

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 835**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2002 PCT/EP2002/03810**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.10.2002 WO02081513**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2002 E 02737923 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 1379657**

54 Título: **Proteína asociada a enfermedad**

30 Prioridad:

06.04.2001 FR 0104712

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

23.01.2017

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (50.0%)
Lichtstrasse, 35
4056 Basel , CH y
UNIVERSITÉ DE STRASBOURG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LEVEILLARD, THIERRY;
MOHAND-SAID, SADDEK y
HICKS, DAVID**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 597 835 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

Proteína asociada a enfermedad

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a métodos y composiciones para la detección y el tratamiento de enfermedades degenerativas retinianas. En particular, la invención se refiere a una proteína que protege frente a la degeneración de los conos, a moléculas de ácidos nucleicos que codifican dicha proteína, a anticuerpos que reconocen la proteína, y a métodos para diagnosticar enfermedades degenerativas retinianas.

Antecedentes de la invención

10 Los fotorreceptores son un subconjunto especializado de neuronas retinianas que son responsables de la visión. Los fotorreceptores consisten en bastoncillos y conos que son las células fotosensibles de la retina. Cada bastoncillo y cono elabora un cilio especializado, denominado segmento externo, que alberga la maquinaria de fototransducción. Los bastoncillos contienen un pigmento visual absorbente de la luz específico, la rodopsina. Existen tres clases de conos en los seres humanos, que se caracterizan por la expresión de pigmentos visuales diferenciados: los pigmentos de los conos azules, de los conos verdes y de los conos rojos. Cada tipo de proteína de pigmento visual
15 está ajustada para absorber luz principalmente en diferentes longitudes de onda. La rodopsina de los bastoncillos media en la visión escotópica (con poca luz), mientras que los pigmentos de los conos son responsables de la visión fotópica (con mucha luz). Los pigmentos rojo, azul y verde también forman la base de la visión en color en seres humanos. Los pigmentos visuales en los bastoncillos y los conos responden a la luz y generan un potencial de acción en las células de salida, las neuronas bipolares de los bastoncillos, que después es transmitido por las
20 neuronas ganglionares retinianas para producir un estímulo visual en la corteza visual.

En los seres humanos, una serie de enfermedades de la retina implican la degeneración progresiva y la muerte final de los fotorreceptores, lo cual conduce inexorablemente a la ceguera. La degeneración de los fotorreceptores, tal como por distrofias retinianas heredadas (por ejemplo, retinitis pigmentosa), la degeneración macular relacionada con el envejecimiento y otras maculopatías, o el desprendimiento de retina, se caracteriza por una atrofia progresiva
25 y pérdida de la función de los segmentos externos del fotorreceptor. Además, la muerte de los fotorreceptores o la pérdida de la función de los fotorreceptores produce una desafuerenciación parcial de las neuronas retinianas de segundo orden (células horizontales y células bipolares de los bastoncillos) en pacientes con distrofias retinianas, disminuyendo con ello la eficacia global de la propagación de la señal eléctrica generada por los fotorreceptores. Unos cambios posteriores en el epitelio pigmentario y en la glía secundarios como resultado de la degeneración de los fotorreceptores producen cambios vasculares que conducen a isquemia y gliosis. Los factores tróficos que son capaces de rescatar a los fotorreceptores de la muerte celular y/o de restablecer la función de fotorreceptores disfuncionales (atróficos o distróficos) pueden representar terapias útiles para el tratamiento de estos trastornos.

El avance de estos trastornos apunta a una pérdida secuencial de ambas clases de fotorreceptores: en un principio, se pierden los bastoncillos como resultado directo de una lesión genética, ambiental o desconocida, que produce
35 ceguera nocturna y una reducción en el campo visual, seguido inevitablemente por la pérdida de los conos que conduce a la ceguera total. Por tanto, los conos mueren indirectamente, puesto que no expresan la lesión primaria.

Aún no han sido identificados todos los genes asociados con la distrofia retiniana. La identificación de dichos genes hará posible diagnosticar la enfermedad e identificar terapias eficaces.

40 En la base de datos EBI, n.º de registro Q8VC33, se describe un polipéptido procedente de retina de ratón que posee 97% de identidad con SEQ ID NO:4 de la presente invención.

En la base de datos EBI, n.º de registro BC021911, se describe un polinucleótido procedente de retina de ratón que posee 99% de identidad con SEQ ID NO:3 de la presente invención.

En la base de datos EBI, n.º de registro BG 294111, se describe un polinucleótido procedente de retina de ratón que posee 100% con SEQ ID NO:1, y 99,7% de identidad con SEQ ID NO:3 de la presente invención.

45 En la base de datos EBI, n.º de registro AC 073678, se describe un polinucleótido procedente de retina de ratón que posee 100% con SEQ ID NO:1, y 100% de identidad con SEQ ID NO:3 de la presente invención.

En la base de datos EBI, n.º de registro BC014127, se describe un polinucleótido procedente de *Homo sapiens* que posee 100% de identidad con SEQ ID NO:5 y 7, y un polipéptido que posee 100% de identidad con SEQ NO:6 y 8 de la presente invención.

50 En la base de datos EBI, n.º de registro AK015847, se describe un polinucleótido procedente de ratón que posee 98% de identidad con SEQ NO:9, y 100% de identidad con SEQ NO:11, y un polipéptido que posee 99% de identidad con SEQ NO:10, y 100% con SEQ NO:12 de la presente invención.

En la base de datos EBI, n.º de registro BC0161199, se describe un polinucleótido procedente de retina de ratón que posee 100% de identidad con SEQ NO:9, y un polipéptido que posee 100% de identidad con SEQ NO:10 de la

presente invención.

En la base de datos EBI, n.º de registro BC 022521, se describe un polinucleótido procedente de *Homo sapiens* que posee 100% de identidad con SEQ ID NO:13, y un polipéptido que posee 100% de identidad con SEQ NO:14 de la presente invención.

5 Sumario de la invención

La invención se refiere, en general, a una nueva familia de genes, el factor de viabilidad de conos derivado de bastoncillos (Rdcvf). En un primer aspecto, la invención proporciona un polipéptido aislado con una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4. Este polipéptido se encuentra en el ojo de los que padecen distrofias retinianas en mucho menor grado que en el ojo de individuos sin distrofia retiniana. Según este aspecto de la invención, se proporciona un polipéptido nuevo de origen mamífero y, en particular, de origen de ratón o humano. También se describen polipéptidos que son sustancialmente similares al polipéptido con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, y SEQ ID NO:14.

Se describe una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en los polipéptidos indicados en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:14, por ejemplo, los nucleótidos 45-374 de SEQ ID NO:1, los nucleótidos 26-676 de SEQ ID NO:3, los nucleótidos 24-353 de SEQ ID NO:5, los nucleótidos 48-686 de SEQ ID NO:7, los nucleótidos 265-570 de SEQ ID NO:9, los nucleótidos 300-770 de SEQ ID NO:11, o los nucleótidos 331-738 de SEQ ID NO:13. En una realización preferida, el ADN aislado toma la forma de una molécula de vector que comprende el ADN indicado en SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:3.

Un tercer aspecto de la presente invención incluye un método para el diagnóstico de la distrofia retiniana en un ser humano, que incluye detectar la disminución en la transcripción del ARN mensajero transcrito a partir del ADN que codifica Rdcvf1 o Rdcvf2 en el ojo de un ser humano, en el que dicha disminución en la transcripción es diagnóstica de que el organismo padece una distrofia retiniana o un envejecimiento patológico (ARMD). Otra realización de aspecto del ensayo de la invención proporciona un método para el diagnóstico de la distrofia retiniana en un ser humano, que requiere la medición de la cantidad de un polipéptido de Rdcvf1 o Rdcvf2 en el ojo de un ser humano sospechoso de padecer una distrofia retiniana, en el que la presencia de una menor cantidad del polipéptido con relación a la cantidad del polipéptido en el ojo de un individuo que no padece una distrofia retiniana es diagnóstica de que el ser humano padece una distrofia retiniana.

Otro aspecto de la invención proporciona un proceso para producir los polipéptidos mencionados anteriormente.

En una realización preferida de este aspecto de la invención se proporcionan métodos para producir los polipéptidos de Rdcvf1 mencionados anteriormente, que comprende cultivar células hospedantes que tienen incorporado un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica Rdcvf1 o Rdcvf2 de origen exógeno bajo condiciones suficientes para la expresión de los polipéptidos de Rdcvf1 o Rdcvf2 en el hospedante, y después recuperar el polipéptido expresado.

Según otro aspecto de la invención se proporcionan productos, composiciones, procesos y métodos que utilizan los polipéptidos y los polinucleótidos mencionados anteriormente, entre otras cuestiones, para la investigación, para fines biológicos, clínicos y terapéuticos.

En ciertos otros aspectos preferidos de la invención, se proporciona un anticuerpo, o uno de sus fragmentos, que se une específicamente a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:8, es decir, Rdcvf1, o SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:14, es decir, Rdcvf2. En ciertos aspectos particularmente preferidos a este respecto, los anticuerpos son muy selectivos para polipéptidos de Rdcvf1 o Rdcvf2 de mamífero, preferiblemente de ratón y, en particular, humanos, o porciones de dichos polipéptidos de Rdcvf1 o Rdcvf2. En un aspecto relacionado, se proporciona un anticuerpo, o su fragmento, que se une a una porción de la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:14.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para tratar una enfermedad en un sujeto, en los que la enfermedad está mediada por la expresión del gen Rdcvf1 o Rdcvf2, o está asociada con un cambio en estos genes, por ejemplo, una disminución de la presencia del polipéptido de RDCVF1 o RDCVF2 en el ojo, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de RDCVF1 o RDCVF2, tal como se indica en SEQ ID NO:2 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:14 al sujeto. También se proporcionan métodos para el diagnóstico de una enfermedad o un trastorno asociado con una disminución en la expresión del gen Rdcvf1 o Rdcvf2, o una disminución en la presencia de un polipéptido de RDCVF1 o RDCVF2 en un sujeto, que comprenden utilizar un anticuerpo que se une a un polipéptido con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:14, en un inmunoensayo.

En otro aspecto, la invención proporciona células que pueden propagarse *in vitro*, preferiblemente células de

vertebrado, que son capaces, tras un crecimiento en cultivo, de producir un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:14, en las que las células contienen secuencias de ADN de control transcripcional distintas de las secuencias de control transcripcional de Rdcvf1 o Rdcvf2 de ratón o humanas, en las que las secuencias de control transcripcional controlan la transcripción del ADN que codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:14.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un método para producir polipéptidos de Rdcvf1 o Rdcvf2, que comprende cultivar una célula hospedante que tiene incorporado un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica Rdcvf1 o Rdcvf2 de origen exógeno bajo condiciones suficientes para la expresión de los polipéptidos de Rdcvf1 o Rdcvf2 en la célula hospedante, provocando con ello la producción de un polipéptido expresado, y recuperar el polipéptido expresado.

En otro aspecto de la presente invención se proporcionan métodos de ensayo y kits que comprenden los componentes necesarios para detectar una expresión anómala, por ejemplo, menor que la normal, de polinucleótidos o polipéptidos de Rdcvf1 o Rdcvf2 en muestras de tejido corporal obtenidas de un paciente, y dichos kits comprenden, por ejemplo, anticuerpos que se unen a Rdcvf1 o Rdcvf2, o sondas oligonucleotídicas que se hibridan con los polinucleótidos de la invención. En una realización preferida, dichos kits también comprenden instrucciones que detallan los procedimientos mediante los cuales se van a utilizar los componentes del kit.

En otro aspecto, la invención se dirige a un polipéptido de Rdcvf1 o Rdcvf2 para su uso en el tratamiento de un cuerpo humano o animal. Un aspecto relacionado se dirige al uso de un polipéptido de Rdcvf1 o Rdcvf2, un nucleótido que codifica Rdcvf1 o Rdcvf2, o un anticuerpo que se une a Rdcvf1 o Rdcvf2 para la fabricación de un medicamento para tratar la distrofia retiniana.

En otro aspecto, la invención proporciona un agente retinoprotector que comprende un polipéptido seleccionado del grupo de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:14, y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un aspecto relacionado, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido de Rdcvf1 o Rdcvf2, un nucleótido que codifica Rdcvf1 o Rdcvf2, para el tratamiento de la distrofia retiniana. En otro aspecto relacionado, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido seleccionado del grupo de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:14, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método para el tratamiento de la distrofia retiniana, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido seleccionado del grupo de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:14, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, a un sujeto que lo necesite.

En otro aspecto, la invención se dirige a métodos para la identificación de moléculas que pueden unirse a Rdcvf1 o Rdcvf2 y/o modulan la actividad de Rdcvf1 o Rdcvf2, o moléculas que pueden unirse a secuencias de ácidos nucleicos que modulan la transcripción o la traducción de Rdcvf1 o Rdcvf2. Estos métodos se describen, por ejemplo, en las patentes de EEUU n.ºs 5.541.070; 5.567.317; 5.593.853; 5.670.326; 5.679.582; 5.856.083; 5.858.657; 5.866.341; 5.876.946; 5.989.814; 6.010.861; 6.020.141; 6.030.779; y 6.043.024. Las moléculas identificadas mediante dichos métodos también se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

En otro aspecto, la invención se dirige a métodos para la introducción de ácidos nucleicos de la invención en uno o más tejidos de un sujeto que necesita tratamiento, con el resultado de que una o más proteínas codificadas por los ácidos nucleicos son expresadas y/o segregadas por las células dentro del tejido.

Esta invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, o su región codificadora, SEQ ID NO:3, o su región codificadora, SEQ ID NO:5, o su región codificadora, SEQ ID NO:7, o su región codificadora, SEQ ID NO:9, o su región codificadora, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Esta invención también proporciona un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, o su región codificadora, SEQ ID NO:3, o su región codificadora, SEQ ID NO:5, o su región codificadora, SEQ ID NO:7, o su región codificadora, SEQ ID NO:9, o su región codificadora, SEQ ID NO:11, o su región codificadora, y SEQ ID NO:13, o su región codificadora, para su uso como producto farmacéutico.

Esta invención también proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de RDCVF1 o RDCVF2 que consiste en una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:14, unida operablemente a una secuencia de control de la transcripción para su uso en la terapia génica de la distrofia retiniana.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para proporcionar células de fotorreceptores para su implantación, en el que las células de fotorreceptores se cultivan junto con RDCVF1 o RDCVF2.

Breve descripción de los dibujos

- Figura 1: secuencia de nucleótidos de Rdcvf1 de ratón procedente de la clonación de expresión, y secuencia de aminoácidos de RdCVF1 de ratón.
- Figura 2: secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos de Rdcvf1L de ratón.
- 5 Figura 3: Rdcvf1 humana y secuencia de aminoácidos de Rdcvf1 humana.
- Figura 4: secuencia de nucleótidos de Rdcvf1L humana, y secuencia de aminoácidos de Rdcvf1L humana.
- Figura 5: secuencia de nucleótidos de Rdcvf2 de ratón, y aminoácidos de Rdcvf2 de ratón.
- Figura 6: secuencia de nucleótidos de Rdcvf2L de ratón, y aminoácidos de Rdcvf2L de ratón.
- Figura 7: secuencia de nucleótidos de Rdcvf2 humana, y secuencia de aminoácidos de Rdcvf2 humana.
- 10 Figura 8: muestra alineamientos de aminoácidos de las formas cortas de Rdcvf (SEQ ID NO:2, 6, 10 y 14) y de las formas largas de Rdcvf SEQ ID NO:4, 8, 12 y 14).
- Figura 9: muestra los cebadores para GST-Rdcvf1.
- Figura 10: múltiples alineamientos de RDCVF1/RDCVF2.
- Figura 11: comparación de RDCVF2 de ratón y humana.
- 15 Figura 12: múltiples alineamientos de Rdcvf2 de ratón con los clones EST be552141, biS17442, bg707818 y bi603812.
- Figura 13: múltiples alineamientos de Rdcvf1 con los clones EST bg299078, ai716631, bg294111, be108041 y bg395178.
- Figura 14: secuencia de EST bg299078 corregida para corresponderse con Rdcvf1.
- 20 Figura 15: secuencia de EST bg294111 corregida para corresponderse con Rdcvf1L.
- Figura 16: análisis de RT-PCR a tiempo real de la expresión de la arrestina de bastoncillos (A) y RdCSF1 (B) en retina de 5 semanas de C57BL/6@N de 5 semanas (verde) y C3H/HE@N (roja).
- Figura 17: análisis de RT-PCR a tiempo real que demuestra que Rdcvf2 se expresa de una manera dependiente de bastoncillos y se expresa en otra parte del SNC.
- 25 Figura 18: análisis de PCR que demuestra que RdCVF1 se expresa de una manera dependiente de bastoncillos.

Descripción detallada de la invención

- En la práctica de la presente invención se emplean muchas técnicas convencionales de la biología molecular, la microbiología y el ADN recombinante. Estas técnicas son muy conocidas y se explican, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology, volúmenes I, II, y III, 1997 (F. M. Ausubel ed.); Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; DNA Cloning: A Practical Approach, volúmenes I y II, 1985 (D. N. Glover ed.); Oligonucleotide Synthesis, 1984 (M. L. Gait ed.); Nucleic Acid Hybridization, 1985 (Hames y Higgins); Transcription and Translation, 1984 (Hames y Higgins, eds.); Animal Cell Culture, 1986 (R. L. Freshney ed.); Immobilized Cells and Enzymes, 1986 (IRL Press); Perbal, 1984, A Practical Guide to Molecular Cloning; the series, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, 1987 (J. H. Miller y M. P. Calos eds., Cold Spring Harbor Laboratory); y Methods in Enzymology, vol. 154 y vol. 155 (Wu y Grossman, y Wu, eds., respectivamente).
- 30
- 35

- Tal como se emplea en la presente, un "gen diferencialmente expresado" se refiere a (a) un gen que contiene al menos una de las secuencia de ADN descritas en la presente (por ejemplo, tal como se muestra en la figura 1 y SEQ ID NO:1, o como se muestra en la figura 2 y SEQ ID NO:3), (b) cualquier secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos codificada por las secuencias de ADN descritas en la presente (por ejemplo, tal como se muestra en la figura 1 y SEQ ID NO:2, o como se muestra en la figura 2 y SEQ ID NO:4); o (c) cualquier secuencia de ADN que sea sustancialmente similar a las secuencias codificadora descritas en la presente.
- 40

- En su sentido más amplio, la expresión "sustancialmente similar", cuando se emplea en la presente con respecto a una secuencia de nucleótidos, significa una secuencia de nucleótidos que se corresponde con una secuencia de nucleótidos de referencia, en la que la secuencia correspondiente codifica un polipéptido que tiene sustancialmente la misma estructura y función que el polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos de referencia, por ejemplo, en la que solo se producen cambios en los aminoácidos que no afectan a la función del polipéptido. De modo deseable, la secuencia de nucleótidos sustancialmente similar codifica el polipéptido codificado por la
- 45

secuencia de nucleótidos de referencia. El porcentaje de identidad entre la secuencia de nucleótidos sustancialmente similar y la secuencia de nucleótidos de referencia es, de modo deseable, al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, y aún más preferiblemente al menos 99%. Las comparaciones de secuencia se realizan empleando un algoritmo de alineamiento de secuencias Smith-Waterman (véase, por ejemplo, Waterman, M.S., Introduction to Computational Biology: Maps, sequences and genomes, Chapman & Hall, Londres: 1995. ISBN 0-412-99391-0, o en <http://www-hto.usc.edu/software/segaln/index.html>). Se emplea el programa localS, versión 1.16, con los siguientes parámetros: apareamiento: 1, penalización de desapareamiento: 0,33, penalización de hueco abierto: 2, penalización de hueco extendido: 2. Una secuencia de nucleótidos "sustancialmente similar" a una secuencia de nucleótidos de referencia se hibrida con la secuencia de nucleótidos de referencia en dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C con un lavado en 2X SSC, SDS al 0,1% a 50 °C, de modo más deseable dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C con un lavado en 1X SSC, SDS al 0,1% a 50 °C, de modo aún más deseable dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C con un lavado en 0,5X SSC, SDS al 0,1% a 50 °C, preferiblemente en dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C con un lavado en 0,1X SSC, SDS al 0,1% a 50 °C, más preferiblemente en dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C con un lavado en 0,1X SSC, SDS al 0,1% a 65 °C, y aún codifica un producto génico funcionalmente equivalente.

Los genes diferencialmente expresados descritos en la presente se expresan en el tejido ocular y, en particular, se producen en las células de los bastoncillos, aunque en un ser humano afectado por una distrofia retiniana, tal como retinitis pigmentosa, degeneración macular relacionada con el envejecimiento, síndrome de Bardet-Biedel, síndrome de Bassen-Kornzweig, enfermedad de Best, coroidema, atrofia girada, amaurosis congénita, síndrome de Refsum, enfermedad de Stargardt y síndrome de Usher, se producen en cantidades menores, concretamente, en cantidades menores con relación a los correspondientes tejidos de seres humanos que no padecen una distrofia retiniana. El ARN mensajero transcrito a partir de los genes diferencialmente expresados, y la proteína traducida a partir de dicho ARNm, está presente en los tejidos de los bastoncillos y/o asociada con dichos tejidos en una cantidad al menos aproximadamente la mitad, preferiblemente al menos aproximadamente cinco veces, más preferiblemente en una cantidad de al menos diez veces, lo más preferiblemente al menos aproximadamente 100 veces menor que los niveles del ARNm y la proteína que se encuentran en los correspondientes tejidos que se encuentran en seres humanos que no padecen una distrofia retiniana. Esta menor transcripción del ARNm de Rdcvf1 o Rdcvf2 se denomina en la presente "menor transcripción."

Una "célula hospedante," tal como se emplea en la presente, se refiere a una célula procariota o eucariota que contiene ADN heterólogo que se ha introducido en la célula por cualquier medio, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección, transformación, infección vírica y similares.

"Heterólogo", tal como se emplea en la presente, significa "de origen natural diferente" o representa un estado no natural. Por ejemplo, si una célula hospedante se transforma con un ADN o un gen derivado de otro organismo, en particular de otra especie, ese gen es heterólogo con respecto a esa célula hospedante y también con respecto a los descendientes de la célula hospedante que porta ese gen. De modo similar, heterólogo se refiere a una secuencia de nucleótidos derivada del mismo tipo de célula natural original e insertada en esta, pero que está presente en un estado no natural, por ejemplo, un número diferente de copias, o bajo el control de diferentes elementos reguladores.

Una molécula de vector es una molécula de ácido nucleico en la cual puede insertarse un ácido nucleico heterólogo que después puede introducirse en una célula hospedante apropiada. Los vectores preferiblemente tienen uno o más orígenes de la replicación, y uno o más sitios en los que puede insertarse el ADN recombinante. Los vectores a menudo poseen medios convenientes por medio de los cuales pueden seleccionarse las células con vectores de las que no los tienen, por ejemplo, codifican genes de resistencia a fármacos. Los vectores habituales incluyen plásmidos, genomas víricos y (principalmente en levaduras y bacterias) "cromosomas artificiales."

Los "plásmidos" en general se indican en la presente con una p minúscula precedida y/o seguida de letras mayúsculas y/o números, según con las convenciones de nomenclatura con las que están familiarizados los expertos en la técnica. Los plásmidos de partida descritos en la presente están disponibles en el mercado, están disponibles al público sin restricción, o pueden construirse a partir de plásmidos disponibles mediante la aplicación habitual de procedimientos publicados muy conocidos. Muchos plásmidos y otros vectores de clonación y expresión que pueden utilizarse según la presente invención son muy conocidos y se encuentran fácilmente disponibles para los expertos en la técnica. Además, los expertos en la técnica pueden construir cualquier otro plásmido adecuado para su uso en la invención. Las propiedades, la construcción y el uso de dichos plásmidos, así como otros vectores, en la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la presente descripción.

El término "aislado" significa que el material se retira de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si es que aparece en la naturaleza). Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido que aparece en la naturaleza presente en un animal vivo no está aislado, pero el mismo polinucleótido o polipéptido, separado de parte o todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado, incluso si después se reintroduce en el sistema natural. Estos polinucleótidos pueden ser parte de un vector y/o dichos polinucleótidos o polipéptidos pueden ser parte de una composición y aún se considera que están aislados, ya que dicho vector o composición no es parte de su entorno natural.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "secuencia de control transcripcional" se refiere a secuencias de ADN, tales como secuencias de iniciadores, secuencias de potenciadores y secuencias de promotores, que inducen, reprimen o controlan de otra forma la transcripción de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas a las cuales están unidas operablemente.

5 Tal como se emplean en la presente, "secuencias de control transcripcional de Rdcvf1" o "secuencias de control transcripcional de Rdcvf2" son cualquiera de las secuencias de control transcripcional que normalmente aparecen asociadas con un gen Rdcvf1 o Rdcvf2 de mamífero, preferiblemente con el gen Rdcvf2 tal como se encuentra en el genoma de ratón o humano.

10 Tal como se emplea en la presente, una "secuencia de control transcripcional no humana" es cualquier secuencia de control transcripcional que no se encuentra en el genoma humano.

El término "polipéptido" se emplea de manera intercambiable en la presente con los términos "polipéptidos", "proteína" y "proteínas".

15 Tal como se emplea en la presente, un "derivado químico" de un polipéptido de la invención es un polipéptido de la invención que contiene otros restos químicos que normalmente no son parte de la molécula. Estos restos pueden mejorar la solubilidad, la absorción, la semivida biológica, etc., de la molécula. Los restos, como alternativa, pueden disminuir la toxicidad de la molécula, eliminar o atenuar cualquier efecto secundario no deseable de la molécula, etc. Los restos capaces de mediar en dichos efectos se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^ª ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1980).

20 Tal como se emplea en la presente, un "agente neuroprotector" es un compuesto que previene o protege a las células neuronales de la degeneración. Un "agente retinoprotector" es un compuesto que previene o protege a las células retinianas de la degeneración.

25 La invención incluye moléculas de ácidos nucleicos, preferiblemente moléculas de ADN, tales como (1) un aislado que comprende una secuencia de nucleótido según se indica en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3, (2) moléculas de ácidos nucleicos aisladas que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que se hibridan bajo condiciones de alta rigurosidad al ADN aislado indicado en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3, y (3) secuencias de ácidos nucleicos que se hibridan con los anteriores (1) o (2). Estas condiciones de hibridación pueden ser muy rigurosas o menos rigurosas, tal como se describió anteriormente. En los casos en que las moléculas de ácidos nucleicos son desoxioligonucleótidos ("oligos"), las condiciones de alta rigurosidad pueden referirse, por ejemplo, a un lavado en 6X SSC/pirofosfato de sodio al 0,05% a 37 °C (para oligos de 14 bases), 48 °C (para oligos de 17 bases), 55 °C (para oligos de 20 bases), y 60 °C (para oligos de 23 bases). Los intervalos adecuados de dichas condiciones de rigurosidad para los ácidos nucleicos de composiciones variables se describen en Krause y Aaronson (1991), Methods in Enzymology, 200:546-556, además de Maniatis *et al.*, citado anteriormente.

30

35 Estas moléculas de ácidos nucleicos pueden actuar como moléculas antisentido de genes diana, útiles, por ejemplo en la regulación de genes diana y/o como cebadores antisentido en reacciones de amplificación de secuencias de ácidos nucleicos de genes diana. Además, estas secuencias pueden emplearse como parte de secuencias de ribozimas y/o triple hélice que también son útiles para la regulación de genes diana. Además, dichas moléculas pueden emplearse como componentes de métodos de diagnóstico, por los cuales puede detectarse la presencia de un alelo que provoca enfermedad de RdCVF1 o RdCVF2.

40 La invención también incluye (a) vectores que contienen cualquiera de las secuencias codificadoras anteriores (es decir, sentido) y/o sus complementos (es decir, antisentido); (b) vectores de expresión que contienen cualquiera de las secuencias codificadoras anteriores asociadas operablemente con un elemento regulador que dirige la expresión de las secuencias codificadoras; y (c) células hospedantes genéticamente modificadas que contienen cualquiera de las secuencias codificadoras anteriores asociadas operablemente con un elemento regulador que dirige la expresión de las secuencias codificadoras en la célula hospedante. Tal como se emplean en la presente, los elementos reguladores incluyen, pero no se limitan a promotores inducibles y no inducibles, potenciadores, operadores y otros elementos conocidos por los expertos en la técnica que dirigen y regulan la expresión.

45

50 La invención incluye fragmentos de cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos descritas en la presente. Los fragmentos del gen Rdcvf1 o Rdcvf2 de longitud completa pueden emplearse como sonda de hibridación para un banco de ADNc para aislar el gen de longitud completa y para aislar otros genes que tienen una alta similitud de secuencia con el gen Rdcvf1 o Rdcvf2 y una actividad biológica similar. Las sondas de este tipo preferiblemente tienen al menos aproximadamente 30 bases y pueden contener, por ejemplo, de aproximadamente 30 a aproximadamente 50 bases, de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 bases, de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 bases, o más de 200 bases (por ejemplo, 300). La sonda también puede utilizarse para identificar un clon de ADNc que se corresponde con un transcrito de longitud completa y un clon o clones genómicos que contienen el gen Rdcvf1 o Rdcvf2 completo que incluye regiones reguladoras y de promotor, exones e intrones.

55

Un ejemplo de una selección comprende aislar la región codificadora del gen Rdcvf1 o Rdcvf2 empleando la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda oligonucleotídica, o el cebado aleatorio de la secuencia aislada descrita en la figura 1 a 8. Se emplean oligonucleótidos marcados que tienen una secuencia complementaria

con la del gen de la presente invención para seleccionar un banco de ADNc humano, ADN genómico, para determinar cuáles son los clones individuales del banco con los que se hibrida la sonda.

Además de las secuencias de genes descritas anteriormente, los ortólogos de dichas secuencias, tal como estén presentes, por ejemplo, en otras especies, pueden identificarse y aislarse con facilidad, sin experimentos innecesarios, mediante técnicas de biología molecular conocidas en la técnica. Además, pueden existir genes en otros locus genéticos dentro del genoma que codifiquen proteínas que tengan una gran homología (homólogos) con uno o más dominios de dichos productos génicos. Estos genes también pueden identificarse a través de técnicas similares. Se proporcionan ejemplos de ortólogos u homólogos en las figuras 8, 10, 11, 12 o 13.

Por ejemplo, la secuencia del gen expresado aislada puede marcarse y emplearse para seleccionar un banco de ADNc construido a partir de ARNm obtenido del organismo de interés. Las condiciones de hibridación serán de menor rigurosidad cuando el banco de ADNc se deriva de un organismo diferente del tipo de organismo del cual se deriva la secuencia marcada. Como alternativa, el fragmento marcado puede emplearse para seleccionar un banco genómico derivado del organismo de interés, de nuevo, empleando condiciones de baja rigurosidad apropiadas. Estas condiciones de baja rigurosidad son muy conocidas por los expertos en la técnica y variarán de modo predecible dependiendo de la filogenia de los organismos específicos de los cuales se derivan el banco y las secuencias marcadas. Para las directrices con respecto dichas condiciones, véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* citado anteriormente.

Además, puede aislarse una secuencia del tipo del gen expresado previamente desconocida realizando una PCR empleando dos agrupamientos de cebadores oligonucleotídicos degenerados diseñados basándose en las secuencias de aminoácidos dentro del gen de interés. El molde para la reacción puede ser un ADNc obtenido mediante transcripción inversa del ARNm preparado a partir de tejidos o líneas celulares humanas o no humanas que se sabe que expresan o que son sospechosos de expresar un homólogo o variante de corte y empalme.

El producto de la PCR puede subclonarse y secuenciarse para asegurar que las secuencias amplificadas representan las secuencias de una secuencia de ácido nucleico similar al gen expresado. El fragmento de la PCR después puede utilizarse para aislar un clon de ADNc de longitud completa mediante una diversidad de métodos. Por ejemplo, el fragmento amplificado puede marcarse y emplearse para seleccionar un banco de ADNc de bacteriófago. Como alternativa, el fragmento marcado puede emplearse para seleccionar un banco genómico.

La tecnología de la PCR también puede utilizarse para aislar secuencias de ADNc de longitud completa. Por ejemplo, el ARN puede aislarse, siguiendo procedimientos convencionales, a partir de una fuente tisular o celular apropiada. Puede realizarse una reacción de transcripción inversa en el ARN empleando un cebador oligonucleotídico específico para el extremo más 5' del fragmento amplificado para el cebado de la síntesis de la primera hebra. Al híbrido de ARN/ADN resultante se le puede poner una "cola" de guaninas empleando una reacción de transferasa terminal convencional, el híbrido puede digerirse con ARNasa H, y después la síntesis de la segunda hebra puede cebarse con un cebador de poli-C. Así, las secuencias de ADNc cadena arriba del fragmento amplificado pueden aislarse con facilidad. Para un análisis de las estrategias de clonación que pueden utilizarse véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, supra.

En los casos en que el gen expresado diferencialmente identificado es el gen normal o de tipo salvaje, este gen puede emplearse para aislar alelos mutantes del gen. Este aislamiento resulta preferible en procesos y trastornos que se sabe o se sospecha que tienen una base genética. Los alelos mutantes pueden aislarse de individuos que se sabe o se sospecha que tienen un genotipo que contribuye a los síntomas de la enfermedad. Los alelos mutantes y los productos de alelos mutantes después pueden utilizarse en los sistemas de ensayo de diagnóstico descritos a continuación.

Un ADNc del gen mutante puede aislarse, por ejemplo, empleando RT-PCR, una técnica que es muy conocida por los expertos en la técnica. En este caso, la primera hebra del ADNc puede sintetizarse hibridando un oligonucleótido oligo-dT (o hexámeros aleatorios) con ARNm aislado a partir de un tejido en que se sabe o se sospecha que se expresa en un individuo que porta putativamente el alelo mutante, y extendiendo la hebra nueva con transcriptasa inversa. Después se sintetiza la segunda hebra del ADNc empleando un oligonucleótido que se hibrida específicamente al extremo 5' del gen normal (o por cualquier otro medio). Empleando estos dos cebadores, el producto después se amplifica a través de una PCR, se clona en un vector adecuado, y se somete a un análisis de secuencia de ADN por medio de métodos muy conocidos por los expertos en la técnica. Comparando la secuencia de ADN del gen mutante con la del gen normal puede determinarse la mutación o mutaciones responsables de la pérdida o alteración de la función del producto del gen mutante.

Como alternativa, puede construirse un banco genómico o de ADNc y seleccionarse empleando ADN o ARN procedente de un tejido que se sabe o se sospecha que expresa el gen de interés en un individuo sospechoso de portar el alelo mutante. El gen normal, o cualquier de sus fragmentos adecuados, después puede marcarse y utilizarse como sonda para identificar los correspondientes alelos mutantes en el banco. El clon que contiene este gen después puede purificarse mediante métodos que se practican habitualmente en la técnica y someterse a un análisis de secuencia, tal como se describió anteriormente.

Además, puede construirse un banco de expresión empleando ADN aislado o ADNc sintetizado a partir de un tejido que se sabe o se sospecha que expresa el gen de interés en un individuo sospechoso de portar el alelo mutante. De esta manera, los productos génicos fabricados por el tejido mutante putativo pueden expresarse y seleccionarse empleando técnicas de selección de anticuerpos convencionales, junto con anticuerpos generados contra el producto génico normal, tal como se describe a continuación (para las técnicas de selección, véase, por ejemplo, Harlow, E. y Lane, eds., 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor.) En los casos en que la mutación produce un producto génico expresado con una función alterada (por ejemplo, como resultado de una mutación de sentido erróneo), es probable que un conjunto policlonal de anticuerpos presente reacción cruzada con el producto del gen mutante. Los clones del banco detectados a través de su reacción con dichos anticuerpos marcados pueden purificarse y someterse a un análisis de secuencia tal como se describió anteriormente.

Los productos del gen diferencialmente expresado incluyen las proteínas codificadas por la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO:13, en particular, un polipéptido que es o que incluye la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:14.

Además, los productos génicos expresados pueden incluir proteínas que representan productos génicos funcionalmente equivalentes. Este producto génico equivalente puede contener deleciones, adiciones o sustituciones de restos aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos codificada por las secuencias génicas diferencialmente expresadas descritas anteriormente, pero que producen un cambio silencioso, produciendo así un producto del gen diferencialmente expresado funcionalmente equivalente (polimorfismos). Las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse basándose en la similitud en la polaridad, la carga, la solubilidad, la hidrofobicidad, la hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los restos implicados y la comparación con secuencias de aminoácidos de otras especies.

Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina; los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, y glutamina; los aminoácidos de carga positiva (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina; y los aminoácidos de carga negativa (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. "Funcionalmente equivalente," tal como se emplea en la presente, puede referirse a una proteína o un polipéptido capaz de mostrar una actividad *in vivo* o *in vitro* sustancialmente similar a los productos del gen diferencialmente expresado endógenos codificados por las secuencias del gen diferencialmente expresado descritas anteriormente. "Funcionalmente equivalente" también puede referirse a proteínas o polipéptidos capaces de interactuar con otras moléculas celulares o extracelulares de una manera similar a la manera en que lo haría la correspondiente porción del producto del gen diferencialmente expresado endógeno. Por ejemplo, un péptido "funcionalmente equivalente" será capaz, en un inmunoensayo, de disminuir la unión de un anticuerpo con el correspondiente péptido (es decir, la secuencia de aminoácidos peptídica que se modificó para lograr el péptido "funcionalmente equivalente") de la proteína endógena, o la propia proteína endógena, habiéndose generado este anticuerpo contra el correspondiente péptido de la proteína endógena. Una concentración equimolar del péptido funcionalmente equivalente disminuirá la unión mencionada del correspondiente péptido en al menos aproximadamente 5%, preferiblemente entre aproximadamente 5% y 10%, más preferiblemente entre aproximadamente 10% y 25%, aún más preferiblemente entre aproximadamente 25% y 50%, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 40% y 50%.

Los productos del gen diferencialmente expresado pueden ser producidos mediante la tecnología del ADN recombinante empleando técnicas muy conocidas en la técnica. Así, en la presente se describen métodos para preparar los polipéptidos y péptidos del gen diferencialmente expresado de la invención expresando el ácido nucleico que codifica las secuencias del gen diferencialmente expresado. Los métodos, que son muy conocidos por los expertos en la técnica, pueden utilizarse para construir vectores de expresión que contiene la secuencias codificadoras de la proteína del gen expresado y las señales de control transcripcional/traduccionales apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación *in vivo*/recombinación genética. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, 1989, supra, y Ausubel *et al.*, 1989, supra. Como alternativa, un ARN o ADNc capaz de codificar secuencias de proteínas del gen expresado puede sintetizarse de modo químico empleando, por ejemplo, sintetizadores. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en "Oligonucleotide Synthesis", 1984, Gait, M. J. ed., IRL Press, Oxford, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

Puede utilizarse una diversidad de sistemas de hospedante-vector de expresión para expresar las secuencias codificadoras de los genes diferencialmente expresados de la invención. Estos sistemas de hospedante-expresión representan vehículos mediante los cuales pueden producirse secuencias codificadoras de interés y después purificarse, pero también representan células que, cuando se transforman o se transfectan con las secuencias codificadoras de nucleótidos apropiadas, pueden expresar la proteína del gen diferencialmente expresado de la invención *in situ*. Estos incluyen, pero no se limitan a microorganismos, tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformados con vectores de expresión recombinantes de ADN de bacteriófago, ADN plasmídico o ADN cosmídico que contienen secuencias codificadoras de proteínas de genes diferencialmente expresados; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levaduras recombinantes que contienen las secuencias codificadoras de proteínas de genes diferencialmente expresados; sistemas de células de

insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias codificadoras de proteínas de genes diferencialmente expresados; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de transformación de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificadoras de proteínas de genes diferencialmente expresados; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que portan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, el promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7.5K del virus de vaccinia; el promotor del gen temprano de *Cytomegalovirus*).

5 También puede realizarse la expresión de RDCVF1 o RDCVF2 por una célula a partir de un gen *Rdcvf1* o *Rdcvf2* que es nativo a la célula. Los métodos para dicha expresión se detallan, por ejemplo, en las patentes de EEUU 5.641.670; 5.733.761; 5.968.502; y 5.994.127. Las células que han sido inducidas para que expresen RDCVF1 o RDCVF2 mediante los métodos de cualquiera de las patentes de EEUU 5.641.670; 5.733.761; 5.968.502; y 5.994.127 pueden implantarse en un tejido deseado en un animal vivo para aumentar la concentración local de RDCVF1 o RDCVF2 en el tejido.

10 En sistemas bacterianos, puede seleccionarse una serie de vectores de expresión de forma ventajosa dependiendo del uso previsto para la proteína del gen diferencialmente expresado que se está expresando. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de dicha proteína, por ejemplo, para la generación de anticuerpos o para seleccionar bancos de péptidos, pueden resultar deseables vectores que dirijan la expresión de niveles elevados de productos de proteínas de fusión que puedan purificarse con facilidad. Estos vectores incluyen, pero no se limitan al vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther *et al.*, 1983, EMBO J., 2:1791), en el que una secuencia codificadora de proteínas del gen diferencialmente expresado puede acoplarse individualmente al vector dentro de marco con la región codificadora de lac Z de modo que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye e Inouye, 1985, Nucleic Acids Res., 13:3101-3109; Van Heeke y Schuster, 1989, J. Biol. Chem., 264:5503-5509); y similares.

15 También pueden emplearse vectores PGEX para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, estas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse con facilidad a partir de células lisadas mediante adsorción a esferas de glutatión-asefagarosa, seguido de una elución en presencia de glutatión libre. Los vectores PGEX se diseñan para que incluyan sitios de ruptura de proteasas de factor Xa o trombina de modo que la proteína del gen diana clonado pueda liberarse del resto GST empleando estas endopeptidasas.

20 Pueden seleccionarse regiones de promotores de cualquier gen deseado empleando vectores que contengan una unidad de transcripción indicadora que carezca de una región de promotor, tal como la unidad de transcripción de cloranfenicol acetil transferasa ("cat") o luciferasa, cadena abajo del sitio o sitios de restricción para introducir un fragmento de promotor candidato, es decir, un fragmento que puede contener un promotor. Tal como se sabe, la introducción en el vector de un fragmento que contiene un promotor en el sitio de restricción cadena arriba del gen cat o luciferasa suscita la producción de actividad CAT o luciferasa, que puede detectarse mediante ensayos de CAT convencionales o luminometría. Los vectores adecuados para este fin son muy conocidos y están fácilmente disponibles. Tres de estos vectores son pKK232-8, -pCM7 y pGL3 (Promega, E1751, Genebank Ass n° u47295). Así, los promotores para la expresión de polinucleótidos de la presente invención incluyen no solo promotores conocidos y fácilmente disponibles, sino también promotores que pueden obtenerse con facilidad mediante la anterior técnica, empleando un ensayo de genes indicadores.

25 Entre los promotores bacterianos conocidos adecuados para la expresión de polinucleótidos y polipéptidos según la presente invención se encuentran los promotores *lacI* y *lacZ* de *E. coli*, los promotores T3 y T7, el promotor T5 *tac*, los promotores lambda PR, PL y el promotor *trp*. Entre los promotores eucariotas conocidos adecuados a este respecto se encuentran el promotor temprano inmediato de CMV, el promotor de timidina quinasa de HSV, los promotores temprano y tardío de SV40, los promotores de LTR retrovíricos, tales como los del virus del sarcoma de Rous ("RSV"), y promotores de metalotioneína, tales como el promotor de metalotioneína-I de ratón.

30 En un sistema de insecto, el virus de la polihedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) es uno de los varios sistemas de insecto que pueden utilizarse como vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificadora del gen diferencialmente expresado puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de polihedrina). La inserción con éxito de la secuencia codificadora del gen diferencialmente expresado dará como resultado la inactivación del gen de polihedrina y la producción de un virus recombinante no ocluido (es decir, un virus que carece de la envuelta proteica codificada por el gen de polihedrina). Estos virus recombinantes después se emplean para infectar células de *Spodoptera frugiperda* en las que se expresa el gen insertado (por ejemplo, véase Smith *et al.*, 1983, J. Virol., 46:584; Smith, patente de EEUU n.º 4.215.051).

35 En células hospedantes de mamífero puede utilizarse una serie de sistemas de expresión basados en virus. En los casos en que se emplea un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificadora del gen diferencialmente expresado de interés puede acoplarse a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia conductora tripartita. Este gen quimérico después puede

insertarse en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción de una región no esencial del genoma vírico (por ejemplo, la región E1 o E3) producirá un virus recombinante que es viable y es capaz de expresar la proteína del gen diferencialmente expresado en hospedantes infectados (por ejemplo, véase Logan y Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3655-3659). También pueden ser necesarias señales de inicio específicas para una traducción eficaz de las secuencias codificadoras del gen diferencialmente expresado insertado. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. En los casos en que un gen diferencialmente expresado completo, que incluya su propio codón de inicio y las secuencias adyacentes, se inserte en el vector de expresión apropiado, es posible que no sean necesarias más señales de control traduccional. Sin embargo, en los casos en que solo se inserta una porción de la secuencia codificadora del gen diferencialmente expresado, deben proporcionarse señales de control traduccional exógenas, que incluyen, quizás, el codón de inicio ATG. Además, el codón de inicio debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificadora deseada para asegurar la traducción de la inserción completa. Estas señales de control traduccional exógenas (secuencia Kozack) y los codones de inicio pueden tener una diversidad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción adecuados, terminadores de la transcripción, etc. (véase Bittner *et al.*, 1987, Methods in Enzymol., 153:516-544).

La selección de los vectores y promotores apropiados para la expresión en una célula hospedante es un procedimiento muy conocido y las técnicas necesarias para la construcción de vectores de expresión, la introducción del vector en el hospedante y la expresión en el hospedante son técnicas habituales per se en la técnica.

En general, los vectores de expresión recombinantes incluyen orígenes de la replicación, un promotor derivado de un gen muy expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural cadena abajo, y un marcador seleccionable para permitir el aislamiento de las células que contienen el vector después de la exposición al vector.

Además, puede elegirse una cepa de células hospedantes que module la expresión de las secuencias insertadas, o que modifique y procese el producto génico en el modo específico deseado. Estas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, ruptura) de productos de proteínas pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células hospedantes tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraduccional y la modificación de proteínas. Pueden elegirse las líneas celulares o los sistemas de hospedante apropiados para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Para este fin, pueden utilizarse células hospedantes eucariotas que posean la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, la glicosilación y la fosforilación del producto génico. Estas células hospedantes de mamífero incluyen, pero no se limitan a CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38, etc.

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden modificarse líneas celulares que expresan de forma estable la proteína diferencialmente expresada. En lugar de emplear vectores de expresión que contienen orígenes de la replicación víricos, las células hospedantes pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, secuencias de promotores y potenciadores, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN extraño, las células modificadas pueden dejarse crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido, y después se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar de modo estable el plásmido en sus cromosomas y crecer para formar focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede utilizarse de modo ventajoso para modificar líneas celulares que expresan la proteína diferencialmente expresada. Estas líneas celulares modificadas pueden ser particularmente útiles para la selección y la evaluación de compuestos que afectan a la actividad endógena de la proteína diferencialmente expresada. Estas líneas celulares estables pueden utilizarse como forma de terapia celular directamente o después de la encapsulación.

Puede utilizarse una serie de sistemas de selección que incluyen, pero no se limitan a los genes de timidina quinasa del virus del herpes simplex (Wigler, *et al.*, 1977, Cell 11:223), de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48:2026), y de adenina fosforribosiltransferasa (Lowy, *et al.*, 1980, Cell 22:817) en células tk⁻, hgprt⁻ o aprt⁻, respectivamente. Además puede emplearse la resistencia a antimetabolitos como base para la selección del gen dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler, *et al.*, 1980, Natl. Acad. Sci. USA, 77:3567; O'Hare, *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:1527); gen gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:2072); gen neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Colberre-Garapin, *et al.*, 1981, J. Mol. Biol., 150:1); y gen hyg, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre, *et al.*, 1984, Gene, 30:147).

Un sistema de proteínas de fusión alternativo permite la purificación sencilla de proteínas de fusión no desnaturalizadas expresadas en líneas celulares humanas (Janknecht, *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8972-8976). En este sistema, el gen de interés se subclona en un plásmido de recombinación de vaccinia de modo que el marco de lectura abierto del gen se condensa traduccionalmente con un marcador amino-terminal que consiste en seis restos histidina. Extractos de células infectadas con el virus de vaccinia recombinante se cargan en una columna de agarosa-ácido nitriloacético Ni²⁺ y las proteínas marcadas con histidina se eluyen selectivamente con tampones que contienen imidazol.

5 Cuando se emplea como un componente en sistemas de ensayo tales como los descritos a continuación, la proteína diferencialmente expresada puede marcarse, de modo directo o indirecto, para facilitar la detección del complejo formado entre la proteína diferencialmente expresada y una sustancia de ensayo. Puede utilizarse cualquiera de una diversidad de sistemas de marcaje adecuados que incluyen, pero no se limitan a radioisótopos, tales como ¹²⁵I; sistemas de marcaje de enzimas que generan una señal calorimétrica detectable o luz cuando se exponen al sustrato; y marcadores fluorescentes.

Cuando se emplea la tecnología del ADN recombinante para producir la proteína diferencialmente expresada en dichos sistemas de ensayo, puede resultar ventajoso modificar proteínas de fusión que puedan facilitar el marcaje, la inmovilización y/o la detección.

10 El marcaje indirecto implica el uso de una proteína, tal como un anticuerpo marcado, que se une específicamente a un producto de un gen diferencialmente expresado. Estos anticuerpos incluyen, pero no se limitan a anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, monocatenarios, fragmentos Fab y fragmentos producidos por un banco de expresión de Fab.

15 En otra realización, los ácidos nucleicos que comprenden una secuencia que codifica una proteína de RDCVF1 o RDCVF2 se administran para estimular la función de los conos, como una terapia génica. Una terapia génica se refiere a una terapia realizada mediante la administración de un ácido nucleico a un sujeto. En esta realización de la invención, el ácido nucleico produce su proteína codificada, que media en un efecto terapéutico estimulando la función de los conos.

20 Cualquiera de los métodos de terapia génica disponibles en la técnica puede utilizarse según la presente invención. A continuación se describen ejemplos de métodos.

25 En un aspecto preferido, el producto terapéutico comprende un ácido nucleico de Rdcvf1 o Rdcvf2 que es parte de un vector de expresión que expresa una proteína de RDCVF1 o RDCVF2 o uno de sus fragmentos o proteínas quiméricas, en un hospedante adecuado. En particular, dicho ácido nucleico presenta un promotor operablemente unido a la región codificadora de Rdcvf1 o Rdcvf2 y dicho promotor es inducible o constitutivo y, opcionalmente, específico de tejido. En otra realización particular, se emplea una molécula de ácido nucleico en la que las secuencias codificadoras de Rdcvf1 o Rdcvf2 y cualquier otra secuencia deseada están flanqueadas por regiones que estimulan la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando con ello la expresión intracromosómica del ácido nucleico de Rdcvf1 o Rdcvf2 (Koller y Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:8932-8935; Zijlstra *et al.*, 1989, Nature, 342:435-438).

30 La administración del ácido nucleico al paciente puede ser directa, en cuyo caso el paciente se expone directamente al ácido nucleico o al vector que porta el ácido nucleico, o indirecta, en cuyo caso las células primero se transforman con el ácido nucleico *in vitro*, y después se transplantan al paciente. Estas dos estrategias se conocen, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

35 En una realización específica, el ácido nucleico se administra directamente *in vivo*, en donde se expresa para producir el producto codificado. Esto puede lograrse mediante cualquiera de numerosos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de modo que deviene intracelular, por ejemplo, mediante una infección empleando un vector retroviral defectuoso o atenuado u otro vector vírico (adenovirus, virus adenoasociado y lentivirus) (véase, por ejemplo, la patente de EEUU n.º 4.980.286 y otras mencionadas *infra*), o mediante inyección directa de ADN desnudo, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o revistiendo con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes de transección, encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas, o mediante su administración unido a un péptido que se sabe que entra en el núcleo, mediante su administración unido a un ligando sometido a la endocitosis mediada por receptor (véanse, por ejemplo, las patentes de EEUU 5.166.320; 5.728.399; 5.874.297; y 6.030.954) (que puede utilizarse para localizar tipos celulares que expresan específicamente los receptores), etc. En otra realización, puede formarse un complejo de ácido nucleico-ligando en el que el ligando comprende un péptido vírico fusogénico para alterar los endosomas, lo cual permite al ácido nucleico evitar la degradación lisosómica. En otra realización, el ácido nucleico puede dirigirse *in vivo* para la captación específica de célula y la expresión, mediante el transporte dirigido a un receptor específico (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 92/06180; WO 92/22635; WO92/20316; WO93/14188; y WO 93/20221). Como alternativa, el ácido nucleico puede introducirse de modo intracelular e incorporarse dentro del ADN de la célula hospedante para su expresión mediante recombinación homóloga (véanse, por ejemplo, las patentes de EEUU 5.413.923; 5.416.260; and 5.574.205; y Zijlstra *et al.*, 1989, Nature, 342:435-438).

55 En una realización específica, se emplea un vector vírico que contiene el ácido nucleico de Rdcvf1 o Rdcvf2. Por ejemplo, puede emplear un vector retroviral (véanse, por ejemplo, las patentes de EEUU 5.219.740; 5.604.090; y 5.834.182). Estos vectores retrovirales se han modificado para delecionar las secuencias retrovirales que no son necesarias para la encapsulación del genoma vírico y la integración en el ADN de la célula hospedante. El ácido nucleico de Rdcvf1 o Rdcvf2 que se va a utilizar en la terapia génica se clona en el vector, lo cual facilita el transporte del gen a un paciente.

Los adenovirus son otros vectores víricos que pueden emplearse en terapia génica. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos para transportar genes al epitelio respiratorio. Los adenovirus naturalmente infectan al epitelio respiratorio, en donde provocan una enfermedad suave. Otras dianas para los sistemas de transporte basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, las células endoteliales y el músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de que son capaces de infectar a células que no se encuentran en división. Los métodos para realizar terapias génicas basadas en adenovirus se describen, por ejemplo, en las patentes de EEUU 5.824.544; 5.868.040; 5.871.722; 5.880.102; 5.882.877; 5.885.808; 5.932.210; 5.981.225; 5.994.106; 5.994.132; 5.994.134; 6.001.557; y 6.033.8843.

Los virus adenoasociados (AAV) también se han propuesto para su uso en la terapia génica. Los virus adenoasociados son vehículos especialmente atractivos para transportar genes a la retina. Se describen métodos para producir e utilizar AAV, por ejemplo, en las patentes de EEUU 5.173.414; 5.252.479; 5.552.311; 5.658.785; 5.763.416; 5.773.289; 5.843.742; 5.869.040; 5.942.496; y 5.948.675.

Otra estrategia en la terapia génica implica la transferencia de un gen a células en cultivo de tejido mediante métodos tales como la electroporación, la lipofección, la transfección mediada por fosfato de calcio o la infección vírica. Habitualmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Después las células se colocan bajo una selección para aislar las células que han captado y están expresando el gen transferido. Estas células después se administran a un paciente directamente o después de una encapsulación.

En esta realización, el ácido nucleico se introduce en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Esta introducción puede realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector vírico o de bacteriófago que contiene las secuencias de ácidos nucleicos, fusión de células, transferencia de genes mediada por cromosomas, transferencia de genes mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, etc. En la técnica se conocen numerosas técnicas para la introducción de genes extraños en células y estas pueden utilizarse según la presente invención, con la condición de que no se alteren las funciones fisiológicas y del desarrollo necesarias de las células receptoras. La técnica debe proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de modo que el ácido nucleico pueda ser expresado por la célula y preferiblemente se herede y pueda ser expresado por la progenie de la célula.

Las células recombinantes resultantes pueden administrarse a un paciente mediante diversos métodos conocidos en la técnica. En una realización preferida, se inyectan células epiteliales, por ejemplo, por vía subcutánea. En otra realización, las células de la piel recombinantes pueden aplicarse como un injerto de piel al paciente. Las células sanguíneas recombinantes (por ejemplo, células pluripotenciales o progenitoras hematopoyéticas) se administran preferiblemente por vía intravenosa. La cantidad de células prevista para su uso depende del efecto deseado, del estado del paciente, etc., y puede ser determinada por los expertos en la técnica.

Las células en las que puede introducirse un ácido nucleico para fines de terapia génica incluyen cualquier tipo de célula deseada y disponible, e incluyen, pero no se limitan a células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas, tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células pluripotenciales o progenitoras, en particular, células pluripotenciales o progenitoras hematopoyéticas, por ejemplo, obtenidas de la médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica; hígado fetal, etc.

En una realización preferida, la célula empleada para la terapia génica es autóloga al paciente.

En una realización en la que se emplean células recombinantes en terapia génica, se introduce un ácido nucleico de Rdcvf1 o Rdcvf2 en las células de modo que pueda ser expresado por las células o su progenie, y las células recombinantes después se administran *in vivo* para lograr un efecto terapéutico. En una realización específica, se emplean células pluripotenciales o progenitoras. Cualquier célula pluripotencial y/o progenitora que pueda aislarse y mantenerse *in vitro* puede emplearse potencialmente según esta realización de la presente invención. Estas células pluripotenciales incluyen, pero no se limitan a células pluripotenciales hematopoyéticas (HSC), células pluripotenciales de tejidos epiteliales, tales como la piel y el revestimiento del intestino, células de músculo cardíaco embrionario, células pluripotenciales del hígado (véase, por ejemplo, el documento WO 94/08598), y células pluripotenciales neurales (Stemple y Anderson, 1992, Cell, 71:973-985).

Pueden obtenerse células pluripotenciales epiteliales (ESC) o queratinocitos a partir de tejidos tales como la piel y el revestimiento del intestino mediante procedimientos conocidos (Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio., 21A:229). En un tejido epitelial estratificado, tal como la piel, la renovación se produce por mitosis de las células pluripotenciales dentro de la capa germinal, la capa más cercana a la lámina basal. Las células pluripotenciales dentro del revestimiento del intestino proporcionan una tasa de renovación rápida de este tejido. Las ESC o queratinocitos obtenidos de la piel o el revestimiento del intestino de un paciente o donante pueden cultivarse en cultivo de tejidos (Pittelkow y Scott, 1986, Mayo Clinic Proc., 61:771). Si las ESC son proporcionadas por un donante, también puede emplearse un método para la supresión de la reactividad del hospedante contra el injerto (por ejemplo, irradiación, administración de fármacos o anticuerpos para estimular una inmunosupresión moderada). Células pluripotenciales

retinianas (Tropepe *et al.*, 2000, Science, 287:2032).

Con respecto a las células pluripotenciales hematopoyéticas (HSC), puede utilizarse cualquier técnica que proporcione el aislamiento, la propagación y el mantenimiento *in vitro* de HSC en esta realización de la invención. Las técnicas mediante las cuales esto puede lograrse incluyen (a) el aislamiento y el establecimiento de cultivos de HSC a partir de células de la médula ósea aisladas a partir del futuro hospedante o de un donante, o (b) el uso de cultivos de HSC a largo plazo previamente establecidos, que pueden ser alogeneicos o xenogeneicos. Preferiblemente, se emplean HSC no autólogas junto con un método para suprimir las reacciones inmunológicas de transplante del futuro hospedante/paciente. En una realización concreta de la presente invención, pueden obtenerse células de la médula ósea humanas a partir de la cresta ilíaca posterior mediante una aspiración con aguja (véase, por ejemplo, Kodo *et al.*, 1984, J. Clin. Invest., 73:1377-1384). En una realización preferida de la presente invención, se puede enriquecer en gran medida las HSC o proporcionarse en forma sustancialmente pura. Este enriquecimiento puede realizarse antes, durante o después del cultivo a largo plazo, y esto puede realizarse por medio de cualquier técnica conocida en la técnica. Los cultivos a largo plazo de células de la médula ósea pueden establecerse y mantenerse empleando, por ejemplo, técnicas de cultivo de células Dexter modificadas (Dexter *et al.*, 1977, J. Cell Physiol., 91:335) o técnicas de cultivo de Witlock-Witte (Witlock y Witte, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:3608-3612).

En una realización específica, el ácido nucleico que se va a introducir para una terapia génica comprende un promotor inducible unido operablemente con la región codificadora, de modo que la expresión del ácido nucleico pueda ser controlada controlando la presencia o la ausencia del inductor de la transcripción apropiado.

En la presente se describen métodos para la producción de anticuerpos capaces de reconocer específicamente uno o más epitopos de genes diferencialmente expresados. Estos anticuerpos pueden incluir, pero no se limitan a anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAb), anticuerpos humanizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos producidos por un banco de expresión de Fab, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id), y fragmentos de unión al epitopo de cualquiera de los anteriores. Estos anticuerpos pueden utilizarse, por ejemplo, para la detección de una huella, diana, gen en una muestra biológica o, como alternativa, como un método para la inhibición de la actividad anómala del gen diana. Así, estos anticuerpos pueden utilizarse como parte de métodos de tratamiento de enfermedades y/o pueden utilizarse como parte de técnicas de diagnóstico, por las cuales los pacientes pueden ensayarse para detectar unos niveles anómalos de Rdcvf1 o Rdcvf2, o para detectar la presencia de formas anómalas de Rdcvf1 o Rdcvf2 tomando muestras del humor acuoso y/o vítreo mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, Forster, R.K., Abbott, R.L., Gelender, H. (1980), Management of infectious endophthalmitis, Ophthalmology, 87,313-319)].

Para la producción de anticuerpos contra un gen diferencialmente expresado, diversos animales hospedantes pueden ser inmunizados mediante una inyección con una proteína diferencialmente expresada, o una de sus porciones, o mediante inmunización de ADN. Estos animales hospedantes pueden incluir, pero no se limitan a conejos, ratones y ratas, por nombrar a unos cuantos. Pueden utilizarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie hospedante, e incluyen, pero no se limitan a adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales, tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivos, tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles, tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos derivadas del suero de animales inmunizados con un antígeno, tal como un producto génico diana, o con uno de sus derivados funcionales antigénicos. Para la producción de anticuerpos policlonales, pueden inmunizarse animales hospedantes, tales como los descritos anteriormente, mediante una inyección con el producto del gen diferencialmente expresado, suplementada con adyuvantes, tal como también se describió anteriormente.

Los anticuerpos monoclonales, que son poblaciones homogéneas de anticuerpos contra un antígeno concreto, pueden obtenerse mediante cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos por líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen, pero no se limitan a la técnica del hibridoma de Kohler y Milstein, (1975, Nature, 256:495-497; y la patente de EEUU n.º 4.376.110), la técnica del hibridoma de células B humanas (Kosbor *et al.*, 1983, Immunology Today, 4:72; Cole *et al.*, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:2026-2030), y la técnica del hibridoma-EBV (Cole *et al.*, 1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Estos anticuerpos pueden pertenecer a cualquier clase de inmunoglobulinas, que incluyen IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquiera de sus subclases. El hibridoma que produce el mAb de esta invención puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*. La producción de altas titulaciones de mAb *in vivo* hace que este sea el método de producción preferido.

Además, pueden emplearse las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851-6855; Neuberger *et al.*, 1984, Nature, 312:604-608; Takeda *et al.*, 1985, Nature, 314:452-454) cortando los genes de una molécula de anticuerpo de ratón con la especificidad de antígeno apropiada, junto con los genes de una molécula de anticuerpo humana con la actividad biológica apropiada. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como los que presentan una región variable o hipervariable derivada de un mAb murino y una región constante

de inmunoglobulina humana.

Como alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (patente de EEUU n.º 4.946.778; Bird, 1988, Science, 242:423-426; Huston *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883; y Ward *et al.*, 1989, Nature, 334:544-546) pueden adaptarse para producir anticuerpos monocatenarios de genes diferencialmente expresados. Los anticuerpos monocatenarios se forman por la unión de fragmentos de la cadena pesada y ligera de la región Fv a través de un puente de aminoácido, lo cual produce un polipéptido monocatenario.

Lo más preferiblemente, las técnicas útiles para la producción de "anticuerpos humanizados" pueden adaptarse para producir anticuerpos contra los polipéptidos, fragmentos, derivados y equivalentes funcionales descritos en la presente. Estas técnicas se describen en las patentes de EEUU n.ºs 5.932.448; 5.693.762; 5.693.761; 5.585.089; 5.530.101; 5.910.771; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.545.580; 5.661.016; y 5.770.429.

Pueden generarse fragmentos de anticuerpos que reconocen epitopos específicos mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, estos fragmentos incluyen, pero no se limitan a fragmentos F(ab')₂ que pueden producirse mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, y fragmentos Fab que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Como alternativa, también pueden construirse bancos de expresión de Fab (Huse *et al.*, 1989, Science, 246:1275-1281) para permitir una identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada.

Se prefiere particularmente, por la facilidad de detección, el ensayo de "sandwich", del cual existen una serie de variaciones, todas las cuales se pretende que se incluyan en la presente invención.

Por ejemplo, en un ensayo directo típico, un anticuerpo sin marcar se inmoviliza sobre un sustrato sólido y la muestra que se va a ensayar se pone en contacto con la molécula unida. Después de un periodo de incubación adecuado se deja el tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo binario de anticuerpo-antígeno. En este punto, se añade un segundo anticuerpo marcado con una molécula indicadora capaz de inducir una señal detectable, y se incuba durante un tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo ternario de anticuerpo-antígeno-anticuerpo marcado. Cualquier material sin reaccionar se lava y se determina la presencia del antígeno mediante la observación de una señal, o puede cuantificarse mediante la comparación con una muestra control que contiene cantidades conocidas de antígeno. Las variaciones en el ensayo directo incluyen el ensayo simultáneo, en el que la muestra y el anticuerpo se añaden simultáneamente al anticuerpo unido, o un ensayo inverso, en el que el anticuerpo marcado y la muestra que se va a ensayar primero se reúnen, se incuban y se añaden al anticuerpo unido a la superficie sin marcar. Estas técnicas son muy conocidas por los expertos en la técnica y serán evidentes las posibilidades de realizar pequeñas variaciones. Tal como se emplea en la presente, un "ensayo de sandwich" incluye todas las variaciones de la técnica de dos sitios básica. Para los inmunoensayos de la presente invención, el único factor limitante es que los anticuerpos no marcados y marcados sean anticuerpos específicos de RdCVF1 o RdCVF2.

Las moléculas indicadoras que se emplean más habitualmente en este tipo de ensayo son enzimas o moléculas que contienen fluoróforos o radionúclidos. En el caso de un inmunoensayo de enzimas, una enzima se conjuga con el segundo anticuerpo, habitualmente por medio de glutaraldehído o peryodato. Sin embargo, tal como se reconocerá, existe una amplia diversidad de diferentes técnicas de acoplamiento, que son muy conocidas por los expertos en la técnica. Las enzimas que se emplean habitualmente incluyen peroxidasa de rábano, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa y fosfatasa alcalina, entre otras. Los sustratos que se emplean con las enzimas específicas se eligen, en general, por la producción, tras la hidrólisis de la correspondiente enzima, de un cambio de color detectable. Por ejemplo, el fosfato de p-nitrofenilo resulta adecuado para su uso con conjugados de fosfatasa alcalina; para los conjugados de peroxidasa se emplean habitualmente 1,2-fenilendiamina o toluidina. También es posible emplear sustratos fluorogénicos, que producen un producto fluorescente, en lugar de los sustratos cromogénicos indicados anteriormente. Después se añade una disolución que contenga el sustrato apropiado al complejo ternario de anticuerpo-RdCVF1- o RdCVF2-anticuerpo marcado. El sustrato reacciona con la enzima unida al segundo anticuerpo, produciendo una señal visual cualitativa que después puede cuantificarse, habitualmente de modo espectrofotométrico, para producir una evaluación de la cantidad de Rdcvf1 o Rdcvf2 que está presente en la muestra de suero.

Como alternativa, pueden acoplarse de modo químico compuestos fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, a los anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activan mediante iluminación con una luz de una longitud de onda concreta, el anticuerpo marcado con el fluorocromo absorbe la energía lumínica, lo cual induce un estado excitabilidad en la molécula, seguido de la emisión de luz a una longitud de onda característica. La emisión aparece como un color característico visualmente detectable con un microscopio óptico. Las técnicas de inmunofluorescencia y de EIA están bien establecidas en la técnica y son particularmente preferidas para el presente método. Sin embargo, también pueden emplearse otras moléculas indicadoras, tales como radioisótopos, moléculas quimioluminiscentes o bioluminiscentes. A los expertos en la técnica les resultará evidente cómo variar el procedimiento para ajustarse al uso requerido.

Esta invención también se refiere al uso de los polinucleótidos de la presente invención como reactivos de diagnóstico. La detección de una forma mutada del gen que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que

consiste en los polipéptidos indicados en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:14 que esté asociado con una disfunción proporcionará una herramienta de diagnóstico que puede añadirse o definir un diagnóstico de una enfermedad, o la susceptibilidad a una enfermedad, que resulta de la infraexpresión, la sobreexpresión o la expresión espacial o temporal alterada del gen. Los individuos que portan mutaciones en el gen pueden detectarse al nivel del ADN mediante una diversidad de técnicas.

Los ácidos nucleicos para el diagnóstico pueden obtenerse a partir de las células de un sujeto, tales como de sangre, orina, saliva, tejido de biopsia o material de autopsia. El ADN genómico puede utilizarse directamente para la detección o puede amplificarse enzimáticamente empleando una PCR u otras técnicas de amplificación antes del análisis. También puede emplearse ARN o ADNc de una manera similar. Las deleciones e inserciones pueden detectarse por un cambio en el tamaño del producto amplificado en comparación con el genotipo normal. Las mutaciones puntuales pueden identificarse mediante la hibridación del ADN amplificado con secuencias de nucleótidos marcadas. Las secuencias perfectamente apareadas pueden distinguirse de los dúplex desapareados mediante una digestión con ARNasa o mediante diferencias en las temperaturas de fusión. Las diferencias en la secuencia de ADN también pueden detectarse mediante alteraciones en la movilidad electroforética de fragmentos de ADN en geles, con o sin agentes desnaturalizantes (SSCP), o mediante secuenciación de ADN directa (por ejemplo, Myers *et al.*, Science (1985), 230:1242). Los cambios de secuencia en localizaciones específicas también pueden revelarse mediante ensayos de protección de nucleasas, tales como protección de S1 y ARNasa o el método de ruptura química (véase Cotton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985), 85:4397-4401). En otra realización, puede construirse una matriz de sondas oligonucleotídicas que comprenden la secuencia de nucleótidos de Rdcvf1 o Rdcvf2, o sus fragmentos, para realizar una selección eficaz, por ejemplo, de mutaciones genéticas. Los métodos de la tecnología de matrices son muy conocidos y tienen aplicabilidad general y pueden emplearse para solucionar una diversidad de cuestiones en la genética molecular, que incluyen la expresión génica, la vinculación genética y la variabilidad genética (véase, por ejemplo, M. Chee *et al.*, Science, vol. 274, pp. 610-613 (1996)).

Los ensayos de diagnóstico ofrecen un proceso para diagnosticar o determinar la susceptibilidad a una enfermedad a través de la detección de una mutación en el gen Rdcvf1 o Rdcvf2 mediante los métodos descritos. Además, dichas enfermedades pueden diagnosticarse mediante métodos que comprenden determinar, a partir de una muestra obtenida de un sujeto, una expresión anómala de Rdcvf1 o Rdcvf2: La expresión puede medirse al nivel del ARN empleando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica para la cuantificación de polinucleótidos, tales como, por ejemplo, amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, PCR, RT-PCR, protección de ARNasa, transferencia Northern y otros métodos de hibridación. Las técnicas de ensayo que pueden utilizarse para determinar los niveles de una proteína, tal como un polipéptido de la presente invención, en una muestra obtenida de un hospedante son muy conocidas por los expertos en la técnica. Estos métodos de ensayo incluyen radioinmunoensayos, ensayos de unión competitiva, análisis de la transferencia Western y ensayos ELISA.

Así, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit de diagnóstico que comprende:

(a) un polinucleótido de la presente invención, preferiblemente la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en los polipéptidos indicados en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:14;

(b) una secuencia de nucleótidos complementaria a (a);

(c) un polipéptido de la presente invención; o

(d) un anticuerpo contra un polipéptido de la presente invención, preferiblemente contra un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en los polipéptidos indicados en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:14.

Se apreciará que en cualquiera de dichos kits, (a), (b), (c) o (d) puede comprender un componente sustancial. Este kit se empleará en el diagnóstico de una enfermedad o de una susceptibilidad a una enfermedad, en particular la retinitis pigmentosa, la degeneración macular relacionada con el envejecimiento, el síndrome de Bardet-Biedel, el síndrome de Bassen-Kornzweig, la enfermedad de Best, el coroidema, la atrofia girada, la amaurosis congénita, el síndrome de Refsum, la enfermedad de Stargardt y el síndrome de Usher. Las secuencias de nucleótidos de la presente invención también son valiosas para la localización cromosómica. La localización cromosómica puede obtenerse mediante PCR de un ADN preparado a partir de un panel de líneas celulares híbridas (ratón-hámster). La localización cromosómica del gen humano puede predecirse a partir de la localización del gen de ratón mediante sintenia (McCarthy *et al.* (1997), Genome research, 7, 1153). La secuencia se localiza específicamente y puede hibridarse con una localización concreta sobre un cromosoma individual, que incluye un cromosoma humano o de ratón. El cartografiado de las secuencias pertinentes en los cromosomas según la presente invención es una primera etapa importante para correlacionar estas secuencias con la enfermedad asociada a genes. Cuando una secuencia se ha cartografiado en una localización cromosómica precisa, la posición física de la secuencia sobre el cromosoma puede correlacionarse con los datos de mapas genéticos. Estos datos se encuentran, por ejemplo, en V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (disponible en línea en Johns Hopkins University Welch Medical Library, RetNet). Después se identifica la relación entre genes y enfermedades que se han cartografiado en la misma región cromosómica mediante un análisis de vinculación (herencia conjunta de genes físicamente adyacentes).

También pueden determinarse las diferencias en la secuencia de ADNc o genómica entre individuos afectados y no afectados. Si se observa una mutación en algunos o todos los individuos afectados, pero no en ninguno de los individuos normales, entonces es probable que la mutación sea el agente causal de la enfermedad.

5 Otra realización de la invención se refiere a la administración de una composición farmacéutica junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, para cualquiera de los efectos terapéuticos analizados anteriormente. Estas composiciones farmacéuticas pueden consistir en Rdcvf1 o Rdcvf2, miméticos o agonistas. Las composiciones pueden administrarse solas o en combinación con al menos otro agente, tal como un compuesto estabilizante, que puede administrarse en cualquier vehículo estéril, biocompatible, que incluye, pero no se limita a disolución salina, disolución salina tamponada, dextrosa y agua. Las composiciones se pueden administrar a un paciente solas o en combinación con otros agentes, fármacos u hormonas.

10 Las composiciones farmacéuticas incluidas en la invención pueden administrarse mediante cualquiera de una serie de vías: por ejemplo, la administración transescleral de la proteína biorreactiva al corioide y la retina (Ambati *et al.* (2000), *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 41, 1186). La formulación de preparaciones oftálmicas tópicas, que incluyen disoluciones, suspensiones y ungüentos oftálmicos, es muy conocida por los expertos en la técnica (véase Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18ª edición, capítulo 86, pp. 1581-1592, Mack Publishing Company, 1990). Están disponibles otras vías de administración, que incluyen inyecciones intracamerales (que pueden realizarse directamente en la cámara anterior o directamente en la cámara vítrea), inyecciones subconjuntivales e inyecciones retrobulbares, y los métodos y medios para producir preparaciones oftálmicas adecuadas para estas vías de administración también son muy conocidos.

20 Tal como se emplea en esta solicitud, "extraocular" se refiere a la superficie ocular y al espacio (externo) entre el globo ocular y el párpado. Los ejemplos de regiones extraoculares incluyen el fórnix del párpado o saco conjuntival, la superficie conjuntival y la superficie corneal. Esta localización es externa a todos los tejidos oculares y no se requiere un procedimiento invasivo para acceder a esta región. Los ejemplos de sistemas extraoculares incluyen insertos y gotas, geles o ungüentos aplicados "por vía tópica" que pueden utilizarse para administrar un material terapéutico a estas regiones. Los dispositivos extraoculares en general pueden extraerse con facilidad, incluso por el propio paciente.

25 Las siguientes patentes describen sistemas extraoculares que se emplean para administrar fármacos a las regiones extraoculares. Higuchi *et al.* describen en las patentes de EEUU n.ºs 3.981.303, 3.986.510 y 3.995.635, un inserto ocular biodegradable que contiene un fármaco. El inserto puede fabricarse con diferentes formas para la retención en el saco conjuntival del globo ocular, el espacio extraocular entre el globo ocular y el párpado. Se describen varios polímeros biocompatibles habituales como adecuados para su uso en la fabricación de este dispositivo. Estos polímeros incluyen alginato de cinc, poli(ácido láctico), polianhídridos y poli(ácido glicólico). Las patentes también describen dispositivos revestidos con membrana con una permeación reducida para el fármaco y cámaras huecas que contienen la formulación de fármaco.

30 Theeuwes, patente de EEUU n.º 4.217.898, describe depósitos microporosos que se emplean para la administración controlada de fármacos. Estos dispositivos se colocan de modo extraocular en el saco conjuntival ocular. Entre los sistemas de polímeros de interés se incluyen copolímeros de poli(cloruro de vinilo)-co-poli(acetato de vinilo). Kaufman describe, en las patentes de EEUU n.ºs 4.865.846 y 4.882.150, un sistema de administración de fármacos oftálmicos que contiene al menos un material bioerosionable o vehículo de ungüento para el saco conjuntival. La patente describe sistema poliméricos, tales como polilactida, poliglicólido, poli(alcohol vinílico) y colágeno reticulado, como sistemas de administración adecuados.

35 En el uso descrito en la presente del producto de proteína de RDCVF1 o RDCVF2 para el tratamiento de enfermedades o lesiones retinianas también resulta ventajoso que una formulación oftálmica de aplicación tópica incluya un agente para estimular la penetración o el transporte del agente terapéutico al ojo. Estos agentes son conocidos en la técnica. Por ejemplo, Ke *et al.*, patente de EEUU n.º 5.221.696, describe el uso de materiales para potenciar la penetración de preparaciones oftálmicas a través de la córnea.

40 Los sistemas intraoculares son los sistemas que son adecuados para su uso en cualquier compartimento tisular dentro, entre o alrededor de las capas de tejido del propio ojo. Estas localizaciones incluyen la subconjuntival (bajo la membrana mucosa ocular adyacente al globo ocular), orbital (detrás del globo ocular), e intracameral (dentro de la cámara del propio globo ocular). Por contraste con los sistemas extraoculares, es necesario un procedimiento invasivo que consiste en la inyección o la implantación para acceder a estas regiones.

45 Las siguientes patentes describen dispositivos intraoculares. Wong, patente de EEUU n.º 4.853.224, describe fármacos microencapsulados para la introducción en la cámara del ojo. Los polímeros que se emplean en este sistema incluyen poliésteres y poliéteres. Lee, patente de EEUU n.º 4.863.457, describe un dispositivo biodegradable que se implanta quirúrgicamente de modo intraocular para la liberación sostenida de agentes terapéuticos. El dispositivo está diseñado para la implantación quirúrgica bajo la conjuntiva (membrana mucosa del globo ocular). Krezancaki, patente de EEUU n.º 4.188.373, describe un vehículo farmacéutico que gelifica a la temperatura corporal humana. Este vehículo es una suspensión acuosa del fármaco y derivados sintéticos procedentes de gomas o celulosa. Haslam *et al.* describen, en las patentes de EEUU n.ºs 4.474.751 y 4.474.752, un sistema de

polímero-fármaco que es líquido a temperatura ambiente y gelifica a temperatura corporal. Los polímeros adecuados utilizados en este sistema incluyen polioxietileno y polioxipropileno. Davis *et al.* describen, en la patente de EEUU n.º 5.384.333, un polímero de administración de fármacos inyectable biodegradable que proporciona una liberación a largo plazo del fármaco. La composición de fármaco está formada por un agente farmacéuticamente activo en una matriz de polímero biodegradable, en el que la matriz polimérica es sólida a temperaturas en el intervalo de 20 °C a 37° C y es fluida a temperaturas en el intervalo de 38 °C a 52 °C. El polímero de administración de fármacos no se limita a la administración de formulaciones de fármacos solubles o líquidas. Por ejemplo, el polímero puede utilizarse como matriz para estabilizar y mantener en el sitio de la inyección microesferas que contienen fármaco, liposomas u otros fármacos unidos a partículas.

Un vehículo particularmente adecuado para la inyección intraocular es agua destilada estéril en la que se formula un producto de proteína de RDCVF1 o RDCVF2 como una disolución estéril isotónica, conservada de modo apropiado. Otra preparación oftálmica puede implicar la formulación del producto de proteína de RDCVF1 o RDCVF2 con un agente, tal como microesferas o liposomas inyectables, que proporciona una liberación lenta o sostenida de la proteína que después puede administrarse como una inyección de liberación lenta (depot). Otros medios adecuados para la introducción intraocular del producto de proteína de RDCVF1 o RDCVF2 incluyen dispositivos de administración de fármacos implantables o que contienen el producto de proteína de RDCVF1 o RDCVF2.

Las preparaciones oftálmicas de la presente invención, en particular las preparaciones tópicas, pueden incluir otros componentes, por ejemplo, conservantes oftálmicamente aceptables, agentes de tonicidad, codisolventes, agentes humectantes, agentes complejantes, agentes tamponantes, antimicrobianos, antioxidantes y tensioactivos, tal como se conoce en la técnica. Por ejemplo, los agentes potenciadores de la tonicidad adecuados incluyen haluros de metal alcalino (preferiblemente cloruro de sodio o potasio), manitol, sorbitol y similares. De forma ventajosa, se añade suficiente agente potenciador de la tonicidad para que la formulación instilada hacia el interior del ojo sea hipotónica o sustancialmente isotónica. Los conservantes adecuados incluyen, pero no se limitan a cloruro de benzalconio, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico y similares. También puede utilizarse el peróxido de hidrógeno como conservante. Los codisolventes adecuados incluyen, pero no se limitan a glicerina, propilenglicol y polietilenglicol. Los agentes complejantes adecuados incluyen cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina. Los tensioactivos o agentes humectantes adecuados incluyen, pero no se limitan a ésteres de sorbitán, polisorbatos, tales como polisorbato 80, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapol y similares. Los tampones pueden ser tampones convencionales, tales como borato, citrato, fosfato, bicarbonato, o Tris-HCl.

Los componentes de formulación están presentes a concentraciones que son aceptables para el sitio extraocular o intraocular de administración. Por ejemplo, se emplean tampones para mantener la composición a un pH fisiológico o a un pH ligeramente menor, generalmente dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8. Otros componentes de formulación pueden incluir materiales que proporcionan una residencia ocular prolongada del agente terapéutico administrado de modo extraocular, de modo que se maximiza el contacto tópico y se estimula la absorción. Los materiales adecuados incluyen polímeros o materiales formadores de gel que proporcionan una mayor viscosidad a la preparación oftálmica. El quitosano es un material particularmente adecuado como agente de control de la velocidad de liberación ocular en formulaciones de fármacos oftálmicas líquidas de liberación sostenida (véase la patente de EEUU n.º 5.422.116, Yen, *et al.*). La idoneidad de las formulaciones de la presente invención para la liberación controlada (por ejemplo, la administración sostenida y prolongada) de un agente de tratamiento oftálmico en el ojo puede determinarse mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en *Journal of Controlled Release*, 6:367-373, 1987, así como sus variaciones.

Además de los ingredientes activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y sustancias auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden utilizarse de modo farmacéutico. Otros detalles sobre las técnicas para la formulación y la administración pueden encontrarse en la última edición de *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Maack Publishing Co., Easton, Pa.).

Las composiciones farmacéuticas para la administración oral pueden formularse empleando vehículos farmacéuticamente aceptables muy conocidos en la técnica en dosificaciones adecuadas para la administración oral. Dichos vehículos permiten que las composiciones farmacéuticas sean formuladas como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones, y similares, para la ingestión por parte del paciente.

Las preparaciones farmacéuticas para un uso oral pueden obtenerse mediante la combinación de los compuestos activos con un excipiente sólido, opcionalmente triturando la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos después de añadir sustancias auxiliares, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son cargas de carbohidratos o proteínas, tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, patata u otras plantas; celulosa, tal como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa sodio; gomas, que incluyen goma arábica y tragacanto; y proteínas, tales como gelatina y colágeno. Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes o solubilizantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido alginico o una de sus sales, tal como alginato sódico.

- 5 Los núcleos de grageas pueden emplearse junto con revestimientos adecuados, tales como disoluciones de azúcares concentrados, que también pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, disoluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o revestimientos de grageas para la identificación del producto o para caracterizar la cantidad del compuesto activo, es decir, la dosificación.
- 10 Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas blandas, selladas, hechas de gelatina y un revestimiento, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos en mezcla con una carga o ligantes, tales como lactosa o almidones, lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos líquidos o polietilenglicol líquido con o sin estabilizantes.
- 15 Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden formularse en disoluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como disolución de Hanks, disolución de Ringer, o disolución salina fisiológicamente tamponada. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Además, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse en forma de suspensiones para inyección oleaginosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres sintéticos de ácidos grasos tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. También pueden utilizarse polímeros amínicos policatiónicos no lipídicos para la administración. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados, que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas.
- 20 Para la administración tópica o nasal, se usan agentes penetrantes adecuados para la barrera concreta a permear en la formulación. Tales penetrantes son en general conocidos en la técnica.
- 25 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden fabricar de una manera conocida en la técnica, por ejemplo mediante procesos convencionales de mezclado, disolución, granulación, formación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.
- 30 La composición farmacéutica puede proporcionarse como una sal y puede formarse con muchos ácidos, que incluyen, pero no se limitan al ácido clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes acuosos u otros disolventes protónicos que en las correspondientes formas de base libre. En otros casos, la preparación preferida puede ser un polvo liofilizado que puede contener cualquiera o todos los siguientes: histidina 1-50 mM, sacarosa al 0,1%-2%, y manitol al 2-7%, a un intervalo de pH de 4,5 a 5,5, que se combina con un tampón antes del uso.
- 35 Después de preparar las composiciones farmacéuticas, estas pueden introducirse en un recipiente apropiado y etiquetarse para el tratamiento de un trastorno indicado. Para la administración de Rdcvf1 o Rdcvf2, este etiquetado incluirá la cantidad, la frecuencia y el método de administración.
- Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en la invención incluyen composiciones en donde los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el fin pretendido. La determinación de la dosis eficaz está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica.
- 40 Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz puede calcularse inicialmente tanto en ensayos de cultivos celulares, por ejemplo, de células neoplásicas, como en modelos animales, normalmente con ratones, conejos, perros o cerdos. También puede utilizarse un modelo animal para determinar el intervalo de concentración y la vía de administración adecuados. Después, esta información puede utilizarse para determinar las dosis y las vías útiles para la administración a seres humanos.
- 45 Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de ingrediente activo, por ejemplo Rdcvf1 o Rdcvf2 o sus fragmentos, anticuerpos contra Rdcvf1, agonistas, que mejoran los síntomas o el trastorno. La eficacia terapéutica y la toxicidad pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo, la ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en 50% de la población) y la LD50 (la dosis letal para 50% de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, y puede expresarse como la proporción LD50/ED50. Se prefieren las composiciones farmacéuticas que muestran un alto índice terapéutico. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se emplean en la formulación de un intervalo de dosificación para el uso en el ser humano. La dosificación contenida en dichas composiciones está preferiblemente en un intervalo de concentraciones en la circulación que incluye la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación varía dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada, la sensibilidad del paciente y la vía de administración.
- 50
- 55 La dosificación exacta será determinada por el médico, a la luz de factores relacionados con el sujeto que requiere tratamiento. La dosificación y la administración se ajustan para proporcionar unos niveles suficientes del resto activo o para mantener el efecto deseado. Los factores que pueden tomarse en cuenta incluyen la gravedad del estado de enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el género del sujeto, la dieta, el momento y la frecuencia

de la administración, la combinación de fármacos, las sensibilidades de reacción, y la tolerancia/respuesta a la terapia. Las composiciones farmacéuticas de acción a largo plazo pueden administrarse cada 3 a 4 días, cada semana o una vez cada dos semanas, dependiendo de la semivida y velocidad de eliminación de la formulación concreta.

- 5 Las cantidades de dosificación normales pueden variar de 0,1 a 100.000 microgramos, hasta una dosis total de aproximadamente 1 g, dependiendo de la vía de administración. En la bibliografía se proporcionan directrices acerca de las dosificaciones y métodos de administración concretos y, en general, estas están disponibles para los médicos. Los expertos en la técnica emplearán diferentes formulaciones para nucleótidos que para proteínas o sus inhibidores. De modo similar, la administración de polinucleótidos o polipéptidos será específica de células, condiciones, localización, etc., concretas. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración oral de proteínas se describen, por ejemplo, en las patentes de EEUU 5.008.114;5.505.962; 5.641.515; 5.681.811; 5.700.486; 5.766.633; 5.792.451; 5.853.748; 5.972.387; 5.976.569; y 6.051.561.

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención, sin que limiten de ninguna forma su alcance.

Ejemplos

15 1. Clonación de expresión:

1) Purificación del ARN total a partir de retinas de ratón normal de cinco semanas:

- Se construyó el banco de ADNc a partir de retinas de ratones C57BL/6@N de cinco semanas de edad según el método, en general, de Glissin *et al.* (1974), *Biochemistry*, 13, 2633-2637. Brevemente, después de sacrificar a los animales, estos se enuclearon y los ojos se colocaron primero en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) suplementada con pirocarbonato de dietilo al 0,1% (DEPC). La retina neural fue rápidamente diseccionada (el epitelio pigmentado retiniano fue omitido en esta preparación de tejido). Rápidamente después de cada disección, los tejidos fueron homogeneizados en cloruro de guanidinio 6 M fresco. Se reunieron diez retinas en 2,4 ml de GC en tubos estériles de 4 ml y el tejido se desorganizó completamente mediante una homogeneización fuerte durante 1 minuto a temperatura ambiente.

25 Purificación del ARN mensajero (ARNm) de retinas de ratón normal de cinco semanas:

- El ARNm se aisló sobre esferas porosas revestidas con oligo-dT (Oligotex, Qiagen) bajo condiciones rigurosas según el método de Kuribayashi *et al.* (1988), *Nucleic Acids Res. Symposium series*, 19, 61-64. Brevemente, 100-150 µg de ARN total de retina de ratón se mezclaron con 15 µl de esferas oligo-dT en tampón de unión [Tris 10 mM, pH 7,5; NaCl 0,3 M; EDTA 0,1 M; dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,5 % en p/v] y se incubó durante 6 minutos a 65 °C en 0,5 l becher de agua, después se enfrió progresivamente hasta la temperatura ambiente durante aproximadamente 3-4 horas, y después se centrifugó a temperatura ambiente para recuperar las esferas de agarosa. Después estas se lavaron dos veces mediante una incubación durante 10 minutos en 0,4 ml de (Tris 0,1 M, pH 7,5; NaCl 0,1 M; EDTA 1 mM; SDS al 0,5 % en p/v). El ARN unido (ARNm) se eluyó en dos etapas con 50 µl de agua sin ARNasa calentada a 70 °C, se precipitó con 10 µl de acetato de sodio, pH 5,2, y 0,25 ml de etanol, y se incubó durante 12 horas a -70 °C. El ARNm se recogió mediante centrifugación (1 hora a 15.000 rpm, seguido de dos lavados con etanol al 70%) y se resuspendió en 20 µl de agua sin ARNasa. Se midió la concentración de ARNm a 260 nm y se comprobó la ausencia de contaminación por ARNr mediante una electroforesis en gel bajo condiciones desnaturizantes, tal como se indicó anteriormente.

Síntesis de ADNc:

- 40 Se realizó según el método de Okayama y Berg (1982), *Mol. Cell. Biol.*, 2, 161-170. La síntesis de la primera hebra se cebó con 2,5 µg de oligonucleótido adaptador NotI (5'TGTTACCAATCTGAAGTGGGAGCGGCCGACAA(T)₁₈ 3') y se incubó durante 2 horas con 50 unidades de transcriptasa inversa del virus de leucemia murina de Moloney modificado (M-MLV) (Superscript II, Life Technology) bajo las condiciones recomendadas por el suministrador. Para la síntesis de la segunda hebra, la reacción se incubó durante 4 horas a 14 °C con 4 unidades de ARNasaH y 100 unidades de ADN polimerasa I en tampón SS [Tris 40 mM, pH 7,2; cloruro de potasio 85 mM; cloruro de magnesio 4,4 mM; DTT 3 mM; albúmina de suero bovina (BSA) 5 µg/ml] en un volumen final de 0,25 ml. Se acoplaron adaptadores EcoRI (5'-OH AATTCGGCAGG 3'-OH/3'-OH GCCGTGCTCC5'-PO₄) en ambos extremos del ADNc bicatenario durante 14 horas a 16 °C empleando 40 unidades de ADN ligasa de T4 (Promega, Madison, EEUU) en un volumen total de 20 µl bajo las condiciones recomendadas por el suministrador. Los productos de esta reacción son ADNcbc que contiene medio sitio EcoRI en 5' y medio sitio NotI en 3' que puede orientarse en el vector de clonación.

Acoplamiento del ADNcbc en pcDNA3:

- 55 Se realizó según Maniatis T. (1992), *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2ª ed., empleando 10 µg de plásmido pcDNA3 (Invitrogen) preparado cortando con EcoRI y NotI (Promega, Madison, EEUU) bajo las condiciones especificadas por el suministrador.

Propagación de los clones recombinantes:

Se realizó en general según el método de Birnboim *et al.* (1979), Nucleic Acids Res., 7, 1513-1523. Brevemente, para obtener agrupaciones de 100 clones primarios, los inventores modificaron ligeramente el protocolo de transformación XL1 Gold (Stratagene) (proporcionado por Stratagene) como sigue. Después de una incubación en medio de crecimiento, la reacción de transformación se llevó a glicerol al 20 % (en vol./vol.) y albúmina de suero de caballo al 8 % (en vol./vol.) (HAS, Life Technologies). La HAS y el glicerol evitan la muerte después de la congelación y descongelación. Se realizó una titulación mediante cultivo en placas de agar (ampicilina 100 µg/ml) aumentando el volumen en cada reacción de transformación para calcular el volumen que produce 100 colonias, y el grueso de la reacción de transformación se conservó a -80 °C. Los plásmidos recombinantes del banco se purificaron en 96 al instante. Para preparar 96 agrupaciones de 100 clones, el volumen calculado correspondiente a 100 clones se cultivó en agua durante 20 horas a 37 °C. El ADN se purificó directamente a partir de las colonias separadas de las placas de agar. Una disolución madre de cada cultivo en glicerol al 23% se conservó a -80 °C. El ADN se purificó empleando Qiawell ultra (Qiagen) utilizando un protocolo recomendado por el suministrador. Generalmente, se obtuvieron 10 µg del plásmido purificado, y la concentración de cada preparación se midió empleando la densidad óptica a 260 nm. Para subdividir las agrupaciones seleccionadas de 100 en agrupaciones de 10, se cultivaron 50 µl de una dilución 1/250.000 de la disolución madre de glicerol de la agrupación original en una placa de agar con ampicilina 100 µg/ml. Después de un crecimiento durante 16 horas a 37 °C, 160 colonias individuales se replicaron en 16 placas de agar (10 por placa) y se cultivaron durante 16 horas a 37 °C. Las diez colonias de cada placa se recolectaron y se cultivaron en medio líquido [caldo de cultivo Luria (LB), ampicilina 100 µg/ml] durante 3 horas a 37 °C. Una disolución madre de estos cultivos en glicerol al 30% se conservó a -80 °C. El ADN plasmídico se preparó como se indicó anteriormente. Para dividir las subagrupaciones de 10 en clones individuales, se cultivaron 50 µl de una dilución 1/250.000 de la disolución madre de glicerol de las subagrupaciones de 10 en una placa de agar con ampicilina 100 µg/ml. Después de un crecimiento durante 16 horas a 37 °C, se escogieron 16 colonias individuales y se cultivaron durante 16 horas en 2 ml de LB, ampicilina 100 µg/ml. Una disolución madre de estos cultivos en glicerol al 30% se conservó a -80 °C. El ADN plasmídico se preparó como se indicó anteriormente.

Transfección transitoria en células COS-1:

Se realizó empleando el método de Chen y Okayama, (1987), High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA (Mol. Cell. Biol., 7, 2745-2752).

Cultivos retinianos de embrión de pollo:

El protocolo se adaptó de Adler y Hatlee [(1989), Science, 243, 391]. Retinas embrionarias de pollo (6 días *in ovo*) se disocian y se cultivan en cultivo de monocapa. Bajo estas condiciones de cultivo con la ausencia de señales de diferenciación, los conos representan 60-80% de las células. Los inventores produjeron anticuerpos policlonales en conejos contra la visinina (un marcadores de conos de pollo, Genbank n.º de registro M84729) y verificaron que la proporción de conos en estos cultivos era del 60-80%. El sencillo entorno del modelo de los inventores (medio químicamente definido, ausencia de contacto entre células), además de la facilidad y rapidez del método, hace que sea un sistema muy apropiado para estudiar los factores tróficos implicados en la supervivencia de los conos. Brevemente, retinas de embriones obtenidas de un aislado control de progenitores se diseccionan después de seis días de desarrollo *in ovo*, las células se disocian y se cultivan a baja densidad (10^5 células/cm²). Durante diez días se siguió la viabilidad de las células (60-80% de conos) empleando el ensayo LIVE/DEAD (Molecular Probes, Eugene, EEUU), un ensayo que cuantifica las células vivas y muertas. El número de células vivas disminuye hasta 8% del número de células inicial después de siete días de cultivo en medio químicamente definido. Cuando se realiza en presencia de medio acondicionado de células COS1 transfectadas con agrupaciones de clones del banco, las células vivas se cuentan después de siete días *in vitro*.

Los pollos progenitores (raza 657 red label) se mantuvieron en un compartimento separado para este experimento, en unas instalaciones de incubación a 25 km del laboratorio. Los huevos fertilizados obtenidos de modo natural se recolectaron cada semana y se mantuvieron a 17 °C (su cero biológico) en el laboratorio después de eclosionar. A diario, 5 huevos fueron incubados durante 24 horas a 20 °C, después durante 136 horas a 37 °C con una reversión intermitente de la inclinación de los huevos en una cámara humidificada. El día del cultivo, la superficie de los huevos se lava con Mucocit-A, después se rompen y los embriones de pollo se trasladan a PBS. Se verifica que el estadio de desarrollo de cada embrión es el 29º mediante comparación visual con Hamburger y Hamilton (1951), en Essential Development Biology, Stern y Holland, ed. Se eligieron dos de los embriones y se enuclearon, y los ojos se trasladaron en medio independiente de CO₂ (Life Technologies). Las retinas se diseccionaron y se trasladaron a tampón de Ringer y se lavaron dos veces. Las retinas se cortaron en trozos pequeños y se trataron durante 20 minutos a 37 °C con una disolución de tripsina (al 0,25 % en p/v). La reacción se detiene mediante la adición de medio de cultivo (M199, Life Technologies) suplementado con FCS inactivado al 10%. La suspensión celular se trata durante unos pocos minutos en 25 µl de ADNasa I (1 mg/ml, Sigma). La suspensión celular después se lava dos veces en medio de cultivo químico definido [CDCM, volúmenes iguales de DMEM y medio 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; citidina 5'-difosfoetanolamina 2,7 µM; citidina 5'-difosfocolina 5,2 µM; hidrocortisona 0,2 µg/ml; 3,3'-5-triiodo-L-tironina 30 nM; piruvato de sodio 1 mM), prostaglandina D₂ 0,3 µM; ácido linoleico 0,1 mg/ml] para

eliminar el FCS. Se mide la concentración de células teñidas con azul de tripano con una célula de Mallassez y se lleva a dos concentraciones (5,6 y 1,12 10⁵ células/ml) que se corresponden con dos densidades de cultivo en placa (2 y 4 10⁵ células/cm²).

5 El medio acondicionado de células COS-1 transfectadas se descongela en hielo y se trasladan 50 µl a dos placas negras tratadas de cultivo de tejido de 96 pocillos (Corning Costar) que habían sido revestidas con una disolución de poli-L-lisina 100 µg/ml (Sigma) según el plan:

Primera ronda de selección:

1	1	1	1	2	C	2	2	2	3	3	P
C	3	3	4	4	4	C	4	5	5	5	5
6	C	6	6	6	7	7	C	7	7	8	8
8	8	C	9	9	9	9	10	C	10	10	10
11	11	11	C	11	12	12	12	12	C	13	13
13	13	14	14	C	14	14	15	15	15	C	15
16	16	16	16	17	C	17	17	17	18	18	C
18	18	19	19	19	19	P	20	20	20	C	20

10 Los números se refieren al n° de agrupaciones de 100 clones, C al medio acondicionado de las células COS-1 transfectadas con el vector vacío (pcDNA3) y P a un control positivo (medio acondicionado transfectado con pcDNA-ratónGDNF).

Segunda y tercera ronda de selección:

x.(y).01	x.(y).01	x.(y).01	x.(y).01	x.(y).02	C	x.(y).02	x.(y).02	x.(y).02	x.(y).03	x.(y).03	P
C	x.(y).03	x.(y).03	x.(y).04	x.(y).04	x.(y).04	C	x.(y).04	x.(y).05	x.(y).05	x.(y).05	x.(y).05
x.(y).06	C	x.(y).06	x.(y).06	x.(y).06	x.(y).07	x.(y).07	C	x.(y).07	x.(y).07	x.(y).08	x.(y).08
x.(y).08	x.(y).08	C	x.(y).09	x.(y).09	x.(y).09	x.(y).09	x.(y).10	C	x.(y).10	x.(y).10	x.(y).10
x.(y).11	x.(y).11	x.(y).11	C	x.(y).11	x.(y).12	x.(y).12	x.(y).12	x.(y).12	C	x.(y).13	x.(y).13
x.(y).13	x.(y).13	x.(y).14	x.(y).14	C	x.(y).14	x.(y).14	x.(y).15	x.(y).15	x.(y).15	C	x.(y).15
x.(y).16	x.(y).16	x.(y).16	x.(y).16	x.(y)	C	x.(y)	x.(y)	x.(y)	C57	C57	C
C57	C57	C3H	C3H	C3H	C3H	P	0	0	0	C	0

15 En la tabla, x (segunda ronda) e y (tercera ronda) representan el n° de agrupaciones seleccionadas en la primera y las segunda ronda, respectivamente. 01 a 16 representan las subagrupaciones empleadas. x(y) representa la agrupación de origen de la cual se derivan las 16 agrupaciones. C es como en la primera ronda. P se modificó como pCMVScript-CNTF en la segunda ronda y progresivamente a pcDNA-939.09.08 en la tercera ronda. 0 representa células de conos de pollito en medio CDCM únicamente. C57 y C3H, medios acondicionados de explantes de retinas preparados como se describe en "Preparación de medio acondicionado de explantes de retinas de ratón" a partir de retinas de ratón C57BL/6@N y C3H/He@N con una edad de 5 semanas, respectivamente.

20 Se añadieron 50 µl de suspensiones celulares que se corresponden con dos densidades (2 y 4 10⁵ células/cm²) al

pocillo de las dos placas de 96 pocillos llenas de medio acondicionado con una pipeta motorizada de 8 canales (Biohit) para minimizar los errores experimentales. Las células se incubaron durante 7 días a 37 °C en 5% de CO₂.

Preparación de medio acondicionado a partir de explantes de retinas de ratón:

5 La segunda y la tercera ronda de selección incluyen controles positivos adaptados a partir de Mohand-Said *et al.* (1998). Se sacrificaron ratones de cinco semanas de edad 5C57BL/6@N (tipo salvaje) y C3H/He@N (*rd1*) y se enuclearon. Dos retinas se diseccionaron y se incubaron durante 24 horas a 37 °C en 5% de CO₂ en 1,5 ml de CDCM en placas de 12 pocillos. El medio acondicionado se recuperó y se concentró en un factor de 40 mediante ultrafiltración en Vivaspin (Sartorius, punto de corte 10 kDa). El medio acondicionado se enfrió en nitrógeno líquido y se conservó en partes alícuotas a -20 °C antes del uso. El día de uso, el medio acondicionado se descongeló en
10 hielo, se diluyó 10 veces en CDCM y se esterilizó mediante filtración en un filtro de 0,22 µm (Acrodisk 13, Gelman Sciences).

Ensayo funcional, ensayo Live/Dead:

15 El ensayo funcional se basa en el número de células retinianas de pollo vivas después de 7 días de incubación *in vitro*. Se empleó el kit de ensayo Live/Dead (Molecular Probes, Eugene, EEUU) que se basa en el uso de dos tintes fluorogénicos (calceína AM y dímero de etidio) que tiñen a las células vivas y muertas, respectivamente. Una célula que está viva procesa una actividad metabólica (en este caso, una actividad esterasa) que convierte el sustrato (calceína AM) en su producto fluorescente que emite a 520 nm. La permeabilidad de membrana de una célula muerta está alterada y permite la tinción del ADN del núcleo por el dímero de etidio que emite a 635 nm. Una célula
20 está viva: emite a 520 nm después de una excitación a 485 nm, o muerta: emite a 635 nm después de una excitación a 520 nm. Empleando microscopía de epifluorescencia, los dos tipos de células fluorescentes pueden visualizarse por separado. Después de 7 días *in vitro*, las células se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad con calceína-AM 2,7 µM y dímero de etidio 0,3 mM.

Adquisición de las imágenes:

25 Brevemente, la adquisición de las imágenes consistió en el autoenfoco de cada pocillo, un recuento celular automático en dos fluorescencias, seguido del procesamiento de los datos brutos empleando un software especializado, por ejemplo, Metamorph (Universal Imaging Corporation, West Chester, EEUU) para obtener fotografías digitalizadas de cada pocillo de la placa. Se empleó un microscopio invertido (Nikon TE 200) equipado con una bombilla epifluorescente de mercurio con dos filtros de excitación de 485 y 520 nm, dos filtros de emisión de 520 y 635 nm, un objetivo (x10), una pletina motorizada controlada por ordenador (Multicontrol 2000, Martzauzer y
30 una cámara CCD (Cohu).

Para registrar la placa, esta se coloca sobre la pletina motorizada y el enfoque se realiza a mano sobre el primer pocillo y se registra este plano (origen z). El umbral de la imagen de células muertas y vivas se ajusta a partir del primer pocillo. El centro del primer pocillo se ajusta empleando luz blanca alineando a mano el fondo del primer pocillo con el fondo de la imagen en el monitor del ordenador, después alineando el extremo derecho del primer pocillo con el derecho de la imagen sobre la pantalla del ordenador y se registran las dos posiciones. El centro del primer pocillo se calcula y este ofrece la posición del centro de cada pocillo de la placa. Los inventores han advertido, durante el proceso de desarrollo, que existe una densidad ligeramente mayor de células en el borde del pocillo y se excluye el borde de las adquisiciones. Es importante que la imagen de cada pocillo se centre perfectamente para evitar cualquier resultado engañoso. Cuando termina el ajuste, el primer barrido de la placa ejecuta un registro de las células muertas. La densidad de células muertas es la menos variable bajo estas condiciones. La aplicación ejecuta un autoenfoco tomando imágenes en diferentes planos focales y eligiendo la más brillante, el foco derecho. Esta posición z se almacena y la pletina ejecuta unos movimientos programados en los ejes x e y tomando un total de 4 imágenes que, cuando se reconstituyen en una imagen, representan 2/3 de la superficie del pocillo. Se almacena un gran número de imágenes de los planos de enfoque para el control. La pletina
40 ejecuta un autoenfoco y cuatro adquisiciones para cada pocillo de la placa, comenzando por los pocillos A1 a A12, después B12 a B1, C1 a C12 etc. Al final, la pletina se mueve alejándose de la placa para sobreexponer el último pocillo (H1). El barrido de las células muertas tarda 30 minutos. El segundo barrido (células vivas) se ejecuta después de cambiar el filtro. Este segundo barrido emplea las posiciones z registradas de cada pocillo del barrido de células muertas. Se toman cuatro imágenes de cada pocillo, como con las células muertas. Al final del segundo barrido (22 minutos), las imágenes reconstituidas de muertas y vivas se almacenan en un archivo que se nombra automáticamente según la fecha del día. El número de células (muertas y vivas) se cuenta automáticamente con parámetros morfométricos preestablecidos (promedio) y se muestra en el monitor del ordenador para comprobar si el experimento es correcto. Es importante comprobar a diario si el número de células vivas no es muy elevado. Los inventores han observado que si se cultiva en placa a una densidad demasiado alta, las células retinianas de pollo sobreviven durante más tiempo, muy probablemente porque producen su propio factor de supervivencia. Se seleccionaron células en ausencia de este efecto. Antes del barrido de la segunda placa (el mismo experimento con el doble de densidad de células cultivadas en placas), se añadió una a al final del nombre del archivo de registro de la primera placa. Las imágenes de cada experimento se almacenaron en un CD-rom. Se generó un banco de más de 250 CD-rom.

Recuento de células y selección de las agrupaciones:

Se contó el número de células (vivas y muertas) empleando imágenes de cada experimento almacenadas en CD-rom. Primero se cargó el archivo de registro de un experimento en un ordenador (recuento fuera de línea) y se abrió empleando el software Metamorph. En una primera etapa, se abren las imágenes correspondientes a los 14 pocillos C (medio acondicionado de células COS-1 transfectadas con el vector vacío). Después de ajustar el umbral de la imagen, se emplea el comando del análisis de morfometría integrado para medir la distribución de las áreas entre 10 y 250 del objeto (número de células vivas para cada área total) para estos pocillos control. La distribución sigue una curva gaussiana, correspondiéndose el número máximo de objetos con una célula aislada. Este valor estándar (SV) después se emplea para calcular el valor del área por encima de la cual un objeto se contará como dos células (punto de corte del objeto estándar, "standard object cut", SOC) por medio de la función empírica de los inventores: $SOC = 29/20,74 SV$. El valor de SOC de cada placa individual se emplea para contar el número de células vivas de la placa. Estos números después se trasladan a una tabla de Excel.

Para la primera ronda de selección, el valor se representó gráficamente para cada agrupación como la diferencia en número de veces (aumento o disminución del número de células vivas) frente al promedio de los 14 pocillos control + la desviación estándar. Para compensar las variaciones que surgen de la diferencia de posición dentro de la placa, se calculó el promedio de la diferencia en número de veces individualmente entre los 80 pocillos que se corresponden con las posiciones en las que fueron ensayadas las agrupaciones y los 14 pocillos control para 20 placas independientes. En promedio, las diferencias observadas fueron debidas solo a la diferencia de posición, y el número de células se corrigió con este coeficiente. Para discriminar de una manera más rigurosa las agrupaciones que se van a seleccionar, los recuentos de células vivas se representaron gráficamente como la diferencia en número de veces frente al control de todos los valores que no eran mayores que 1,3 pero sí mayores que 0,4. De esta manera, se considera que todas las agrupaciones en las que la diferencia en número de veces frente a los 14 pocillos que se corresponden con el vector vacío está en el intervalo de 0,4 a 1,3 no tienen efecto y se emplean como control. Después de la corrección, la diferencia en número de veces frente al control de las dos placas se multiplicó y el resultado se clasificó según la diferencia en número de veces decreciente. Las agrupaciones en la parte superior de esta lista volvieron a comprobarse mediante inspección visual de la gráfica que se corresponde con las 20 agrupaciones del experimento (ambas placas) y de las imágenes de las células vivas y muertas para evitar seleccionar agrupaciones engañosas.

Para la segunda y tercera ronda, las placas que seleccionan a las subagrupaciones incluyen un control adicional. Se preparó un medio acondicionado a partir de explantes de retina de 5 semanas de edad. Se seleccionaron los experimentos en los que se registraron efectos positivos para los explantes de retina de C57BL/6@N y se rechazaron los demás. Los resultados se representaron gráficamente como la diferencia en número de veces frente a los 14 pocillos control; no se volvió a realizar un cálculo del control. La diferencia en número de veces frente al control de las dos placas se multiplicó y los resultados se clasificaron según la diferencia en número de veces decreciente para las 16 subagrupaciones.

El ADNc aislado se secuenció empleando el cebador T7 (5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3') en un secuenciador capilar (CEQ2000, Beclan Coulter). La secuencia de ADN se comparó con las bases de datos empleando la herramienta de búsqueda de alineamiento local básica ("Basic Local Alignment Search Tool", BLAST).

Identificación de homólogos de Rdcvf2 y humanos:

Empleando la secuencia de Rdcvf1 (la secuencia de nucleótidos que codifica los polipéptidos indicados en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4) y BLAST, se identificaron polipéptidos murinos y humanos homólogos (figura 8). Se identificaron los clones EST con homología con el RdCVF2 de ratón (GenBank n.º de registro bc016199): GenBank n.º de registro: be552141, bi517442, bg707818, bi603812, ai433287, be088414, bg297383, bg297304 (véase también la figura 12). Se identificaron los clones EST con homología con el Rdcvf1 de ratón (SEQ ID NO:1): GenBank n.º de registro: bg299078, ai716631, bg294111, be108041, bg395178 (véase también la figura 13).

Análisis de RT-PCR a tiempo real de la expresión de Rdcvf1:

Se estudia la expresión retiniana de Rdcvf1 por ratones C57BL/6@N y C3H/He@N envejecidos, así como C3H congénitos (+/+ y rd/rd) de 5 semanas empleando una RT-PCR a tiempo real en un ciclador de luz (Roche) con el kit de PCR SYBR Green (Roche). Los ADNc se producen cebando con un oligonucleótido hexámero aleatorio (pdN6, Amersham), transcriptasa inversa de M-MLV (Superscript II, Life Technologies) y ARN total de retina de ratón preparado como en 1). Los ADNc se normalizan empleando la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa del mensajero ubicua (G6PDH). Se amplifican 0,2 µl de la síntesis de la primera hebra de ADNc (un equivalente a 10 ng de ARN total) con 2 µM de los oligonucleótidos de SEQ ID NO:24 y SEQ ID NO:25 en triple en un volumen total de 25 µl empleando el siguiente programa: 30 segundos a 95 °C, y 35 ciclos de una secuencia de (1 segundo a 95 °C, 18 segundos a 55 °C, 10 segundos a 72 °C). El análisis (figura 16) demuestra que la expresión de Rdcvf1 disminuye después de la degeneración de los bastoncillos en el ratón rdl (C3H/He@N). También se demostró que Rdcvf1 fue directamente expresado por los fotorreceptores mediante una RT-PCR a tiempo real empleando ARN preparado a partir de la capa externa de la retina mediante cortes con un vibrotomo. Los productos se comprobaron mediante una electroforesis en gel de agarosa. Se obtuvieron resultados similares con otra pareja de cebadores específicos

de Rdcvf1. Como control positivo, se controla la expresión de la arrestina de los bastoncillos (Ass n° M24086) en las mismas condiciones que los cebadores (5' CTATTACGTCAAGCCTGTAGCC 3' y 5' CATCCTCATCTTTCTTCCCTTC 3'). La confirmación de que Rdcvf1 es un factor protector de los conos también puede obtenerse añadiendo una cantidad adecuada de Rdcvf1 a un explante retiniano de ratón *rd1* de 5 semanas de edad (C3H/He@N). Puede determinarse una cantidad adecuada mediante algunos experimentos de titulación iniciales. Comparado con los controles apropiados después de 7 días, la supervivencia de los conos aumenta.

5 **Análisis de RT-PCR de Rdcvf2**

La RT-PCR para la expresión de Rdcvf2 se realizó empleando los cebadores 5' GCCAGCGTTTTCTGCCTTTTAC 3' y 5' AAGCCCTGCCTGCTCTAACATC 3'. El análisis demuestra que RdCVF2 se expresa de una manera dependiente de los bastoncillos, y que la expresión de Rdcvf2 no se limita a la retina, sino que también otras células neuronales expresan Rdcvf2 (figura 17), mientras que la expresión de Rdcvf1 parece limitada a las células retinianas.

15 **Ensayos Live/Death de Rdcvf1 o Rdcvf2**

Se transfectan células COS-1 con un vector de expresión adecuado que porta Rdcvf1 o Rdcvf2 bajo el control de un promotor inducible. Las células control se transfectan con el vector vacío. Las células se incuban durante un periodo de tiempo adecuado tras la inducción de la expresión de Rdcvf1 o Rdcvf2. Después, el número de células de conos supervivientes se incuba con medio acondicionado procedente de células COS-1 transfectadas con Rdcvf1 o Rdcvf2 y se cuenta el número de células control supervivientes según el método descrito anteriormente. Las células que expresan Rdcvf1 o Rdcvf2 muestran un número significativamente mayor de células supervivientes.

20 **Factor específico de bastoncillos**

Un análisis de RT-PCR a tiempo real, realizado bajo condiciones convencionales, de la expresión de la arrestina de bastoncillos (control) y Rdcvf1 en explantes retinianos de 5 semanas de C57BL/6@N de 5 semanas y C3H/HE@N, empleando los cebadores:

SEQ ID NO:24: 5' TCTATGTGTCCCAGGACCCTACAG 3'

25 SEQ ID NO:25: 5' TTTATGCACAAGTAGTACCAGGACAG 3'

demuestra que RdCVF1 se expresa solo en presencia de bastoncillos (CVF1 derivado de bastoncillos).

Producción de anticuerpos policlonales:

Se preparan anticuerpos policlonales inyectando una proteína de fusión purificada de glutatión-S-transferasa (GST) (GST-Rdcvf1), así como una secuencia peptídica de RdCVF1 de ratón de los aminoácidos 11 a 32 de SEQ ID NO:2 (Ab n°2) y una secuencia peptídica de los aminoácidos 79 a 96 de SEQ ID NO:2 (Ab n°3) en conejos. La construcción de fusión pGST-Rdcvf1 se prepara mediante amplificación con los oligonucleótidos de SEQ ID NO:26 y SEQ ID NO:27 empleando pcDNA-Rdcvf1 como molde bajo condiciones convencionales. El marco de lectura abierto (ORF) de Rdcvf1 se clona dentro de marco en pGex2TK (Pharmacia) entre los sitios de restricción BamHI y EcoRI, y se transforma en *E. coli* [BL21 (DE3) pLysS, Promega] mediante procedimientos convencionales. Una única colonia se cultiva en 3 litros de medio líquido LB con ampicilina 100 µg/ml a 30 °C y se induce la producción de proteínas mediante la adición de isopropiltio-β-D-galactósido (IPTG) 1 µg/ml y se continúa durante 5 horas a 30 °C. Las células se recolectan, se lisan mediante sonicación y se purifican en glutatión-Sepharose con el protocolo convencional. La proteína de fusión eluye con glutatión reducido 10 mM a temperatura ambiente. La proteína eluida se dializa en PBS antes de la inyección a conejos. La pureza de la proteína se controla mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida. Dos conejos se inmunizan mediante una inyección intradérmica en 80 sitios de 100 µg de GST-Rdcvf1 purificado. El suero se recolecta después de 8 semanas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSITE LOUIS PASTEUR/ NOVARTIS AG

5 <120> Proteína asociada a enfermedad

<130> 4-31883

<160> 35

10 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 468

15 <212> ADN

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

20 <222> (45)..(374)

<223>

<400> 1

atcggatccc tctctggggtc cccagctcct tgcatactgc tacc atg gca tct ctc 56
Met Ala Ser Leu
1

ttc tct gga cgc atc ttg atc agg aac aac agc gac cag gat gaa gtg 104
Phe Ser Gly Arg Ile Leu Ile Arg Asn Asn Ser Asp Gln Asp Glu Val
5 10 15 20

gag aca gag gca gag ctg agc cgt agg tta gag aat cgt ctg gtg ttg 152
Glu Thr Glu Ala Glu Leu Ser Arg Arg Leu Glu Asn Arg Leu Val Leu
25 30 35

ctg ttc ttc ggc gcc ggc gcc tgt ccc cag tgc cag gcc ttt gcc cca 200
Leu Phe Phe Gly Ala Gly Ala Cys Pro Gln Cys Gln Ala Phe Ala Pro
40 45 50

gtc ctc aaa gac ttc ttc gtg cgg ctc act gac gag ttc tac gtg ctg 248
Val Leu Lys Asp Phe Phe Val Arg Leu Thr Asp Glu Phe Tyr Val Leu
55 60 65

cgg gca gca cag ctg gcc ctg gtc tat gtg tcc cag gac cct aca gag 296
Arg Ala Ala Gln Leu Ala Leu Val Tyr Val Ser Gln Asp Pro Thr Glu

25 Page 1
70 75 80

gag caa cag gac ctc ttc ctc agg gac atg cct gaa aaa tgg ctc ttc 344
Glu Gln Gln Asp Leu Phe Leu Arg Asp Met Pro Glu Lys Trp Leu Phe
85 90 95 100

ctg ccg ttc cat gat gaa ctg agg agg tga ggccccaggg aagaccaggg 394
Leu Pro Phe His Asp Glu Leu Arg Arg
105

agggcttcct ggagaaggca tttccctgga ggtttactgt cctggtacta cttgtgcata 454
aagaggtatt cctc 468

<210> 2

<211> 109

30 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 2

ES 2 597 835 T3

Met Ala Ser Leu Phe Ser Gly Arg Ile Leu Ile Arg Asn Asn Ser Asp
1 5 10 15

Gln Asp Glu Val Glu Thr Glu Ala Glu Leu Ser Arg Arg Leu Glu Asn
20 25 30

Arg Leu Val Leu Leu Phe Phe Gly Ala Gly Ala Cys Pro Gln Cys Gln
35 40 45

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

Phe Tyr Val Leu Arg Ala Ala Gln Leu Ala Leu Val Tyr Val Ser Gln
65 70 75 80

Asp Pro Thr Glu Glu Gln Gln Asp Leu Phe Leu Arg Asp Met Pro Glu
85 90 95

Lys Trp Leu Phe Leu Pro Phe His Asp Glu Leu Arg Arg
100 105

<210> 3

<211> 764

5 <212> ADN

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

10 <222> (26)..(676)

<223>

<400> 3

ES 2 597 835 T3

ccccagctcc ttgcatactg ctacc atg gca tct ctc ttc tct gga cgc atc 52
Met Ala Ser Leu Phe Ser Gly Arg Ile
1 5

ttg atc agg aac aac agc gac cag gat gaa gtg gag aca gag gca gag 100
Leu Ile Arg Asn Asn Ser Asp Gln Asp Glu Val Glu Thr Glu Ala Glu
10 15 20 25

ctg agc cgt agg tta gag aat cgt ctg gtg ttg ctg ttc ttc ggc gcc 148
Leu Ser Arg Arg Leu Glu Asn Arg Leu Val Leu Leu Phe Phe Gly Ala
30 35 40

ggc gcc tgt ccc cag tgc cag gcc ttt gcc cca gtc ctc aaa gac ttc 196
Gly Ala Cys Pro Gln Cys Gln Ala Phe Ala Pro Val Leu Lys Asp Phe
45 50 55

ttc gtg cgg ctc act gac gag ttc tac gtg ctg cgg gca gca cag ctg 244
Phe Val Arg Leu Thr Asp Glu Phe Tyr Val Leu Arg Ala Ala Gln Leu
60 65 70

gcc ctg gtc tat gtg tcc cag gac cct aca gag gag caa cag gac ctc 292
Ala Leu Val Tyr Val Ser Gln Asp Pro Thr Glu Glu Gln Gln Asp Leu
75 80 85

ttc ctc agg gac atg cct gaa aaa tgg ctc ttc ctg ccg ttc cat gat 340
Phe Leu Arg Asp Met Pro Glu Lys Trp Leu Phe Leu Pro Phe His Asp
90 95 100 105

gaa ctg agg agg gac ctc ggg cgc cag ttc tct gtc cgt caa ctg cca 388
Glu Leu Arg Arg Asp Leu Gly Arg Gln Phe Ser Val Arg Gln Leu Pro
110 115 120

gcg gtt gtg gta ctt aag cct ggt ggg gac gtg ctg aca agc gac gcc 436
Ala Val Val Val Leu Lys Pro Gly Gly Asp Val Leu Thr Ser Asp Ala
125 130 135

acg gag gag atc cag cgt ctg gga ccc gcc tgc ttt gcc aac tgg cag 484
Thr Glu Glu Ile Gln Arg Leu Gly Pro Ala Cys Phe Ala Asn Trp Gln
140 145 150

gag gcc gca gag ctc ctg gac cgc agc ttc ctg caa ccg gag gat ttg 532
Glu Ala Ala Glu Leu Leu Asp Arg Ser Phe Leu Gln Pro Glu Asp Leu
155 160 165

gat gag cct gcg cgg cgc agc atc acc gag cct ctg cgc cgt cgc aag 580
Asp Glu Pro Ala Arg Arg Ser Ile Thr Glu Pro Leu Arg Arg Arg Lys
170 175 180 185

tac cga gta gac cgg gat gtc ggc ggg agc ggg gcg aaa cgg cgc gac 628
Tyr Arg Val Asp Arg Asp Val Gly Gly Ser Gly Ala Lys Arg Arg Asp
190 195 200

tct ggt gaa ccc cag ggg gac gcg ggt aca agg gcg gag ctc tgg tga 676
Ser Gly Glu Pro Gln Gly Asp Ala Gly Thr Arg Ala Glu Leu Trp
205 210 215

ctcccagggt aggagtgggg accggagctc tggtgacacc aaagtaccgg tgcacgaccg 736
aggttgatga ccctcccgaa ggaaccgg 764

<210> 4
<211> 216
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 4

5

10

ES 2 597 835 T3

Met Ala Ser Leu Phe Ser Gly Arg Ile Leu Ile Arg Asn Asn Ser Asp
 1 5 10 15
 Gln Asp Glu Val Glu Thr Glu Ala Glu Leu Ser Arg Arg Leu Glu Asn
 20 25 30
 Arg Leu Val Leu Leu Phe Phe Gly Ala Gly Ala Cys Pro Gln Cys Gln
 35 40 45
 Ala Phe Ala Pro Val Leu Lys Asp Phe Phe Val Arg Leu Thr Asp Glu
 50 55 60
 Phe Tyr Val Leu Arg Ala Ala Gln Leu Ala Leu Val Tyr Val Ser Gln
 65 70 75 80
 Asp Pro Thr Glu Glu Gln Gln Asp Leu Phe Leu Arg Asp Met Pro Glu
 85 90 95
 Lys Trp Leu Phe Leu Pro Phe His Asp Glu Leu Arg Arg Asp Leu Gly
 100 105 110
 Arg Gln Phe Ser Val Arg Gln Leu Pro Ala Val Val Val Leu Lys Pro
 115 120 125
 Gly Gly Asp Val Leu Thr Ser Asp Ala Thr Glu Glu Ile Gln Arg Leu
 130 135 140
 Gly Pro Ala Cys Phe Ala Asn Trp Gln Glu Ala Ala Glu Leu Leu Asp
 145 150 155 160
 Arg Ser Phe Leu Gln Pro Glu Asp Leu Asp Glu Pro Ala Arg Arg Ser
 165 170 175
 Ile Thr Glu Pro Leu Arg Arg Arg Lys Tyr Arg Val Asp Arg Asp Val
 180 185 190
 Gly Gly Ser Gly Ala Lys Arg Arg Asp Ser Gly Glu Pro Gln Gly Asp
 195 200 205
 Ala Gly Thr Arg Ala Glu Leu Trp
 210 215

- 5 <210> 5
- <211> 353
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- 10 <220>
- <221> CDS
- <222> (24)..(353)
- <223>
- 15 <400> 5

ES 2 597 835 T3

cccagcacc aaccaggtt acc atg gcc tcc ctg ttc tct ggc cgc atc ctg 53
Met Ala Ser Leu Phe Ser Gly Arg Ile Leu
1 5 10

atc cgc aac aat agc gac cag gac gag ctg gat acg gag gct gag gtc 101
Ile Arg Asn Asn Ser Asp Gln Asp Glu Leu Asp Thr Glu Ala Glu Val
15 20 25

agt cgc agg ctg gag aac cgg ctg gtg ctg ctg ttc ttt ggt gct ggg 149
Ser Arg Arg Leu Glu Asn Arg Leu Val Leu Leu Phe Phe Gly Ala Gly
30 35 40

gct tgt cca cag tgc cag gcc ttc gtg ccc atc ctc aag gac ttc ttc 197
Ala Cys Pro Gln Cys Gln Ala Phe Val Pro Ile Leu Lys Asp Phe Phe
45 50 55

gtg cgg ctc aca gat gag ttc tat gta ctg cgg gcg gct cag ctg gcc 245
Val Arg Leu Thr Asp Glu Phe Tyr Val Leu Arg Ala Ala Gln Leu Ala
60 65 70

ctg gtg tac gtg tcc cag gac tcc acg gag gag cag cag gac ctg ttc 293
Leu Val Tyr Val Ser Gln Asp Ser Thr Glu Glu Gln Gln Asp Leu Phe
75 80 85 90

ctc aag gac atg cca aag aaa tgg ctt ttc ctg ccc ttt gag gat gat 341
Leu Lys Asp Met Pro Lys Lys Trp Leu Phe Leu Pro Phe Glu Asp Asp
95 100 105

ctg agg agg tga 353
Leu Arg Arg

<210> 6
<211> 109
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

Met Ala Ser Leu Phe Ser Gly Arg Ile Leu Ile Arg Asn Asn Ser Asp
1 5 10 15

Gln Asp Glu Leu Asp Thr Glu Ala Glu Val Ser Arg Arg Leu Glu Asn
20 25 30

Arg Leu Val Leu Leu Phe Phe Gly Ala Gly Ala Cys Pro Gln Cys Gln
35 40 45

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

Phe Tyr Val Leu Arg Ala Ala Gln Leu Ala Leu Val Tyr Val ser Gln
65 70 75 80

Asp Ser Thr Glu Glu Gln Gln Asp Leu Phe Leu Lys Asp Met Pro Lys
85 90 95

10 Lys Trp Leu Phe Leu Pro Phe Glu Asp Asp Leu Arg Arg
100 105

<210> 7
<211> 686
15 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
20 <222> (48)..(686)
<223>

ES 2 597 835 T3

<400> 7

ccgaggacca cacgccgcgc tgccccagc acccaaccca gggtacc atg gcc tcc 56
Met Ala Ser
1

ctg ttc tct ggc cgc atc ctg atc cgc aac aat agc gac cag gac gag 104
Leu Phe Ser Gly Arg Ile Leu Ile Arg Asn Asn Ser Asp Gln Asp Glu
5 10 15

ctg gat acg gag gct gag gtc agt cgc agg ctg gag aac cgg ctg gtg 152
Leu Asp Thr Glu Ala Glu Val Ser Arg Arg Leu Glu Asn Arg Leu Val
20 25 30 35

ctg ctg ttc ttt ggt gct ggg gct tgt cca cag tgc cag gcc ttc gtg 200
Leu Leu Phe Phe Gly Ala Glu Ala Cys Pro Gln Cys Gln Ala Phe Val
40 45 50

ccc atc ctc aag gac ttc ttc gtg cgg ctc aca gat gag ttc tat gta 248
Pro Ile Leu Lys Asp Phe Phe Val Arg Leu Thr Asp Glu Phe Tyr Val
55 60 65

ctg cgg gcg gct cag ctg gcc ctg gtg tac gtg tcc cag gac tcc acg 296
Leu Arg Ala Ala Gln Leu Ala Leu Val Tyr Val Ser Gln Asp Ser Thr
70 75 80

gag gag cag cag gac ctg ttc ctc aag gac atg cca aag aaa tgg ctt 344
Glu Glu Gln Gln Asp Leu Phe Leu Lys Asp Met Pro Lys Lys Trp Leu
85 90 95

ttc ctg ccc ttt gag gat gat ctg agg agg gac ctc ggg cgc cag ttc 392
Phe Leu Pro Phe Glu Asp Asp Leu Arg Arg Asp Leu Gly Arg Gln Phe
100 105 110 115

tca gtg gag cgc ctg ccg gcg gtc gtg gtg ctc aag ccg gac ggg gac 440
Ser Val Glu Arg Leu Pro Ala Val Val Val Leu Lys Pro Asp Gly Asp
120 125 130

gtg ctc act cgc gac ggc gcc gac gag atc cag cgc ctg ggc acc gcc 488
Val Leu Thr Arg Asp Gly Ala Asp Glu Ile Gln Arg Leu Gly Thr Ala
135 140 145

tgc ttc gcc aac tgg cag gag gcg gcc gag gtg ctg gac cgc aac ttc 536
Cys Phe Ala Asn Trp Gln Glu Ala Ala Glu Val Leu Asp Arg Asn Phe
150 155 160

cag ctg cca gag gac ctg gag gac cag gag cca cgg agc ctc acc gag 584
Gln Leu Pro Glu Asp Leu Glu Asp Gln Glu Pro Arg Ser Leu Thr Glu
165 170 175

tgc ctg cgc cgc cac aag tac cgc gtg gaa aag gcg gcg cga ggc ggg 632
Cys Leu Arg Arg His Lys Tyr Arg Val Glu Lys Ala Ala Arg Gly Gly
180 185 190 195

cgc gac ccc ggg gga ggg ggt ggg gag gag ggc ggg gcc ggg ggg ctg 680
Arg Asp Pro Gly Gly Gln Gly Gly Glu Glu Gly Gly Ala Gly Gly Leu
200 205 210

ttc tga 686
Phe

5

<210> 8

<211> 212

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

ES 2 597 835 T3

Met Ala Ser Leu Phe Ser Gly Arg Ile Leu Ile Arg Asn Asn Ser Asp
 1 5 10 15

Gln Asp Glu Leu Asp Thr Glu Ala Glu Val Ser Arg Arg Leu Glu Asn
 20 25 30

Arg Leu Val Leu Leu Phe Phe Gly Ala Gly Ala Cys Pro Gln Cys Gln
 35 40 45

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

Phe Tyr Val Leu Arg Ala Ala Gln Leu Ala Leu Val Tyr Val Ser Gln
 65 70 75 80

Asp Ser Thr Glu Glu Gln Gln Asp Leu Phe Leu Lys Asp Met Pro Lys
 85 90 95

Lys Trp Leu Phe Leu Pro Phe Glu Asp Asp Leu Arg Arg Asp Leu Gly
 100 105 110

Arg Gln Phe Ser Val Glu Arg Leu Pro Ala Val Val Val Leu Lys Pro
 115 120 125

Asp Gly Asp Val Leu Thr Arg Asp Gly Ala Asp Glu Ile Gln Arg Leu
 130 135 140

Gly Thr Ala Cys Phe Ala Asn Trp Gln Glu Ala Ala Glu Val Leu Asp
 145 150 155 160

Arg Asn Phe Gln Leu Pro Glu Asp Leu Glu Asp Gln Glu Pro Arg Ser
 165 170 175

Leu Thr Glu Cys Leu Arg Arg His Lys Tyr Arg Val Glu Lys Ala Ala
 180 185 190

Arg Gly Gly Arg Asp Pro Gly Gly Gly Gly Gly Glu Glu Gly Gly Ala
 195 200 205

Gly Gly Leu Phe
 210

- 5 <210> 9
- <211> 600
- <212> ADN
- <213> *Mus musculus*
- 10 <220>
- <221> CDS
- <222> (265)..(570)
- <223>
- 15 <400> 9

ES 2 597 835 T3

<221> CDS
 <222> (300)..(770)
 <223>

5 <400> 11

```

    ttgactctgg tgggtagaga gggtttgcaa ggcaggataa aatagagggt gggagaggtt    60
    gatggcgtgg cctctgtttt tgggctgggg caccagctgt catcgtctgt gtcgcagctt    120
    ctggagtggc cactgtgctc tctcctccct tcggctcaag gtgagctggt ccagcagaag    180
    gcggggctga gaggcgccta gtgctgcggg aggctcagtg tcattctcca gctaacaggt    240
    ggccgtgcag cccagggctc gtctctccac tgtgtcctct tcacgccgag ctctgtggcg    299
    atg gtg gac gtg ctg ggc ggg cgg cgc ctg gtg acc cgg gag ggc acg    347
    Met Val Asp Val Leu Gly Gly Arg Arg Leu Val Thr Arg Glu Gly Thr
    1 5 10 15
    gtg gtg gag gcc gag gtg gcg ctg cag aac aag gtg gta gct ttg tac    395
    Val Val Glu Ala Glu Val Ala Leu Gln Asn Lys Val Val Ala Leu Tyr
    20 25 30
    ttt gcg gcg ggc cgg tgc tcg ccc agc cgc gac ttc acg ccg ctg ctc    443
    Phe Ala Ala Gly Arg Cys Ser Pro Ser Arg Asp Phe Thr Pro Leu Leu
    35 40 45
    tgc gac ttc tac acg gag ctg gtg agc gag gcg cgg cgg ccc gct ccc    491
    Cys Asp Phe Tyr Thr Glu Leu Val Ser Glu Ala Arg Arg Pro Ala Pro
    50 55 60
    ttc gag gtg gtt ttc gtg tcg gca gac ggc agt gcg gag gag atg ttg    539
    Phe Glu Val Val Phe Val Ser Ala Asp Gly Ser Ala Glu Glu Met Leu
    65 70 75 80
    gac ttc atg cgc gag ctg cac ggc tcc tgg ctg gca ttg ccc ttc cac    587
    Asp Phe Met Arg Glu Leu His Gly Ser Trp Leu Ala Leu Pro Phe His
    85 90 95
    gac ccc tac cgg cat gaa ctg aag aag agg tac gaa atc acc gcc atc    635
    Asp Pro Tyr Arg His Glu Leu Lys Lys Arg Tyr Glu Ile Thr Ala Ile
    100 105 110
    ccc aag ctg gtg gtc atc aag cag aac gga gct gtc atc acc aac aaa    683
    Pro Lys Leu Val Val Ile Lys Gln Asn Gly Ala Val Ile Thr Asn Lys
    115 120 125
    ggg cgg aag cag atc cga gag cgc ggg cta gct tgc ttt cag aac tgg    731
    Gly Arg Lys Gln Ile Arg Glu Arg Gly Leu Ala Cys Phe Gln Asn Trp
    130 135 140
    gtg gaa gca gcc gat gtt ttc caa aac ttc tcg ggg tga ccagggcagt    780
    Val Glu Ala Ala Asp Val Phe Gln Asn Phe Ser Gly
    145 150 155
    tgctggaagt tcagggaac tatcttcaaa aagggcttag ctggttcctt tctctgctga    840
    ggaatgtcat tgtagagtca ccatgctgtg acagagagca taaactgctc aggaaagaac    900
    tacgtctgcc ccctgtgggt cctagagctc cggtgaatgt ttatttctta cacctttctc    960
    caccggtgcc taggatccag gacacatcag ccacgagtta acagaactct atgcaagatg    1020
    ctctttccta caggaaatth ctttgataaa ttgacctatg gaggtgatac attttctgat    1080
    gacatttttg tgatgctttg gtaaactgat ttattactcg ggtttgtaga ctgtgtaatt    1140
    taataaacca aactcacac tttg    1164
    
```

10 <210> 12
 <211> 156
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 12

ES 2 597 835 T3

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

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

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

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

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

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

Asp Pro Tyr Arg His Glu Leu Lys Lys Arg Tyr Glu Ile Thr Ala Ile
100 105 110

Pro Lys Leu Val Val Ile Lys Gln Asn Gly Ala Val Ile Thr Asn Lys
115 120 125

Gly Arg Lys Gln Ile Arg Glu Arg Gly Leu Ala Cys Phe Gln Asn Trp
130 135 140

Val Glu Ala Ala Asp Val Phe Gln Asn Phe Ser Gly
145 150 155

- 5 <210> 13
- <211> 1472
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*

- 10 <220>
- <221> CDS
- <222> (331)..(738)
- <223>

- 15 <400> 13

ES 2 597 835 T3

Met Val Asp Ile Leu Gly Glu Arg His Leu Val Thr Cys Lys Gly Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Glu Ala Glu Ala Ala Leu Gln Asn Lys Val Val Ala Leu Tyr
 20 25 30
 Phe Ala Ala Ala Arg Cys Ala Pro Ser Arg Asp Phe Thr Pro Leu Leu
 35 40 45
 Cys Asp Phe Tyr Thr Ala Leu Val Ala Glu Ala Arg Arg Pro Ala Pro
 50 55 60
 Phe Glu Val Val Phe Val Ser Ala Asp Gly Ser Cys Gln Glu Met Leu
 65 70 75 80
 Asp Phe Met Arg Glu Leu His Gly Ala Trp Leu Ala Leu Pro Phe His
 85 90 95
 Asp Pro Tyr Arg Gln Arg Ser Leu Ala Leu Leu Pro Arg Leu Glu Cys
 100 105 110
 Ser Gly Val Ile Leu Ala His Cys Asn Leu Cys Leu Leu Gly Ser Ser
 115 120 125
 Asp Ser Leu Ala Leu Ala Ser
 130 135

5 <210> 15
 <211> 702
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 15
 atcggatcct ctctgggtcc ccagctcctt gcatactgct accatggcat ctctcttctc 60
 tggacgcatc ttgatcagga acaacagcga ccaggatgaa gtggagacag aggcagagct 120
 gagccgtagg ttagagaatc gtctgggtgtt gctgttcttc ggcgccggcg cctgtcccca 180
 gtgccaggcc ttgccccagt cctcaaagac ttcttcgtgc ggctcactga cgagttctac 240
 gtgctgctggg cagcacagct ggccttggtc tatgtgtccc aggaccctac agaggagcaa 300
 caggacctct tcctcagga catgcctgaa aatggctct tcctgccgtc ccactgatga 360
 actgaggagg tgaggcccca ggaagacca gggagggtt cctggagaag gcatttcctt 420
 ggaggtttac tgtcctggta ctacttgtgc actaaagagg tattcctcca caccaaccac 480
 aggcgacaac aacacacaag aggtgtccca tccgctcttc catcacagcc cactgacgcc 540
 agacagcatc gcgacgctca cggctcagaa aacacaggt agtctcacag gcctgccatc 600
 ctaatactgg ccacctgag cacaagagcg atggctacaa gcctcaaggc tagaatctaa 660
 aaccacgagg tggggaccgt aggccccact ccccgggagc gc 702

15 <210> 16
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> *Rattus norvegicus*

20 <400> 16

ES 2 597 835 T3

cggccgctta attaagacgg atccccgact acgtagtcgg gaattcggca cgaggggccc 60
 catcttgatc aggaacaaca gcgaccagga tgaagtggag acagaggcag agctgagccg 120
 ccggttagag aatcgtcttg tgctactggt cttcgggtgct ggggcctgtc cccagtgcc 180
 ggccttcgcc ccagtcctca aagacttctt cgtgcggctc actgatgagt tctacgtgct 240
 acgggcagca cagctggccc tgggttatgt gtcccaggac cctacagagg agcaacagga 300
 cctgttcctc cgggacatgc ctgaaaagtg gctcttcctg ccgttccatg atgacctgag 360
 gagagacctc gggcgccagt tctccgt 387

<210> 17
 <211> 759
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 17

cagctccttg catactgcta ccatggcatc tctcttctt ggacgcatct tgatcaggaa 60
 caacagcgac caggatgaag tggagacaga ggcagagctg agccgtaggt tagagaatcg 120
 tctggtgtgc tgttcttcgg cgccggcgcc tgtccccagt gccaggcctt gccccagtcc 180
 tcaaagactt cttcgtgcgg ctcaactgac agttctacgt gctgcgggca gcacagctgg 240
 ccctggtcta tgtgtcccag gaccctacag aggagcaaca ggacctctc ctcagggaca 300
 tgcctgaaaa atggctcttc ctgccgttcc atgatgaact gaggaggac ctcgggcgcc 360
 agttctctgt ccgtcaactg ccagcggttg tggacttaa gcctggtggg gacgtgctga 420
 caagcgacgc cacggaggag atccagcgtc tgggaccgc ctgctttgcc aactggcagg 480
 aggccgcaga gctcctggac cgcagcttcc tgcaaccgga ggatttggat gagcctgccc 540
 ggcgcagcat caccgagcct ctgcccgtc gcaagtaccg agtagaccgg gatgtcggcg 600
 ggagcggggc gaaacggcg gactctggtg aaccccaggg ggacgcgggt acaagggcgg 660
 agctctggtg actcccaggg taggagtggg gaccggagct ctggtgacac caaagtaccg 720
 gtgcacgacc gaggttgatg accctcccga aggaaccgg 759

10

<210> 18
 <211> 443
 <212> ADN
 <213> *Rattus norvegicus*

15

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (46)..(46)
 <223> cualquier nucleótido

20

<400> 18

ES 2 597 835 T3

acgagggtcaa ccttggctac acagggagtc tgaggacagc atgggntaca agaaaccctc 60
 tctcaaaacc aaacaaggcc tggcagttact agtgcacttg ggaggcagag gaacaacagc 120
 gaccaggatg aagtggagac agaggcagag ctgagccgcc ggtagagaa tcgtcttgtg 180
 ctactgttct tcggtgctgg ggctgtccc cagtgccagg ccttcgcccc agtcctcaaa 240
 gacttcttcg tgcggctcac tgatgagttc tacgtgctac gggcagcaca gctggccctg 300
 gtctatgtgt cccaggaccc tacagaggag caacaggacc tgttcctccg ggacatgcct 360
 gaaaagtggc tcttcctgcc gttccatgat gacctgagga gtaataaaaa ttagaggttg 420
 tggctcaaaa aaaaaaaaaa aaa 443

<210> 19
 <211> 889
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 19

acgccgcgct gtccccagca cccaaccag gttaccatgg cctccctggt ctctggccgc 60
 atcctgatcc gcaacaatag cgaccaggac gagctggata cggaggctga ggtcagtcgc 120
 aggctggaga accggctggt gctgctgttc tttggtgctg gggcttgtcc acagtgccag 180
 gccttcgtgc ccctcctcaa ggacttcttc gtgaggctca cagatgagtt ctatgtactg 240
 cgggcggctc agctggccct ggtgtactg tcccaggact ccacggagga gcagcaggac 300
 ctgttctca aggacatgcc aaagaaatgg ctttctctgc cttttgagga tgatctgagg 360
 agggacctcg ggcgccagtt ctcagtggag cgctgcccgg cggctgtggt gctcaagccg 420
 gacggggacg tgctcactcg cgacggcgcc gacgagatcc agcgcctggg caccgctgc 480
 ttcgccaact ggaggaggc ggccgaggtg ctggaccgca acttccagct gccagaggac 540
 ctggaggacc aggagccacg gagcctcacc gagtgctgc gccgccaca gtaccgctg 600
 gaaaaggcgg cgcgaggcgg cgcgaccggg gggaggggct ggggacggag gccggggccc 660
 ggggggctgt actgaccgct ggggtggagca gaggggggg gattggtgga agaacaaca 720
 ccacacgcag ccagcaccag gtatcccagc taggggagac agggcgaaga cctgacccaa 780
 10 agcacaacca cgggggacac taaacgactc aactcaatcc tgtgggcacc aggacaccgc 840
 aaaaaaaaaa aaaaaaagca aaatgcaaaa aaagacagga catacgacg 889

<210> 20
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 20

tgctctcggg tctcaggtgg ctgctgtct gcgccatggt tgacattctg ggcgagcggc 60
 acctggtgac ctgtaagggc gcgacggtgg aggccgaggc ggcgctgcag aacaaggtgg 120
 tggcactgta cttcgcggcg gcccggtgcg cgcgagccg cgacttcacg ccgctgtctt 180
 gcgacttcta tacggcgtg gtggccgagg cgcggcggcc cgcgcccttc gaagtgtct 240
 tcgtgtcagc cgacggcagc tcccaggaga tgctggactt catgcgagag ctgcatggcg 300
 cctggctggc gctgcccttc cagcaccct accggcacca ttgctgtg 348

20

<210> 21
 <211> 340
 <212> ADN

ES 2 597 835 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 21

tgtcctcggg tctcaggtgg ctgcgtgtct gcgccatggt tgacattctg ggcgagcggc	60
acctggtgac ctgtaagggc gcgacggtgg aggccgaggc ggcgctgcag aacaaggtgg	120
tggcactgta cttcgcggcg gcccggtgcg gccgagccgc gattcacgcc gctgctctgc	180
gacttctata cggcgctggg ggccgagcgc ggggccgcgc cttcgaagtg gtcttcgtgt	240
cagccgacgg cagctcccag gagatgctgg acttcatgcg cgagctgatg gcgcctggct	300
ggcgctgcct tccacgacct ctaccggcac agccggagcc	340

5

<210> 22

<211> 348

<212> ADN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 22

tgtcctcggg tctcaggtgg ctgcgtgtct gcgccatggt tgacattctg ggcgagcggc	60
acctggtgac ctgtaagggc gcgacggtgg aggccgaggc ggcgctgcag aacaaggtgg	120
tggcactgta cttcgcggcg gcccggtgcg gccgagccgc cgacttcacg ccgctgctct	180
gcgacttcta tacggcgctg gtggccgagg cgcggcggcc cgcgcccttc gaagtgtct	240
tcgtgtcagc cgacggcagc tgccaggaga tgctggactt catgcgcgag ctgcatggcg	300
cctggctggc gctgcccttc cacgaacctt accggcaacg gagtctcg	348

15

<210> 23

<211> 350

<212> ADN

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 23

tgtcctcggg tctcaggtgg ctgcgtgtct gcgccatggt tgacattctg ggcgagcggc	60
acctggtgac ctgtaagggc gcgacggtgg aggccgaggc ggcgctgcag aacaaggtgg	120
tggcactgta cttcgcggcg gcccggtgcg gccgagccgc cgacttcacg ccgctgctct	180
gcgacttcta tacggcgctg gtggccgagg cgcggcggcc cgcgcccttc gaagtgtct	240
tcgtgtcagc cgacggcagc tgccaggaga tgcttgactt tcatgcgcga gctgcattgc	300
gcctggcttg gcgctgcctt tccacgacct ctaccggcaa cggagtctcg	350

25

<210> 24

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Cebador

<400> 24

35

tctatgtgc ccaggacct acag 24

<210> 25

<211> 26

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 5 <400> 25
 tttatgcaca agtagtacca ggacag 26
 10 <210> 26
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador
 <400> 26
 20 cgggatccat ggcattctctc ttctctggac gc 32
 <210> 27
 <211> 31
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 27
 ggaattctca cctcctcagt tcatcatggaa 31
 <210> 28
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Adaptador
 <400> 28
 45 tgttaccat ctgaagtggg agcggccgac aatTTTTTTT tTTTTTTT 50
 <210> 29
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Adaptador
 <400> 29
 55 aattcggcac gagg 14
 <210> 30
 <211> 10
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Adaptador
 65 <400> 30

ES 2 597 835 T3

cctcgtgccg 10

5 <210> 31
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 31

15 gtaatacgac tcactatagg gc 22

<210> 32
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador

<400> 32

25 ctattacgtc aagcctgtag cc 22

<210> 33
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador

35 <400> 33

catcctcatc tttcttcct tc 22

40 <210> 34
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <400> 34

gccagcgttt tctgccttt ac 22

50 <210> 35
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

<400> 35

55 aagccctgcc tgcttaaca tc 22

REIVINDICACIONES

- 1.- Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido seleccionado del grupo de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:14, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 2.- Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, o su región codificadora, SEQ ID NO:3, o su región codificadora, SEQ ID NO:5, o su región codificadora, SEQ ID NO:7, o su región codificadora, SEQ ID NO:9, o su región codificadora, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 3.- Un polipéptido seleccionado del grupo de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:14 para su uso como un producto farmacéutico.
- 4.- Un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, o su región codificadora, SEQ ID NO:3, o su región codificadora, SEQ ID NO:5, o su región codificadora, SEQ ID NO:7, o su región codificadora, SEQ ID NO:9, o su región codificadora, SEQ ID NO:11, o su región codificadora, y SEQ ID NO:13, o su región codificadora, para su uso como un producto farmacéutico.
- 15 5.- Un polipéptido seleccionado del grupo de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:14 para su uso en un método para el tratamiento de la distrofia retiniana.
- 6.- Un nucleótido que codifica un polipéptido seleccionado del grupo de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:14, para su uso en un método para el tratamiento de la distrofia retiniana.
- 20 7.- Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de RDCVF1 o RDCVF2 que consiste en una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:14, unida operablemente a una secuencia de control de la transcripción para su uso en la terapia génica de la distrofia retiniana.
- 8.- El vector de la reivindicación 7, en el que el vector se deriva de un adenovirus o de un virus adenoasociado.
- 25 9.- Un método para el diagnóstico de la distrofia retiniana en un ser humano, que comprende: detectar *in vitro* o *ex vivo* la transcripción de un ARN mensajero transcrito que se corresponde con un ADNc de RDCVF1 o RDCVF2 según se indica en SEQ ID NO:5, o su región codificadora, SEQ ID NO:7, o su región codificadora, o SEQ ID NO:13, o su región codificadora, en el ojo de un ser humano, en el que una disminución en la transcripción, con relación a la transcripción en el ojo de un individuo que no padece distrofia retiniana, es diagnóstica de que dicho ser humano
- 30 padece una distrofia retiniana.
- 10.- Un método para el diagnóstico de la distrofia retiniana en un ser humano, que comprende: medir *in vitro* o *ex vivo* la cantidad de un polipéptido de RDCVF1 o RDCVF2 que consiste en una secuencia de aminoácidos según se indica en SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, o SEQ ID NO:14, en células de bastoncillos de un ser humano, en el que la presencia de una cantidad menor de dicho polipéptido, con relación a la cantidad de dicho polipéptido en tejido de
- 35 ojo normal, es diagnóstica de que dicho ser humano padece una distrofia retiniana.
- 11.- El método de la reivindicación 10, en el que dicha etapa de detección comprende poner en contacto dicho tejido con un anticuerpo que se une específicamente con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, o SEQ ID NO:14, y detectar la unión específica de dicho anticuerpo con un polipéptido en dicho tejido, en el que la detección de la unión específica a un polipéptido indica la presencia de un polipéptido que comprende una
- 40 secuencia de aminoácidos según se indica en SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, o SEQ ID NO:14.
- 12.- Un polipéptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos según se indica en SEQ ID NO:2, o un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos con una identidad de al menos 90% con la región codificadora de SEQ ID NO:1.
- 45 13.- Un polipéptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos según se indica en SEQ ID NO:4, o un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos con una identidad de al menos 99% con la región codificadora de SEQ ID NO:3.
- 14.- Un método para producir polipéptidos de RDCVF1 según la reivindicación 12 o 13, que comprende:
- 50 cultivar una célula hospedante que lleva incorporado un vector de expresión que contiene un polinucleótido de origen exógeno que codifica un polipéptido según la reivindicación 12 o 13 bajo condiciones suficientes para la expresión de dichos polipéptidos en la célula hospedante, provocando con ello la producción de un polipéptido expresado; y recuperar el polipéptido producido por dicha célula.
- 15.- Un anticuerpo purificado, o su fragmento, que se une específicamente a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:14.

16.- Un fragmento de anticuerpo según la reivindicación 15 que es un fragmento Fab o F(ab')₂.

17.- Un anticuerpo según la reivindicación 15 que es un anticuerpo policlonal.

18.- Un anticuerpo según la reivindicación 15 que es un anticuerpo monoclonal.

5 19.- Un kit para el diagnóstico de la distrofia retiniana en un ser humano que comprende un medio para recoger una muestra y un anticuerpo según la reivindicación 15.

Figura 1:

ADNc de RdCVF1 de ratón: SEQ ID NO:1

```

1 ATCGGATCCCTCTCTGGGTCCCCAGCTCCTTGCATACTGCTACCATGGCA 50
51 TCTCTCTTCTCTGGACGCATCTTGATCAGGAACACAGCGACCAGGATGA 100
101 AGTGGAGACAGAGGCAGAGCTGAGCCGTAGGTTAGAGAATCGTCTGGTGT 150
151 TGCTGTTCTTCGGCGCCGGCGCCTGTCCCCAGTGCCAGGCCTTTGCCCA 200
201 GTCCTCAAAGACTTCTTCGTGCGGCTCACTGACGAGTTCTACGTGCTGCG 250
251 GGCAGCACAGCTGGCCCTGGTCTATGTGTCCCAGGACCCTACAGAGGAGC 300
301 AACAGGACCTTCTCCTCAGGGACATGCCTGAAAAATGGCTCTTCTGCGG 350
351 TTCCATGATGAACTGAGGAGGTGAGGCCCCAGGGAAGACCAGGGAGGGCT 400
401 TCCTGGAGAAGGCATTTCCCTGGAGGTTTACTGTCCTGGTACTACTTGTG 450
451 CATAAAGAGGTATTCCTC 468
    
```

Polipéptido : ATG a TGA: SEQ ID NO:2

```

1 MASLFSGRIL IRNNSDQDEV ETEAELSRRL ENRLVLLFFG AGACPQCQAF
51 APVLKDFVVR LTDEFYVLRA AQLALVYVSQ DPTEEQDLEF LRDMPEKWLF
101 LPFHDELRR
    
```

Figura 2:

ADNc de RdCVF1L de ratón: SEQ ID NO:3

```

1 CCCAGCTCC TTGCATACTG CTACCATGGC ATCTCTCTTC TCTGGACGCA
51 TCTTGATCAG GAACAACAGC GACCAGGATG AAGTGGAGAC AGAGGCAGAG
101 CTGAGCCGTA GGTTAGAGAA TCGTCTGGTG TTGCTGTTCT TCGGCGCCGF
151 CGCCTGTCC CAGTGCCAGG CCTTTGCCCC AGTCCTCAA GACTTCTTCG
201 TGCGGCTCAC TGACGAGTTC TACGTGCTGC GGGCAGCACA GCTGGCCCTG
251 GTCTATGTGT CCCAGGACCC TACAGAGGAG CAACAGGACC TCTTCCTCAG
301 GGACATGCCT GAAAAATGGC TCTTCCTGCC GTTCCATGAT GAACTGAGGA
351 GGGACCTCGG GCGCCAGTTC TCTGTCCGTC AACTGCCAGC GGTGTGGTA
401 CTTAAGCCTG GTGGGGACGT GCTGACAAGC GACGCCACGG AGGAGATCCA
451 GCGTCTGGGA CCCGCCTGCT TTGCCAACTG GCAGGAGGCC GCAGAGCTCC
501 TGGACCGCAG CTTCTCTGCAA CCGGAGGAT TGGATGAGCC TGCGCGGCGC
551 AGCATCACCG AGCCTCTGCG CCGTCGCAAG TACCGAGTAG ACCGGGATGT
601 CGGCGGGAGC GGGGCGAAAC GGC CGGACTC TGGTGAACCC CAGGGGACG
651 CGGTACAAG GCGGAGCTC TGGTACTCC CAGGGTAGGA GTGGGACCG
701 GAGCTCTGGT GACACCAAAG TACCGGTGCA CGACCGAGGT TGATGACCCT
751 CCCGAAGGAA CCGG
    
```

Polipéptido : ATG a TGA: SEQ ID NO:4

```

1 MASLFSGRIL IRNNSDQDEV ETEAELSRRL ENRLVLLFFG AGACPQCQAF
51 APVLKDFVVR LTDEFYVLRA AQLALVYVSQ DPTEEQDLEF LRDMPEKWLF
101 LPFHDELRRD LGRQFSVRQL PAVVVLKPGG DVLTSDATEE IQLGPAFCA
151 NWQEAAELLD RSFLQPEDLD EPARRSITEP LRRRKYRVDR DVGSGAKRR
201 DSGEPQDAG TRAEW
    
```

Figura 3:

ADNc de RdCVF1 humano: SEQ ID NO:5

```

1   CCCAGCACCC AACCCAGGTT ACCATGGCCT CCCTGTTCTC TGGCCGCATC
51  CTGATCCGCA ACAATAGCGA CCAGGACGAG CTGGATACGG AGGCTGAGGT
101 CAGTCGCAGG CTGGAGAACC GGCTGGTGCT GCTGTTCTTT GGTGCTGGGG
151 CTTGTCCACA GTGCCAGGCC TTCGTGCCCA TCCTCAAGGA CTTCTTCGTG
201 CGGCTCACAG ATGAGTTCTA TGTACTGCGG GCGGCTCAGC TGGCCCTGGT
251 GTACGTGTCC CAGGACTCCA CCGAGGAGCA GCAGGACCTG TTCCTCAAGG
301 ACATGCCAAA GAAATGGCTT TTCCTGCCCT TTGAGGATGA TCTGAGGAGG
351 TGA

```

Polipéptido : ATG a TGA: SEQ ID NO:6

```

1   MASLFSGRIL IRNNSDQDEL DTEAEVSRRL ENRLVLLFFG AGACPQCQAF
51  VPILKDFVVR LTDEFYVLRA AQLALVYVSQ DSTEEQQDLF LKDMPPKWLK
101 LPFEDDLRR

```

Figura 4:

ADNc de RdCVF1L humano: SEQ ID NO:7

```

1   CCGGGGACCA CACGCCGCGC TGTCCTCAGC ACCCAACCCA GGTTACCATG
51  GCCTCCCTGT TCTCTGGCCG CATCCTGATC CGCAACAATA GCGACCAGGA
101 CGAGCTGGAT ACGGAGGCTG AGGTCAGTCG CAGGCTGGAG AACCGGCTGG
151 TGCTGCTGTT CTTTGGTGCT GGGGCTTGTC CACAGTGCCA GGCCTTCGTG
201 CCCATCCTCA AGGACTTCTT CGTGCGGCTC ACAGATGAGT TCTATGTACT
251 GCGGGCGGCT CAGCTGGCCC TGGTGTACGT GTCCCAGGAC TCCACGGAGG
301 AGCAGCAGGA CCTGTTCCCTC AAGGACATGC CAAAGAAATG GCTTTTCCTG
351 CCCTTTGAGG ATGATCTGAG GAGGGACCTC GGGCGCCAGT TCTCAGTGGA
401 GCGCCTGCCG GCGGTCGTGG TGCTCAAGCC GGACGGGGAC GTGCTCACTC
451 GCGACGGCGC CGACGAGATC CAGCGCCTGG GCACCGCCTG CTTCGCCAAC
501 TGGCAGGAGG CGGCCGAGGT GCTGGACCGC AACTTCCAGC TGCCAGAGGA
551 CCTGGAGGAC CAGGAGCCAC GGAGCCTCAC CGAGTGCCCTG CGCCGCCACA
601 AGTACCGCGT GGAAAAGGCG GCGCGAGGCG GCGCGGACCC CGGGGGAGGG
651 GGTGGGGAGG AGGGCGGGGC CGGGGGGCTG TTCTGA

```

Polipéptido : ATG a TGA: SEQ ID NO:8

```

1   MASLFSGRIL IRNNSDQDEL DTEAEVSRRL ENRLVLLFFG AGACPQCQAF
51  VPILKDFVVR LTDEFYVLRA AQLALVYVSQ DSTEEQQDLF LKDMPPKWLK
101 LPFEDDLRRD LGRQFSVERL PAVVVLKPDG DVLTRDGADE IQRIGTACFA
151 NWQEAAEVL D RNFQLPEDLE DQEPRSLTEC LRRHKYRVEK AARGGRDPGG
201 GGGEEGGAGG LF

```

Figura 5:

ADNc de RdCVF2 de ratón: SEQ ID NO:9

```

1  ATAAAATAGA GGGTGGGAGA GGTGATGGC GTGGCTCTGC TTTTGGTGC
51  GGGGCACCCA GCTGTCATCG CTGCTGTCCG AGCTTCTGGA GTGGCCACTG

101 TGCTCTCTCC TCCCTFCGGC TCAAGGTGAG CTGTTCCAGC AGAAGGCGGG
151 GCTGAGAGGC GCCTAGTGCT GCGGGAGGCT CAGTGTCTAT TTCCAGCTAA
201 CAGGTGGCCG TGCAGCCCAG GGCTCGTCTC TCCACTGTGT CCTCTTCACG
251 CCGAGCTCGT GGCATGGTG GACGTGCTGG GCGGGCGGGC CCTGGTGACC
301 CGGGAGGGCA CGGTGGTGA GCGCGAGGTG GCGCTGCAGA ACAAGGTGGT
351 AGCTTTGTAC TTTGCGCGCG GCCGGTGCTC GCCCAGCCGC GACTTCACGC
401 CGCTGCTCTG CGACTTCTAC ACGGAGCTGG TGAGCGAGGC GCGGCGGCCC
451 GCTCCCTTCG AGGTGGTTTT CGTGTCCGCA GACGGCAGTG CGGAGGAGAT
501 GTTGGACTTC ATGCCGAGC TGCACGGCTC CTGGCTGGCA TTGCCCTTCC
551 ACGACCCCTA CCGGCAGTGA GTGGGGACCC AGGGGTCATG GGGCTGGCGC

```

Polipéptido : ATG a TGA: SEQ ID NO:10

```

1  MVDVLGGRRL VTREGTVVEA EVALQNKVVA LYFAAGRCSP SRDFTPLLCD
51  FYTELVSEAR RPAPFEVVFV SADGSAEEML DFMRELHGSW LALPFHDPYR
101 Q

```

Figura 6:

ADNc de RdCVF2L de ratón: SEQ ID NO:11

```

1  TTGACTCTGG TGGGTAGAGA GGGTTTGCAA GGCAGGATAA AATAGAGGGT
51  GGGAGAGGTT GATGGCGTGG CTCTGCTTTT TGGTGCGGGG CACCAGCTGT
101 CATCGCTGCT GTCGCAGCTT CTGGAGTGGC CACTGTGCTC TCTCCTCCCT
151 TCGGCTCAAG GTGAGCTGTT CCAGCAGAAG GCGGGGCTGA GAGGCGCCTA
201 GTGCTGCGGG AGGCTCAGTG TCATCTTCCA GCTAACAGGT GGCCGTGCAG
251 CCCAGGGCTC GTCTCTCCAC TGTGTCTCTT TCACGCCGAG CTGCTGGCGA
301 TGGTGGACGT GCTGGGCGGG CCGCGCCTGG TGACCCGGGA GGGCACGGTG
351 GTGGAGGCCG AGGTGGCGCT GCAGAACAAG GTGGTAGCTT TGTACTTTGC
401 GCGGGGCCGG TGCTCGCCCA GCCGCGACTT CACGCCGCTG CTCTGCGACT
451 TCTACACGGA GCTGGTGAGC GAGGCGCGGC GGCCCGCTCC CTTCGAGGTG
501 GTTTTCTGTT CGGCAGACGG CAGTGCCGAG GAGATGTTGG ACTTCATGGC
551 CGAGCTGCAC GGCTCCTGGC TGGCATTGCC CTCCACGAC CCCTACCGGC
601 ATGAACTGAA GAAGAGGTAC GAAATCACCG CCATCCCCAA GCTGGTGGTC
651 ATCAAGCAGA ACGGAGCTGT CATCACC AACAGGGCGGA AGCAGATCCG
701 AGAGCGCGGG CTAGCTTGCT TTCAGAACTG GGTGGAAGCA GCCGATGTTT
751 TCCAAAACCT CTCGGGGTGA CCAGGGCAGT TGCTGGAAGT TCAGGGCAAC
801 TATCTTCAA AAGGGCTTAG CTGGTTCCTT TCTCTGCTGA GGAATGTCAT
851 TGTAGAGTCA CCATGCTGTG ACAGAGAGCA TAACTGCTC AGGAAAGAAC
901 TACGTCTGCC CCCTGTGGGT CCTAGAGCTC CGTTGAATGT TTATTTCTTA
951 CACCTTTCTC CACCGGTGCC TAGGATCCAG GACACATCAG CCACGAGTTA
1001 ACAGAACTCT ATGCAAGATG CTCTTCCCTA CAGGAAATTT CTTTGATAAA
1051 TTGACCTATG GAGGTGATAC ATTTTCTGAT GACATTTTTG TGATGCTTTG
1101 GTAAACGTAT TTATTACTCG GGTGTTGTAGA CTGTGTAATT TAATAACCA
1151 AACTCACAC TTTG

```

Polipéptido : ATG a TGA: SEQ ID NO:12

```

1  MVDVLGGRRL VTREGTVVEA EVALQNKVVA LYFAAGRCSP SRDFTPLLCD

```

```

51 FYTELVSEAR RPAPFEVVFV SADGSAEEML DFMRELHGSW LALPFHDPYR
101 HELKKRYEIT AIPKLVVIKQ NGAVITNKGR KQIRERGLAC FQNWVEAADV
151 FQNFSG
    
```

Figura 7:

ADNc de RdCVF2 humano: SEQ ID NO:13

```

1 GTGTGGGCGG GCGCAGTTG GGGGAGGGTG CAGAGACCTG AGGGCTTGAG
51 GTTGCCTGGC TGGCCCCGCT CCCAGAGGCG GGTGCCGCGC TGTCGCCCAG
101 GTATCTGGGG TCTCTGGTGT CTGAGTGTCT CATTGTGCGC GCGAACACAA
151 TTGCTCCAGC CACAGGCGAG GCCTGGCCAA GGTGTGGGCG CATCTAGGGC
201 AGGTCTTGAG AGGTCCAGCG CCCGGTGGTG CGGACAGAGG CGGGGCACCC
251 CGGCGCTCGC CGCCGCCTCC CCGCAGGTGA TCATCCTCCT GCAGGTGTCC
301 TCGGGTCTCA GGTGGCTGCG TGTCTGCGCC ATGGFTGACA TTCTGGGCGA
351 GCGGCACCTG GTGACCTGTA AGGGCGCGAC GGTGGAGGCC GAGGCGGGCG
401 TGCAGAACAA GGTGGTGGCA CTGTACTTCG CGCGGCCCCG GTGCGCGCCC
451 AGCCGCGACT TCACGCCGCT GCTCTGCGAC TTCTATACGG CGCTGGTGGC
501 CAGAGCGCGG CGGCCGCGC CTTTCAAGT GGTCTTCGTG TCAGCCGACG
551 GCAGCTGCCA GGAGATGCTG GACTTCATGC GCGAGCTGCA TGGCGCCTGG
601 CTGGCGCTGC CCTTCCACGA CCCCTACCGG CAACGGAGTC TCGCTCTGTT
651 GCCCAGGCTG GAGTGCAGTG GCGTGATCTT AGCTCACTGC AACCTTTGCC
701 TCCTGGGTTC AAGTGATTCT CTAGCCTTAG CCTCCTGAGC ATCTGGGACT
751 ACAGCCATG CTGTGAATTA CGTGAGGGAA AGATATTGAA GAGGAGTTGG
801 ACACTCCGAG AGTGCAGCTG TTCTCCCCC GCACCATCCG TGTCTGCAT
851 TCTGCGAGTC TGTGCTCATT AACAATGTGC TGTGACCATG TGACTCAGCA
901 ATCCTGCTGC TGGGTATATA CCCGAAAGAA AGGAAAAGGA AGCCAGTATA
951 TTGAAGAGGT ATCTGCACCC CCATGTTTTAT TGCAGCACTG TTCACAACAG
1001 CCAAGATTTG GAAGCAACCT AAGTGTCCAT CAACAGATGA ATGGATAAAG
1051 AAAACGTGGT ACATATACAC AATGGAGTAC TCTTCAGCCA TTAAAAAAT
1101 GAGATTCTGT CATTGTCAAT AATATAGATG GAAAAGGAGG CCCTTATGTG
1151 AAGTCAAATA AGCCAGGCAC AGAAAGACAA ACATCACATG TTCTACTTAA
1201 TTTGTGGGAT CTAATGATCA AAACAATTGA ACTCTTGGAC ATAGAGAGTA
1251 GAAGTTGGT TACCAGAAGC TGGAAAGGAA AGTGGGGTTG GGAGGAAGGT
1301 GGAATGGTT AATAGGTACA AAAAAATACA AAGAATAAAT AAGACCTAAT
1351 ATTTGATAGC ACAACAGTGT GACTACTGTC AATAATCATT TAATTGTACA
1401 TTTAAAAATA ACTATAATTG CATTGTTTGT AACACAAAAG ATAAATGCTT
1451 GAGGAGAAAA AAAAAAAAAA AA
    
```

Polipéptido : ATG a TGA : SEQ ID NO:14

```

1 MVDILGERHL VTCKGATVEA EAALQNKVVA LYFAAARCAP SRDFTPLLCD
51 FYTALVAEAR RPAPFEVVFV SADGSCQEML DFMRELHGAW LALPFHDPYR
101 QRSLALLPRL ECSGVILAHC NLCLLGSDDS LALAS
    
```

Figura 8:

Secuencias cortas apiladas:

```

1 50
mRdCVF1 MASLFSGRIL IRNNSDQDEV ETEAELSRRL ENRLVLLFFG AGACPQCQAF
hRdCVF1 MASLFSGRIL IRNNSDQDEL DTEAEVSRRL ENRLVLLFFG AGACPQCQAF
mRdCVF2 MVDVLGGRRL VTREG...T VVEAEVA..L QNKVVVLYFA AGRCSPSRDF
hRdCVF2 MVDILGERHL VTCKG...A TVEAEAA..L QNKVVVLYFA AARCAPSRDF
    
```



```

                    51                                     100
mRdCVF1 APVLKDFVVR LTDEFYVLR AQLALVYVSQ DPTEEQQDLF LRDMPEKWLF
hRdCVF1 VPILKDFVVR LTDEFYVLR AQLALVYVSQ DSTEEQQDLF LKDMPPKWLF
mRdCVF2 TPLLCDFYTE LVSE..ARRP APFEVVFVSA DGSAEEMLDF MRELHGSWLA
hRdCVF2 TPLLCDFYTA LVAE..ARRP APFEVVFVSA DGSCQEMLDF MRELHGAWLA

                    101                                     143
mRdCVF1 LPPFHDELRR
hRdCVF1 LPPFEDLRR
mRdCVF2 LPPFHDPYRQ
hRdCVF2 LPPFHDPYRQ SLALLPRLEC SGVILAHCNL CLLGSSDSL A LAS

```

Secuencias largas apiladas:

```

                    1                                     50
mRdCVF1L MASLFSGRIL IRNNSDQDEV ETEAELSRRL ENRLVLLFFG AGACPQCQAF
hRdCVF1L MASLFSGRIL IRNNSDQDEL DTEAEVSRRL ENRLVLLFFG AGACPQCQAF
mRdCVF2L MVDVLGGRRL VTREG....T VVEAEVA..L QNKVVVLYFA AGRCSPSRDF
hRdCVF2L MVDILGERHL VTCKG....A TVEAEAA..L QNKVVVLYFA AARCAPSRDF

                    51                                     100
mRdCVF1L APVLKDFVVR LTDEFYVLR AQLALVYVSQ DPTEEQQDLF LRDMPEKWLF
hRdCVF1L VPILKDFVVR LTDEFYVLR AQLALVYVSQ DSTEEQQDLF LKDMPPKWLF
mRdCVF2L TPLLCDFYTE LVSE..ARRP APFEVVFVSA DGSAEEMLDF MRELHGSWLA
hRdCVF2L TPLLCDFYTA LVAE..ARRP APFEVVFVSA DGSCQEMLDF MRELHGAWLA

                    101                                     150
mRdCVF1L LPPFHDELRRD ...LGRQFSV RQLPAVVVLK PGGDVLTSDA TEEIQR LGPA
hRdCVF1L LPPFEDLRRD ...LGRQFSV ERLPAVVVLK PDGDVLTRDG ADEIQR LGTA
mRdCVF2L LPPFHDPYRHE ...LKKRYEI TAIPKLVVIK QNGAVITNKG RKQIRERGLA
hRdCVF2L LPPFHDPYRQR SLALLPRLEC SGV...ILAH CNLCLLGSSD SLALAS

                    151                                     200
mRdCVF1L CFANWQEAAE LLDRSFLQPE DLDEPARRSI TEPLRRRKYR VDRDVGSGA
hRdCVF1L CFANWQEAAE VLDRNFQLPE DLEDQEPRSL TECLRRHKYR VEKAARGG..
mRdCVF2L CFQNWVEAAD VFQNFSG
hRdCVF2

                    201                                     219
mRdCVF1L KRRDSGEPQG DAGTRAELW
hRdCVF1L ..RDPGGGGG EEGGAGGLF
mRdCVF2L
hRdCVF2

```

Figura 9:

SEQ ID NO: 26: 5' cgggatccATGGCATCTCTCTTCTCTGGACGC 3'

SEQ ID NO: 27: 5' ggaattcTCACCTCCTCAGTTCATCATGGAA 3'

Figura 10:

	1					50
RdCVF1	MASLFSGRIL	IRNNSDQDEV	ETEAELSRRL	ENRLVLLFFG	AGACPQCQAF	
RdCVF2	MVDVLGGRRL	V...TREGT	VVEAEVA..L	QNKVVALYFA	AGRCSPSRDF	
	51					100
RdCVF1	APVLKDFVFR	LTDEFYVLRA	AQLALVYVSQ	DPTEEQQDLF	LRDMPEKWLF	
RdCVF2	TPLLCDFYTE	LVSE..ARRP	APFEVVFVSA	DGSAEEMLDF	MRELHGSWLA	
	101					
RdCVF1	LPFHDELRR					
RdCVF2	LPFHDPYRQ					

Figura 11:

bc016199		RdCVF2 de ratón				
bg707818		RdCVF2 humano				
	1					50
bc016199	MVDVLGGRRL	VTREGTVVEA	EVALQNKVVA	LYFAAGRCSP	SRDFTPLLCD	
bg707818	MVDILGERHL	VTCKGATVEA	EAALQNKVVA	LYFAAARCAP	SRDFTPLLCD	
	51					100
bc016199	FYTELVSEAR	RPAPFEVVFV	SADGSAEEML	DFMRELHGWS	LALPFHDPYR	
bg707818	FYTALVAEAR	RPAPFEVVFV	SADGSCQEML	DFMRELHGAW	LALPFHEPYR	
	101		120			
bc016199	Q*					
bg707818	QRSLALLPRL	ECSGVILAH*				

Figura 12:

Nombre: mRdCVF2	secuencia de ratón bc016199					
Nombre: be552141	homo sapiens					
Nombre: bi517442	homo sapiens					
Nombre: bg707818	homo sapiens					
Nombre: bi603812	homo sapiens					
mRdCVF2				ATGGT	GGACGTGCTG	
be552141	TGTCCTCGGG	TCTCAGGTGG	CTGCGTGTCT	GCGCCATGGT	TGACATTCTG	
bi517442	TGTCCTCGGG	TCTCAGGTGG	CTGCGTGTCT	GCGCCATGGT	TGACATTCTG	
bg707818	TGTCCTCGGG	TCTCAGGTGG	CTGCGTGTCT	GCGCCATGGT	TGACATTCTG	
bi603812	TGTCCTCGGG	TCTCAGGTGG	CTGCGTGTCT	GCGCCATGGT	TGACATTCTG	
mRdCVF2	GGCGGCGGC	GCCTGGTGAC	CCGGGAGGGC	ACGGTGGTGG	AGGCCGAGGT	
be552141	GGCGAGCGGC	ACCTGGTGAC	CTGTAAGGGC	GCGACGGTGG	AGGCCGAGGC	
bi517442	GGCGAGCGGC	ACCTGGTGAC	CTGTAAGGGC	GCGACGGTGG	AGGCCGAGGC	
bg707818	GGCGAGCGGC	ACCTGGTGAC	CTGTAAGGGC	GCGACGGTGG	AGGCCGAGGC	
bi603812	GGCGAGCGGC	ACCTGGTGAC	CTGTAAGGGC	GCGACGGTGG	AGGCCGAGGC	
mRdCVF2	GGCGCTGCAG	AACAAGGTGG	TAGCTTTGTA	CTTTGCGGCG	GGCCGGTGCT	
be552141	GGCGCTGCAG	AACAAGGTGG	TGGCACTGTA	CTTCGCGGCG	GCCCCGTGCG	
bi517442	GGCGCTGCAG	AACAAGGTGG	TGGCACTGTA	CTTCGCGGCG	G.CCGGTGCG	
bg707818	GGCGCTGCAG	AACAAGGTGG	TGGCACTGTA	CTTCGCGGCG	GCCCCGTGCG	
bi603812	GGCGCTGCAG	AACAAGGTGG	TGGCACTGTA	CTTCGCGGCG	GCCCCGTGCG	

```

mRdCVF2 CGCCCAGCCG CGACTTCACG CCGCTGCTCT GCGACTTCTA CACGGAGCTG
be552141 CGCCGAGCCG CGACTTCACG CCGCTGCTCT GCGACTTCTA TACGGCGCTG
bi517442 CGCCGAGCCG CGA.TTCACG CCGCTGCTCT GCGACTTCTA TACGGCGCTG
bg707818 CGCCGAGCCG CGACTTCACG CCGCTGCTCT GCGACTTCTA TACGGCGCTG
bi603812 CGCCGAGCCG CGACTTCACG CCGCTGCTCT GCGACTTCTA TACGGCGCTG

mRdCVF2 GTGAGCGAGG CGCGGCGGCC CGCTCCCTTC GAGGTGGTTF TCGTGTCCGGC
be552141 GTGGCCGAGG CGCGGCGGCC CGCGCCCTTC GAAGTGGTCT TCGTGTCCAGC
bi517442 GTGGCCGAG. . . CGCGGG CCGCGCCCTTC GAAGTGGTCT TCGTGTCCAGC
bg707818 GTGGCCGAGG CGCGGCGGCC CGCGCCCTTC GAAGTGGTCT TCGTGTCCAGC
bi603812 GTGGCCGAGG CGCGGCGGCC CGCGCCCTTC GAAGTGGTCT TCGTGTCCAGC

mRdCVF2 AGACGGCAGT GCGGAGGAGA TGT.TGGACT TCATGCGCGA GCTGCACGGC
be552141 CGACGGCAGC TCCCAGGAGA TGC.TGGACT TCATGCGCGA GCTGCATGGC
bi517442 CGACGGCAGC TCCCAGGAGA TGC.TGGACT TCATGCGCGA GCTG.ATGGC
bg707818 CGACGGCAGC TGCCAGGAGA TGC.TGGACT TCATGCGCGA GCTGCATGGC
bi603812 CGACGGCAGC TGCCAGGAGA TGCTTGGACT TCATGCGCGA GCTGCATTGC

mRdCVF2 TCCTGGC.TG GCATTGCCCT TCCACGACCC CTACCGGCAG TGA
be552141 GCCTGGC.TG GCGCTGCCCT TCCACGACCC CTACCGGCAC CATTGCTGTG
bi517442 GCCTGGC.TG GCGCTG.CCT TCCACGACCC CTACCGGCAC AGCCGGAGCC
bg707818 GCCTGGC.TG GCGCTGCCCT TCCACGAACC CTACCGGCAA CGGAGTCTCG
bi603812 GCCTGGCTTG GCGCTGCCCT TCCACGACCC CTACCGGCAA CGGAGTCTCG
    
```

Figura 13:

apilamiento

Peso de hueco: 5
 Peso de longitud de hueco: 1

Nombre: RdCVF1
 Nombre: bg299078
 Nombre: ai716631
 Nombre: bg294111
 Nombre: be108041 Rev
 Nombre: bg395178

```

          1                                     50
RdCVF1 -----
bg299078 ----- --ATCGGATC CTCTCTGGGT
ai716631 ----- -----CG GCCGCTTAAT SINE
bg294111 -----
be108041 ACGAGGTCAA CCTTGGCTAC ACAGGGAGTC TGAGGACAGC ATGGGNTACA
bg395178 ----- --A CGCCGCGCTG

          51                                     100
RdCVF1 ----- --ATGGC ATCTCTCTTC TCTGGACGCA
bg299078 CCCCAGCTCC TTGCATACTG CTACCATGGC ATCTCTCTTC TCTGGACGCA
ai716631 TAAGACGGAT CCCCAGCTAC GTAGTCGGGA ATTGGGCAGG AGGGGCCGCA
bg294111 ---CAGCTCC TTGCATACTG CTACCATGGC ATCTCTCTTC TCTGGACGCA
be108041 AGAAACCCTC TCTCAAAACC AAACAAGGCC TGGCAGTACT AGTGCACCTG
bg395178 TCCCAGCAC CCAACCCAGG TTACCATGGC CTCCCTGTTC TCTGGCCGCA

          101                                     150
RdCVF1 TCTTGATCAG GAACAACAGC GACCAGGATG AAGTGGAGAC AGAGGCAGAG
bg299078 TCTTGATCAG GAACAACAGC GACCAGGATG AAGTGGAGAC AGAGGCAGAG
    
```

ai716631	TCTTGATCAG	GAACAACAGC	GACCAGGATG	AAGTGGAGAC	AGAGGCAGAG
bg294111	TCTTGATCAG	GAACAACAGC	GACCAGGATG	AAGTGGAGAC	AGAGGCAGAG
be108041	GGAGGCAGAG	GAACAACAGC	GACCAGGATG	AAGTGGAGAC	AGAGGCAGAG
bg395178	TCCTGATCCG	CAACAATAGC	GACCAGGACC	AGCTGGATAC	GGAGGCTGAG
	151				200
RdCVF1	CTGAGCCGTA	GGTTAGAGAA	TCGTCTGGTG	TTGCTGTTCT	TCGGCGCCGG
bg299078	CTGAGCCGTA	GGTTAGAGAA	TCGTCTGGTG	TTGCTGTTCT	TCGGCGCCGG
ai716631	CTGAGCCGCC	GGTTAGAGAA	TCGTCTTGTG	CTACTGTTCT	TCGGTGCTGG
bg294111	CTGAGCCGTA	GGTTAGAGAA	TCGTCTGGTG	TTGCTGTTCT	TCGGCGCCGG
be108041	CTGAGCCGCC	GGTTAGAGAA	TCGTCTTGTG	CTACTGTTCT	TCGGTGCTGG
bg395178	GTCAGTCGCA	GGCTGGAGAA	CCGGCTGGTG	CTGCTGTTCT	TTGGTGCTGG
	201				250
RdCVF1	CGCCTGTCCC	CAGTGCCAGG	CCTTTGCCCC	AGTCCTCAAA	GACTTCTTCG
bg299078	CGCCTGTCCC	CAGTGCCAGG	CC.TTGCCCC	AGTCCTCAAA	GACTTCTTCG
ai716631	GGCCTGTCCC	CAGTGCCAGG	CCTTCGCCCC	AGTCCTCAAA	GACTTCTTCG
bg294111	CGCCTGTCCC	CAGTGCCAGG	CC.TTGCCCC	AGTCCTCAAA	GACTTCTTCG
be108041	GGCCTGTCCC	CAGTGCCAGG	CCTTCGCCCC	AGTCCTCAAA	GACTTCTTCG
bg395178	GGCTTGTCBA	CAGTGCCAGG	CCTTCGTGCC	CATCCTCAAG	GACTTCTTCG
	251				300
RdCVF1	TGCGGCTCAC	TGACGAGTTC	TACGTGCTGC	GGGCAGCACA	GCTGGCCCTG
bg299078	TGCGGCTCAC	TGACGAGTTC	TACGTGCTGC	GGGCAGCACA	GCTGGCCCTG
ai716631	TGCGGCTCAC	TGATGAGTTC	TACGTGCTAC	GGGCAGCACA	GCTGGCCCTG
bg294111	TGCGGCTCAC	TGACGAGTTC	TACGTGCTGC	GGGCAGCACA	GCTGGCCCTG
be108041	TGCGGCTCAC	TGATGAGTTC	TACGTGCTAC	GGGCAGCACA	GCTGGCCCTG
bg395178	TGCGGCTCAC	AGATGAGTTC	TATGTACTGC	GGGCGGCTCA	GCTGGCCCTG
	301				350
RdCVF1	GTCTATGTGT	CCCAGGACCC	TACAGAGGAG	CAACAGGACC	TCTTCCTCAG
bg299078	GTCTATGTGT	CCCAGGACCC	TACAGAGGAG	CAACAGGACC	TCTTCCTCAG
ai716631	GTCTATGTGT	CCCAGGACCC	TACAGAGGAG	CAACAGGACC	TGTTCTCCG
bg294111	GTCTATGTGT	CCCAGGACCC	TACAGAGGAG	CAACAGGACC	TCTTCCTCAG
be108041	GTCTATGTGT	CCCAGGACCC	TACAGAGGAG	CAACAGGACC	TGTTCTCCG
bg395178	GTGTACGTGT	CCCAGGACTC	CACGGAGGAG	CAGCAGGACC	TGTTCTCAA
	351				400
RdCVF1	GGACATGCCT	GAAAAATGGC	TCTTCCTGCC	GTTCCA.TGA	TGAACTGAGG
bg299078	GGACATGCCT	GAAAAATGGC	TCTTCCTGCC	GTCCCACTGA	TGAACTGAGG
ai716631	GGACATGCCT	GAAAAAGTGGC	TCTTCCTGCC	GTTCCA.TGA	TGACCTGAGG
bg294111	GGACATGCCT	GAAAAATGGC	TCTTCCTGCC	GTTCCA.TGA	TGAACTGAGG
be108041	GGACATGCCT	GAAAAAGTGGC	TCTTCCTGCC	GTTCCA.TGA	TGACCTGAGG
bg395178	GGACATGCCA	AAGAAATGGC	TTTTCCTGCC	CTTTGA.GGA	TGATCTGAGG
	401				450
RdCVF1	AGGTGA-----	-----	-----	-----	-----
bg299078	AGGTGAGGCC	CCAGGGAAGA	CCAGGGAGGG	CTTCCTGGAG	AAGGCATTTT
ai716631	AGAGACCTCG	GGCGCCAGTT	CTCCGT-----	-----	-----
bg294111	AGGGACCTCG	GGCGCCAGTT	CTCTGTCCGT	CAACTGCCAG	CGGTTGTGGT
be108041	AGTAATAAAA	ATTAGAGGTT	GTGGCTCAAA	AAAAAAAAAA	AAAA-----
bg395178	AGGGACCTCG	GGCGCCAGTT	CTCAGTGAGG	CGCCTGCCGG	CGGTCGTGGT
	451				500
RdCVF1	-----	-----	-----	-----	-----
bg299078	CCTGGAGGTT	TACTGTCCTG	GFACTACTTG	TGCACTAAAG	AGGTATTCTT
ai716631	-----	-----	-----	-----	-----
bg294111	ACTTAAGCCT	GGTGGGGACG	TGCTGACAAG	CGACGCCACG	GAGGAGATCC
be108041	-----	-----	-----	-----	-----
bg395178	GCTCAAGCCG	GACGGGGACG	TGCTCACTCG	CGACGGCGCC	GACGAGATCC

ES 2 597 835 T3

	501				550
RdCVF1	-----	-----	-----	-----	-----
bg299078	CCACACCAAC	CACAGGCGAC	AACAACACAC	AAGAGGTGTC	CCATCCGCTC
ai716631	-----	-----	-----	-----	-----
bg294111	AGCGTCTGGG	ACCCGCCTGC	TTTGCCAAC	GGCAGGAGGC	CGCAGAGCTC
be108041	-----	-----	-----	-----	-----
bg395178	AGCGCCTGGG	CACCGCCTGC	TTCGCCAACT	GGCAGGAGGC	GGCCGAGGTG
	551				600
RdCVF1	-----	-----	-----	-----	-----
bg299078	TTCCATCACA	GCCCACTGAC	GCCAGACAGC	ATCGCGACGC	TCACGGCTCA
ai716631	-----	-----	-----	-----	-----
bg294111	CTGGACCGCA	GCTTCCTGCA	ACCGGAGGAT	TTGGATGAGC	CTGCGCGGGC
be108041	-----	-----	-----	-----	-----
bg395178	CTGGACCGCA	ACTTCCAGCT	GCCAGAGGAC	CTGGAGGACC	AGGAGCCACG
	601				650
RdCVF1	-----	-----	-----	-----	-----
bg299078	GAAAAACACA	GGTAGTCTCA	CAGGCCTGCC	ATCCTAATAC	TGGCCACCCT
ai716631	-----	-----	-----	-----	-----
bg294111	CAGCATCACC	GAGCCTCTGC	GCCGTGCGAA	GTACCGAGTA	GACCGGGATG
be108041	-----	-----	-----	-----	-----
bg395178	GAGCCTCACC	GAGTGCCTGC	GCCGCCACAA	GTACCGCGTG	GAAAAGGCGG
	651				700
RdCVF1	-----	-----	-----	-----	-----
bg299078	GAGCACAAGA	GCGATGGCTA	CAAGCCTCAA	GGCTAGAATC	TAAAACCACG
ai716631	-----	-----	-----	-----	-----
bg294111	TCGGCGGGAG	CGGGCGGAAA	CGGCGCGACT	CTGGTGAACC	CCAGGGGGAC
be108041	-----	-----	-----	-----	-----
bg395178	CGCGAGGCGG	CGCGACCCGG	GGGAGGGGCT	GGGGACGGAG	GCCGGGGCCC
	701				750
RdCVF1	-----	-----	-----	-----	-----
bg299078	AGGTGGGGAC	CGTAGGCCCC	ACTCCCCGGG	AGCGC-----	-----
ai716631	-----	-----	-----	-----	-----
bg294111	GCGGGTACAA	GGGCGGAGCT	CTGGTGACTC	CCAGGGTAGG	AGTGGGGACC
be108041	-----	-----	-----	-----	-----
bg395178	GGGGGGCTGT	ACTGACCGCT	GGGTGGAGCA	GAGGGAGGGG	GATTGGTGGA
	751				800
RdCVF1	-----	-----	-----	-----	-----
bg299078	-----	-----	-----	-----	-----
ai716631	-----	-----	-----	-----	-----
bg294111	GGAGCTCTGG	TGACACCAA	GTACCGGTGC	ACGACCGAGG	TTGATGACCC
be108041	-----	-----	-----	-----	-----
bg395178	AGAACAACAA	CCACACGCAG	CCAGCACCAG	GTATCCCGAC	TAGGGGAGAC
	801				850
RdCVF1	-----	-----	-----	-----	-----
bg299078	-----	-----	-----	-----	-----
ai716631	-----	-----	-----	-----	-----
bg294111	TCCCGAAGGA	ACCGG-----	-----	-----	-----
be108041	-----	-----	-----	-----	-----
bg395178	AGGGCGAAGA	CCTGACCCAA	AGCACAACCA	CCGGGGACAC	TAAACGACTC
	851				900
RdCVF1	-----	-----	-----	-----	-----
bg299078	-----	-----	-----	-----	-----
ai716631	-----	-----	-----	-----	-----
bg294111	-----	-----	-----	-----	-----

```

be108041 ~~~~~
bg395178 AACTCAATCC TGTGGGCACC AGGACACCGC AAAAAAAAAAC AAAAAAAGCA

          901                               929

RdCVF1 ~~~~~
bg299078 ~~~~~
ai716631 ~~~~~
bg294111 ~~~~~
be108041 ~~~~~
bg395178 AAATGCAAAA AAAGACAGGA CATAACGACG
    
```

Figura 14:

BG299078

```

ATCGGATCCTCTCTGGGTCCCCAGCTCCTTGCATACTGCTACCATGGCATCTCTCTTCTC
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TAGCCTAGGAGAGACCCAGGGGTCGAGGAACGTATGACGATGGTACCCTAGAGAGAAGAG

    TGGACGCATCTTGATCAGGAACAACAGCGACCAGGATGAAGTGGAGACAGAGGCAGAGCT
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
ACCTGCGTAGAAGTACTGCTTGTGTGCTGGTCTACTTCACCTCTGTCTCCGTCTCGA

    GAGCCGTAGGTTAGAGAATCGTCTGGTGTGCTGTTCTTCGGCGCCGGCGCCTGTCCCCA
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
CTCGGCATCCAATCTCTTAGCAGACCACAACGACAAGAAGCCGCGCCGCGGACAGGGGT
    +T
GTGCCAGGCCTTGCCCCAGTCCCTCAAAGACTTCTTCGTGCGGCTCACTGACGAGTTCTAC
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CACGGTCCGGAACGGGGTCAGGAGTTTCTGAAGAAGCACGCCGAGTGACTGCTCAAGATG

    GTGCTGCGGGCAGCACAGCTGGCCCTGGTCTATGTGTCCCAGGACCTACAGAGGAGCAA
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CACGACGCCCGTCTGTGTCGACCCGGGACCAGATACACAGGGTCTGGGATGTCTCCTCGTT
    eliminado
CAGGACCTCTTCTCAGGGACATGCCTGAAAAATGGCTCTTCTGCCGTCCCAGTATGATGA
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
GTCCTGGAGAAGGAGTCCCTGTACGGACTTTTTACCGAGAAGGACGGCAGGGTGACTACT

    ACTGAGGAGGTGAGGCCCCAGGGAAGACCAGGGAGGGCTTCCTGGAGAAGGCATTTCCCT
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
TGACTCCTCCACTCCGGGGTCCCTTCTGGTCCCTCCCGAAGGACCTCTTCCGTAAAGGGA

    GGAGGTTTACTGTCTGGTACTACTTGTGCACTAAAGAGGTATTCCTCCACACCAACCAC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
CCTCCAAATGACAGGACCATGATGAACACGTGATTTCTCCATAAGGAGGTGTGGTTGGTG

    AGGCGACAACAACACACAAGAGGTGTCCCATCCGCTCTTCCATCACAGCCCCTGACGCC
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
TCCGCTGTTGTTGTGTGTTCTCCACAGGGTAGGCGAGAAGGTAGTGTCCGGTGACTGCGG

    AGACAGCATCGCGACGCTCACGGCTCAGAAAAACACAGGTAGTCTCACAGGCCCTGCCATC
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
TCTGTCTGTAGCGCTGCGAGTGCCGAGTCTTTTTGTGTCCATCAGAGTGTCCGGACGGTAG

    CTAATACTGGCCACCCTGAGCACAAGAGCGATGGCTACAAGCCTCAAGGCTAGAATCTAA
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
GATTATGACCGGTGGGACTCGTGTCTCGCTACCGATGTTCCGAGTTCGGATCTTAGATT
    
```


Figura 16:

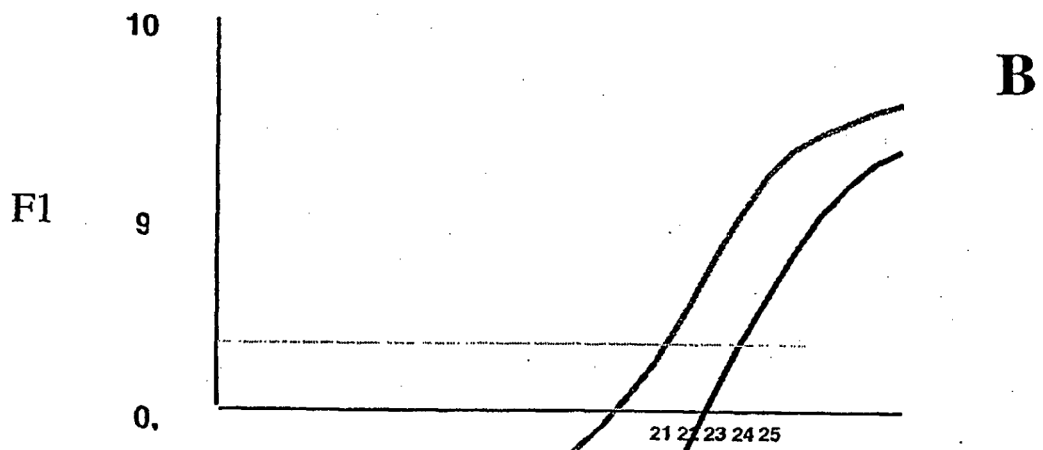
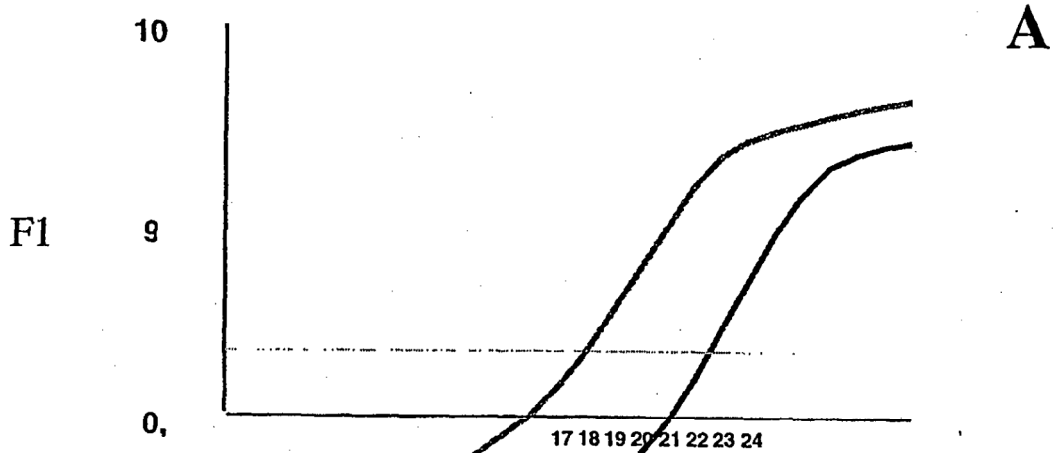


Figura 17:

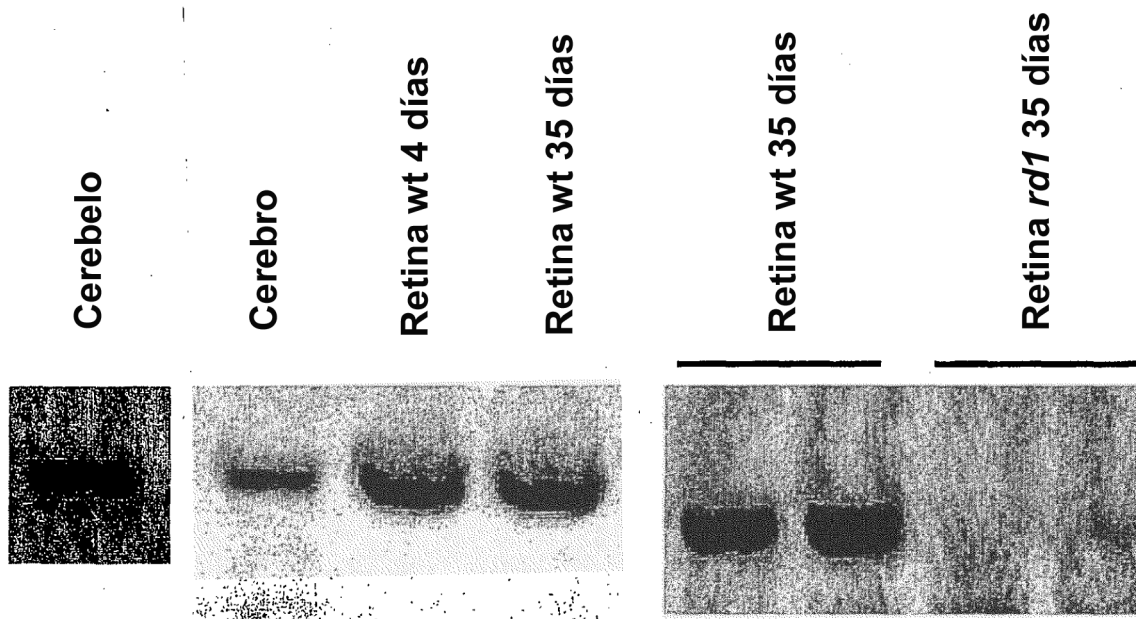


Figura 18:

