(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 761 328**

(51) Int. CI.:

A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.12.2016 PCT/IB2016/057267**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **08.06.2017 WO17093935**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2016 E 16809182 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019 EP 3383439**

(54) Título: **SynP161, un promotor para la expresión específica de genes en fotorreceptores de bastón**

(30) Prioridad:

03.12.2015 EP 15197901

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.05.2020

(73) Titular/es:

FRIEDRICH MIESCHER INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH (100.0%)
Maulbeerstrasse 66
4058 Basel, CH

(72) Inventor/es:

HARTL, DOMINIK;
SCHUEBELER, DIRK;
ROSKA, BOTOND;
KREBS, ARNAUD y
JUETTNER, JOSEPHINE

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

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

SynP161, un promotor para la expresión específica de genes en fotorreceptores de bastón

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico que da lugar a la expresión de genes específicamente en las células de fotorreceptores de bastón.

Antecedentes de la invención

Con fines de expresión, los genes recombinantes se transfectan normalmente en las células, poblaciones de células o tejidos diana, en forma de constructos de ADNc en el contexto de un casete de expresión activo para permitir la transcripción del gen heterólogo. El constructo de ADN es reconocido por la maquinaria de la transcripción celular en un proceso que conlleva la actividad de muchos factores de transcripción que actúan en trans (TF) en elementos reguladores cis, que incluyen potenciadores, silenciadores, aisladores y promotores (en la presente denominados globalmente «promotores»).

Los promotores génicos están implicados en todos estos niveles de regulación, ejerciendo como elemento determinante en la transcripción génica al integrar las influencias de la secuencia de ADN, la unión a factores de transcripción y rasgos epigenéticos. Determinan la intensidad de, por ejemplo, la expresión de un transgén que es codificado por un vector plasmídico, así como en qué tipo o tipos de célula se expresará dicho transgén.

Los promotores más comunes utilizados para dirigir la expresión génica heteróloga en las células de mamífero son el promotor temprano inmediato principal de citomegalovirus (CMV) humano y de ratón. Estos confieren una expresión marcada y se ha demostrado que son estables en varios tipos de célula. Otros promotores virales tales como el promotor temprano inmediato de SV40 y el promotor de repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma de Rous (RSV) también se utilizan frecuentemente en casetes de expresión.

En lugar de promotores virales, se pueden utilizar también promotores celulares. Entre los promotores conocidos se encuentran los de genes constitutivos que codifican transcritos celulares que se transcriben profusamente tales como beta-actina, factor de elongación 1-alfa (EF-I alfa) o ubiquitina. En comparación con los promotores virales, la expresión de genes eucariotas es más compleja y requiere una coordinación precisa de muchos factores diferentes.

Uno de los aspectos relacionados con el uso de elementos reguladores endógenos para la expresión de transgenes es la generación de ARNm estable y que la expresión pueda tener lugar en el ambiente nativo de la célula hospedadora donde se proporcionan consecuentemente los factores de transcripción que actúan en trans. Debido a que la expresión de genes eucariotas está controlada por una maquinaria compleja de elementos reguladores que actúan en cis y en trans, la mayoría de los promotores celulares adolecen de una falta de caracterización funcional extensiva. Algunas partes del promotor eucariota se ubican de forma habitual inmediatamente antes en dirección 5’ de su secuencia transcrita y sirve como el punto de iniciación transcripcional. El promotor del núcleo rodea inmediatamente el sitio de comienzo de la transcripción (TSS), lo cual es suficiente para que sea reconocido por la maquinaria de la transcripción. El promotor proximal comprende la región en dirección 5’ del promotor del núcleo y contiene el TSS y otros rasgos de la secuencia necesarios para la regulación de la transcripción. Los factores de transcripción actúan con especificidad de secuencia uniéndose a motivos reguladores en la secuencia del promotor y del potenciador, con lo cual activan enzimas que modifican cromatina e histonas que alteran la estructura del nucleosoma y su posición, lo cual finalmente permite el inicio de la transcripción. La identificación de un promotor funcional depende principalmente de la presencia de elementos potenciadores asociados en dirección 5’ o 3’.

Otro aspecto crucial relacionado con el uso de elementos reguladores endógenos para la expresión de transgenes es que algunos promotores pueden actuar de una forma con especificidad celular y darán lugar a la expresión del transgén en células de un tipo específico o, dependiendo del promotor, en células de un subconjunto particular.

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es la obtención de nuevas secuencias adecuadas para la expresión de genes recombinantes en células de mamífero con niveles de expresión elevados y de una forma con especificidad por un tipo de célula.

Dicha secuencia satisface una necesidad en la técnica de promotores específicos para células retinianas con el fin de desarrollar sistemas para el estudio de trastornos neurodegenerativos, restauración de la visión, descubrimiento de fármacos, terapias tumorales y diagnóstico de trastornos.

Compendio de la invención

Los inventores de la presente han combinado epigenética, bioinformática y neurociencia para encontrar promotores que, cuando se encuentren en el ojo, controlen la expresión génica solamente en los fotorreceptores de bastón.

La secuencia de ácido nucleico de la secuencia de la invención es:
ATTCCGGTCACACGGCCAAGATTATTCCACCTGCGCTTTGAGCAATAGGGAGAGGGCTCTG
GTGCCTCTTCCTGGAATTTGATTAATTCGCTTGAGTCAGTCACAGAATTTGAGGAAGCATTGA
TATTTGAAGATGTGTTCTTCTAAAGGATACAAATGAATATATGCATAGTGAGAGTTTAGGAGA
TAGG (SEQ ID NO:1).

La presente invención proporciona, por tanto, una molécula de ácido nucleico aislada que comprende, o está constituida por, la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de ácido nucleico de al menos 150 pb que tiene al menos un 90% de identidad respecto a dicha secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1, donde dicha molécula de ácido nucleico aislada da lugar específicamente a la expresión en los fotorreceptores de bastón de un gen ligado operativamente a dicha secuencia de ácido nucleico que codifica dicho gen.

La molécula de ácido nucleico aislada de la invención puede además comprender un promotor mínimo, por ejemplo, un promotor mínimo de SV40, p. ej., el promotor mínimo de SV40 o el utilizado en los ejemplos.

La presente invención también proporciona un casete de expresión que comprende un ácido nucleico aislado de la invención tal como se ha descrito anteriormente, donde dicho promotor está ligado operativamente a al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen que se ha de expresar específicamente en los fotorreceptores de bastón.

La presente invención proporciona además un vector que comprende el casete de expresión de la invención. En algunas realizaciones, dicho vector es un vector viral.

La presente invención también engloba el uso de un ácido nucleico de la invención, de un casete de expresión de la invención o de un vector de la invención para la expresión de un gen en los fotorreceptores de bastón.

La presente invención proporciona además un método para expresar un gen en los fotorreceptores de bastón que comprende los pasos de transfectar una célula aislada, una línea celular o una población celular (p. ej., un tejido) con un casete de expresión de la invención, donde el gen a expresar será expresado por la célula aislada, la línea celular o la población celular si dicha célula es, o dichas células comprenden, fotorreceptores de bastón. En algunas realizaciones, la célula aislada, línea celular o población celular o tejido es humano.

La presente invención también proporciona una célula aislada que comprende el casete de expresión de la invención. En algunas realizaciones, el vector o casete de expresión se integra de forma estable en el genoma de dicha célula.

Un gen típico que se puede ligar operativamente al promotor de la invención es un gen que codifica una halorodopsina o una canalrodopsina.

Además, la presente invención también proporciona un kit para expresar un gen en fotorreceptores de bastón, donde el kit comprende una molécula de ácido nucleico aislada de la invención.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Imágenes de microscopio confocal de barrido láser de la expresión de EGFP a partir del promotor con la SEQ ID NO: 1, 3 semanas después de la inyección subretiniana de AAV-synP161-ChR2-EGFP en ojos de ratón C57BL/6 adulto en forma de proyección lateral y vista superior en la capa de fotorreceptores. Se puede observar la expresión inducida en los fotorreceptores de bastón. Verde = EGFP dirigida por la SEQ ID NO:1, Rojo = mCAR, Blanco = Hoechst.

Descripción detallada de la invención

Los inventores de la presente han combinado epigenética, bioinformática y neurociencia para encontrar promotores que, cuando se encuentren en el ojo, controlen la expresión génica solamente en los fotorreceptores de bastón.

La secuencia de ácido nucleico de la secuencia de la invención es:
ATTCCGGTCACACGGCCAAGATTATTCCACCTGCGCTTTGAGCAATAGGGAGAGGGCTCTG
GTGCCTCTTCCTGGAATTTGATTAATTCGCTTGAGTCAGTCACAGAATTTGAGGAAGCATTGA
TATTTGAAGATGTGTTCTTCTAAAGGATACAAATGAATATATGCATAGTGAGAGTTTAGGAGA
TAGG (SEQ ID NO:1).

La presente invención proporciona, por tanto, una molécula de ácido nucleico aislada que comprende, o está constituida por, la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de ácido nucleico de al menos 150 pb que tiene al menos un 90% de identidad respecto a dicha secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1, donde dicha molécula de ácido nucleico aislada da lugar específicamente a la expresión en los fotorreceptores de bastón de un gen ligado operativamente a dicha secuencia de ácido nucleico que codifica dicho gen.

La molécula de ácido nucleico aislada de la invención puede además comprender un promotor mínimo, por ejemplo, un promotor mínimo de SV40, p. ej., el promotor mínimo de SV40 o el utilizado en los ejemplos.

La presente invención también proporciona un casete de expresión que comprende un ácido nucleico aislado de la invención tal como se ha descrito anteriormente, donde dicho promotor está ligado operativamente a al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen que se ha de expresar específicamente en los fotorreceptores de bastón.

La presente invención proporciona además un vector que comprende el casete de expresión de la invención. En algunas realizaciones, dicho vector es un vector viral.

La presente invención también engloba el uso de un ácido nucleico de la invención, de un casete de expresión de la invención o de un vector de la invención para la expresión de un gen en los fotorreceptores de bastón.

La presente invención proporciona además un método para expresar un gen en los fotorreceptores de bastón que comprende los pasos de transfectar una célula aislada, una línea celular o una población celular (p. ej., un tejido) con un casete de expresión de la invención, donde el gen a expresar será expresado por la célula aislada, la línea celular o la población celular si dicha célula es, o dichas células comprenden, fotorreceptores de bastón. En algunas realizaciones, la célula aislada, línea celular o población celular o tejido es humano.

La presente invención también proporciona una célula aislada que comprende el casete de expresión de la invención. En algunas realizaciones, el vector o casete de expresión se integra de forma estable en el genoma de dicha célula.

Un gen típico que se puede ligar operativamente al promotor de la invención es un gen que codifica una halorodopsina o una canalrodopsina.

Además, la presente invención también proporciona un kit para expresar un gen en fotorreceptores de bastón, donde el kit comprende una molécula de ácido nucleico aislada de la invención.

Tal como se utiliza en la presente, el término «promotor» se refiere a cualesquiera elementos reguladores cis, que incluyen potenciadores, silenciadores, aisladores y promotores. Un promotor es una región de ADN que se ubica generalmente en una posición anterior (hacia la región 5') del gen que es necesario transcribir. El promotor permite la activación o represión adecuada del gen que controla. En el contexto de la presente invención, los promotores dan lugar a la expresión específica de genes ligados operablemente a ellos en los fotorreceptores de bastón. La expresión «expresión específica» también denominada «expresión solamente en un determinado tipo de célula» se refiere a que al menos más de un 75% de las células que expresan el gen de interés son del tipo especificado, es decir, fotorreceptores de bastón en el presente caso.

Los casetes de expresión se introducen habitualmente en un vector que facilita la entrada del casete de expresión en una célula hospedadora y el mantenimiento del casete de expresión en la célula hospedadora. Dichos vectores se utilizan normalmente y son muy conocidos por los expertos en la técnica. Existen numerosos vectores de este tipo comercializados, p. ej., de Invitrogen, Stratagene, Clontech, etc., y se describen en numerosas guías tales como Ausubel, Guthrie, Strathem, o Berger, todas mencionadas anteriormente. Dichos vectores habitualmente incluyen promotores, señales de poliadenilación, etc., junto con múltiples sitios de clonación, así como elementos adicionales tales como orígenes de replicación, genes marcadores seleccionables (p. ej., LEU2, URA3, TRP 1, HIS3, GFP), secuencias centroméricas, etc.

Los vectores virales, por ejemplo, un AAV, un PRV o un lentivirus, son adecuados para utilizar como diana y suministrar genes a los fotorreceptores de bastón utilizando un promotor de la invención.

La señal de salida de las células retinianas se puede medir utilizando un método eléctrico tal como una matriz multielectrodo o uno de fijación de membranas, o utilizando un método visual tal como la detección de fluorescencia.

Los métodos que utilizan la secuencia de ácido nucleico de la invención se pueden utilizar con el fin de identificar agentes terapéuticos para el tratamiento de un trastorno neurológico o de un trastorno de la retina que involucra los fotorreceptores de bastón, comprendiendo dicho método los pasos de poner en contacto un compuesto de prueba con los fotorreceptores de bastón que expresan uno o más transgenes bajo un promotor de la invención, y comparar al menos una señal de salida de los fotorreceptores de bastón obtenida en presencia de dicho compuesto de prueba con la misma señal de salida obtenida en ausencia de dicho compuesto de prueba.

Además, los métodos que utilizan los promotores de la invención también se pueden utilizar para la evaluación *in vitro* de la restauración de la visión, comprendiendo dicho método los pasos de poner en contacto los fotorreceptores de bastón que expresan uno o más transgenes bajo el control de un promotor de la invención con un agente, y comparar al menos una señal de salida obtenida después del contacto con dicho agente con la misma señal de salida obtenida antes de dicho contacto con dicho agente.

Las canalrodopsinas son una subfamilia de proteínas de tipo opsina que actúan como canales iónicos controlados por la luz. Sirven como fotorreceptores sensoriales en las algas verdes unicelulares, controlando la fototaxis, es decir, el movimiento en respuesta a la luz. Al expresarse en las células de otros organismos, permiten el uso de la luz para controlar la acidez intracelular, la entrada de calcio, la excitabilidad eléctrica y otros procesos celulares. Se conocen actualmente al menos tres canalrodopsinas «naturales»: Canalrodopsina-1 (ChR1), Canalrodopsina-2 (ChR2), y Canalrodopsina Volvox (VChR1). Además, también existen algunas versiones modificadas/mejoradas de estas proteínas. Todas las canalrodopsinas son canales catiónicos inespecíficos, que gestionan iones de H+, Na+, K+, y Ca2+.

La halorodopsina es una bomba de iones dirigida por la luz, específica para los iones cloruro, y se encuentra en las «bacterias» antiguas desde el punto de vista filogenético (arqueas), conocidas como halobacterias. Es una proteína con siete dominios transmembrana de la familia de proteínas de retinilideno, homóloga a la bomba de protones dirigida por la luz, bacteriorodopsina, y similar en su estructura terciaria (pero no la estructura de la secuencia primaria) a las rodopsinas de vertebrados, los pigmentos que detectan la luz en la retina. La halorodopsina también comparte similitud de secuencia con la canalrodopsina, un canal iónico dirigido por la luz. La halorodopsina contiene el derivado con todos los enlaces en trans retiniano de vitamina A isomerizable por la luz esencial. La halorodopsina es una de las pocas proteínas de membrana cuya estructura cristalina es conocida. Las isoformas de halorodopsina se pueden encontrar en múltiples especies de halobacteria, que incluyen *H. salinarum* y *N. pharaonis*. Una gran cantidad de investigación en curso explora estas diferencias y las utiliza para discernir las propiedades del fotociclo y de la bomba. Después de la bacteriorodopsina, la halorodopsina puede ser la mejor opsina (microbiana) de tipo I estudiada. La absorbancia del pico del complejo retiniano de halorodopsina es de aproximadamente 570 nm. Recientemente, la halorodopsina se ha convertido en una herramienta en optogenética. Al igual que el canal de iones activados por la luz azul canalrodopsina-2 proporciona la capacidad para activar células excitables (tales como neuronas, células musculares, células pancreáticas y células inmunitarias) con pulsos breves de luz azul, la halorodopsina proporciona la capacidad de silenciar las células excitables con pulsos breves de luz amarilla. Por tanto, la halorodopsina y la canalrodopsina permiten juntas la activación, silenciamiento y desincronización de la actividad neural óptica con múltiples colores, lo que crea un grupo de herramientas de neuroingeniería poderosas.

En algunas realizaciones, el promotor es parte de un vector dirigido a una retina, expresando dicho vector al menos un gen indicador que es detectable en los fotorreceptores de bastón vivos.

Los vectores virales adecuados para la invención son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, un AAV, un PRV o un lentivirus, son adecuados para utilizar como diana y suministrar genes a los fotorreceptores de bastón.

Cuando se trabaja con retina aislada, un suministro viral óptimo para las células retinianas se puede lograr montando el lado con células ganglionares hacia abajo, de modo que el lado fotorreceptor de la retina quede expuesto y, por tanto, se pueda transfectar mejor. Otra técnica es cortar en láminas, p. ej., con una cuchilla, la membrana limitante interna de la retina, de modo que los virus suministradores puedan penetrar las membranas internas. Una forma adicional es integrar la retina en agar, cortar en láminas dicha retina y aplicar los virus suministradores desde el lado del corte.

La señal de salida de las células transfectadas se puede medir utilizando métodos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, utilizando un método eléctrico tal como una matriz multielectrodo o uno de fijación de membranas, o utilizando un método visual tal como la detección de fluorescencia. En algunos casos, la membrana limitante interna se elimina mediante microcirugía de la membrana limitante interna. En otros casos, el registro se consigue a través de cortes llevados a cabo en la membrana limitante interna.

Se puede utilizar cualquier fuente de células retinales para la presente invención. En algunas realizaciones de la invención, las células retinales proceden de una retina humana o se encuentran en ella. En otras realizaciones, la retina es de un animal, p. ej., de origen bovino o de roedor. La retina humana se puede obtener fácilmente a partir de bancos de córnea, donde dichas retinas normalmente se descartan después de la disección de la córnea. La retina humana adulta tiene una gran superficie (aproximadamente 1100 mm^2) y, por tanto, se puede separar fácilmente en una serie de subregiones experimentalmente. Además, las retinas también se pueden utilizar como un modelo excelente para la comunicación sináptica, debido a que la retina tiene sinapsis que son idénticas al resto del cerebro.

Tal como se utiliza en la presente, el término «animal» se utiliza en la presente para incluir todos los animales. En algunas realizaciones de la invención, el animal no humano es un vertebrado. Algunos ejemplos de animales son seres humanos, ratones, ratas, vacas, cerdos, caballos, pollos, patos, ocas, gatos, perros, etc. El término «animal» también incluye un animal individual en todas las etapas del desarrollo, incluidas las etapas embrionaria y fetal. Un «animal genéticamente

modificado» es cualquier animal que contenga una o más células que porten información genética alterada o recibida, directa o indirectamente, mediante manipulación genética deliberada a un nivel subcelular tal como mediante recombinación dirigida, microinyección o infección con virus recombinantes. No se pretende que el término «animal genéticamente modificado» englobe el cruce clásico o la fertilización *in vitro*, sino que se pretende que englobe los animales en los que una o más células son alteradas por una molécula de ADN recombinante, o la reciben. Esta molécula de ADN recombinante se puede dirigir específicamente a un locus genético definido, se puede integrar aleatoriamente dentro de un cromosoma o puede ser un ADN que se replica de forma extracromosómica. La expresión «animal genéticamente modificado en la línea germinal» se refiere a un animal genéticamente modificado en el que la alteración genética o información genética se introdujo en células germinales, con lo cual confiere la capacidad para transferir la información genética a su descendencia. Si dicha descendencia posee realmente algo o todo de esa alteración o información genética, son también animales genéticamente modificados.

La alteración o información genética puede ser exógena respecto a la especie de animal a la cual pertenece el receptor, o exógena solamente respecto al receptor individual particular, o puede ser información genética que ya poseía el receptor. En el último caso, el gen alterado o introducido se puede expresar de forma diferente al gen nativo, o no expresarse en absoluto.

Los genes utilizados para alterar un gen diana se pueden obtener mediante una amplia variedad de técnicas que incluyen, sin carácter limitante, el aislamiento a partir de fuentes genómicas, la preparación de ADNc a partir de moldes de ARNm aislados, síntesis directa o una combinación de estos.

Un tipo de células diana para la introducción de transgenes son las células ES. Las células ES se pueden obtener a partir de embriones de preimplantación cultivados *in vitro* y fusionados con embriones (Evans *et al.* (1981), *Nature* 292:154-156; Bradley *et al.* (1984), *Nature* 309:255-258; Gossler *et al.* (1986), P*roc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9065-9069; Robertson *et al.* (1986), *Nature* 322:445-448; Wood *et al.* (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:4582- 4584). Los transgenes se pueden introducir de forma eficiente en las células ES mediante técnicas estándar tales como transfección de ADN utilizando electroporación o mediante transducción mediada por retrovirus. Las células ES transformadas resultantes pueden combinarse posteriormente con mórulas mediante agregación o inyectarse en blastocitos de un animal no humano. Las células ES introducidas posteriormente colonizan los embriones y contribuyen a la línea germinal del animal quimérico resultante (Jaenisch (1988), *Science* 240:1468-1474). El uso de células ES con dirección génica en la generación de ratones genéticamente modificados con dirección génica fue descrito en 1987 (Thomas *et al.* (1987), *Cell* 51:503-512) y se revisa en otra parte (Frohman *et al.* (1989), *Cell* 56:145-147; Capecchi (1989), *Trends in Genet.* 5:70-76; Baribault *et al.* (1989), *Mol. Biol. Med.* 6:481-492; Wagner (1990), EMBO J. 9:3025-3032; Bradley *et al.* (1992), *Bio/Technology* 10:534-539).

Hay técnicas disponibles para inactivar o alterar cualquier región genética respecto a cualquier mutación deseada utilizando recombinación homóloga dirigida para insertar cambios específicos en los alelos cromosómicos. Tal como se utiliza en la presente, un «gen dirigido» es una secuencia de ADN introducida en la línea germinal de un animal no humano por medio de la intervención humana, que incluye, sin carácter limitante, los métodos descritos en la presente. Los genes dirigidos de la invención incluyen secuencias de ADN que se diseñan para que alteren específicamente alelos endógenos cognados.

En la presente invención, el término «aislado» se refiere a material retirado de su ambiente original (p. ej., el ambiente natural si es de origen natural) y, por tanto, es alterado «por la mano del hombre» respecto a su estado natural. Por ejemplo, un polinucleótido aislado podría ser parte de un vector o una composición de materia, o podría estar contenido dentro de una célula, y aún estar «aislado» debido a que ese vector, composición de materia o célula particular no es el ambiente original del polinucleótido. El término «aislado» no se refiere a colecciones genómicas o de ADNc, preparados de células completas totales o de ARNm, preparados de ADN genómico (que incluyen aquellos separados por electroforesis y transferidos a membranas de transferencia), preparados de ADN genómico celular completo sometido a cizallamiento u otras composiciones donde la técnica demuestra características no distintivas del polinucleótido/las secuencias de la presente invención. Algunos ejemplos adicionales de moléculas de ADN aisladas incluyen moléculas de ADN recombinante mantenidas en células hospedadoras heterólogas o moléculas de ADN (parcial o sustancialmente) purificadas en solución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de las moléculas de ADN de la presente invención. Sin embargo, un ácido nucleico contenido en un clon que es un miembro de una colección (p. ej., una colección genómica o de ADNc) que no ha sido aislado de otros miembros de la colección (p. ej., en forma de solución homogénea que contiene el clon y otros miembros de la colección) o un cromosoma eliminado de una célula o un lisado celular (p. ej., una «extensión cromosómica», como en un cariotipo) o un preparado de ADN genómico sometido a cizallamiento de forma aleatoria o un preparado de ADN genómico cortado con una o más enzimas de restricción no está «aislado» a efectos de esta invención. Tal como se discute adicionalmente en la presente, las moléculas de ácido nucleico aisladas de acuerdo con la presente invención se pueden producir de forma natural, recombinante o sintética.

Los «polinucleótidos» pueden estár compuestos por ADN mono- y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones mono- y bicatenarias, ARN mono- y bicatenario y ARN que es una mezcla de regiones mono- y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarios o, más habitualmente, bicatenarios o una mezcla de

regiones mono- y bicatenarias. Además, los polinucleótidos pueden estar compuestos por regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Los polinucleótidos también pueden contener una o más bases modificadas o esqueletos de ADN o ARN modificados por razones de estabilidad o por otras razones. Las bases «modificadas» incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inosina. Se pueden llevar a cabo una serie de modificaciones al ADN y ARN, por tanto, el término «polinucleótido» engloba formas modificadas química, enzimática o metabólicamente.

La expresión «polinucleótido que codifica un polipéptido» engloba un polinucleótido que incluye solamente la secuencia codificante para el polipéptido, así como un polinucleótido que incluye una secuencia codificante y/o no codificante adicional.

La expresión «condiciones de hibridación rigurosas» se refiere a una incubación durante la noche a 42 grados C en una solución que comprende un 50% de formamida, 5x SSC (NaCl 750 mM, citrato trisódico 75 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7.6), 5x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10% y ADN espermático de salmón sometido a cizallamiento desnaturalizado con una concentración de 20 µg/mL, seguida de lavado de los filtros en 0.1x SSC a aproximadamente 50 grados C. Los cambios en la rigurosidad de la hibridación y la detección de señales se consiguen principalmente mediante la manipulación de la concentración de formamida (porcentajes inferiores de formamida dan lugar a una rigurosidad reducida); condiciones salinas o temperatura. Por ejemplo, unas condiciones de rigurosidad moderadamente elevada incluyen una incubación durante la noche a 37 grados C en una solución que comprende 6X SSPE (20X SSPE = NaCl 3M; NaH_2PO_4 0.2M; EDTA 0.02 M, pH 7.4), 0.5% de SDS, 30% de formamida, ADN bloqueante espermático de salmón con una concentración de 100 µg/mL; seguida de lavados a 50 grados C con 1XSSPE, 0.1% de SDS. Además, para lograr una rigurosidad incluso menor, se pueden llevar a cabo lavados después de la hibridación rigurosa con concentraciones salinas superiores (p. ej., 5X SSC). Se pueden conseguir variaciones en las condiciones anteriores mediante la inclusión y/o sustitución de reactivos bloqueantes alternos utilizados para suprimir el fondo en los experimentos de hibridación. Los reactivos bloqueantes habituales incluyen el reactivo de Denhardt, BLOTTO, heparina, ADN espermático de salmón desnaturalizado y formulaciones patentadas comercializadas. La inclusión de reactivos bloqueantes específicos puede requerir la modificación de las condiciones de hibridación descritas anteriormente, debido a problemas con la compatibilidad.

Los términos «fragmento», «derivado» y «análogo» cuando se hace referencia a polipéptidos se refieren a polipéptidos que retienen sustancialmente la misma función o actividad biológica que dichos polipéptidos. Un análogo incluye una proproteína que puede ser activada por la escisión de la porción de proproteína para producir un polipéptido maduro activo.

El término «gen» se refiere al segmento de ADN implicado en la producción de una cadena polipeptídica; incluye regiones que preceden y siguen a la región codificante «líder y trailer», así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones).

Los polipéptidos pueden estar compuestos por aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isoésteres peptídicos, y pueden contener aminoácidos diferentes de los 20 aminoácidos codificados por los genes. Los polipéptidos se pueden modificar por procesos naturales tales como procesado posterior a la traducción o mediante técnicas de modificación química que son muy conocidas en la técnica. Dichas modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una abultada bibliografía de investigación. Las modificaciones pueden tener lugar en cualquier parte del polipéptido, incluido el esqueleto peptídico, las cadenas laterales de aminoácidos y el extremo amino o carboxilo. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo grado o en grados variables en varios sitios en un polipéptido determinado. Además, un polipéptido determinado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden estar ramificados, por ejemplo, como resultado de una ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden ser el resultado de procesos naturales posteriores a la traducción o se pueden preparar mediante métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen, sin carácter limitante, acetilación, acilación, biotinilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto heme, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de fosfotidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, derivatización con grupos protectores/bloqueantes conocidos, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclaje de GPI, hidrolixación, yodación, unión a una molécula de anticuerpo u otro ligando celular, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesado proteolítico (p. ej., escisión), fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos a proteínas mediada por ARN de transferencia tal como arginilación y ubiquitinación (Remítase, por ejemplo, a PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2.ª Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1993); POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, págs. 1-12 (1983); Seifter *et al.*, *Meth Enzymol* 182:626-646 (1990); Rattan *et al.*, *Ann NY Acad Sci* 663:48-62 (1992).)

Un fragmento polipeptídico «que tiene actividad biológica» se refiere a polipéptidos que presentan actividad similar, pero no necesariamente idéntica, a una actividad del polipéptido original, incluidas las formas maduras, medida en un ensayo biológico particular, con o sin dependencia de la dosis. En el caso donde sí existe dependencia de la dosis, no es necesario que sea idéntica a la del polipéptido, sino sustancialmente similar a la dependencia de la dosis en una actividad determinada en comparación con el polipéptido original (es decir, el polipéptido candidato presentará una actividad mayor o no más de aproximadamente 25 veces menor y, en algunas realizaciones, no más de una actividad aproximadamente diez veces menor, o no más de una actividad aproximadamente tres veces menor respecto al polipéptido original).

Pueden aislarse homólogos de especie e identificarse produciendo sondas o cebadores adecuados a partir de las secuencias proporcionadas en la presente y cribar una fuente de ácidos nucleicos adecuada en busca del homólogo deseado.

El término «variante» se refiere a un polinucleótido o polipéptido que difiere del polinucleótido o polipéptido original, pero que mantiene sus propiedades esenciales. Por lo general, las variantes son globalmente muy similares y, en muchas regiones, idénticas al polinucleótido o polipéptido original.

Como cuestión práctica, se puede determinar si cualquier molécula de ácido nucleico o polipéptido particular es al menos un 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una secuencia de nucleótidos de la presente invención de forma convencional utilizando programas informáticos conocidos. Un método preferido para determinar la mejor coincidencia total entre una secuencia problema (una secuencia de la presente invención) y una secuencia objeto, también denominada alineamiento de secuencias global, se puede determinar utilizando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.* (*Comp. App. Blosci.* (1990) 6:237-245). En un alineamiento de secuencias, las secuencias problema y objeto son ambas secuencias de ADN. Una secuencia de ARN se puede comparar convirtiendo las U en T. El resultado de dicho alineamiento de secuencia global es en identidad porcentual. Los parámetros preferidos utilizados en un alineamiento FASTDB de secuencias de ADN para calcular la identidad porcentual son: Matriz=Unitaria, k-tupla=4, Penalización por apareamiento erróneo--1, Penalización por unión--30, Longitud del grupo de aleatorización=0, Puntuación de corte=I, Penalización por hueco--5, Penalización por tamaño de hueco 0.05, Tamaño de la ventana=500 o la longitud de la secuencia de nucleótidos objeto, la que sea más corta. Si la secuencia objeto es más corta que la secuencia problema debido a deleciones 5’ o 3’, no debido a deleciones internas, se debe llevar a cabo una corrección manual de los resultados. Esto es debido a que el programa FASTDB no considera los truncamientos 5’ y 3’ de la secuencia objeto al calcular la identidad porcentual. Para las secuencias objeto truncadas en los extremos 5’ o 3’, respecto a la secuencia problema, la identidad porcentual se corrige calculando el número de bases de la secuencia problema que están en posición 5’ y 3’ de la secuencia objeto, que no están apareadas/alineadas, como porcentaje de las bases totales de la secuencia problema. El hecho de si un nucleótido está apareado/alineado se determina mediante los resultados del alineamiento de secuencias FASTDB. A continuación, este porcentaje se sustrae de la identidad porcentual, calculada con el programa FASTDB anterior utilizando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación de identidad porcentual final. Esta puntuación corregida es lo que se utiliza para los fines de la presente invención. Solamente las bases fuera de la región 5’ y 3’ de la secuencia objeto, tal como muestra el alineamiento FASTDB, que no están apareadas/alineadas con la secuencia problema, se calculan a efectos de ajustar manualmente la puntuación de identidad porcentual. Por ejemplo, una secuencia objeto de 90 bases se alinea respecto a una secuencia problema de 100 bases para determinar la identidad porcentual. Las deleciones tienen lugar en el extremo 5’ de la secuencia objeto y, por tanto, el alineamiento FASTDB no muestra ningún apareamiento/alineamiento de las 10 primeras bases en el extremo 5’. Las 10 bases afectadas representan un 10% de la secuencia (número de bases en los extremos 5’ y 3’ no apareadas/número total de bases en la secuencia problema) de modo que se sustrae un 10% de la puntuación de identidad porcentual calculada con el programa FASTDB. Si las 90 bases restantes estuvieran perfectamente apareadas, la identidad porcentual final sería de un 90%. En otro ejemplo, se compara una secuencia objeto de 90 bases con una secuencia problema de 100 bases. Esta vez, las deleciones son deleciones internas de modo que no hay bases en la región 5’ o 3’ de la secuencia objeto que no estén apareadas/alineadas con la secuencia problema. En este caso, la identidad porcentual calculada por FASTDB no se corrige manualmente. Una vez más, solamente se corrigen manualmente las bases 5’ y 3’ de la secuencia objeto que no están apareadas/alineadas con la secuencia problema.

Por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos, por ejemplo, un 95% «idéntica» a una secuencia de aminoácidos problema de la presente invención, se pretende hacer referencia a que la secuencia de aminoácidos del polipéptido objeto es idéntica a la secuencia problema salvo por que la secuencia del polipéptido objeto puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos problema. Dicho de otro modo, para obtener un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos al menos un 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos problema, hasta un 5% de los residuos de aminoácidos en la secuencia objeto se puede insertar, eliminar o sustituir con otro aminoácido. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden tener lugar en las posiciones amino o carboxi terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre residuos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

Como cuestión práctica, se puede determinar si cualquier polipéptido particular es al menos un 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntico a, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos mostradas en una secuencia

o a la secuencia de aminoácidos codificada por un clon de ADN depositado de forma convencional utilizando programas informáticos conocidos. Un método preferido para determinar el mejor apareamiento total entre una secuencia problema (una secuencia de la presente invención) y una secuencia objeto, también denominado alineamiento de secuencias global, se puede determinar utilizando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.* (*Comp. App. Biosci.* (1990) 6:237-245). En un alineamiento de secuencias, las secuencias problema y objeto son ambas secuencias de nucleótidos o ambas secuencias de aminoácidos. El resultado de dicho alineamiento de secuencia global es en identidad porcentual. Los parámetros preferidos utilizados en un alineamiento de aminoácidos FASTDB son: Matriz=PAM 0, k-tupla=2, Penalización por apareamiento incorrecto--I, Penalización por unión=20, Longitud del grupo de aleatorización=0, Puntuación de corte=I, Tamaño de la ventana=longitud de secuencia, Penalización por hueco--5, Penalización por tamaño de hueco--0.05, Tamaño de la ventana=500 o la longitud de la secuencia de aminoácidos objeto, la que sea más corta. Si la secuencia objeto es más corta que la secuencia problema debido a deleciones N o C terminales, no debido a deleciones internas, se debe llevar a cabo una corrección manual de los resultados. Esto es debido a que el programa FASTDB no considera los truncamientos N y C terminales de la secuencia objeto al calcular la identidad porcentual global. Para las secuencias objeto truncadas en los extremos N y C, en relación con la secuencia problema, la identidad porcentual se corrige calculando el número de residuos de la secuencia problema que están en posición N y C terminal de la secuencia objeto, que no están apareados/alineados con un residuo objeto correspondiente, como porcentaje de las bases totales de la secuencia problema. El hecho de si un residuo está apareado/alineado se determina mediante los resultados del alineamiento de secuencias FASTDB. A continuación, este porcentaje se sustrae de la identidad porcentual, calculada con el programa FASTDB anterior utilizando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación de identidad porcentual final. Esta puntuación de identidad porcentual final es lo que se utiliza para los fines de la presente invención. Solamente se consideran residuos en los extremos N y C de la secuencia objeto, que no están apareados/alineados con la secuencia problema, a fin de ajustar manualmente la puntuación de identidad porcentual. Es decir, solamente las posiciones de residuos problema fuera de los residuos N y C terminales más lejanos de la secuencia objeto. Solamente se corrigen manualmente las posiciones de residuos fuera de los extremos N y C terminales de la secuencia objeto, como se muestra en el alineamiento FASTDB, que no están apareados/alineados con la secuencia problema. No se han de hacer otras correcciones manuales para los fines de la presente invención.

Las variantes proteicas de origen natural se denominan «variantes alélicas» y se refieren a una de varias formas alternas de un gen que ocupa un locus determinado en un cromosoma de un organismo. (*Genes* 11, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, Nueva York (1985).) Estas variantes alélicas pueden variar a nivel polinucleotídico y/o polipeptídico. Como alternativa, se pueden producir variantes que no son de origen natural mediante técnicas de mutagénesis o mediante síntesis directa.

El término «etiqueta» se refiere a agentes que son capaces de proporcionar una señal detectable, ya sea directamente o mediante interacción con uno o más miembros adicionales de un sistema productor de señales. Las etiquetas que se pueden detectar directamente y pueden tener utilidad en la invención incluyen las etiquetas fluorescentes. Los fluoróforos específicos incluyen tintes de fluoresceína, rhodamina, BODIPY, cianina y similares.

Una «etiqueta fluorescente» se refiere a cualquier etiqueta con la capacidad de emitir luz de una determinada longitud de onda cuando es activada por luz de otra longitud de onda.

El término «fluorescencia» se refiere a cualquier característica detectable de una señal fluorescente, que incluye intensidad, espectro, longitud de onda, distribución intracelular, etc.

El término «detectar» la fluorescencia se refiere a evaluar la fluorescencia de una célula utilizando métodos cualitativos o cuantitativos. En algunas de las realizaciones de la presente invención, la fluorescencia se detectará de una forma cualitativa. Dicho de otro modo, el marcador fluorescente está presente, lo que indica que la proteína de fusión recombinante se expresa, o no. Para otros casos, la fluorescencia se puede determinar utilizando medios cuantitativos, p. ej., midiendo la intensidad, espectro o distribución intracelular de la fluorescencia, lo que permite la comparación estadística de los valores obtenidos en condiciones diferentes. El nivel también se puede determinar utilizando métodos cualitativos tales como el análisis visual y una comparación por parte de un ser humano de múltiples muestras, p. ej., muestras detectadas utilizando un microscopio fluorescente u otro detector óptico (p. ej., sistema de análisis de imagen, etc.). Una «alteración» o «modulación» en la fluorescencia se refiere a cualquier diferencia detectable en la intensidad, distribución intracelular, espectro, longitud de onda u otro aspecto de la fluorescencia en una condición particular en comparación con otra condición. Por ejemplo, una «alteración» o «modulación» se detecta cuantitativamente, y la diferencia es una diferencia estadísticamente significativa. Cualesquiera «alteraciones» o «modulaciones» en la fluorescencia pueden ser detectadas utilizando instrumentación estándar tal como microscopio fluorescente, CCD o cualquier otro detector fluorescente, y pueden ser detectadas utilizando un sistema automatizado tal como los sistemas integrados, o pueden reflejar una detección subjetiva de una alteración, por parte de un observador humano.

La «proteína fluorescente verde» (GFP) es una proteína, compuesta por 238 aminoácidos (26.9 kDa), aislados originalmente a partir de la medusa *Aequorea victoria/Aequorea aequorea/Aequorea forskalea* que emite fluorescencia verde cuando se expone a luz azul. La GFP de *A. victoria* tiene un pico de excitación principal a una longitud de onda de 395 nm y uno secundario a 475 nm. Su pico de emisión se encuentra a 509 nm, que está en la parte verde inferior del

espectro visible. La GFP del Pensamiento del mar (*Renilla reniformis*) tiene un único pico de excitación principal a 498 nm. Debido al potencial para el uso generalizado y las necesidades en evolución de los investigadores, se han producido mediante ingeniería genética muchas mutaciones diferentes de GFP. Esta primera mejora principal fue una mutación puntual (S65T) publicada en 1995 en *Nature* por Roger Tsien. Esta mutación mejoró de forma drástica las características espectrales de GFP, lo que dio como resultado una mayor fluorescencia, fotoestabilidad y un desplazamiento del pico de excitación principal hasta 488 manteniéndose el pico de emisión a 509 nm. La adición de la mutación puntual (F64L) de la eficiencia de plegamiento a 37 ºC a esta matriz proporcionó GFP potenciada (EGFP). EGFP tiene un coeficiente de extinción (denotado ε), también conocido como su sección transversal óptica de 9.13×10-21 m^2/molécula, también indicada como 55 000 L/(mol•cm). La GFP con superplegamiento, una serie de mutaciones que permiten que la GFP se pliegue y madure rápidamente cuando se fusiona con péptidos que se pliegan de forma deficiente, se describió en 2006.

La «proteína fluorescente amarilla» (YFP) es una mutación genética de la proteína fluorescente verde, derivada de *Aequorea victoria*. Su pico de excitación es 514 nm y su pico de emisión es 527 nm.

Tal como se utiliza en la presente, las formas singulares «un/a» y «el/la» incluyen la referencia al plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Un «virus» es un agente infeccioso submicroscópico que no es capaz de crecer o reproducirse fuera de una célula hospedadora. Cada partícula viral, o virión, está consituido por material genético, ADN o ARN, dentro de un recubrimiento proteico protector denominado cápside. La forma de la cápside varía de formas helicoidales e icosahédricas simples (polihédrica o cuasiesférica), a estructuras más complejas con colas o una envoltura. Los virus infectan formas de vida celulares y se agrupan en tipos animales, vegetales y bacterianos, de acuerdo con el tipo de hospedador infectado.

La expresión «virus transináptico», tal como se utiliza en la presente, se refiere a virus capaces de migrar de una neurona a otra neurona conectada a través de una sinapsis. Algunos ejemplos de dichos virus transinápticos son rabdovirus, p. ej., virus de la rabia y alfaherpesvirus, p. ej., virus del herpes simple o de seudorrabia. La expresión «virus transináptico», tal como se utiliza en la presente, también engloba subunidades virales que tienen por sí mismas la capacidad para migrar de una neurona a otra neurona conectada a través de una sinapsis y vectores biológicos tales como virus modificados, que incorporan una subunidad de este tipo y demuestran una capacidad de migrar de una neurona a otra neurona conectada a través de una sinapsis.

La migración sináptica puede ser anterógrada o retrógrada. Durante una migración retrógrada, un virus viajará de una neurona postsináptica a una presináptica. Por consiguiente, durante una migración anterógrada, un virus viajará de una neurona presináptica a una postsináptica.

El término homólogo se refiere a proteínas que comparten un ancestro común. Los análogos no comparten ningún ancestro común, pero tienen alguna similitud funcional (en lugar de estructural) que hace que se incluyan en una clase (p. ej., las serinproteasas de tipo tripsina y las de subtilisina claramente no están relacionadas, sus estructuras fuera del sitio activo son completamente diferentes, pero tienen sitios activos virtualmente idénticos desde el punto de vista geométrico y, por tanto, se consideran un ejemplo de evolución convergente a análogos).

Hay dos subclases de homólogos: ortólogos y parálogos. Los ortólogos son el mismo gen (p. ej., citocromo ‘c’), en especies diferentes. Dos genes en el mismo organismo no pueden ser ortólogos. Los parálogos son los resultados de la duplicación génica (p. ej., hemoglobina beta y delta). Si dos genes/proteínas son homólogos y se encuentran en el mismo organismo, son parálogos.

Tal como se utiliza en la presente, el término «trastorno» se refiere a una dolencia, patología, enfermedad, afección clínica o afección patológica.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión «portador farmacéuticamente aceptable» se refiere a un medio portador que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del principio activo, es químicamente inerte y no es tóxico para el paciente al que se administra.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión «derivado farmacéuticamente aceptable» se refiere a cualquier homólogo, análogo o fragmento de un agente, p. ej., identificado utilizando un método de cribado de la invención, que es relativamente atóxico para el sujeto.

La expresión «agente terapéutico» se refiere a cualquier molécula, compuesto o tratamiento, que contribuye a la prevención o el tratamiento de trastornos, o complicaciones de trastornos.

Se pueden preparar, envasar y etiquetar para el tratamiento composiciones que comprenden un agente de este tipo formulado en un portador farmacéutico compatible.

Si el complejo es hidrosoluble, entonces se puede formular en un tampón apropiado, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato u otras soluciones fisiológicamente compatibles.

Como alternativa, si el complejo resultante tiene una solubilidad deficiente en disolventes acuosos, entonces se puede formular con un tensioactivo no iónico tal como Tween o polietilenglicol. Por tanto, los compuestos y sus solvatos fisiológicamente aceptables se pueden formular para la administración mediante inhalación o insuflación (a través de la boca o la nariz) o administración oral, bucal, parenteral, rectal o, en el caso de tumores, inyectarse directamente en un tumor sólido.

Para la administración oral, el preparado farmacéutico puede estar en forma líquida, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o se puede presentar como un producto farmacológico para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Dichos preparados líquidos se pueden preparar mediante métodos convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (p. ej., jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas), agentes emulsionantes (p. ej., lecitina o acacia); vehículos no acuosos (p. ej., aceite de almendras, ésteres oleosos o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (p. ej., *p*-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (p. ej., almidón de maíz pregelatinizado, polivinil pirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa); rellenos (p. ej, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (p. ej., estearato de magnesio, talco o sílice); desintegrantes (p. ej., almidón de patata o glicolato de almidón sódico); o agentes humectantes (p. ej., laurilsulfato sódico). Los comprimidos se pueden recubrir mediante métodos muy conocidos en la técnica.

Los preparados para administración oral se pueden formular de forma adecuada para proporcionar una liberación controlada del compuesto activo.

Los compuestos se pueden formular para la administración parenteral por inyección, p. ej., mediante inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido.

Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos acuosos u oleosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, el principio activo se puede encontrar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, p. ej., agua estéril exenta de pirógenos, antes del uso.

Los compuestos también se pueden formular en forma de aplicación tópica tal como una crema o loción.

Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos también se pueden formular como un preparado de liberación lenta. Dichas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implantación (por ejemplo, intraocular, subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intraocular.

De este modo, por ejemplo, los compuestos se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble. Los liposomas y las emulsiones son ejemplos muy conocidos de vehículos o portadores de suministro para fármacos hidrófilos.

Las composiciones se pueden presentar, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas farmacéuticas unitarias que contengan el principio activo. El envase puede comprender, por ejemplo, una lámina metálica o de plástico tal como un envase blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración.

La invención también proporciona kits para llevar a cabo los regímenes terapéuticos de la invención. Dichos kits comprenden cantidades eficaces desde el punto de vista terapéutico o profiláctico de las composiciones en forma farmacéuticamente aceptable en uno o más recipientes.

La composición en un vial de un kit puede estar en forma de una solución farmacéuticamente aceptable, p. ej., combinada con solución salina estéril, solución de dextrosa o solución tamponada, u otro fluido estéril farmacéuticamente aceptable. Como alternativa, el complejo se puede liofilizar o desecar, en este caso, el kit comprende además opcionalmente en un recipiente una solución farmacéuticamente aceptable (p. ej., solución de dextrosa, salina, etc.), preferentemente estéril, para reconstituir el complejo con el fin de formar una solución para inyección.

En otra realización, un kit comprende además una aguja o jeringa, preferentemente envasada en forma estéril, para inyectar el complejo y/o una toallita con alcohol envasada. Opcionalmente, se incluyen instrucciones para la administración de las composiciones por parte de un terapeuta o por parte del paciente.

Los fotorreceptores de bastón, células de bastón, o bastones, son células fotorreceptoras en la retina del ojo que pueden actuar con una luz menos intensa que el otro tipo de fotorreceptores visuales, células de cono. Los bastones se concentran en los bordes externos de la retina y se utilizan en la visión periférica. De media, hay aproximadamente 90 millones de células de bastón en la retina humana. Más sensibles que las células de cono, las células de bastón son responsables prácticamente por completo de la visión nocturna. Sin embargo, como solamente tienen un tipo de pigmento sensible a la luz, en lugar de los tres tipos que tienen las células de cono humanas, los bastones tienen poca función, si es que tienen alguna, en la visión a color.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado con el que los entiende normalmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente en la práctica o evaluación de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, primará la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Ejemplos

Constructo génico

Se generaron mapas de metilación de ADN de alta resolución del genoma completo en el tipo de célula de interés (bastón) para identificar regiones reguladoras candidatas. Se seleccionaron potenciadores candidatos basándose en la presencia de hipometilación de ADN específica para un tipo de célula. Los elementos así seleccionados se cribaron para detectar la expresión utilizando un ensayo indicador de alto rendimiento *in vivo* en conos y bastones. Los elementos de secuencia específicos para bastones se sintetizaron y se clonaron entonces delante de una secuencia de promotor mínimo ATCCTCACATGGTCCTGCTGGAGTTAGTAGAGGGTATATAATGGAAGCTCGACTTCCAGCTATCACATCCACTGTGT TGTTGTGAACTGGAATCCACTATAGGCCA (SEQ ID NO:2). La secuencia codificante de ChR2-eGFP se insertó inmediatamente después de este promotor y la secuencia de Kozak optimizada (GCCACC), y fue seguida por un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) y el sitio de poliadenilación de SV40. Las neuronas retinianas se dirigieron utilizando el serotipo 2/8 de AAV con una concentración entre 3.43E+11 y 1.75E+12 GC/mL.

Transfección viral y preparación de tejidos

Para la administración de AAV, los ojos de los animales anestesiados se perforaron en la esclerótica cerca del cristalino con una aguja de calibre 30 aguda. Se inyectaron 2 microL de suspensión de partículas de AAV a nivel subretiniano con una jeringa de Hamilton. Después de tres semanas, las retinas aisladas se fijaron durante 30 min en PFA al 4% en PBS, a lo que siguió un paso de lavado en PBS a 4°C. Las retinas completas se trataron con suero de asno normal normal al 10% (NDS), BSA al 1%, Triton X-100 al 0.5% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. El tratamiento con anticuerpo anti-GFP de rata monoclonal (Molecular Probes Inc.; 1:500) y anticuerpo policlonal de conejo antiarrestina de conos de ratón (Millipore: 1:200) en NDS al 3%, BSA al 1%, Triton X-100 al 0.5% en PBS se llevó a cabo durante 5 días a temperatura ambiente. El tratamiento con Ab Alexa Fluor-488 anti-rata de asno secundario (Molecular Probes Inc.; 1:200), Alexa Fluor-633 anti-conejo y Hoechst, se llevó a cabo durante 2 h. Las secciones se lavaron, se montaron con reactivo ProLong Gold para evitar la pérdida de color (Molecular Probes Inc.) en portaobjetos de vidrio y se fotografiaron utilizando un microscopio confocal de barrido láser Zeiss LSM 700 Axio Imager Z2 (Carl Zeiss Inc.).

LISTA DE SEQUENCIAS

<110> Instituto Friedrich Miescher para la investigación biomédica

<120> SynP161, un promotor para la expresión específica de genes en fotorreceptores de bastón

<130> PAT057174

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 191
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 1
attccggtca cacggccaag attattccac ctgcgctttg agcaataggg agagggctct 60

ggtgcctctt cctggaattt gattaattcg cttgagtcag tcacagaatt tgaggaagca 120

ttgatatttg aagatgtgtt cttctaaagg atacaaatga atatatgcat agtgagagtt 180

taggagatag g 191

<210> 2
<211> 106
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 2
atcctcacat ggtcctgctg gagttagtag agggtatata atggaagctc gacttccagc 60

tatcacatcc actgtgttgt tgtgaactgg aatccactat aggcca 106

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende, o está constituida por, la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1, o está constituida por una secuencia de ácido nucleico de al menos 150 pb que tienen al menos un 90% de identidad respecto a dicha SEQ ID NO: 1, donde dicha molécula de ácido nucleico aislada da lugar a la expresión específica de un gen en los fotorreceptores de bastón cuando una secuencia de ácido nucleico que codifica dicho gen está ligada operativamente a dicha molécula de ácido nucleico aislada.

2. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, que comprende además un promotor mínimo, p. ej., el promotor mínimo de la SEQ ID NO: 2.

3. Casete de expresión que comprende, como un elemento que promueve la expresión génica en células específicas, un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde dicho ácido nucleico aislado está ligado operativamente a al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen que se ha de expresar específicamente en los fotorreceptores de bastón.

4. Un vector que comprende el casete de expresión de la reivindicación 3.

5. El vector de la reivindicación 4, donde dicho vector es un vector viral.

6. Uso de un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, de un casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 3 o de un vector de acuerdo con la reivindicación 4 para la expresión *in vitro* o *ex vivo* de un gen en los fotorreceptores de bastón.

7. Un método *in vitro* o *ex vivo* para la expresión de un gen en los fotorreceptores de bastón que comprende los pasos de transfectar una célula aislada, una línea celular o una población celular con un casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 3, donde el gen a expresar será expresado específicamente por la célula aislada, la línea celular o la población celular si dicha célula es, o dichas células comprenden, fotorreceptores de bastón.

8. Una célula aislada que comprende el casete de expresión de la reivindicación 3 o el vector de la reivindicación 4.

9. La célula de la reivindicación 8, donde el casete de expresión o vector se integra de forma estable en el genoma de dicha célula.

10. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1 o 2, el casete de expresión de la reivindicación 3, el vector de la reivindicación 4, el uso de la reivindicación 6, el método de la reivindicación 7 o la célula de la reivindicación 8, donde el producto del gen es una molécula sensible a la luz, por ejemplo halorodopsina o canalrodopsina.

11. Un kit para expresar un gen en fotorreceptores de bastón que comprende una molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.

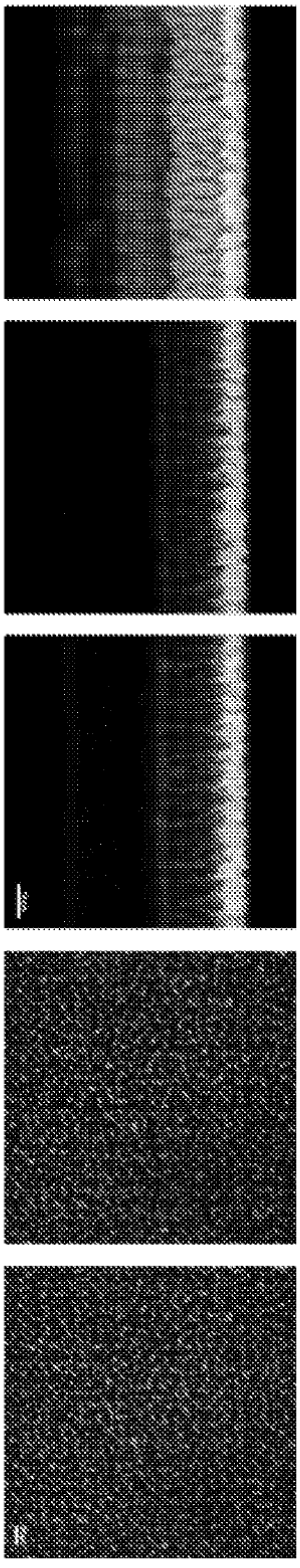

Fig. 1