

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 464**

51 Int. Cl.:

A61P 25/28 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2008 PCT/EP2008/057031**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2008 WO08148860**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2008 E 08760606 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 2175932**

54 Título: **Nuevo factor de viabilidad neuronal y su uso para tratar la distrofia de conos**

30 Prioridad:

05.06.2007 EP 07109652

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.07.2017

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM) (50.0%)
101, RUE DE TOLBIAC
75013 PARIS, FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (50.0%)**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 623 464 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

Nuevo factor de viabilidad neuronal y su uso para tratar la distrofia de conos

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a trastornos neurodegenerativos, y más particularmente a una composición farmacéutica para tratar y/o prevenir trastornos neurodegenerativos.

10 **Estado de la técnica**

Los trastornos neurodegenerativos han supuesto un desafío durante muchos años, tanto en la investigación básica como en contextos clínicos.

15 Como ejemplo de tal trastorno neurodegenerativo, la *retinosis pigmentaria* (RP) es la degeneración de la retina genéticamente heterogénea caracterizada por la degeneración secuencial de una población de neuronas que corresponde a los fotorreceptores de conos y bastones. Los primeros signos clínicos de la RP son la ceguera nocturna y el estrechamiento del campo de visión periférico que empeora progresivamente para volverse visión “en túnel”. Con el tiempo, la visión central se ve reducida a ceguera total en la mayoría de los casos. A nivel celular, los fotorreceptores de bastones retinianos involucrados en la visión nocturna y lateral degeneran lentamente. Posteriormente, los fotorreceptores de conos responsables de la visión del color y del alto contraste, de la agudeza visual, de la percepción de los detalles y la visión a luz normal se ven afectados de manera similar. El ratón con degeneración retiniana 1 (rd1) es el modelo animal más estudiado en la retinosis pigmentaria. Lleva a cabo una mutación recesiva en el gen de la subunidad beta de la GMPc fosfodiesterasa específica de los bastones que conduce a la muerte de los fotorreceptores de bastones a través de la apoptosis (CARTER-DAWSON *et al.*, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., vol. 17(6), p:489-498, 1978; PORTERA-CAILLIAU *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., vol. 91(3), p: 974-978, 1994) seguido de la muerte de los conos, supuestamente debido a la falta de soporte trófico (MOHAND-SAID *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., vol. 95(14), p: 8357-8362, 1998).

30 En consecuencia, el problema técnico subyacente en la presente intención es proporcionar compuestos novedosos que tengan actividades neurotróficas, cuyos compuestos sean adecuados para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos tales como la retinosis pigmentaria, para la que actualmente no existe tratamiento.

35 El gen RdCVF, también denominado tiorredoxina de tipo 6 (Txn16) o nucleorredoxina de tipo 1 (Nxn11), codifica la proteína Q8VC33 UniProt [6], que tiene una similitud limitada con la superfamilia de la tiorredoxina y que ejerce actividad trófica sobre los fotorreceptores de conos (LEVEILLARD *et al.*, Nat. Genet. vol. 36(7), p: 755-759, 2004). Las tiorredoxinas (TXN) habitualmente son pequeñas proteínas que pueden estar involucradas en actividades pleiotrópicas tales como el control redox, la regulación de la apoptosis y la actividad de las citocinas (HOLMGREN, Annu. Rev. Biochem., vol. 54, p: 237-271, 1985; HOLMGREN, J. Biol. Chem., vol. 264(24), p: 13963-13966, 1989; ARNER y HOLMGREN, Eur. J. Biochem., vol. 267(20), p: 6102-6109, 2000). El sitio activo conservado de la TXN contiene dos cisteínas distintas (CXXC) que contribuyen a una actividad tiorredoxina (ARNER y HOLMGREN, 2000, anteriormente mencionada; POWIS y MONFORT, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., vol. 41, p: 261-295, 2001) cataliza la reducción de los enlaces de disulfuro en múltiples proteínas de sustrato (HOLMGREN, J. Biol. Chem., vol. 254(18), p: 9113-9119, 1979; HOLMGREN, J. Biol. Chem., vol. 254(19), p: 9627-9632, 1979). El gen RdCVF codifica dos productos a través del corte y empalme alternativo: una proteína de longitud completa y una proteína post-transcripcionalmente truncada en la región C-terminal que comparte similitudes con TRX80. Esta última forma de tiorredoxina humana de tipo 1 (Txn) (PEKKARI *et al.*, J. Biol. Chem., vol. 275(48), p: 37474-37480, 2000; PEKKARI *et al.*, Blood, vol. 105(4), :1598-1605, 2005; LIU *et al.*, Blood, vol. 105(4): 1606-1613, 2005) no tiene actividad tiorredoxina pero está involucrada en controlar el crecimiento de las células sanguíneas mononucleares periféricas (PEKKARI *et al.*, 2000, anteriormente mencionada; PEKKARI *et al.*, FEBS Lett., vol. 539(1-3): 143-148, 2003). De manera similar a Txn, RdCVF parece un gen bifuncional ya que codifica tanto una forma larga (RdCVF-L, 217 aa, Q8VC33) que tiene una supuesta actividad tiorredoxina (JEFFERY, Trends Biochem. Sci., vol. 24(1): 8-11, 1999; JEFFERY, Trends Genet., vol. 19(8): 415-417, 2003), como una forma corta (RdCVF-S, 109 aa, Q91W38) con actividad trófica de los conos, pero sin actividad redox.

55 **Objeto de la invención**

La presente invención está definida por las reivindicaciones.

60 La presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende un transportador farmacéuticamente aceptable y un compuesto seleccionado del grupo que comprende:

- 65 i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende la secuencia de aminoácidos de la isoforma corta del *Homo sapiens* del gen RdCVF2 (SEQ ID NO:1), ortólogos, derivados y fragmentos del mismo;
- ii) un polinucleótido que codifica dicho polipéptido;

- iii) un vector que comprende dicho polinucleótido; y
- iv) una célula huésped modificada por ingeniería genética que expresa dicho polipéptido.

5 En otro ejemplo, la presente divulgación se refiere a un uso, para tratar y/o prevenir un trastorno neurodegenerativo, de un compuesto seleccionado del grupo que comprende:

- 10 i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende la secuencia de aminoácidos de la isoforma del *Homo sapiens* del gen RdCVF2 (SEQ ID NO:1), ortólogos, derivados y fragmentos del mismo;
- ii) un polinucleótido que codifica dicho polipéptido;
- iii) un vector que comprende dicho polinucleótido; y
- iv) una célula huésped modificada por ingeniería genética que expresa dicho polipéptido.

15 En otro ejemplo más, la presente divulgación se refiere a un método de prevención y/o tratamiento de un trastorno neurodegenerativo que comprende proporcionar, a un sujeto que presenta o se predice que presenta un trastorno neurodegenerativo, una cantidad eficaz de una composición que comprende un compuesto seleccionado del grupo que comprende:

- 20 i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende la secuencia de aminoácidos de la isoforma corta del *Homo sapiens* del gen RdCVF2 (SEQ ID NO:1), ortólogos, derivados y fragmentos del mismo;
- ii) un polinucleótido que codifica dicho polipéptido;
- iii) un vector que comprende dicho polinucleótido; y
- iv) una célula huésped modificada por ingeniería genética que expresa dicho polipéptido.

25 En otro ejemplo más, la presente divulgación se refiere finalmente a un método de prueba de un sujeto que se cree que padece o que está predispuesto a padecer un trastorno neurodegenerativo, que comprende la detección de la presencia de una mutación en el gen RdCVF2 y/o en su promotor asociado en una muestra biológica de dicho sujeto.

30 **Descripción de las figuras**

- La figura 1 muestra la conservación de la estructura genética de RdCVF y RdCVF2.
- 35 La figura 2 muestra las similitudes en la secuencia y la estructura de las proteínas RdCVF y RdCVF2 de ratón con miembros de la superfamilia de la tiorredoxina.
- La figura 3 muestra la validación de la expresión de RdCVF2 en la retina.
- La figura 4 muestra el ensayo de viabilidad de los conos en presencia de RdCVF-S y RdCVF2-S.

40 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se basa en el descubrimiento de un nuevo gen RdCVF2 como un gen parálogo a RdCVF, mejorando la proteína codificada por dicho gen la viabilidad de las neuronas tales como los fotorreceptores de conos y las neuronas olfativas.

45 De este modo, en un primer aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un transportador farmacéuticamente aceptable y un compuesto seleccionado del grupo que comprende:

- 50 i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende la secuencia de aminoácidos de la isoforma corta del *Homo sapiens* del gen RdCVF2 (SEQ ID NO:1), ortólogos, derivados y fragmentos del mismo;
- ii) un polinucleótido que codifica dicho polipéptido;
- iii) un vector que comprende dicho polinucleótido; y
- iv) una célula huésped modificada por ingeniería genética que expresa dicho polipéptido.

55 Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a una cadena molecular de aminoácidos que mejora la viabilidad de las neuronas, tales como los fotorreceptores de conos o las neuronas olfativas. Este polipéptido, si es necesario, puede modificarse *in vitro* y/o *in vivo*, por ejemplo mediante glucosilación, miristoilación, amidación, carboxilación o fosforilación, y puede obtenerse, por ejemplo, mediante técnicas sintéticas o recombinantes conocidas en la materia.

60 De acuerdo con un ejemplo preferido, la composición de la invención puede comprender un transportador farmacéuticamente aceptable y un compuesto seleccionado del grupo que comprende:

- 65 i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta como (SEC ID NO:10);
- ii) un polinucleótido que codifica dicho polipéptido;
- iii) un vector que comprende dicho polinucleótido; y

iv) una célula huésped modificada por ingeniería genética que expresa dicho polipéptido.

Como se usa en el presente documento, el término "ortólogos" se refiere a proteínas de diferentes especies que las proteínas SEQ ID NO.1 y SEQ ID NO.10 del *Homo sapiens* que evolucionaron a partir de un gen ancestral común por especiación. Como ejemplo de tales ortólogos, se pueden mencionar las proteínas que corresponden a RdCVF2-S en *Mus musculus* (SEQ ID NO.2), *Rattus norvegicus* (SEQ ID NO.3), *Pan troglodytes* (SEQ ID NO.4), *Bos Taurus* (SEQ ID NO.5), *Gallus gallus* (SEQ ID NO.6), *Xenopus laevis* (SEQ ID NO.7), *Tetraodon nigroviridis* (SEQ ID NO.8) y *Danio rerio* (SEQ ID NO.9).

Como se usa en el presente documento, el término "derivados" se refiere a polipéptidos que tienen un porcentaje de identidad de al menos 75 % con SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.10 o con ortólogos de las mismas, preferentemente de al menos 85 %, como un ejemplo de al menos 90 %, y más preferentemente de al menos 95 %.

Ha de observarse que la isoforma corta de RdCVF2 del *Homo sapiens* tiene menos del 40 % de identidad con la isoforma corta de RdCVF del *Homo sapiens*.

Como se usa en el presente documento, el término "fragmentos" se refiere a polipéptidos que tienen una longitud de al menos 25 aminoácidos, preferentemente de al menos 50 aminoácidos, como ejemplo de al menos 75 u 85 aminoácidos, y más preferentemente de al menos 100 aminoácidos.

Como se usa en el presente documento, "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de aminoácidos, significa el porcentaje de aminoácidos idénticos, entre las dos secuencias a comparar, obtenido con el mejor alineamiento de dichas secuencias, siendo este porcentaje puramente estadístico y siendo las diferencias entre estas dos secuencias distribuidas aleatoriamente a lo largo de las secuencias de aminoácidos. Como se usa en el presente documento, "mejor alineamiento" o "alineamiento óptimo", significa el alineamiento para el que el porcentaje de identidad determinado (véase más adelante) es el más alto. La comparación de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos se efectúa normalmente comparando estas secuencias que previamente se han alineado de acuerdo con el mejor alineamiento; esta comparación se efectúa en segmentos de comparación para identificar y comparar las regiones locales de similitud. El mejor alineamiento de secuencias para realizar la comparación puede efectuarse, además de forma manual, usando el algoritmo de homología global desarrollado por SMITH y WATERMAN (Ad. App. Math., vol. 2), p: 482, 1981, usando el algoritmo de homología local desarrollado por NEDDLEMAN y WUNSCH (J. Mol. Biol., vol. 48), p: 443, 1970, usando el método de similitudes desarrollado por PEARSON y LIPMAN (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., vol. 85), p: 2444, 1988, usando programas informáticos que emplean tales algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA, TFASTA en el paquete informático de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wisconsin, EE.UU.), usando los algoritmos de alineamiento múltiple MUSCLE (Edgar, Robert C., Nucleic Acids Research, vol. 32, p: 1792, 2004). Para obtener el mejor alineamiento local, se puede usar preferentemente el programa informático BLAST, con la matriz BLOSUM 62, o la matriz PAM 30. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina comparando estas dos secuencias alineadas óptimamente, siendo capaces las secuencias de aminoácidos de comprender adiciones o supresiones con respecto a la secuencia de referencia para obtener el alineamiento óptimo entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de la posición idéntica entre estas dos secuencias, y dividiendo este número por el número total de posiciones comparadas, y multiplicando el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que son fisiológicamente tolerables y que habitualmente no producen una reacción adversa alérgica o similar, tal como molestias digestivas, mareos y similares, cuando se administra a un ser humano. Preferentemente, como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que está aprobado por una agencia reguladora del Gobierno Federal o de un gobierno estatal o que está incluido en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

El término "transportador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra el compuesto. Tales transportadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos aquellos cuyo origen es petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Las soluciones salinas de agua o solución acuosa y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol se emplean preferentemente como transportadores, particularmente para soluciones inyectables. En "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin se describen los transportadores farmacéuticos adecuados.

Como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido" se refiere a ARN o ADN, preferentemente a ADN. Dicho ADN puede ser bicatenario o monocatenario.

Preferentemente, el polinucleótido comprende la secuencia SEQ ID NO.11.

Preferentemente, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica la secuencia SEQ ID NO:10.

El polinucleótido de la invención puede incluir además la secuencia codificante del polipéptido definida anteriormente, una secuencia codificante adicional, tal como una secuencia líder o una secuencia de proproteína, y/o secuencias no codificantes adicionales, tales como intrones o secuencias 5' y/o 3' UTR.

- 5 Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a un vector de expresión, y puede estar, por ejemplo, en forma de plásmido, partícula vírica, un fago, etc.

10 Tales vectores pueden incluir plásmidos bacterianos, ADN de fagos, baculovirus, plásmidos de levaduras, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, ADN vírico tal como el virus de la variolovacuna, adenovirus, el virus de la difteria aviar, y la pseudorrabia. Los expertos en la materia conocen un gran número de vectores adecuados que están disponibles en el comercio. Los siguientes vectores se proporcionan a modo de ejemplo. Bacterianos: pQE70, pQE60, pQE-9 (QUIAGEN), pbs, pD10, phagescript, psiX174, pbluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH18A (STRATAGENE), ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (PHARMACIA). Eucariotas: pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (STRATAGENE), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (PHARMACIA). Sin embargo, puede usarse cualquier otro vector siempre y cuando sea replicable y viable en el huésped.

20 La secuencia de polinucleótidos, preferentemente la secuencia de ADN del vector, está unida operativamente a una(s) secuencia(s) de control de expresión apropiada(s) (promotor) para dirigir la síntesis del ARNm. Como ejemplos representativos de tales promotores, pueden mencionarse promotores procariontes o eucariotas tales como el inmediato temprano del CMV, el HSV timidina quinasa, SV40 temprano y tardío, Las LTR de retrovirus, y metalotioneína-I de ratón. El vector de expresión también contiene un sitio de unión a ribosomas para el inicio de la traducción y un vector de transcripción. El vector puede incluir también secuencias apropiadas para amplificar la expresión.

25 Además, los vectores contienen preferentemente uno o más genes marcadores de selección para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células huésped transformadas tales como dihidrofolato reductasa o resistencia a la neomicina para el cultivo celular eucariota, o tal como resistencia a tetraciclina o ampicilina en *E. coli*.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "célula huésped modificada por ingeniería genética" se refiere a células huésped que han sido transducidas, transformadas o transfectadas con el polinucleótido o con el vector descritos anteriormente.

35 Como ejemplos representativos de células huésped apropiadas, pueden mencionarse las células bacterianas, tales como *E. coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium*, células fúngicas tales como levaduras, células de insecto tal como Sf9, células animales tales como CHO o COS, células vegetales, etc. La selección de un huésped apropiado se considera que ha de estar dentro del alcance de aquellos expertos en la materia a partir de las enseñanzas del presente documento.

40 Preferentemente, dicha célula huésped es una célula animal, y más preferentemente una célula humana.

La introducción en la célula huésped del polinucleótido o del vector descritos anteriormente puede efectuarse mediante un método bien conocido por los expertos en la materia, tal como transfección con fosfato cálcico, transfección mediada con DEAE-dextrano, o electroporación.

45 La composición de la invención pueden comprender uno o más aditivos (por ejemplo, estabilizantes, conservantes). Véase, en general, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, sexta edición. (varios editores, 1989-1998, Marcel Dekker); y Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery System (ANSEL *et al.*, 1994, WILLIAMS & WILKINS).

50 En una realización, la presente invención proporciona un compuesto para su uso, en terapia, seleccionado del grupo que comprende:

- 55 i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta como (SEC ID NO:10);
- ii) un polinucleótido que codifica dicho polipéptido;
- iii) un vector que comprende dicho polinucleótido; y
- iv) una célula huésped modificada por ingeniería genética que expresa dicho polipéptido.

60 En otra realización, la presente invención proporciona su uso, para tratar y/o prevenir la distrofia de conos.

Habitualmente, el medicamento puede usarse para el tratamiento terapéutico o profiláctico de un sujeto, correspondiendo dicho sujeto a un mamífero, en particular a un ser humano.

65 Como se usa en el presente documento, la expresión "trastorno neurodegenerativo" se refiere a un trastorno asociado con la degeneración de las neuronas, tales como los trastornos degenerativos del sistema nervioso central, implicando preferentemente la degeneración de las células de Purkinje, los trastornos degenerativos de los

fotorreceptores, o los trastornos degenerativos de las neuronas olfativas.

Como ejemplo de trastornos degenerativos del sistema nervioso central, puede mencionarse la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, y la enfermedad de Huntington/Corea.

5 Como ejemplo de trastornos degenerativos de los fotorreceptores, puede mencionarse la distrofia de conos (por ejemplo, la retinosis pigmentaria).

Como ejemplo de trastornos degenerativos de las neuronas olfativas, puede mencionarse la anosmia.

10 Dicho polipéptido, polinucleótido, vector, y célula huésped son como se han descrito anteriormente.

De acuerdo con un caso preferido, dicho medicamento puede usarse para tratar y/o prevenir los trastornos degenerativos de los fotorreceptores o los trastornos degenerativos de las neuronas olfativas.

15 También se proporciona la prevención y/o el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo que comprende proporcionar, a un sujeto que presenta o se predice que presenta un trastorno neurodegenerativo, una cantidad eficaz de una composición que comprende un compuesto seleccionado del grupo que comprende:

- 20 i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende la secuencia de aminoácidos de la isoforma corta del *Homo sapiens* del gen RdCVF2 (SEQ ID NO:1), ortólogos, derivados y fragmentos del mismo;
- ii) un polinucleótido que codifica dicho polipéptido;
- iii) un vector que comprende dicho polinucleótido; y
- 25 iv) una célula huésped modificada por ingeniería genética que expresa dicho polipéptido.

De acuerdo con la invención, una "cantidad eficaz" de una composición es una que es suficiente para conseguir un efecto biológico deseado, en este caso, aumentar la viabilidad neuronal. Se entiende que la dosis eficaz dependerá de la edad, del sexo, de la salud, y del peso del receptor, del tipo de tratamiento simultáneo, en caso de haberlo, de la frecuencia del tratamiento, y de la naturaleza del efecto deseado. Los intervalos de dosis eficaces proporcionados más adelante no pretenden limitar la invención y representan intervalos de dosis preferentes. Sin embargo, la posología preferente puede estar adaptada al sujeto individual, como entiende y puede determinar un experto en la materia, sin experimentación excesiva.

35 Dicho polipéptido, polinucleótido, vector, y célula huésped son como se han descrito anteriormente.

También se proporciona un método *in vitro* para realizar pruebas en un sujeto que se cree que padece o que está predispuesto a padecer un trastorno neurodegenerativo, que comprende la etapa de analizar una muestra biológica de dicho sujeto para:

- 40 i) detectar la presencia de una mutación en el gen RdCVF2 y/o en su promotor asociado, y/o
- ii) analizar la expresión del gen RdCVF2.

Como se usa en el presente documento, la expresión "muestra biológica" se refiere a cualquier muestra de un sujeto, tal como sangre o suero.

Como se usa en el presente documento, la expresión "trastorno neurodegenerativo" se refiere a un trastorno asociado con la degeneración de las neuronas, tales como los trastornos degenerativos del sistema nervioso central, los trastornos degenerativos de los fotorreceptores, o los trastornos degenerativos de las neuronas olfativas.

50 Preferentemente, el trastorno neurodegenerativo es un trastorno neurodegenerativo de los fotorreceptores, tal como la distrofia de conos (por ejemplo, la retinosis pigmentaria).

Las técnicas habituales para detectar una mutación en el gen RdCVF2 pueden incluir el polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción, técnicas de hibridación, secuenciación de ADN, resistencia a la exonucleasa, microsecuenciación, extensión en fase sólida usando los ddNTP, extensión en solución usando los ddNTP, ensayos con oligonucleótidos, métodos para detectar polimorfismo mononucleotídico, tales como la hibridación dinámica específica de alelo, reacción en cadena de ligamiento, minisequenciación, "microplacas" de ADN, hibridación con oligonucleótidos específica de alelo con sondas marcadas sencillas o dobles combinado con PCR o con balizas moleculares (*molecular beacons*), y otros.

El análisis de la expresión del gen RdCVF2 puede evaluarse mediante cualquiera de una amplia variedad de métodos bien conocidos para detectar la expresión de un ácido nucleico transcrito o proteína traducida.

65 En un caso preferido, la expresión del gen RdCVF2 se evalúa analizando la expresión del transcrito de ARNm o de los precursores de ARNm, tales como el ARN naciente, de dicho gen. Dichos análisis pueden evaluarse preparando

ARNm/ADNc de células en una muestra biológica de un sujeto, e hibridando el ARNm/ADNc con un polinucleótido de referencia. El ARNm/ADNc preparado puede usarse en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, pero no están limitados a, análisis Southern o Northern, análisis de reacción en cadena de la polimerasa, tales como PCR cuantitativa (TaqMan), y series de sondas tales como series de ADN GeneChip™ (AFFYMETRIX).

5 Ventajosamente, el análisis del nivel de expresión del ARNm transcrito del gen RdCVF2 implica el proceso de amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, por RT-PCR (realización experimental expuesta en el N.º de patente estadounidense 4.683.202), por reacción en cadena de la ligasa (BARANY, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., vol. 88, p: 189-193, 1991), por replicación de secuencia autosostenida (GUATELLI *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., vol. 87, 10 p: 1874-1878, 1990), por sistema de amplificación transcripcional (KWOH *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., vol. 86, p: 1173-1177, 1989), por Q-Beta replicasa (LIZARDI *et al.*, Biol. Technology, vol. 6, p: 1197, 1988), por replicación de círculo rodante (N.º de patente estadounidense 5.854.033) o por cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos, seguido de la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas que los expertos en la materia conocen bien. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de 15 moléculas de ácido nucleico si dichas moléculas están presentes en números muy bajos. Como se usa en el presente documento, los cebadores de amplificación se definen como un par de moléculas de ácido nucleico que pueden hibridarse en regiones 5' o 3' de un gen (cadenas positivas y negativas, respectivamente, o viceversa) y contienen una región corta entre medias. En general, los cebadores de amplificación tienen una longitud de aproximadamente 10 a 30 nucleótidos y flanquean una región de aproximadamente 50 a 200 nucleótidos de 20 longitud. En las condiciones adecuadas y con los reactivos adecuados, tales cebadores permiten la amplificación de una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos flanqueada por los cebadores.

En vista de la presente solicitud, un experto en la materia puede identificar simplemente la secuencia del gen RdCVF2 en un sujeto.

25 Como ejemplo, la secuencia del ADNc que codifica la isoforma corta de RdCVF2 del *Homo sapiens* tiene la secuencia SEQ ID NO.11.

30 En otro ejemplo preferente, la expresión del gen RdCVF2 se evalúa analizando la expresión de la proteína traducida a partir de dicho gen. Dicho análisis puede evaluarse usando un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo marcado con radio, marcado con cromóforo, marcado con fluoróforo o marcado con enzima), un derivado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de anticuerpo con un sustrato o con la proteína o ligando de una proteína de un par proteína/ligando (por ejemplo, biotina-estreptavidina)), o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monocatenario, un dominio hipervariable del anticuerpo aislado, etc.) que se une específicamente a la proteína 35 traducida a partir del gen RdCVF2.

Dicho análisis puede evaluarse mediante una variedad de técnicas bien conocidas por los expertos en la materia, incluyendo, pero no limitándose a, ensayo inmunoenzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA), análisis de transferencia Western y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (RIA).

40 Los anticuerpos policlonales pueden prepararse inmunizando un animal adecuado, tal como un ratón, conejo o cabra, con una proteína codificada por el gen RdCVF2 o un fragmento del mismo. El título de anticuerpos en el animal inmunizado puede monitorizarse a lo largo del tiempo mediante técnicas convencionales, tales como con ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando un polipéptido inmovilizado. En un tiempo apropiado 45 después de la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpos específicos son los más altos, las células productoras de anticuerpos pueden obtenerse del animal y usarse para preparar anticuerpos monoclonales (mAb) mediante técnicas convencionales, tales como la técnica de hibridoma descrita originalmente por KOHLER y MILSTEIN (Nature, vol. 256, p: 495-497, 1975), la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (KOZBOR *et al.*, Immunol., vol. 4, p: 72, 1983), la técnica de hibridoma-VEB (COLE *et al.*, In Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., p: 77-96, 1985) o técnicas de trioma. La tecnología para producir hibridomas es bien conocida (véase generalmente Current Protocols in Immunology, COLIGAN *et al.* ed., John Wiley & Sons, Nueva York, 1994). Las células de hibridoma que producen el anticuerpo monoclonal deseado se detectan identificando los sobrenadantes de cultivo de hibridoma para los anticuerpos que se unen al polipéptido de interés, por ejemplo, usando un ensayo ELISA convencional.

55 El método de la invención puede comprender comparar el nivel de expresión del gen RdCVF2 en una muestra biológica de un sujeto con el nivel de expresión normal de dicho gen en un control. Un nivel de expresión de dicho gen significativamente más débil en la muestra biológica de un sujeto en comparación con el nivel de expresión normal, es un indicio de que el paciente padece o está predispuesto a desarrollar un trastorno neurodegenerativo.

60 El nivel "normal" de expresión del gen RdCVF2 es el nivel de expresión de dicho gen en una muestra biológica de un sujeto no afectado por ningún trastorno neurodegenerativo, preferentemente no afectado por retinosis pigmentaria. Preferentemente, dicho nivel normal de expresión se evalúa en una muestra de control (por ejemplo, una muestra de un sujeto sano, que no está afectado por ningún trastorno neurodegenerativo) y preferentemente, el nivel de 65 expresión medio de dicho gen en varias muestras de control.

A continuación, la invención se describe con mayor detalle en relación con las secuencias de aminoácidos, las secuencias de ácidos nucleicos y los ejemplos.

Ejemplos

5

1) Identificación de RdCVF2, un gen parálogo a RdCVF

El gen RdCVF de ratón se localiza en el cromosoma 8 y contiene tres exones y puede transcribirse en dos variantes de corte y empalme distintas que corresponden a RdCVF-L (larga) y RdCVF-S (corta), respectivamente.

10

En la figura 1, panel a, se describe la estructura de ambas variantes de corte y empalme de RdCVF. El ARNm de RdCVF-L (NM_145598, cromosoma 8 de ratón, cadena negativa, de 70'033'763 a 70'027'717) se compone de tres exones (1-3) de 348, 687 y 1751 pb. El ARNm de RdCVF-S (BC017153, de 70'033'785 a 70'032'615) se compone de un exón (1172 pb). Las regiones codificantes y no codificantes están representadas en gris oscuro y en gris claro respectivamente. La región genómica que rodea el codón de terminación en el extremo del primer exón codificante y las secuencias ortólogas correspondientes en 12 genomas de otros vertebrados están alineadas. Los triángulos negros indican el extremo del primer exón codificante de RdCVF-L. Los codones de terminación conservados están en color rojo. Al final, se ofrecen las longitudes de las regiones codificantes (CDS) y de las regiones no traducidas (UTR, por las siglas *untranslated regions*) terminales.

15

La variante de corte y empalme de RdCVF-L se compone de tres exones, cuya variante codifica una proteína en la que los últimos 109 amino ácidos se denominan "cap" (caperuzón).

20

La variante de corte y empalme de RdCVF-S se compone de un único exón en el que la secuencia codificante es la misma que el primer exón de la forma larga extendida por un codón seguido de un codón de terminación (TGA) y finalmente una región 3' (UTR) no traducida.

25

En consecuencia, el "cap" (es decir, los últimos 109 amino ácidos) de RdCVF-L faltan en RdCVF-S.

30

Una búsqueda BLAST en las bases de datos permitió la identificación de un gen parálogo denominado RdCVF2.

En la figura 1, panel b, se describe la estructura de ambas variantes de corte y empalme de RdCVF2. El ARNm de RdCVF2-L (AK015847, cromosoma 13 de ratón, cadena positiva, de 50'202'630 a 50'206'797) se compone de dos exones (1-2) de 603 y 564 pb. El ARNm de RdCVF2-S (BC016199, de 50'202'667 a 50'205'571) se compone de un exón (2904 pb). Las regiones codificantes y no codificantes están representadas en gris oscuro y en gris claro respectivamente. La región genómica que rodea el codón de terminación en el extremo del primer exón codificante y las secuencias ortólogas correspondientes en 12 genomas de otros vertebrados están alineadas. Los triángulos negros indican el extremo del primer exón codificante de RdCVF2-L. Los codones de terminación conservados están en color rojo. Al final, se ofrecen las longitudes de las regiones codificantes (CDS) y de las regiones no traducidas (UTR) terminales.

35

Este análisis permite localizar el gen RdCVF2 en el cromosoma 13 y demostrar que las secuencias de RdCVF y RdCVF2 y las estructuras genéticas son muy similares entre ambas. De hecho, parece que RdCVF2 también codifica, tanto la proteína de tipo tiorredoxina (156 aa, SEQ ID NO.12), como una forma más corta (101 aa, SEQ ID NO.2) denominadas RdCVF2-L y RdCVF2-S, respectivamente.

40

Finalmente, el análisis secuencial ha revelado que el grado de homología entre RdCVF y RdCVF2 es del 58,0 % para las isoformas largas y del 53,5 % para las isoformas cortas.

45

2) Conservación de la estructura genética de RdCVF y RdCVF2 durante la evolución

La viabilidad de los conos se relaciona con la producción de la forma RdCVF-S y, por extensión, con la presencia del codón de terminación en el extremo del primer exón requerido para obtener tal isoforma.

50

Para evaluar aún más la conservación de dicho codón de terminación, el servidor del buscador BLAT de genoma UCSC (HINRICHS *et al.*, Nucleic Acids Revs., vol. 34 (publicación de la base de datos): D590-598, 2006; KENT, Genome Res., vol. 12(4): 656-664, 2002) se usó para mapear los genes RdCVF y RdCVF2 de ratón de todos los genomas de vertebrados disponibles y para extraer las secuencias genómicas correspondientes.

55

Los resultados han mostrado que ambos locus se hallaron en 13 vertebrados. Todos estos organismos manifestaron ambos genes exceptuando *Takifugu rubripes* y *Tetraodon nigroviridis*, en los que RdCVF se duplicó en la misma ubicación cromosómica (RdCVF a y b) con un intrón adicional insertado en el primer exón codificante de estos locus. Merece la pena destacar que el codón de terminación en el extremo del primer exón se conserva estrictamente en su gran mayoría (figura 1, paneles a y b).

60

Finalmente, esta observación implica la posible existencia de isoformas cortas de RdCVF en la mayoría de los

65

vertebrados, exceptuando RdCVF en *Gallus gallus* y *Brachydarzio rerio*; RdCVFb en *Tetraodon nigroviridis* y *Takifugu rubripes*.

3) Análisis de las secuencias de proteínas de RdCVF y RdCVF2

Para identificar las proteínas ortólogas candidatas de RdCVF y RdCVF2, se realizaron búsquedas de homología en las bases de datos públicas de secuencias UniProt (WU *et al.*, Nucleic Acids Res., vol. 34 (publicación de la base de datos), p: D187-191,2006) y EMBL (COCHRANE *et al.*, Nucleic Acids Res., vol. 34 (publicación de la base de datos): D10-15, 2006), usando los programas BLAST (ALTSCHUL *et al.*, J. Mol. Biol., vol. 215(3): 403-410, 1990; ALTSCHUL *et al.*, Nucleic Acids Res., vol. 25(17): 3389-3402, 1997).

Las proteínas ortólogas a RdCVF(-L/2-L) que se refieren a las isoformas largas de ambos genes RdCVF, se identificaron o predijeron en vertebrados (*Rattus norvegicus*, *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Bos taurus*, *Canis familiaris*, *Gallus gallus*, *Xenopus laevis*, *Tetraodon nigroviridis*, *Brachydanio rerio*) de acuerdo con las búsquedas en las bases de datos de proteínas o genoma.

Después, se usaron los programas TBA (BLANCHETTE *et al.*, Genome Res., vol. 14(4): 708-715, 2004) y PipeAlign (PLEWNIK *et al.*, Nucleic Acids Res., vol. 31(13): 3829-3832, 2003) con parámetros por defecto para generar los múltiples alineamientos de secuencias de genomas y proteínas, respectivamente. Puntualmente, el alineamiento de proteínas incluía ajustes manuales en consonancia con la conservación de la estructura secundaria de la proteína.

La figura 2 (panel a) muestra el alineamiento de secuencias de RdCVF, RdCVF2, triparredoxina (TRYX), nucleorredoxina (NXN) y tiorredoxina (TXN). Se ofrecen (a la izquierda) el nombre, organismo y número de registro (entre paréntesis) de cada secuencia de proteína. Los restos conservados idénticos (texto blanco sobre fondo negro) pequeños (A, D, G, P, S, T; texto blanco sobre fondo verde) hidrófobos (A, C, F, G, I, L, M, S, T, V, W, Y; texto negro sobre fondo amarillo) polares (D, E, H, K, N, Q, R, S; texto azul) y cargados (D, E, K, R; texto blanco sobre fondo rojo) se muestran de acuerdo con un umbral de conservación del 85 %. Una secuencia de consenso se ofrece bajo los múltiples alineamientos en los que s, h, p y c corresponden a los restos pequeños, hidrófobos, polares y cargados, respectivamente. Las estructuras secundarias (lámina β y hélice α) de la estructura I de la triparredoxina (1EWX) de *Crithidia fasciculata* se ofrecen debajo de la secuencia de consenso. Los rectángulos de puntos azules indican las tres inserciones específicas de RdCVF(2). El rectángulo de puntos verde muestra la región del "cap" ausente en RdCVF(2)-S. Se indica (triángulo rojo) la posición del producto de escisión de la tiorredoxina humana (TRX80). El panel b presenta la estructura de los modelos TRYX-I (1EWX) (izquierda), RdCVF-L de ratón (centro) y RdCVF2-L de ratón (derecha) de *Crithidia fasciculata*. Las regiones de la cadena principal de TRYX-I conservada en RdCVF(2)-L están coloreadas con rojo. La región "cap" (caperuza) y las tres inserciones específicas están representadas con verde y azul, respectivamente. El supuesto sitio catalítico (C₄₄XXC₄₇) se muestra en amarillo con una representación de relleno de espacio.

Un análisis filogenético entre la superfamilia de TXN estableció que las proteínas RdCVF y RdCVF2 están estrechamente relacionadas con los miembros de TRYX y NXN (MICOSS *et al.*, Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr., vol. 58 (Pt 1): 21-28, 2002; KRUMME *et al.*, Biochemistry, vol. 42(50): 14720-14728, 2003; ALPHEY *et al.*, J. Biol. Chem., vol. 274(36): 25613-25622, 1999; EKLUND *et al.*, Proteins, vol. 11(1): 13-28, 1991; KUROOKA *et al.*, Genomics, vol. 39(3): 331-339, 1997; LAUGH-NER *et al.*, Plant Physiol., vol. 118(3): 987-996, 1998). Incluso los homólogos distantes tales como la triparredoxina I de *Crithidia fasciculata* (O96438, TRYX-I) (ALPHEY *et al.*, 1999, anteriormente mencionada) manifiestan 42,5 % y 45,4 % de similitud secuencial con respecto a las proteínas de ratón RdCVF(-L/2-L). Tres inserciones en el alineamiento múltiple (denominadas 1,2 y 3) permiten distinguir estas familias de proteína filogenética (figura 2, panel a).

La inserción 3 (restos 87-110) contiene el motivo conservado WLALP [W₁₀₈(L,V)(A,F)(L,V,I)P₁₁₂] y discrimina claramente la familia TRYX [TRYX, NXN, RdCVF y RdCVF2] de la superfamilia TXN.

La inserción 2 (63-72) y dos restos adicionales (96-97) de la inserción 3 permiten diferenciar las proteínas RdCVF y RdCVF2 del resto de la familia TRYX.

Finalmente, la inserción 1 (16-21) separa inequívocamente RdCVF de todos los otros miembros de la familia TXN, incluyendo RdCVF2. Ha de observarse que el sitio activo de la tiorredoxina C₄₄XXC₄₇ solo se conserva en el 44,4 % (4/9) y 72,7 % (8/11) de las proteínas de vertebrados RdCVF y RdCVF2, respectivamente.

4) Modelización estructural de RdCVF y RdCVF2

La alta similitud de la secuencia de las RdCVF con las proteínas TRYX incitó la creación de los modelos estructurales RdCVF(-L/2-L/-S/2-S) con la estructura cristalina TRYX-I de *Crithidia fasciculata* (número de registro PDB: 1EWX, estructura de resolución 1,7 Å) (ALPHEY *et al.*, 1999, anteriormente mencionada) como molde. Por analogía con los modelos de TXN y TRX80 humanos (PEKKARI *et al.*, 2000, anteriormente mencionada) se asumió que los modelos de la estructura RdCVF(-S/2-S) mantenían el mismo plegamiento total. Los modelos estructurales para las RdCVF y RdCVF2 de ratón (ambas formas S y L) usando los primeros restos 155 y 147, respectivamente,

se crearon usando el paquete de modelización por homología Builder (KOEHL y DELARUE, J. Mol. Biol., vol. 239(2): 249-275, 1994; KOEHL y DELARUE, Nat. Struct. Biol., vol. 2(2): 163-170, 1995; KOEHL y DELARUE, Curr. Opin. Struct. Biol., vol. 6(2): 222-226, 1996). Los modelos finales se volvieron a perfeccionar mediante minimización de energía, usando ENCAD (LEVITT *et al.*, Computer Physics Comm., vol. 91: 215-231, 1995). En cada modelo se aplicaron 1000 etapas de minimización en gradiente conjugado. La mutación E₁₄₆(1EWX)→P₁₄₆(RdCVF-L) obliga a que la conformación de la cadena principal local en la estructura del molde se adapte para ajustarse a la prolina. Builder muestrea simultáneamente la conformación de los bucles en las cinco inserciones/supresiones y en la región de mutación E→P, y la conformación de cadenas laterales, usando un enfoque de campo medio autoconsistente. PyMOL (www.pymol.org) se usó para reproducir las estructuras finales.

La figura 2 (panel b) muestra las estructuras de TRYX-I (1EWX y RdCVF(-L/2-L)).

La figura 2 presenta las estructuras secundarias de 1EWX (lámina β y hélice α) debajo del alineamiento múltiple (panel a) y en la estructura 3D de TRYX-I (panel b).

La modelización estructural muestra que las inserciones 1, 2 y 3 corresponden respectivamente a: un aumento del tamaño de las láminas $\beta_{1.1}$ - $\beta_{1.2}$, una extensión de un giro en la hélice α_2 , y una región estructural más grande que contiene la extensión α_{sup} - β_{sup} y α_3 específica de TRYX. Los dos restos (96-97) que pertenecen a la inserción 3 en las proteínas RdCVF corresponden a un bucle contraído mayor delante de la cadena β_{sup} y permiten discriminar estas proteínas de los miembros de TRYX. Merece la pena destacar que la ubicación sobre la proteína plegada donde se localizan las tres inserciones está en el lado opuesto del supuesto sitio catalítico (C₄₄XXC₄₇) en RdCVF (figura 2, panel b).

Finalmente, la región C-terminal ausente en las proteínas RdCVF(-S/2-S) (en lo sucesivo, denominada "cap" y representada en verde en la figura 2, panel b) está fijada posicionalmente relativa al sitio catalítico. La región "cap" en las proteínas TXN interactúa con la enzima de reciclaje tiorredoxina reductasa [7, 13] y su ausencia podría afectar a la actividad de la tiorredoxina en TRX80 y RdCVF(-S/2-S) [4, 13].

Una característica llamativa de estos modelos estructurales es la clara proximidad espacial de los restos de las tres inserciones. Esta coincidencia apunta a un posible sitio de interacción novedoso en RdCVF(-L/2-L). Como se esperaba, la conformación de la cadena principal del modelo perfeccionado de RdCVF(-S/2-S) es la misma que su equivalente en las formas largas, con menores modificaciones observadas en las cadenas laterales en la interfaz entre las regiones de "cap" y sin "cap". Debería destacarse que la ausencia del "cap" produce la aparición de un parche hidrófobo mayor en la superficie de RdCVF(-S/2-S). Como consecuencia, la parte hidrófoba del área de superficie accesible de las proteínas RdCVF aumenta de 2394 Å² en la forma larga a 3157 Å² en la forma corta.

4) RdCVF-S, RdCVF2-S y RdCVF2-L se expresan en la retina dependiendo de los bastones

El ARN total de la retina neural de ratones de tipo silvestre (C57BL/6@N) y rd1 mutante (C3H/He@N) de 8, 15 y 35 días de vida y del epitelio olfativo (Balb/c) se purificó mediante gradiente en cesio (CHIRGWIN *et al.*, Biochemistry, vol. 18(24): 5294-5299, 1979).

El ADNc bicatenario se sintetizó a partir de 5 µg de ARN total usando Superscript Choice System (INVITROGEN), los ADNc se produjeron por estimulación aleatoria y se normalizaron de acuerdo con el ARNm de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). La primera cadena de ADNc (0,2 µl) se amplificó por triplicado usando 2 µM de los cebadores específicos. Los cebadores 5'- CATCAC- CAACAAAGGGCGGAAG -3' (SEQ ID NO.13) y 5'- CATTCTCAGCAGAGAAGGGAAC -3' (SEQ ID NO.14) se usaron para RdCVF2-S; los cebadores 5'- CCGTGCTATTGTTTCAGAGCCCTTAACCTTTCTATC -3' (SEQ ID NO.15) y 5'- CT-GACACTCCAATCGTAAAAGGCAGAAAACGC -3' (SEQ ID NO.16) se usaron para RdCVF2-L. Los cebadores 5'- AAGCCGAT- GAGCAACTTCC-3' (SEQ ID NO.17) y 5'-TCATCTCCCAGTGGATTCTT-3' (SEQ ID NO.18) se usaron para la rodopsina en un LigthCycler (Roche, Basel, Suiza).

Para llevar a cabo análisis de transferencia Northern, se usaron 2 µg de ARNm poli-A y la membrana se hibridó con una sonda correspondiente al exón 1 del gen RdCVF2 usando un método convencional.

La ausencia de contaminación de ADN se comprobó omitiendo la transcriptasa inversa. Los resultados se presentan como factor de diferencia en comparación con la expresión más baja.

La figura 3, panel a, muestra los resultados de RT-PCR en la retina de los ratones de tipo silvestre y rd1 en el día 35 posparto para las isoformas cortas (RdCVF2-S, fragmento 176 pb) y largas (RdCVF2-L, fragmento 170 pb) de RdCVF2.

La figura 3, panel b, muestra la expresión de los transcritos de RdCVF2 en el cerebro, testículos, retina normal (ts), retina degenerada (rd1) y en todo el embrión del ratón en el día embrionario 12,5 (ED12,5).

Los resultados establecieron que RdCVF2-S y -L se expresan en la retina del ratón de tipo silvestre (figura 3, panel

a). Curiosamente, la expresión de RdCVF2-S y -L estaba ausente en la retina del ratón rd1 tras la degeneración de los fotorreceptores de bastones. Los resultados también muestran que además de la expresión en la retina, más probablemente por los fotorreceptores de bastones ya que su expresión está ausente en la retina degenerada (rd1), se observa una expresión más débil de RdCVF2 en el cerebro y los testículos. Además, los resultados han mostrado que una expresión de los dos ARN mensajeros que corresponden a las isoformas corta (RdCVF2-S) y larga (RdCVF2-L) también se detecta en el epitelio olfativo. Finalmente, no se detectó ninguna expresión en el todo el embrión del ratón en el día embrionario 12,5.

La expresión del ARNm de RdCVF2-S y -L en la retina y en el epitelio olfativo se analizó mediante hibridación *in situ* con una ribosonda antisentido murina marcada con digoxigenina (DIG).

La RdCVF2-S y RdCVF2-L de ratón se amplificó mediante PCR usando los siguientes cebadores: cebadores 5'-GTAGCTTT- GTACTTTGCGGCG-3' (SEQ ID NO.19) y 5'-GTCATCAGAAAATGTATCACCTCCATAGG-3' (SEQ ID NO.20) para RdCVF2-S; cebadores 5'-GCCATCTCTGCGACTTATTTTTACC-3' (SEQ ID NO.21) y 5'-AATTAGTGCCACCAGCACCATC-3' (SEQ ID NO.22) para RdCVF2-L. El producto de la PCR se clonó en el vector fácil PGEM (PROMEGA). Las sondas sentido y antisentido de ARNm RdCVF2 generadas a partir de los promotores SP6 o T7 y marcadas con digoxigenina-UTP (ROCHE) se generaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Después de descongelar y secar a temperatura ambiente, las secciones de la retina y el epitelio olfativo se fijaron posteriormente sobre hielo durante 10 minutos en paraformaldehído al 4 % lavado en PBS a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las secciones de retina se hibridaron con sondas sentido y antisentido de ARNm de RdCVF2 generadas a partir de los promotores SP6 o T7 y marcadas con digoxigenina-UTP. La hibridación *in situ* y la detección de sondas marcadas con digoxigenina se realizó como se ha descrito anteriormente (ROGER *et al.*, Dev. Biol., vol. 298(2): 527-539, 2006). La especificidad de la tinción se demostró por la falta de señal de hibridación con la sonda sentido.

La figura 3, panel c, muestra los resultados de la hibridación *in situ* en las secciones de la retina de los ratones de tipo silvestre y rd1 con RdCVF2-S marcado con digoxigenina y ribosondas L (AS: antisentido, S: sentido). Ampliación original: 40x.

Los resultados muestran que los transcritos para RdCVF2-S y -L fueron detectados en la capa del fotorreceptor. No se observó tinción con las sondas de control sentido, soportando la especificidad de las sondas de RdCVF2-S y L. Finalmente, no se detectó expresión en la retina de rd1 tras la degeneración de los bastones (no se muestra el resultado). Además, los resultados han mostrado que la ubicación de las células marcadas en el epitelio olfativo sugiere que las células basales, neuronas inmaduras y maduras expresan claramente ARNm de RdCVF2, y que no se observó ninguna expresión de ARNm de RdCVF2 en la posición apical del citoplasma de las células de soporte. Ha de destacarse que también se observó una pequeña expresión de ARNm de RdCVF2 durante el desarrollo (E12,5) específicamente restrictivo con respecto al desarrollo nasal.

Finalmente, la expresión de RdCVF2-S y de RdCVF2-L se analizó durante el proceso de degeneración de los bastones.

La figura 3, panel d, muestra el curso temporal de la expresión de ambas isoformas de RdCVF2 y los transcritos de rodopsina en ratones de tipo silvestre (ts) y rd1 en el día posparto 8, 15 y 31 (PN8, PN15 y PN35).

Los resultados establecieron que en el día posparto 8 (PN8) antes del comienzo de la pérdida de bastones, RdCVF2-S se expresó a un nivel similar en la retina del tipo silvestre y del tipo rd1 de manera similar al gen de la rodopsina del fotopigmento de los bastones. De PN15 a PN35, la degeneración de los bastones (medida por el descenso de la expresión de la rodopsina) está correlacionada con un descenso en la expresión de RdCVF2-S. En consecuencia, los resultados indican que RdCVF2-S se expresa dependiendo de los bastones.

Se han observado los mismos resultados con RdCVF2-L (no se muestran los datos).

5) El ARNm de RdCVF2 no solo se expresa en la retina y en el epitelio olfativo, sino también en otros tejidos

El ARNm de ratón y las secuencias EST asociadas con ambas isoformas de RdCVD y RdCVF2 (L y S) se usaron para estimar la especificidad del tejido de cada mensajero. Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Genes	Isoforma	Números de registro del ARNm y EMBL EST	Ubicación de la expresión
RdCVF	L	BC021911; BI738445; CB849876; CK623520; BI731629; BI872244; BG294111; BI734135; BU505070; BU840744; BQ929742; BQ938066; BI73223; CK628091; BY742305; N539863; CO424399; BB277874; BB279867; CO42641	Retina, EPR, coroides y/u ojo
	S	BF470336; BE983242; AW495183 BC017153; CB849876; BG299078; BY742292	Ninguna Retina y/u ojo

Genes	Isoforma	Números de registro del ARNm y EMBL EST	Ubicación de la expresión
RdCVF-2	L	CK621895; CK620198; BG288447; BB282056; BB279962; BB281743; BB277718; BB277574; BB277714; B1732427	Retina
		BC038905; BI108740	Tumor mamario, tumor y/o tejido total
		BY715393; AV266697	Testículos
		DT906804	Células madre hematopoyéticas
		BY435086	Amnios
Genes	Isoforma	Números de registro del ARNm y EMBL EST	Ubicación de la expresión
		AI324093	Placenta
		BB552115	Oviducto
		AA261233	Feto
		BB241367	Timo
		AI536471	Glándula mamaria
		BX632214; BF460609; BX514476	
		BC016199; BG297304; BG297383	Retina
	S	BX514476	Ninguna

Como se informó anteriormente (LEVEILLARD *et al.*, 2004, anteriormente mencionada), los resultados confirmaron que los ARNm de RdCVF-L y RdCVF-S se expresan específicamente en el ojo y la retina a la vez que se hallaron las secuencias 20/23 y 4/4 en estos tejidos, respectivamente. Los resultados muestran que el ARNm de RdCVF2 de ratón también se expresa preferentemente en la retina (10/24), pero también está presente en otros tipos de tejido tales como tumor (2), testículos (2), células madre (2), amnios (1), placenta (1), oviducto (1), feto (1), timo (1), y glándula mamaria (1). Estos resultados confirmaron la expresión de RdCVF2 observada en los testículos y el cerebro (figura 4, panel b). Finalmente, las secuencias de ARNm y EST que corresponden a RdCVF2-S se expresan exclusivamente en la retina (3/4).

6) Efectos de la viabilidad de los conos en RdCVF2

Las fuertes similitudes entre los locus de RdCVF y RdCVF2 en términos de organización de genes, conservación de la secuencia y expresión dependiente de los conos lleva a formular la hipótesis de que la proteína RdCVF2 también podría ser capaz de promover la viabilidad de los conos, como se indicó anteriormente para RdCVF-S (LEVEILLARD *et al.*, 2004, anteriormente mencionada).

Las isoformas de RdCVF(-S/2-S/2-L) se clonaron en los plásmidos de expresión pcADN3 y se transfectaron en células COS-1. Tras 48 horas después de la transfección, el medio condicionado de las células COS transfectadas se recogió e incubó con un sistema de cultivo de células primario enriquecido con conos de embriones de pollo (60-80 % de conos) (FINTZ *et al.*, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., vol. 44(2): 818-825 2003).

Tras siete días de incubación, un periodo durante el cual estas células postmitóticas degeneran, la viabilidad de las células en el cultivo se puntuó usando el ensayo Live/Dead (MOLECULAR PROBES) y una plataforma de recuento de células, como se ha descrito anteriormente [4]. La viabilidad que corresponde a los tres ensayos independientes se representa como plegamiento sobre pcADN3 usado como control negativo.

La figura 4 muestra la actividad de rescate de RdCVF-S y RdCVF2-S cuando se compara con la del vector vacío (pcADN3). El análisis estadístico (prueba Tuckey) muestra que los resultados son estadísticamente significativos ($p < 0,001$).

Los resultados muestran que el número de células vivas en presencia de RdCVF-S es el doble que el del control (pcADN3). Se observa un aumento menos pronunciado, pero estadísticamente significativo, en la viabilidad de los conos (1,6 veces) para RdCVF2-S. Estos hallazgos confirman que RdCVF2-S también es un factor de viabilidad de conos similar a RdCVF-S (LEVEILLARD *et al.*, 2004, anteriormente mencionada). De manera importante, no se observa ningún efecto trófico sinérgico en los conos cuando ambas RdCVF-S y RdCVF2-S se transfectan conjuntamente en las células COS-1, apuntando al uso de la misma ruta por ambos factores (no se muestran los datos).

7) Efectos de viabilidad de NSO de RdCVF2

Ya que RdCVF2 también se expresa en las neuronas olfativas, se ha analizado la posible actividad de viabilidad de RdCVF2 en el cultivo de las neuronas sensitivas olfativas (NSO).

Ratones adultos se sacrificaron por decapitación. La parte posterior del tabique nasal se diseccionó sin la cavidad nasal y se colocó inmediatamente en medio frío de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía 50 µg/ml de gentamicina (EUROBIO; GIBCO) y 10 % (v/v) de suero fetal de ternero (EUROBIO). Se retiró el cartílago del

tabique y se incubó la mucosa olfativa durante 30 minutos a 37 °C en una solución de 2,4 unidades/ml de dispasa II (ROCHE). El epitelio olfativo se separó cuidadosamente de la lámina propia subyacente con un microscopio de disección y se trituró con cuidado aproximadamente 20 veces para separar las células. La suspensión celular resultante se transfirió a un tubo cónico de 50 ml y la dispasa se inactivó añadiendo 40 ml de HBSS sin calcio y magnesio. La suspensión celular se centrifugó a 700 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró y el sedimento que contenía las células se resuspendió en un medio compuesto de DMEM que contenía insulina (10 µg/ml, SIGMA), transferrina (10 µg/ml, SIGMA), selenio (10 µg/ml, SIGMA), suero fetal de ternero (5 %), ácido ascórbico (200 µM). Las células se sembraron en una placa a la densidad de las células/cm² sobre cubreobjetos de vidrio estéril de 12 mm revestidos con 5 µg/cm² de colágeno IV humano (SIGMA).

Los vectores de expresión que codifican las isoformas de RdCVF(-S/2-S/2-L) descritas anteriormente se transfectaron en células COS-1. Tras 48 horas después de la transfección, el medio condicionado de las células COS transfectadas se recogió e incubó con el cultivo de NSO. Tras 4 días de cultivo, las células se fijaron y marcaron con tubulina III, y se contaron.

Los resultados mostrados en la figura 5 han establecido que la viabilidad celular de NSO fue más importante en presencia de la isoforma de RdCVF2-S en comparación con el control. Se observaron efectos protectores con RdCVF2-L.

8) Efectos de viabilidad de las células de Purkinje de RdCVF2

Tras la decapitación del ratón en el día posparto 1-3, los cerebros se diseccionaron en solución salina equilibrada de Gey que contenía 5 mg/ml de glucosa, y se extirparon las meninges. Las fracciones parasagitales de cerebelo (de 350 o 250 µm de grosor) se cortaron con una cuchilla de tejido McIlwain y se transfirieron sobre membranas de insertos de cultivo MILLIPORE de 30 mm con un tamaño de poro de 0,4 µm (MILLICELL; MILLIPORE, Bedford, Massachussets). Las fracciones se mantuvieron en cultivo en placas de seis pocillos que contenían 1 ml o en placas de cultivo de 10 cm que contenían 3 ml de medio a 35 C en una atmósfera de CO₂ humidificado al 5 %. El medio se componía de 50 % de medio basal con sales de Earle (INVITROGEN), 25 % de HBSS (INVITROGEN), 25 % de suero de caballo (INVITROGEN), L-glutamina (1 mM), y 5 mg/ml de glucosa (Stoppini *et al.*, J. Neurosci. Method., vol. 37(2), p: 173-82, 1991).

Los vectores de expresión que codifican las isoformas de RdCVF(-S/2-S/2-L) descritas anteriormente se transfectaron a células COS-1. Tras 48 horas después de la transfección, el medio condicionado de las células COS transfectadas se recogió e incubó con el cultivo de las células de Purkinje. Tras 4 días de cultivo, las células se fijaron y contaron.

9) Efectos de viabilidad de las neuronas corticales de RdCVF2

La preparación sin suero de los cultivos primarios corticales de ratón se realizó con el ratón en el día 1 posparto. Tras la extirpación de las meninges, todas las cortezas se disociaron mecánicamente en una solución de glucosa con solución salina tamponada con fosfato sin la adición de cationes divalentes (NaCl 100 mM, KCl 3 mM, LH₂PO₄ 1,5 mM, Na₂HPO₄ 7,9 mM, glucosa 33 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin) y se resuspendieron en un medio Neurobasal (GIBCO-INVITROGEN) que contenía 2 % de suplemento B27 (GIBCO), glutamina 0,5 mM y glutamato 25 µM. Después, las células se cultivaron en cubreobjetos revestidos con poli-ornitina para producir cultivos altamente enriquecidos en neuronas.

Los vectores de expresión que codifican las isoformas de RdCVF(-S/2-S/2-L) descritas anteriormente se transfectaron a células COS-1. Tras 48 horas después de la transfección, el medio condicionado de las células COS transfectadas se recogió e incubó con el cultivo de neuronas corticales. Tras 4 días de cultivo, las células se fijaron y contaron.

Finalmente, los resultados establecieron que se había identificado un factor trófico novedoso para la supervivencia de los conos, y más generalmente para la supervivencia de las neuronas. Este factor define una familia novedosa de proteínas bifuncionales con posible intervención en la neuroprotección y en la respuesta al estrés oxidativo.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSERM Léveillard, Thierry

<120> NUEVO FACTOR DE VIABILIDAD NEURONAL Y USO DEL MISMO

<130> 353047/D25504

<150> EP 07109652.3

<151> 05-06-2007

ES 2 623 464 T3

<160> 78

<170> PatentIn versión 3.3

5 <210> 1
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 1

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 Ser 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
 100

15 <210> 2
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20 <400> 2

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

ES 2 623 464 T3

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

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

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

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

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

Asp Pro Tyr Arg Gln
 100

<210> 3
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

5

<400> 3

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

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

Phe Ala Ala Gly Arg Cys Ala 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 Arg Ser Ala Glu Glu Met Leu
 65 70 75 80

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

Asp Pro Tyr Arg Gln
 100

10

<210> 4
 <211> 101
 <212> PRT

ES 2 623 464 T3

<213> *Pan troglodytes*

<400> 4

```

Met Val Asp Ile Leu Gly Gly 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 Ser 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
                               100

```

5

<210> 5

<211> 101

<212> PRT

10 <213> *Bos taurus*

<400> 5

```

Met Val Asp Val Leu Gly Gly Arg Arg Leu Val Thr Cys Asp Gly Ala
 1                               5                               10                               15

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

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

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

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

```

ES 2 623 464 T3

Glu Phe Met Lys Glu Leu His Gly Ala Trp Leu Ala Leu Pro Phe His
 85 90 95

Asp Pro Tyr Arg Gln
 100

5 <210> 6
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> *Gallus gallus*
 <400> 6

Met Val Asp Val Phe Ser Gly Arg Leu Leu Val Ser Lys Asp Gly Arg
 1 5 10 15

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

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

Cys Asp Phe Tyr Thr Asp Leu Leu Glu Glu Cys Gln Pro Pro Ala Pro
 50 55 60

Phe Glu Val Val Phe Ile Ser Ser Asp His Ser Ala Glu Glu Met Val
 65 70 75 80

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

10 Asp Pro Tyr Lys Gln
 100

15 <210> 7
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> *Xenopus laevis*
 <400> 7

Met Asp Ile Phe Ser Gly His Ile Leu Leu Asn Lys Tyr Gly Glu Arg
 1 5 10 15

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

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

ES 2 623 464 T3

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

Glu Ile Val Phe Ile Ser Ser Asp Lys Ser Pro Glu Glu Met Val Asp
 65 70 75 80

Tyr Met His Asp Met Gln Gly Asp Trp Leu Ala Leu Pro Phe His Asp
 85 90 95

Pro Tyr Lys Gln
 100

5 <210> 8
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> *Tetraodon nigroviridis*
 <400> 8

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

Leu Val Asp Pro Glu Glu Ala Leu Arg Asn Lys Val Val Gly Ile Tyr
 20 25 30

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

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

Phe Glu Val Val Phe Val Ser Ser Asp Lys Thr Ser Glu Asp Met Val
 65 70 75 80

Glu Tyr Tyr His Asp Leu His Gly Asp Trp Leu Ala Leu Pro Trp Ser
 85 90 95

10 Asp Asp Tyr Lys Lys
 100

15 <210> 9
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> *Danio rerio*
 <400> 9

Met Val Glu Val Phe Ser Gly Arg Thr Leu Val Asn Lys Glu Gly Asp
 1 5 10 15

ES 2 623 464 T3

Leu Val Glu Pro Glu Glu Ala Leu Arg Asn Lys Val Val Gly Leu Tyr
 20 25 30

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

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

Phe Glu Ile Val Phe Ile Ser Ser Asp Lys Ser Thr Glu Asp Met Val
 65 70 75 80

Glu Tyr Tyr His Asp Met His Gly Asp Trp Leu Ala Leu Pro Trp Thr
 85 90 95

Asp Pro Tyr Lys Gln
 100

<210> 10
 <211> 156
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 10

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 Ser 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 His Glu Leu Arg Lys Arg Tyr Asn Val Thr Ala Ile
 100 105 110

10

ES 2 623 464 T3

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

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

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

5 <210> 11
 <211> 306
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 11

atggttgaca ttctgggcca gcggcacctg gtgacctgta agggcgcgac ggtggaggcc 60
 gaggcggcgc tgcagaacaa ggtggtggca ctgtactteg cggcggcccc gtgcgcgccg 120
 agccgcgact tcacgccgct gctctgcgac ttctatacgg cgctggtggc cgaggcgcgg 180
 cgccccgcgc ccttogaagt ggtcttcgtg tcagccgacg gcagctccca ggagatgctg 240
 gacttcatgc gcgagctgca tggcgcctgg ctggcgctgc ccttccacga ccctaccgg 300
 cagtga 306

10
 15 <210> 12
 <211> 156
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 12

ES 2 623 464 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> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 13
 catcaccaac aaagggcgga ag 22

15 <210> 14
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador

<400> 14
 cattcctcag cagagaaggg aac 23

25 <210> 15

ES 2 623 464 T3

<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Cebador

<400> 15
ccgtgctatt gtttcagagc ccttaacttt ctatc 35

10 <210> 16
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador

<400> 16
20 tgacactcca atcgtaaaag gcagaaaacg c 31

<210> 17
<211> 19
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

30 <400> 17
aagccgatga gcaacttc 19

<210> 18
<211> 20
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

40 <400> 18
tcactccca gtggattctt 20

<210> 19
<211> 21
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> Cebador

<400> 19
gtagctttgt acttgcggc g 21

55 <210> 20
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Cebador

<400> 20
65 gtcacagaa aatgtatcac ctccatagg 29

<210> 21

<211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 21
 gccatctctg cgacttatt ttacc 25
 10 <210> 22
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador
 <400> 22
 20 aattagtgcc accagcacca tc 22
 <210> 23
 <211> 4
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Figura 1
 30 <400> 23
 Glu Leu Arg Arg
 1
 <210> 24
 35 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Figura 1 - RdCVF-S - *M. musculus*
 <400> 24
 gaactgagga ggtgaggccc c 21
 45 <210> 25
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Figura 1 - RdCVF-S - *R. norvegicus*
 <400> 25
 55 gacctgagga ggtgaggccc c 21
 <210> 26
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Figura 1 - RdCVF-S - *M. domestica*
 <400> 26

gagctgaaaa ggtgagccta c 21

5 <210> 27
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Figura 1 - RdCVF-S - *H. sapiens*

<400> 27
 gatctgagga ggtgaggagg g 21

15 <210> 28
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Figura 1 - RdCVF-S - *P. troglodytes*

<400> 28
 gatctgagga ggtgaggagg g 21

25 <210> 29
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Figura 1 - RdCVF-S - *M. mulatta*

<400> 29
 gaactgagga ggtgasggag gg 22

35 <210> 30
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Figura 1 - RdCVF-S - *B. taurus*

<400> 30
 gacctgagga ggtgagacaa g 21

45 <210> 31
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Figura 1 - RdCVF-S - *C. familiaris*

55 <400> 31
 gacctgagga ggtgaggtgg g 21

60 <210> 32
 <211> 128
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Figura 1 - RdCVF-S - *G. gallus*

<220>

<221> misc_feature
 <222> (16)..(115)
 <223> N= A, T, G o C

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (116)..(125)
 <223> n es a, c, g o t

10 <400> 32
 gacctgagga ggtggnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 120
 nnnnntaa 128

15 <210> 33
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> 1 - RdCVF-S -X. *tropicalis*
 <400> 33
 gaattcagga ggtgagatag g 21

25 <210> 34
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Figura 1 - RdCVF-S -B. *rerio*

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(51)
 <223> N= A, T, G o C

40 <400> 34
 ccctataggc agtacnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ntga 54

45 <210> 35
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Figura 1 - RdCVF-S -T. *rubripes*
 <400> 35
 ccatacagac agtaggtgga t 21

55 <210> 36
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Figura 1 - RdCVF-S -T. *nigroviridis*
 <400> 36
 ccatacagac agtaggtgga c 21

5 <210> 37
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Figura 1 - RdCVF-S - *T. rubripes*

10 <400> 37
cccttcagga ggtgtggtg ttag 24

<210> 38
<211> 58
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Figura 1 - RdCVF-S - *T. nigroviridis*

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(55)
<223> N= A, T, G o C

25 <400> 38
ccttttagga ggtgtnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnntga 58

30 <210> 39
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Figura 1- RdCVF2-L

<400> 39

40 Pro Tyr Arg His
1

<210> 40
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Figura 1- RdCVF2-S

50 <400> 40

55 Pro Tyr Arg Gln
1

<210> 41
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Figura 1 - RdCVF2-S - *M. musculus*

<400> 41
ccctaccggc agtgagtggg gac 23

<210> 42
 <211> 23
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Figura 1 - RdCVF2-S - *R. norvegicus*
 10 <400> 42
 ccctaccggc agtgagtggg gac 23

 <210> 43
 15 <400> 43
 000

 <210> 44
 <211> 23
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Figura 1 - RdCVF2-S - *H. sapiens*
 25 <400> 44
 ccctaccggc agtgagtggg ggc 23

 <210> 45
 <211> 23
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> Figura 1 - RdCVF2-S - *P. troglodytes*

 <400> 45
 ccctaccggc agtgagtggg ggc 23
 40 <210> 46
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Figura 1 - RdCVF2-S - *M. mulatta*

 <400> 46
 50 ccctaccagc agtgagtggg ggc 23

 <210> 47
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Figura 1 - RdCVF2-S - *B. taurus*

 <400> 47
 60 ccctaccggc agtgagtgga ggc 23

 <210> 48
 <211> 23
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Figura 1 - RdCVF2-S - *G. gallus*

 <400> 48
 5 ccctacaagc agtaagtacc gca 23

 <210> 49
 <211> 23
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Figura 1 - RdCVF2-S -*X. tropicalis*

 <400> 49
 15 ccatacaagc agtaagtcc ttg 23

 <210> 50
 <211> 23
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Figura 1 - RdCVF2-S -*B. rerio*

 <400> 50
 25 ccatacaaac agtgagtca cca 23

 <210> 51
 <211> 23
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Figura 1 - RdCVF2-S -*T. rubripes*

 <400> 51
 35 gactacaaga agtgagtgag gtt 23

 <210> 52
 <211> 23
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Figura 1 - RdCVF2-S -*T. nigroviridis*

 <400> 52
 50 gactacaaga agtgagtccg cct 23

 <210> 53
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

 55 <400> 53

ES 2 623 464 T3

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

<210> 54
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 54

5

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

10

ES 2 623 464 T3

<210> 55

<211> 435

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 55

Met Ser Gly Phe Leu Glu Glu Leu Leu Gly Asp Lys Leu Val Thr Gly
1 5 10 15

Gly Gly Glu Glu Val Asp Val His Ser Leu Gly Ala Arg Gly Ile Ala
20 25 30

Leu Leu Gly Leu Tyr Phe Gly Cys Ser Leu Ser Ala Pro Cys Ala Gln
35 40 45

ES 2 623 464 T3

Leu Ser Ala Ser Leu Ala Ala Phe Tyr Gly Arg Leu Arg Gly Asp Ala
 50 55 60

Ala Ala Gly Pro Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ala Ala Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Pro Arg His Arg Leu Glu Ile Val Phe Val Ser Ser Asp Gln Asp
 85 90 95

Gln Arg Gln Trp Gln Asp Phe Val Arg Asp Met Pro Trp Leu Ala Leu
 100 105 110

Pro Tyr Lys Glu Lys His Arg Lys Leu Lys Leu Trp Asn Lys Tyr Arg
 115 120 125

Val Ser Asn Ile Pro Ser Leu Ile Phe Leu Asp Ala Thr Thr Gly Lys
 130 135 140

Val Val Cys Arg Asn Gly Leu Leu Val Ile Arg Asp Asp Pro Glu Gly
 145 150 155 160

Leu Glu Phe Pro Trp Gly Pro Lys Pro Phe Arg Glu Val Ile Ala Gly
 165 170 175

Pro Leu Leu Arg Asn Asn Gly Gln Ser Leu Glu Ser Ser Ser Leu Glu
 180 185 190

Gly Ser His Val Gly Val Tyr Phe Ser Ala His Trp Cys Pro Pro Cys
 195 200 205

Arg Ser Leu Thr Arg Val Leu Val Glu Ser Tyr Arg Lys Ile Lys Glu
 210 215 220

Ala Gly Gln Glu Phe Glu Ile Ile Phe Val Ser Ala Asp Arg Ser Glu
 225 230 235 240

Glu Ser Phe Lys Gln Tyr Phe Ser Glu Met Pro Trp Leu Ala Val Pro
 245 250 255

Tyr Thr Asp Glu Ala Arg Arg Ser Arg Leu Asn Arg Leu Tyr Gly Ile
 260 265 270

Gln Gly Ile Pro Thr Leu Ile Val Leu Asp Pro Gln Gly Glu Val Ile
 275 280 285

ES 2 623 464 T3

Thr Arg Gln Gly Arg Val Glu Val Leu Asn Asp Glu Asp Cys Arg Glu
 290 295 300

Phe Pro Trp His Pro Lys Pro Val Leu Glu Leu Ser Asp Ser Asn Ala
 305 310 315 320

Val Gln Leu Asn Glu Gly Pro Cys Leu Val Leu Phe Val Asp Ser Glu
 325 330 335

Asp Asp Gly Glu Ser Glu Ala Ala Lys Gln Leu Ile Gln Pro Ile Ala
 340 345 350

Glu Lys Ile Ile Ala Lys Tyr Lys Ala Lys Glu Glu Glu Ala Pro Leu
 355 360 365

Leu Phe Phe Val Ala Gly Glu Asp Asp Met Thr Asp Ser Leu Arg Asp
 370 375 380

Tyr Thr Asn Leu Pro Glu Ala Ala Pro Leu Leu Thr Ile Leu Asp Met
 385 390 395 400

Ser Ala Arg Ala Lys Tyr Val Met Asp Val Glu Glu Ile Thr Pro Ala
 405 410 415

Ile Val Glu Thr Phe Val Asn Asp Phe Leu Ala Glu Lys Leu Lys Pro
 420 425 430

Glu Pro Ile
 435

<210> 56
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> *C. facsiculata*

5

<400> 56

Met Ser Gly Leu Asp Lys Tyr Leu Pro Gly Ile Glu Lys Leu Arg Arg
 1 5 10 15

Gly Asp Gly Glu Val Glu Val Lys Ser Leu Ala Gly Lys Leu Val Phe
 20 25 30

Phe Tyr Phe Ser Ala Ser Trp Cys Pro Pro Cys Arg Gly Phe Thr Pro
 35 40 45

Gln Leu Ile Glu Phe Tyr Asp Lys Phe His Glu Ser Lys Asn Phe Glu

10

ES 2 623 464 T3

50 55 60

Val Val Phe Cys Thr Trp Asp Glu Glu Glu Asp Gly Phe Ala Gly Tyr
 65 70 75 80

Phe Ala Lys Met Pro Trp Leu Ala Val Pro Phe Ala Gln Ser Glu Ala
 85 90 95

Val Gln Lys Leu Ser Lys His Phe Asn Val Glu Ser Ile Pro Thr Leu
 100 105 110

Ile Gly Val Asp Ala Asp Ser Gly Asp Val Val Thr Thr Arg Ala Arg
 115 120 125

Ala Thr Leu Val Lys Asp Pro Glu Gly Glu Gln Phe Pro Trp Lys Asp
 130' 135 140

Ala Pro
 145

<210> 57
 <211> 156
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 57

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

10

ES 2 623 464 T3

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> 58
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 58

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

10 Asp Pro Tyr Arg Gln
 100

15 <210> 59
 <211> 156
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 59

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

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

ES 2 623 464 T3

Phe Ala Ala Gly Arg Cys Ala 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 Arg 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 Asp Ile Thr Val Ile
 100 105 110

Pro Lys Val 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

<210> 60
 <211> 156
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 60

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 Ser Gln Glu Met Leu
 65 70 75 80

10

ES 2 623 464 T3

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

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

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

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

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

- <210> 61
- <211> 156
- <212> PRT
- <213> *Pan troglodytes*
- <400> 61

5

ES 2 623 464 T3

Met Val Asp Ile Leu Gly Gly 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 Ser 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 His Glu Leu Arg Lys Arg Tyr Asn Val Thr Ala Ile
 100 105 110

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

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

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

<210> 62
 <211> 156
 <212> PRT
 <213> *Bos taurus*
 <400> 62

5

ES 2 623 464 T3

Met Val Asp Val Leu Gly Gly Arg Arg Leu Val Thr Cys Asp Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Phe Met Lys Glu Leu His Gly Ala Trp Leu Ala Leu Pro Phe His
 85 90 95

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

Pro Arg Leu Val Ile Leu Lys Pro Ser Gly Glu Val Ile Thr Asp 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 Ile Phe Gln Asn Phe Ser Ser
 145 150 155

<210> 63
 <211> 156
 <212> PRT
 <213> *Gallus gallus*

<400> 63

Met Val Asp Val Phe Ser Gly Arg Leu Leu Val Ser Lys Asp Gly Arg

5

10

ES 2 623 464 T3

Glu Ile Val Phe Ile Ser Ser Asp Lys Ser Pro Glu Glu Met Val Asp
65 70 75 80

Tyr Met His Asp Met Gln Gly Asp Trp Leu Ala Leu Pro Phe His Asp
85 90 95

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

Lys Leu Val Ile Val Lys Gln Asn Gly Asp Val Ile Thr Asp Lys Gly
115 120 125

Arg Lys Gln Ile Arg Glu Arg Gly Leu Ser Cys Phe Arg Thr Trp Leu
130 135 140

Glu Val Gly Asp Val Phe Gln Asn Phe Thr Gly Lys
145 150 155

<210> 65
<211> 156
<212> PRT
<213> *Tetraodon nigroviridis*

5

<400> 65

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

Leu Val Asp Pro Glu Glu Ala Leu Arg Asn Lys Val Val Gly Ile Tyr
20 25 30

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

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

Phe Glu Val Val Phe Val Ser Ser Asp Lys Thr Ser Glu Asp Met Val
65 70 75 80

Glu Tyr Tyr His Asp Leu His Gly Asp Trp Leu Ala Leu Pro Trp Ser
85 90 95

Asp Asp Tyr Lys Asn Glu Leu Lys Gln Arg Tyr Lys Ile Thr Ala Val
100 105 110

Pro Lys Leu Val Ile Val Lys Glu Ser Gly Glu Val Ile Thr Asp Lys

10

ES 2 623 464 T3

115

120

125

Gly Arg Lys Gln Ile Arg Asp Arg Gly Leu Ala Cys Phe Arg Ser Trp
 130 135 140

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

5 <210> 66
 <211> 156
 <212> PRT
 <213> *Danio rerio*

<400> 66

Met Val Glu Val Phe Ser Gly Arg Thr Leu Val Asn Lys Glu Gly Asp
 1 5 10 15

Leu Val Glu Pro Glu Glu Ala Leu Arg Asn Lys Val Val Gly Leu Tyr
 20 25 30

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

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

Phe Glu Ile Val Phe Ile Ser Ser Asp Lys Ser Thr Glu Asp Met Val
 65 70 75 80

Glu Tyr Tyr His Asp Met His Gly Asp Trp Leu Ala Leu Pro Trp Thr
 85 90 95

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

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

Gly Arg Lys Gln Ile Arg Asp Gln Gly Leu Ala Cys Phe Arg Ser Trp
 130 135 140

Ile Glu Val Ala Glu Ile Phe Gln Asn Phe Lys Gly
 145 150 155

10
 15 <210> 67
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

ES 2 623 464 T3

<400> 67

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 Arg Glu Arg Gly Arg Asn Gly Arg Asp Ser Gly Asp Pro Gln Gly
 195 200 205

Asp Ala Gly Thr Arg Ala Glu Leu Trp
 210 215

5 <210> 68
 <211> 109
 <212> PRT

ES 2 623 464 T3

<213> *Mus musculus*

<400> 68

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

5

<210> 69

<211> 576

<212> PRT

10

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 69

Met Val 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

ES 2 623 464 T3

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 Asp 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 Asp 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 Ala
180 185 190

Gly Arg Gly Arg Gly Arg Asn Glu Cys Asp Ser Arg Asn Pro Gln Gly
195 200 205

Gly Arg Gly Cys Arg Asp Gly Ala Leu Val Ile Pro Pro Ala Pro Gln
210 215 220

Gly Thr Arg Val His Trp Trp Asn Phe Gly Asp Leu Gln Gly Asn Ser
225 230 235 240

Gly Leu Gly Ile Gly Val Gln Leu Arg Val Gln Pro Val Gly Ala Tyr
245 250 255

Ala Pro Gln Leu Arg Ala Pro Cys Leu Glu Leu Glu Gln Gln Leu Arg
260 265 270

Ser Gln Arg Asp Gln His Arg Gly Arg Asp Ala Gln Lys Gly His Arg
275 280 285

Gly Gln Tyr Pro Ala Ser Ala Cys Ala Met Gly Arg Ser Tyr Gly Gly
290 295 300

Arg Val Leu Ala Ala Met Thr Leu Leu Gly Ile Pro Ala Ala Val Leu
305 310 315 320

Val Ala Leu Ala Ala Gln Leu Leu Phe Gln Leu Gln Ala Gly Arg Ala

ES 2 623 464 T3

				325						330					335
Glu	Leu	Arg	Gly	Ile	Arg	Thr	Asp	Gly	Leu	His	Pro	Glu	Leu	Asp	Pro
			340					345					350		
Asp	Ala	Gly	Leu	Pro	Glu	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala
		355					360					365			
Thr	Ala	Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Gln	Val	Leu	Gly	Leu	Gly	Cys	Leu	Leu
	370					375					380				
Leu	Ala	Ala	Leu	Cys	Gly	His	Leu	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Gly	Pro
385					390					395					400
Gly	Pro	Gly	Arg	Leu	Thr	Leu	Asn	Val	Trp	Ser	Cys	Phe	Asn	Leu	Pro
				405					410					415	
Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Ala	Leu	Ala	Ile	Tyr	Ala	Leu	Leu	Leu	Phe	Glu
			420					425					430		
Ile	Glu	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Ser	Ile	Leu	Gly	Ser	Gly	Ala	Leu
		435					440					445			
Ile	Leu	Val	Ala	Ile	Met	Thr	His	Thr	Leu	Phe	Arg	Ala	Val	Gln	Ala
	450					455					460				
Thr	Arg	Arg	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Pro	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Asp	Glu
465					470					475					480
Pro	Ala	Arg	Ser	Ser	Glu	Asp	Ser	Lys	Ala	Gly	Cys	Arg	Ala	Gln	Pro
				485					490					495	
Gln	Gln	Gly	Thr	His	Cys	Gln	Ile	Phe	Tyr	Asn	Pro	Ser	Gln	Glu	Leu
			500					505					510		
Gly	Asp	Pro	Pro	Gly	Ser	Met	Ala	Thr	Cys	Ile	Thr	Ser	Ala	Val	Leu
		515					520					525			
Glu	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Ser	Leu	Leu	Ala	Ser	His	Leu	Pro	Gln	Thr
	530					535					540				
Leu	Arg	Ser	Met	Gly	Pro	Trp	Asp	Gly	Val	Thr	Tyr	Glu	Met	His	Gly
545					550					555					560
Met	Leu	Gly	His	Arg	Pro	Pro	Asp	Met	Gly	Lys	Asp	Ala	Thr	Leu	Val
				565					570					575	

ES 2 623 464 T3

<210> 70
 <211> 212
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*

<400> 70

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 Glu Glu Gly Gly Ala
 195 200 205

ES 2 623 464 T3

Gly Gly Leu Phe
210

5 <210> 71
<211> 202
<212> PRT
<213> *Pan troglodytes*

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (168)..(201)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 71

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 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
165 170 175

15

ES 2 623 464 T3

Xaa
180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala
195 200

- <210> 72
- <211> 218
- <212> PRT
- <213> *Canis familiaris*

- <400> 72

ES 2 623 464 T3

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

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

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

Ala Phe Ala Pro Ile Leu Arg 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 Lys
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

Arg Gly Lys Arg Gly Pro Gly Gly Gly Ser Gln Pro Glu Gly Gly Arg
 195 200 205

Gly Ala Glu Gly Gly Ala Gly Asp Leu Phe
 210 215

<210> 73
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> *Bos taurus*

5

<400> 73

ES 2 623 464 T3

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

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

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

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

Phe Tyr Val Leu Arg Ala Ala Gln Val 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 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

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

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

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

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

Arg Arg Ala Arg Gly Arg Gly Arg Ala Gly Gly Ser Gly Gln Glu Gly
 195 200 205

Glu Ala Glu Gly Glu Ala Ala Gly Leu Phe
 210 215

5 <210> 74
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> *Gallus gallus*

ES 2 623 464 T3

<400> 74

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Gly Asp Val Ile Val Gly Asn Ala Val Asp Glu Ile Thr Ser Met
 130 135 140

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

Arg Asn Phe Arg Leu Ala Glu Asp Phe Asp Glu Cys Ala Arg Arg Ser
 165 170 175

Ile Thr Asp Pro Leu Arg Arg Leu Lys Tyr Lys Leu Gly Lys Gly Glu
 180 185 190

Glu Pro Arg Ser Glu Glu Gln Lys Glu Asp Gly Asp Glu Ser Ser
 195 200 205

5 <210> 75
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> *Xenopus laevis*

10 <400> 75

ES 2 623 464 T3

Met Ala Asp Leu Phe Leu Asp Lys Ile Leu Val Lys Asn Asn Arg Asp
 1 5 10 15

Gln Asp Glu Leu Asp Thr Glu Arg Glu Ile Trp Glu Arg Leu Glu Asn
 20 25 30

Arg Val Ile Leu Leu Phe Phe Ala Lys Ser Arg Ser Ser Gln Cys Gln
 35 40 45

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

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

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

Arg Trp Leu Phe Val Pro Phe Lys Asp Glu Glu Phe Arg Arg Asn Leu
 100 105 110

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

Pro Ser Gly His Val Ile Ser Phe Asn Ala Val Asp Glu Val Val Arg
 130 135 140

Leu Gly Pro Pro Cys Phe Lys Asn Trp Gln Glu Val Ser Glu Ile Ile
 145 150 155 160

Asp Arg Ser Phe Leu Leu Pro Glu Phe Thr Asp Asp Arg Ala Gly Arg
 165 170 175

Ser Met Thr Asp Pro Ile Arg Arg Ile Lys Tyr Lys Asp Glu Thr Thr
 180 185 190

Asn Glu Lys Lys Lys Arg Lys His Cys Asp Asp Glu Asp Glu Gly Gly
 195 200 205

Gly Gly Gly Thr Glu Phe Phe
 210 215

<210> 76
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> *Tetraodon nigroviridis*

5

ES 2 623 464 T3

<400> 76

Met Val Asp Leu Phe Leu Asn Arg Val Leu Val Glu Asn Asn Trp Asp
 1 5 10 15

Gln Asp Gln Leu Asn Thr Glu Arg Glu Ile Val Gly Ile Leu Glu Asn
 20 25 30

Arg Ile Leu Leu Leu Phe Phe Ala Ser Ala Ser Cys Gln Lys Cys Gln
 35 40 45

Asp Phe Leu Pro Ile Leu Asn Asn Phe Phe Lys Arg Leu Lys Asp Pro
 50 55 60

Ala His Ile Glu Tyr Pro Lys Leu Leu Ala Leu Ile Phe Ile Ser Leu
 65 70 75 80

Asp Gln Ser Glu Glu Gln Gln Glu Arg Phe Leu Lys Glu Leu His Lys
 85 90 95

Lys Val Leu Phe Leu Ala Phe Asp Asp Pro Tyr Arg Gln Glu Leu Gln
 100 105 110

Ala Met Phe Glu Val Lys Glu Leu Pro Thr Val Val Val Leu Arg Pro
 115 120 125

Asp Gly Ser Val Leu Ala Ala Asn Ala Ala Gln Asp Ile Cys Ser Tyr
 130 135 140

Gly Ser Glu Cys Phe Arg Asp Trp Gln Glu Ser Ala Glu Leu Ile Glu
 145 150 155 160

Arg Thr Phe Met Leu Asn Glu Glu Phe Asp Asn Leu Asn Leu Arg Thr
 165 170 175

Ser Ala Thr Pro
 180

5 <210> 77
 <211> 169
 <212> PRT
 <213> *Tetraodon nigroviridis*

10 <400> 77

ES 2 623 464 T3

Met Val Asp Leu Phe Ile Asp Arg Val Leu Leu Lys Asn Asn Ser Glu
 1 5 10 15

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

Arg Ile Leu Leu Leu Phe Phe Gly Cys Val Val Ser Arg Ser Cys Gln
 35 40 45

Leu Phe Ala Pro Lys Leu Ser Ser Phe Phe Lys Gln Leu Thr Asp Glu
 50 55 60

Ala Tyr Val Asp Arg Ser Ala Gln Leu Val Leu Leu Tyr Ile Ser Met
 65 70 75 80

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

Lys Cys Leu Phe Leu Ala Phe Glu Asp Pro Phe Arg Arg Glu Leu Glu
 100 105 110

Ala Met Phe Asn Val Glu Glu Leu Pro Thr Val Val Val Leu Arg Pro
 115 120 125

Asp Cys Ser Val Leu Ala Ala Asn Ala Val Glu Glu Ile Leu Arg Leu
 130 135 140

Gly Pro Asp Cys Tyr Arg Asn Trp Gln Glu Ala Ala Glu Leu Tyr Arg
 145 150 155 160

Gln Glu Leu Pro Asp Gln Arg Arg Leu
 165

5 <210> 78
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> *Danio rerio*
 <400> 78

ES 2 623 464 T3

Met Val Asp Leu Phe Leu Gly Lys Val Leu Val Lys Asn Asn Lys Asp
1 5 10 15

Arg Asp Glu Leu Asp Thr Glu Arg Glu Ile Ile Leu Arg Leu Gln Asn
20 25 30

Arg Ile Leu Met Leu Phe Phe Gly Ser Gly Asp Ser Glu Lys Cys Gln
35 40 45

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

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

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

Arg Cys Leu Phe Leu Pro Tyr Glu Asp Pro Tyr Arg Gln Glu Leu Gly
100 105 110

Val Met Phe Glu Val Arg Asp Leu Pro Arg Val Val Val Leu Arg Pro
115 120 125

Asp Cys Ser Val Leu Ser Pro Asn Ala Val Ser Glu Ile Cys Thr Leu
130 135 140

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

Arg Asn Phe Met Met Asn Glu Glu Phe Asp Glu Gly Lys Met Arg Ser
165 170 175

Met Thr Asp Pro Ile Arg Arg Ile Lys Tyr Lys Val Glu Asp Glu Lys
180 185 190

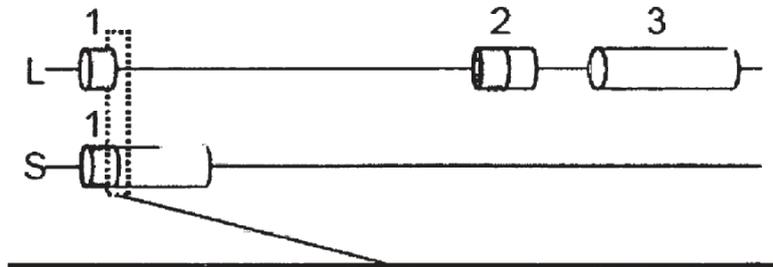
Lys Lys Lys Lys Lys Arg Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Gly Gly
195 200 205

Gly Gly Gly Gly Pro Trp Gly
210 215

REIVINDICACIONES

1. Compuesto para su uso en terapia seleccionado del grupo que consiste en:
 - 5 i) un polipéptido que comprende la secuencia de amino ácidos expuesta en SEC ID NO:10;
 - ii) un polinucleótido que codifica dicho polipéptido;
 - iii) un vector que comprende dicho polinucleótido; y
 - iv) una célula huésped modificada por ingeniería genética que expresa dicho polipéptido.
- 10 2. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en un método para tratar y/o prevenir la distrofia de conos.

a gen RdCVF, cadena negativa del cromosoma 8

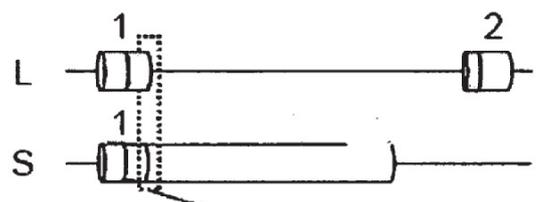


RdCVF-L	E..L..R..
RdCVF-S	E..L..R..R..*
<i>M. musculus</i>	GAACTGAGGAGG TGACGCCCC
<i>R. norvegicus</i>	GACCTGAGGAGG TGAGGCCCC
<i>M. domestica</i>	GAGCTGAAAAGG TGAGCCTAC
<i>H. sapiens</i>	GATCTGAGGAGG TGACGAGGG
<i>P. troglodytes</i>	GATCTGAGGAGG TGAGGAGGG
<i>M. mulatta</i>	GAACTGAGGAGG TGAGGGAGGG
<i>B. taurus</i>	GACCTGAGGAGG TGAGACAAG
<i>C. familiaris</i>	GACCTGAGGAGG TGAGGTGGG
<i>G. gallus</i>	GACCTGAGGAGG TGG[n110]TAA
<i>X. tropicalis</i>	GAATTCAGGAGG TGACATAGG
<i>B. rerio</i>	CCCTATAGGCAG TAC[n36]TGA
<i>T. rubripes a</i>	CCATACAGACAG TAGGTGGAT
<i>T. nigroviridis a</i>	CCATACAGACAG TAGGTGGAC
<i>T. rubripes b</i>	CCCTTCAGGAGG TGTCTGGTTTAG
<i>T. nigroviridis b</i>	CCTTTTAGGAGG TGT[n40]TGA

	L	S
5'UTR	22 pb	44 pb
CDS	654 pb	330 pb
3'UTR	2076 pb	798 pb

Figura 1A

b gen RdCVF, cromosoma 13 500 pb



RdCVF2-L	P..Y..R..H.
RdCVF2-S	P..Y..R..Q..*
<i>M. musculus</i>	CCCTACCGGCAGTGAGTGGGGAC
<i>R. norvegicus</i>	CCCTACCGGCAGTGAGTGGGGAC
<i>M. domestica</i>	CCTCTCAAGCAGTGAGTAGCGAG
<i>H. sapiens</i>	CCCTACCGGCAGTGAGTGGGGGC
<i>P. troglodytes</i>	CCCTACCGGCAGTGAGTGGGGGC
<i>M. mulatta</i>	CCCTACCAGCAGTGAGTGGGGGC
<i>B. taurus</i>	CCCTACCGGCAGTGAGTGGAGGC
<i>G. gallus</i>	CCCTACAAGCAGTAAGTACCGCA
<i>X. tropicalis</i>	CCATACAAGCAGTAAGTTTCCTTG
<i>B. rerio</i>	CCATACAAACAGTGAGTTCACCA
<i>T. rubripes</i>	GACTACAAGAAGTGAGTGAGGTT
<i>T. nigroviridis</i>	GACTACAAGAAGTGAGTCCGCCT

	L	S
5'UTR	299 pb	264 pb
CDS	471 pb	306 pb
3'UTR	397 pb	2334 pb

Figura 1B

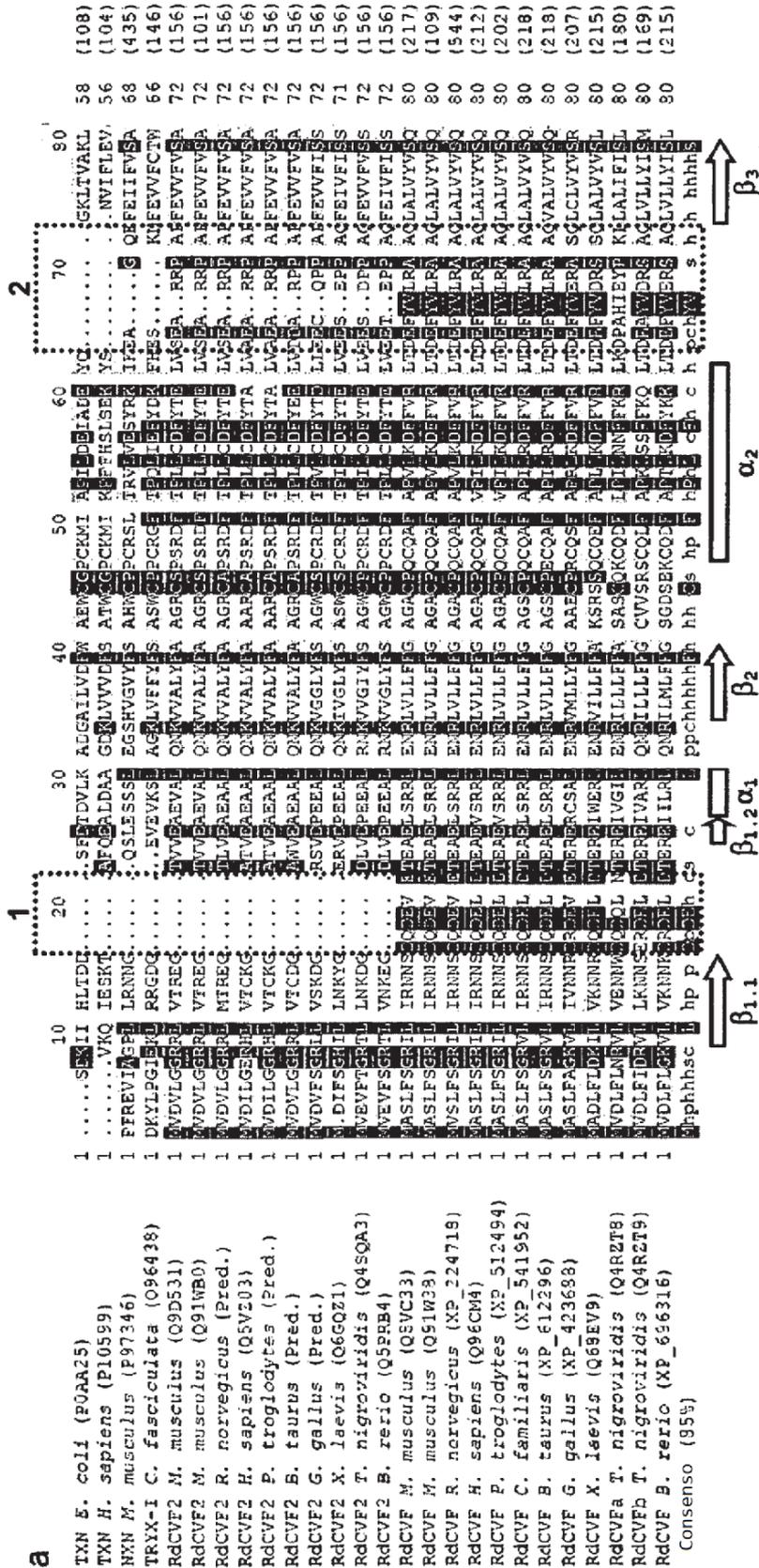


Figura 2A

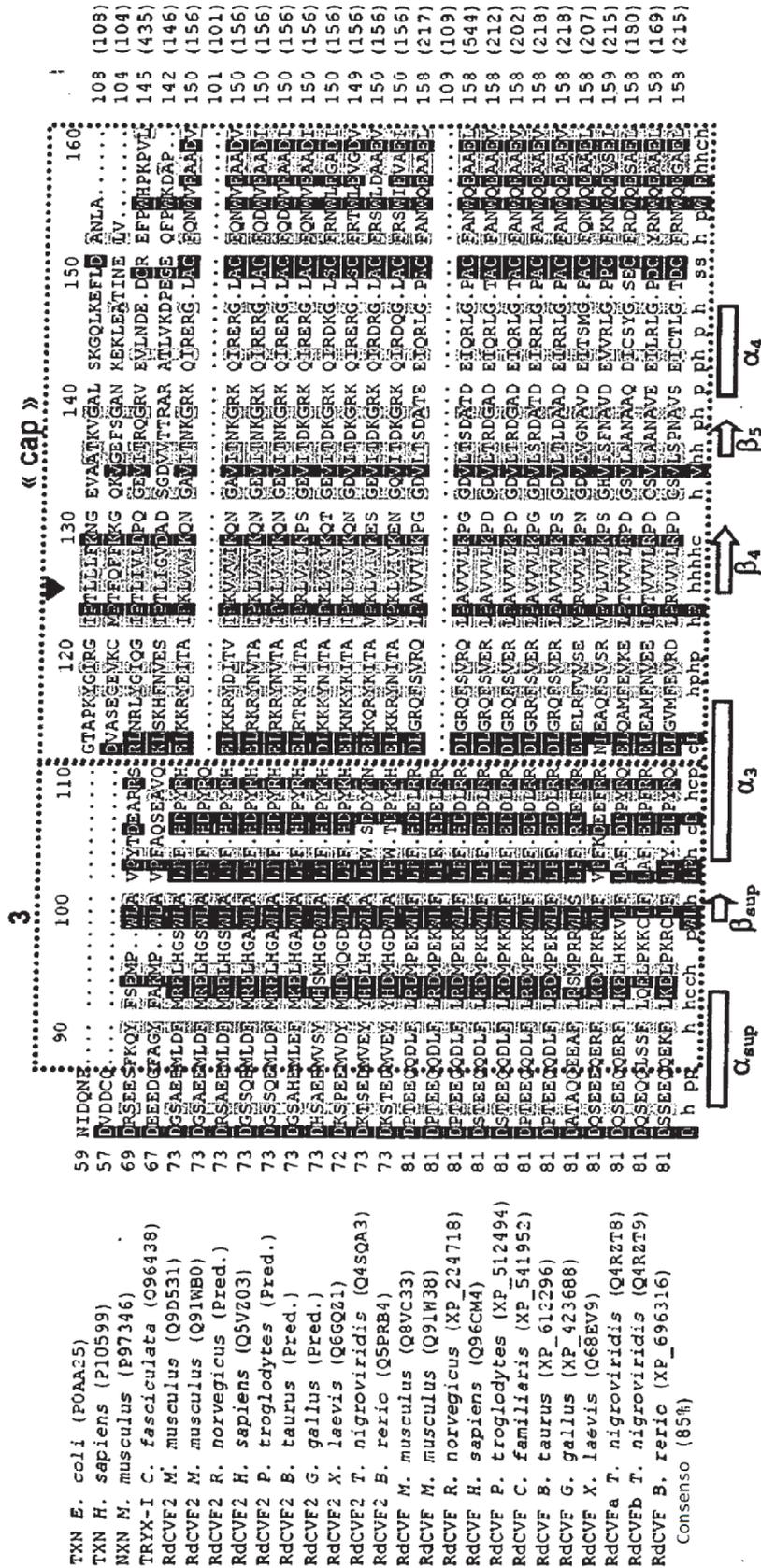


Figura 2B

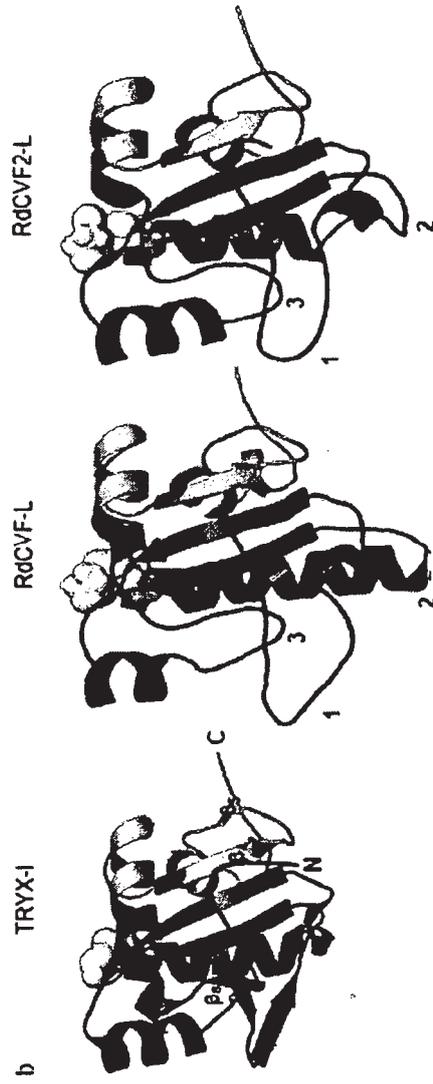


Figura 2C

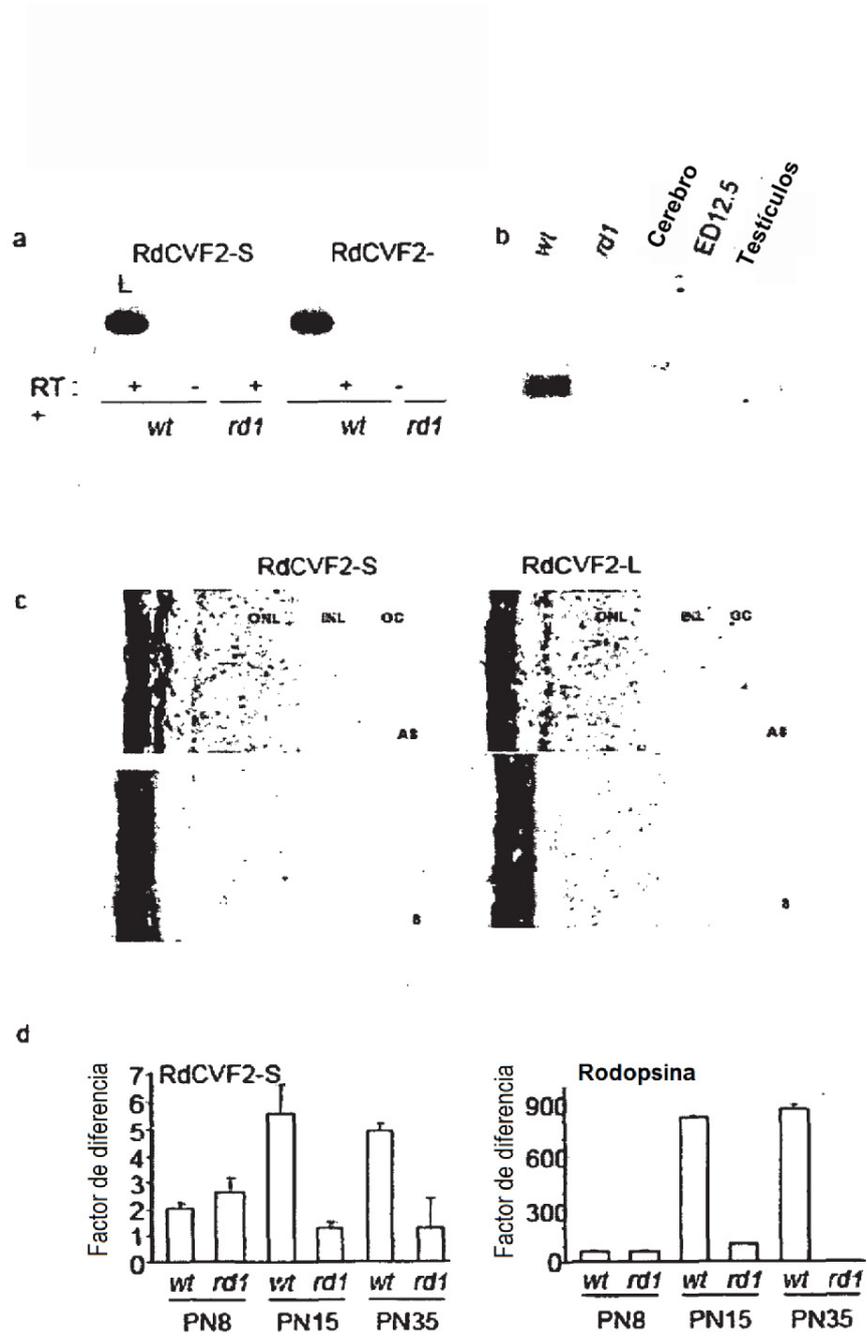


Figura 3

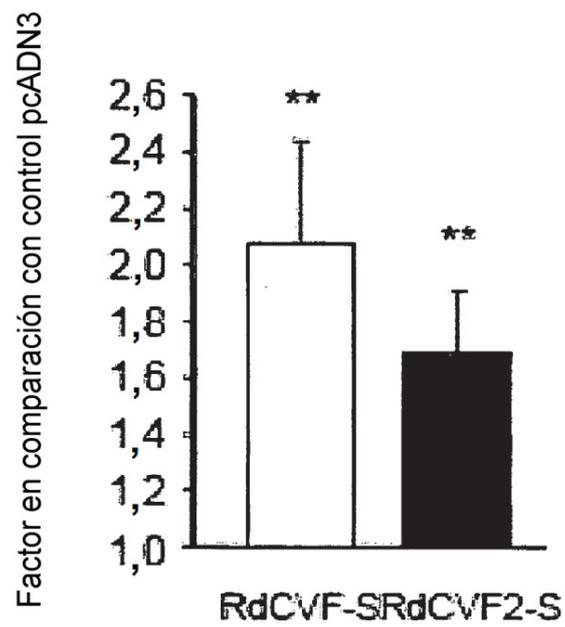


Figura 4

Viabilidad celular (% de control)

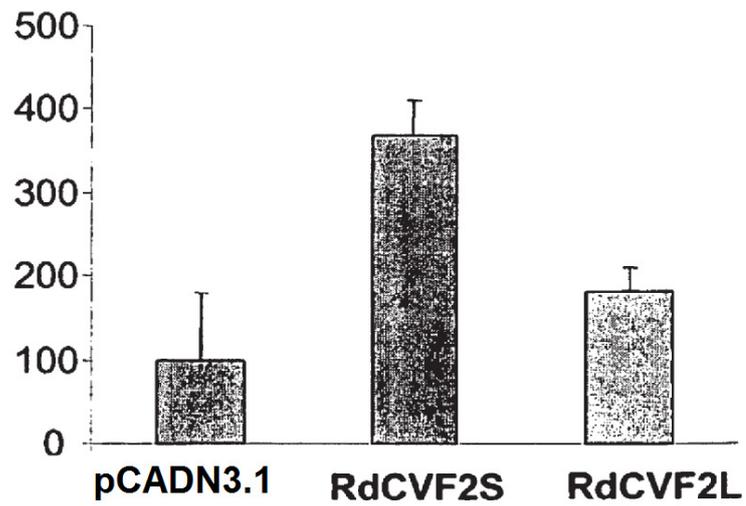


Figura 5