específicos (por ejemplo, agentes de un tipo que aumentan la actividad del polipéptido). Por lo tanto, la presente divulgación proporciona métodos para determinar si un sujeto puede tratarse eficazmente con un agente para 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 para el polipéptido (por ejemplo, en el que la ausencia del polipéptido o ácido nucleico es diagnóstico para que a un sujeto se le pueda administrar el agente para tratar un trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante del polipéptido).

Los métodos de la divulgación también se pueden utilizar para detectar lesiones genéticas o mutaciones en un gen de la invención, determinando con ello si un sujeto con el gen lesionado tiene riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión o actividad aberrante de un polipéptido de la invención (por ejemplo, enfermedades degenerativas de la retina). En un aspecto preferido 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 una de una alteración que afecta a la integridad de un gen que codifica el polipéptido de la invención, o la mis-expresión del gen que codifica para el polipéptido de la invención. Por ejemplo, tales lesiones o mutaciones genéticas pueden detectarse mediante la determinación de 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 reordenación 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 una proteína codificada por el gen de tipo no silvestre; 9) una pérdida alélica del gen y 10) una modificación post-traducciona inapropiada de la proteína codificada por el gen. Como se describe en la presente memoria, hay un gran número de técnicas de ensayo conocidas en la técnica que se pueden usar para detectar lesiones en un gen.

En ciertos aspectos, la detección de la lesión implica el uso de una sonda/cebador en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (véase, por ejemplo, las patentes US-4.683.195 y US-4.683.202), tal como la PCR de anclaje o PCR RACE, o como alternativa, una reacción en cadena de ligación (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 un 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 ocurre 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 control. Se prevé que la PCR y/o la LCR puedan ser deseables para usar como etapa de amplificación preliminar junto con cualquiera de las técnicas usadas para detectar las mutaciones descritas en este documento.

En un aspecto alternativo, las mutaciones en un gen seleccionado de una célula de muestra pueden identificarse mediante alteraciones en los patrones de escisión de enzimas de restricción. Por ejemplo, se aísla ADN de una muestra y de un control, se amplifican (opcionalmente), se digieren con una o más endonucleasas de restricción y se determina el tamaño de longitud de los fragmentos por electroforesis en gel y se comparan. Las diferencias en el tamaño de longitud de los fragmentos entre el ADN de muestra y de control indica mutaciones en el ADN de la muestra.

En otro aspecto más, se puede usar cualquiera de una variedad de reacciones de secuenciación conocidas en la técnica para secuenciar directamente el gen seleccionado y detectar las mutaciones comparando la secuencia de los ácidos nucleicos de la muestra con la secuencia de tipo silvestre (control) correspondiente. Ejemplos de reacciones de secuenciación incluyen las basadas en técnicas desarrolladas por Maxim y Gilbert ((1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:560) o Sanger ((1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463). También se contempla que se pueda utilizar cualquiera de una variedad de procedimientos de secuenciación automatizados 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.º WO 94/16101; Cohen et al. (1996) *Adv. Chromatogr.* 36:127-162 y Griffin et al. (1993) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38: 147-159).

En otros aspectos, se utilizarán las alteraciones en la movilidad electroforética para identificar mutaciones en los genes. Por ejemplo, el polimorfismo de conformación de cadena única (SSCP) se pueden utilizar para detectar diferencias en la movilidad electroforética entre ácidos nucleicos mutantes y de tipo silvestre (Orita et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2766; ver también Cotton (1993) *Mutat. Res.* 285:125-144; Hayashi (1992) *Genet. Anal.*

Tech. Appl. 9:73-79). Los fragmentos de ADN de una sola hebra de la muestra y los ácidos nucleicos control se desnaturalizarán y se dejarán renaturalizar. La estructura secundaria de los ácidos nucleicos monocatenarios varía según la secuencia, y la alteración resultante en la movilidad electroforética permite la detección de incluso un único cambio de base. Los fragmentos de ADN pueden marcarse o detectarse con sondas marcadas. La sensibilidad del ensayo puede potenciarse mediante el uso de ARN (más que ADN), en el que la estructura secundaria es más sensible a un cambio en la secuencia. En una realización preferida, el método objeto utiliza análisis de heterodúplex para separar moléculas de heterodúplex de doble hebra basados en los cambios en la movilidad electroforética (Keen et al. (1991) Trends Genet. 7:5).

En otro aspecto más, el movimiento de los mutantes o de los fragmentos de tipo silvestre en geles de poliacrilamida que contienen un gradiente de desnaturalizante se ensaya usando electroforesis en gel desnaturalizante en gradiente (DGGE) (Myers et al. (1985) Nature 313:495). Cuando se utiliza DGGE como el método de análisis, el ADN se modificará para asegurar que no se desnaturaliza completamente, por ejemplo, mediante la adición de una abrazadera GC de aproximadamente 40 pb de ADN rico en GC de alta 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 la muestra (Rosenbaum y Reissner (1987) Biophys. Chem. 265:12753).

Ejemplos de otras técnicas para detectar mutaciones puntuales incluyen, pero no se limitan a, hibridación selectiva de oligonucleótidos, amplificación selectiva, o extensión de cebador selectiva. Por ejemplo, se pueden preparar cebadores de oligonucleótidos en los cuales la mutación conocida se coloca centralmente y luego se hibridan con el ADN diana en condiciones que permitan la hibridación sólo si se encuentra una coincidencia perfecta (Saiki et al. (1986) Nature 324:163); Saiki et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6230). Tales oligonucleótidos específicos de alelo se hibridan con ADN diana amplificado por PCR o un número de mutaciones diferentes cuando los oligonucleótidos están unidos a la membrana de hibridación y se hibridan con ADN diana marcado.

Como alternativa, la tecnología de amplificación específica de alelo que depende de la amplificación selectiva por PCR puede utilizarse conjuntamente con la presente invención. Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para la amplificación específica pueden llevar la mutación de interés en el centro de la molécula (de modo que la amplificación depende 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, la no coincidencia 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 una detección basada en la escisión (Gasparini et al. (1992) Mol. Cell Probes 6:1). Se prevé que en ciertos aspectos, la amplificación también puede realizarse usando Taq ligasa para la amplificación (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189). En tales casos, la ligación sólo se producirá si hay un apareamiento perfecto en el extremo 3' de la secuencia 5', por lo que es posible detectar la presencia de una mutación conocida en un sitio específico buscando la presencia o ausencia de amplificación.

Los métodos descritos en la presente memoria se pueden realizar, por ejemplo, mediante la utilización de kits de diagnóstico pre-ensados que comprenden al menos un ácido nucleico sonda o reactivo de anticuerpo descrito en la presente memoria, que puede usarse convenientemente, por ejemplo, en entornos clínicos para diagnosticar pacientes que muestran síntomas o antecedentes familiares de una enfermedad o una afección que implica un gen que codifica para un polipéptido de la invención.

La invención se ilustrará adicionalmente en vista de la siguiente figura y el ejemplo.

FIGURA:

Figura 1: El efecto del clon 0073.09.37 (SEQ ID NO: 1) sobre la viabilidad de las células en cultivos enriquecidos con conos. Este gráfico representa la compilación de tres experimentos totalmente independientes.

EJEMPLO:

Medio condicionado:

Se transformaron células COS-1 con un vector pcDNA3 que contiene la secuencia de ácido nucleico como la expuesta en SEQ ID NO: 1. Un vector vacío se utilizó como control negativo. Esto se realizó utilizando el método de Chen y Okayama, (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. Mol Cell Biol., 7, 2745-2752. A continuación, el medio condicionado de las células COS-1 se almacenó congelado hasta el momento de la prueba en un modelo de degeneración de la retina.

Cultivos de retina de embrión de pollo

El protocolo fue adaptado de Adler y Hatlee [(1989) Science, 243, 391]. La retina embrionaria de pollo (6 días en ovo) se disocia y se siembra en cultivo en monocapa. En estas condiciones de cultivo con la ausencia de señales de diferenciación, los conos representan el 60-80 % de las células. Se produjeron anticuerpos policlonales en conejo contra visinina (un marcador de conos de pollo, número de acceso Genbank M84729) y se verificó que la proporción

de conos en nuestro cultivo es del 60-80 %. El entorno sencillo de nuestro modelo (medio químicamente definido, ausencia de contacto entre células) además de la facilidad y rapidez del método, le convierten en un sistema muy apropiado para estudiar los factores tróficos implicados en la supervivencia de los conos. Brevemente, las retinas de los embriones obtenidos de un aislado de control de los progenitores, se diseccionan después de seis días de desarrollo in ovo, las células se disocian y se siembran a baja densidad (10^5 células/cm²). Durante diez días se hizo un seguimiento de la viabilidad celular (60-80 % conos) utilizando el ensayo LIVE/DEAD (Molecular Probes, Eugene, EE.UU.) un ensayo que cuantifica las células vivas y muertas. El número de células vivas disminuye hasta un 8 % del número inicial de células después de siete días de cultivo en medio definido químicamente. Cuando se realiza en presencia de medio condicionado a partir de células COS1 transfectadas, las células vivas se cuentan después de siete días in vitro.

Los progenitores de pollo (cepa 657 etiqueta de color rojo) se mantuvieron en un compartimento separado para el propósito de este experimento en una instalación de incubadora a 25 km del laboratorio. Los huevos fertilizados obtenidos de forma natural se recogieron semanalmente, y se mantuvieron a 17 °C (su cero biológico) en el laboratorio después de la eclosión. Diariamente se incubaron 5 huevos durante 24 horas a 20 °C y luego 136 horas a 37 °C con reversión intermitente de la inclinación de los huevos en una cámara humidificada. El día del cultivo, la superficie de los huevos se lavó con Mucocit, a continuación se rompieron, y los embriones de pollo se transfirieron a PBS. Se verifica que la etapa de desarrollo del embrión es del 29 por comparación visual según Hamburger y Hamilton (1951), en (Essential Development Biology, Stern and Holland Ed). Dos de los embriones fueron elegidos y enucleados, los ojos transferidos a medio independiente de CO₂- (Life Technologies). Las retinas se diseccionaron y se transfirieron a tampón de Ringer y se lavaron dos veces. Las retinas se cortan en trozos pequeños y se tratan 20 minutos a 37 °C con una solución de tripsina (0,25 % p/v). La reacción se detuvo mediante la adición de medios de cultivo (M199, Life Technologies) suplementados con FCS 10% inactivado. La suspensión de células se trata durante unos pocos minutos en 25 µl de ADNasa I (1 mg/ml, Sigma). La suspensión de células se lava después dos veces en Medios de cultivo químicos definidos [CDCM, volúmenes iguales de medios DMEM y M199 (Life Technologies) y AB con suplementos (insulina 5 µg/ml; transferrina 5 µg/ml; progesterona 64 nM; putrescina 0,1 mM; selenio 5 ng/ml; taurina 3 mM; citidín 5'-difosfoetanolamina 2,7 µM; citidín 5'-difosfocolina 5,2 µM; hidrocortisona 0,2 µg/ml; 3,3'-5-triiodo-L-tironina 30 nM; piruvato sódico 1 mM), prostaglandina D2 0,3 µM; ácido linoleico 0,1 mg/ml] con el fin de eliminar el FCS. La concentración de células teñidas con azul de tripano se mide con la cámara de Mallassez y se lleva a dos concentraciones (5,6 y 1,12 10^5 células/ml) correspondientes a las dos densidades de sembrado (2 y 4 10^5 células/cm²).

Los medios condicionados de células COS-1 transfectadas se descongelan en hielo y se transfieren 50 µl a dos placas de cultivo de tejido negras tratadas de 96 pocillos (Corning Costar) que se han recubierto con una solución de 100 µg/ml de poli-L-lisina (Sigma).

Ensayo funcional, ensayo Vivas/Muertas: El ensayo funcional se basa en el número de células de retina de pollo vivas después de 7 días de incubación in vitro. Se utilizó el kit de ensayo Live/Dead (Molecular Probes, Eugene, EE.UU.) que se basa en el uso de dos colorantes fluorógenos (calceína AM y dímero de etidio) que tiñen células vivas y células muertas, respectivamente. Una célula que está viva posee una actividad metabólica (aquí una actividad esterasa) que convierte el sustrato (calceína AM) en su producto fluorescente que emite a 520 nm. La permeabilidad de la membrana de una célula muerta se altera y permite la tinción del ADN del núcleo por el dímero de etidio que emite a 635 nm. Una célula está viva si emite a 520 nm después de la excitación a 485 nm, o muerta si emite a 635 nm después de la excitación a 520 nm. Usando microscopía de epifluorescencia, los dos tipos de células fluorescentes se pueden visualizar por separado. Después de 7 días in vitro, las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad con calceína-AM 2,7 µM y dímero de etidio 0,3 mM.

Adquisición de imágenes y recuento de células: En resumen, la adquisición de imágenes consistía en el enfoque automático de cada pocillo, el recuento automático de células en dos fluorescencias seguido por el procesamiento de los datos en bruto usando un software especializado, por ejemplo, Metamorph (Universal Imaging Corporation, West Chester, USA) para obtener imágenes digitalizadas de cada pocillo de la placa. Se utilizó un microscopio invertido (Nikon TE 200) equipado con una lámpara de epifluorescencia de mercurio con dos filtros de excitación a 485 y 520 nm, dos filtros de emisión a 520 y 635 nm, un objeto (x10), una plataforma motorizada dirigida por ordenador (Multicontrol 2000, Martsauzer y una cámara CCD (Cohu).

Para grabar la placa, esta se coloca sobre la plataforma motorizada y se hace un enfoque de forma manual al primer pocillo y se registra este plano (origen z). Se establece el umbral de la imagen viva y muerta del primer pocillo. El centro del primer pocillo se ajusta utilizando luz blanca mediante la alineación manual de la parte inferior del primer pocillo a la parte inferior de la imagen en el monitor del ordenador, alineando a continuación el extremo derecho del primer pocillo con la parte derecha de la imagen en la pantalla del ordenador y se registran las dos posiciones. Se calcula el centro del primer pocillo y da la posición del centro de cada pocillo de la placa. Se ha observado durante el proceso de revelado que hay una ligera mayor densidad de células en el borde del pocillo y se excluyó el borde de las adquisiciones. Es importante que la imagen de cada pocillo esté perfectamente centrada con el fin de evitar cualquier resultado engañoso. Cuando se realiza la configuración, la primera exploración de la placa realiza una grabación de las células muertas. La densidad de células muertas es la menos variable en estas condiciones. La aplicación ejecuta un enfoque automático tomando imágenes en diferentes planos focales y eligiendo el más

brillante, el enfoque correcto. Esta posición z se almacena y la plataforma ejecuta movimientos programados en los ejes X e Y, tomando un total de 4 imágenes que cuando se reconstituye en una sola imagen representa 2/3 de la superficie del pocillo. Se almacena una pila de imágenes de los planes de enfoque almacena para control. La plataforma realiza un enfoque automático y cuatro adquisiciones para cada pocillo de la placa empezando por los pocillos A1 a A12, a continuación, B12 a B1, C1 a C12 etc. Al final, la plataforma se desplaza fuera de la placa con el fin de sobreexponer el último pocillo (H1). El barrido de células muertas dura 30 minutos. La segunda exploración (células vivas) se ejecuta después de cambiar el filtro. Esta segunda exploración utiliza las posiciones z registrados de cada pocillo de la exploración de las células muertas. Se toman cuatro imágenes de cada pocillo como para las células muertas. Al final de la segunda exploración (22 minutos) las imágenes reconstituidas de células vivas y muestras son almacenadas en un archivo que se denomina automáticamente con la fecha del día. Los números de células (muertas y línea) se cuentan automáticamente con parámetros morfométricos pre-establecidos (promedio) y se muestran en el monitor del ordenador con el fin de comprobar si el experimento es correcto. Es importante comprobar diariamente que el número de células vivas no es demasiado alto. Se ha observado que si se siembran a una densidad demasiado alta, las células de la retina de pollo sobrevivían más tiempo, lo más probable por producir su propio factor de supervivencia. Se seleccionaron las células con ausencia de este efecto. Antes de escanear la segunda placa (mismo experimento con el doble de densidad de células sembradas), se añadió una "a" al final del nombre del archivo de registro de la primera placa. Las imágenes de cada experimento fueron almacenados en CD-ROM. Los números de células (vivas y muertas) se contaron usando imágenes de cada experimento almacenados en CD-ROM utilizando el software Metamorph.

El medio condicionado de las células COS-1 transfectadas con el vector que contiene la secuencia de ADNc como la expuesta en SEQ ID NO: 1 muestra un efecto positivo sobre la viabilidad de las células en cultivos enriquecidos en conos, en comparación con un vector vacío (Figura 1). Este experimento fue repetido tres veces.

25 **Identificación de un marco de lectura abierto**

El análisis bioinformático de la SEQ ID NO: 1 predice que la secuencia de ácido nucleico como la expuesta en SEQ ID NO: 2 corresponde a un marco de lectura abierto (ORF). Este ORF codifica para un polipéptido de SEQ ID NO: 3.

30 Utilizando la SEQ ID NO: 3, se realizó una búsqueda BLAST que condujo a la identificación de secuencias homólogas en los genomas de ratón y humano. Los ortólogos de ratón y humano del polipéptido de rata expuestos en la SEQ ID NO: 3 son los polipéptidos expuestos en las SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, respectivamente.

35 **Ensayos vivos/muertas de la SEQ ID NO: 2**

Células COS-1 se transfectan con un vector de expresión adecuado que lleva la SEQ ID NO: 2 bajo el control de un promotor eucariota. Las células de control son transfectadas con el vector vacío. Las células se incuban durante un período de tiempo adecuado de la expresión de la SEQ ID NO: 2. Posteriormente, se cuenta el número de células como supervivientes incubadas con medio condicionado de células COS-1 transfectadas con la SEQ ID NO: 2 y el número de células de cono supervivientes incubadas con el medio condicionado de control de células COS-1 de acuerdo con el método descrito anteriormente. Las células incubadas con medio condicionado de células que expresan la SEQ ID NO: 2 muestran una cantidad significativamente mayor de células supervivientes.

45 Por lo tanto, el polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 es capaz de exhibir actividad de rescate de los conos.

LISTADO DE SECUENCIAS

50 <110> INSERM
<120> FACTOR TRÓFICO PARA EL TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES DEGENERATIVAS DE LA RETINA
55 <130> BEP 070546
<160> 5
<170> PatentIn versión 3.3
60 <210> 1
<211> 1885
<212> ADN
<213> Artificial
65 <220>
<223> ADNc

ES 2 582 559 T3

<400> 1

	tccagtgtgg	tggaattctg	cagatggaag	acattccggc	agagctcctg	ctttaccag	60
5	catcagagga	ctcacaccgg	agagaagccc	tatgagtgtg	atcagtgtgg	gaagaccttc	120
	agcctaagtg	cccggcttat	cgfccaccag	cgaaccacaca	ctggggaaaa	gccctacaaa	180
	tgcaagcagt	gtggcaaagc	ctttattagc	agttctaagc	gcagtaggca	ccaggctact	240
10	cacagcgagg	agtcctgcaa	gtcctgacca	gttgagagtc	tgagctggag	ttgactcctg	300
	tcagtccaat	cctctgaagt	tccgtctgaa	ggaatgcaact	tgaccagaag	tgctcagtgtg	360
15	agaagaatgc	acacaggcct	ttcctcacc	cgtagacagt	acagaaagga	gtaagtaagg	420
	ccttcggttt	ggcagatgtg	gataagaggt	ccctgtagaa	gaaaagctgt	tacaccctgg	480
	cagtggcgcg	tactaggatg	actgcaggca	tcgtccctaa	gccaatctca	aaaggccacc	540
20	tttaactgtc	agaaatcggt	tcccaaagca	ctctgtgtac	agagaaggca	gaagctagac	600
	ttagaaaaac	tgaatgctag	atcaaatact	gcaagcttag	tgagaagcc	ctcttggttg	660
	tgagttcggc	ctggtccttg	agagcacagc	ttctctgttg	caaagctggc	actctgtaga	720
25	tttcgttcag	gaggtgtgca	ttctaaatgc	tcttacttag	ggaagttaac	tgctggccag	780
	cagctttgct	ctcctcctgc	tggtcttttt	ccttcattgct	actaggtggc	taagccacga	840
30	cctcccgcct	tatccccccg	tgcaagctcc	tcatacctac	tcacttcagg	caggtgagcc	900
	atcagatccc	tcatttatgc	aggcttaacc	agtcaggttc	cagtcatagc	caaacgtaag	960
	ctcacttcgg	agtaccctac	tgctcttcaa	aggagctgct	tttctatcgc	aaagatttct	1020
35	cttatgctgt	ccttactagt	cattccgtgc	catcaggaga	caacatagga	gtcactgcct	1080
	tagagtgaca	ggtggccatt	gagttgtcgg	ggccctagtc	tgctaaacca	agctcatctg	1140
	agccaaggaa	tggactccct	tgctctcaaa	gccccctaca	gtattgctgt	ggatgctggc	1200
40	catgagctgg	aagggctcag	aaatccacaa	gcagggttaa	gcttggacca	gcatggaggt	1260
	gaacctgtgc	taaaaacca	tgactagtga	ggctgagtca	agaggcttgt	tcaagccagc	1320
45	ctgtgttaca	tagcaaaact	gtcttgaaag	aaagagaaag	aaaaagaaag	aaaacaaact	1380
	cgctctatgt	gtactcctac	atacatacta	aacgttcggt	cttttcctg	aagaaagaaa	1440
50	gcactcagat	cctagtctca	gagaacctaa	ttcgaaaacc	aatggccttt	cctaagagac	1500
	ttacgtcaac	cgttgactgg	cggatgtgct	gtgggtgactc	aacttagacc	ttacgttggg	1560
	tcagggatatt	tgaccatgtc	agtctgccta	gttgccctga	ttggtagttt	gttacttggt	1620
55	ttatacactt	ctgttaaagt	tgaagatttt	ctacaactaa	ggcaaattggc	cagtggaaat	1680
	caaacacatg	tcaagagcat	agaaactctg	gaacctcctt	gagaaagtgt	ttatgtatag	1740
	tgtgaagttg	aaaagggata	ctaagctatt	tattgatacc	gttgtttatt	tgttatctct	1800
60	ccgagatgca	tgttgtgcta	tataacatgg	tacaaggaat	aaaaatttat	ctgaagcaaa	1860
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaa				1885

65

<210> 2

ES 2 582 559 T3

<211> 240
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> ORF

<400> 2

10 aagacattcc ggcagagctc ctgctttacc cagcatcaga ggactcacac cggagagaag 60
 ccctatgagt gtaatcagtg tgggaagacc ttcagcctaa gtgcccggct tatcgtccac 120
 15 cagcgaacctt acactgggga aaagccctac aaatgcagcc agtgtggcaa agcctttatt 180
 agcagttcta agcgcagtag gcaccaggct actcacagcg aggagtccctg caagtcctga 240

20 <210> 3
 <211> 79
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

25 <400> 3

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

50 <210> 4
 <211> 79
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 4

55

60

65

ES 2 582 559 T3

1 Lys Thr Phe Arg Gln Ser Ser Cys Phe Thr Gln His Gln Arg Thr His
 5
 5 Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Glu Cys Asn Gln Cys Gly Lys Thr Phe Ser
 20
 10 Leu Ser Ala Arg Leu Ile Val His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys
 35
 15 Pro Tyr Lys Cys Gly Gln Cys Gly Lys Ala Phe Ile Ser Ser Ser Lys
 50
 20 Arg Ser Arg His Gln Ala Thr His Ser Glu Asp Ala Cys Lys Ser
 65
 25
 <210> 5
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30
 35
 40
 45
 50

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 3, 4 o 5 o una variante de la misma, en el que dicha variante tiene una identidad de al menos 80 % con la SEQ ID NO: 3, 4 o 5 y dicho polipéptido o variante exhiben actividad de rescate de los conos y dicho polipéptido o variante tiene menos de 100 aminoácidos.
- 10 2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.
3. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido o variante del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
- 15 4. La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicha molécula de ácido nucleico tiene la secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
5. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3 o 4.
- 20 6. Una célula hospedadora, que ha sido transformada por una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3 o 4 o un vector de acuerdo con la reivindicación 5.
7. La célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dicha célula hospedadora es una célula hospedadora de mamífero.
- 25 8. Un anticuerpo que se une selectivamente a un polipéptido o variante del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
9. Un método para detectar la presencia de un polipéptido o variante del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en una muestra, que comprende las etapas de:
- 30 a) poner en contacto la muestra con un compuesto que se une selectivamente a un polipéptido o variante del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 y
b) determinar si el compuesto se une a dicho polipéptido o variante del mismo en la muestra.
- 35 10. Un método para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3 o 4 en una muestra, que comprende las etapas de:
- 40 a) poner en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico o cebador que hibrida selectivamente con una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3 o 4 y
b) determinar si la sonda de ácido nucleico o cebador se une a dicha molécula de ácido nucleico en la muestra.
11. Un kit que comprende un oligonucleótido que hibrida selectivamente con una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3 o 4.
- 45 12. El polipéptido o variante del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o una molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 3 o 4 para su uso para el tratamiento de una enfermedad degenerativa de la retina.
- 50 13. Una composición para su uso para el tratamiento de una enfermedad degenerativa de la retina que comprende:
- a) un polipéptido o variante del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o una molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 3 o 4 y
b) un factor de viabilidad de conos derivado de bastones seleccionado del grupo que consiste en RdCVF1 y RdCVF2.
- 55 14. Un kit para su uso para el tratamiento de una enfermedad degenerativa de la retina que comprende:
- a) un polipéptido o variante del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o una molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, y
b) un factor de viabilidad de conos derivado de bastones seleccionado del grupo que consiste en RdCVF1 y RdCVF2.
- 60 15. El polipéptido o variante del mismo o la molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 12 o la composición de acuerdo con la reivindicación 13 o el kit de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicha enfermedad degenerativa de la retina se selecciona del grupo que consiste en retinitis pigmentosa, degeneración macular asociada a la edad, síndrome de Bardet-Biedel, síndrome de Bassen-Kornzweig, enfermedad de Best,
- 65

coroideremia, atrofia girada, amaurosis congénita de Leber, enfermedad de Refsum, enfermedad de Stargardt o síndrome de Usher.

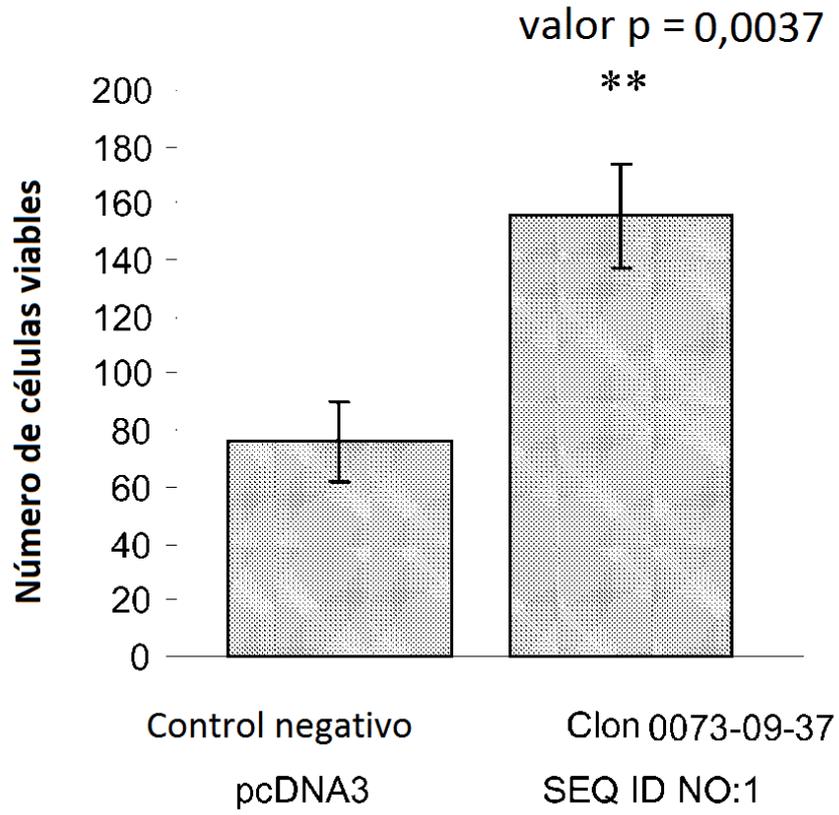


Figura 1