



02 089153 00

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación: 02089153-00000000
Fecha (AMD): 2002-10-03 16:12:11
Trámite: 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: POPO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Folios: 136

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
2000-3**

SOLICITUD DE:

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

2

Nombre: **Novartis AG y Université
Louis Pasteur**

IDENTIFICACIÓN

Dirección:

C.C.

NIT

Teléfono:

Fax:

C.E.

Otro

E-mail:

Domicilio: 4056 Basilea, Suiza y 67000
Strasbourg, Francia

Número

**SOLICITANTE
(71)**

3

Nombre: **JIMENA ESCOBAR URIBE**

IDENTIFICACIÓN

Dirección: Cra. 11A No. 94-76 (Of. 305)

C.C.

NIT

Teléfono: 6 162051/61 Fax: 6 161889

C.E.

Otro

E-mail: escobaru@elsitio.net.co

Número 39.779.452 T.P. 68228

**REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)**

4

Nombre: **VER ANEXOS**

IDENTIFICACIÓN

Dirección:

C.C.

NIT

Teléfono:

Fax:

C.E.

Otros

E-mail:

Domicilio

Número

**INVENTOR (ES)
(72)**

5

TÍTULO (54) PROTEINA ASOCIADA CON ENFERMEDAD.

6 Clasificación Internacional (51)

A 61

7 Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☐ NO ☒

8 Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los:

6 meses

☒

12 meses

☐

18 meses

☐

otros

☐

9 Comprobante de pago No. 02 - 64,154

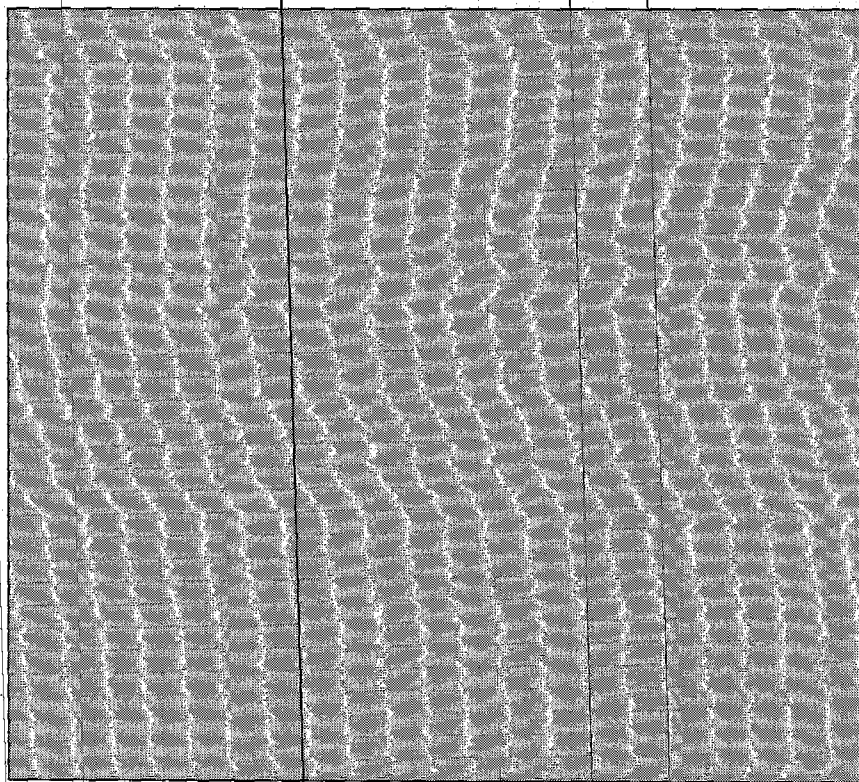
Fecha Septiembre 25, 2002

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación
- ☐ Comprobante de pago por la reivindicación de prioridad
- ☒ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica No. 17.398
- ☒ Poderes, si fuere el caso **Novartis AG** Protocolo No. 17.398
- ☐ Copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☒ Descripción de la invención
- ☒ Una o más reivindicaciones
- ☒ Dibujos y/o planos necesarios
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .

11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12

NOMBRE: JIMENA ESCOBAR URIBEFIRMA: *Jimena Escobar Uribe*

C.C. 39.779.452 de Usaquén T.P. 68.288

2487/P.

2487

2-2

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 02009153 00000000 Folios: 136

Fecha (AND): 2002-10-03 16:12:11

Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

BO OFICIAL DE CAJA : 02 - 64,154

: SEPTIEMBRE 25 DE 2002

***** CONSIGNACION *****

DEBITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
RIBE ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	4884776	25/09/2002	1,877,000.00

***** CONCEPTO *****

RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
50005-01-01 SOLICITUDES	7 TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUS	378,000.00
	TOTAL :	\$ 378,000.00

TRESCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS

BO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
 Conmutador 382 0840
 Fax 350 5220
 E-mail: info@sic.gov.co
 www.sic.gov.co
 Bogotá, D.C., Colombia

3 3

ANEXOS

INVENTORES

1.) **THIERRY LÉVEILLARD**
(67201 Eckbolsheim, Francia);

2.) **JOSÉ ALAIN SAHEL**
(67000 Strasbourg, Francia),

3.) **SADDEK MOHAND-SAID**
(67000 Strasbourg, Francia);

4.) **DAVID HICKS**
(67000 Strasbourg, Francia).



4
4

Solicito expresamente a nombre de las sociedades
NOVARTIS AG, sociedad constituida de
conformidad con las leyes de Suiza, domiciliada en
Lichtstrasse 35, 4056 Basilea, Suiza y **UNIVERSITÉ**
LOUIS PASTEUR, sociedad constituida de
conformidad con las leyes de Francia, domiciliada en 4,
rue Blaise Pascal, 67000 Strasbourg, Francia, el
otorgamiento de Patente para la invención titulada
"PROTEINA ASOCIADA CON ENFERMEDAD".

Clase: A 61


JIMENA ESCOBAR URIBE
C.C. 39.779.452 de Usaquén.
T.P. 12.772
Cod. 267

5 \$

PROTEINA ASOCIADA CON ENFERMEDAD

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a métodos y composiciones para la
5 detección y tratamiento de enfermedades degenerativas retinales. En
particular, la invención se refiere a una proteína que se protege contra
la degeneración de cono, moléculas de ácido nucléico que codifican tal
proteína, anticuerpos que reconocen la proteína, y métodos para
diagnosticar enfermedades degenerativas retinales.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los fotorreceptores son un subconjunto especializado de
neuronas retinales, que son responsables de la vista. Los
fotorreceptores consisten de barras y conos los cuales son las células
15 fotosensibles de la retina. Cada barra y cono elabora un cilio
especializado, referido como segmento exterior, que aloja la maquinaria
de la fototransducción. Las barras contienen un pigmento visual
específico que absorbe la luz, la rodopsina. Existen tres clases de
conos en los seres humanos, caracterizados por la expresión de
20 diferentes pigmentos visuales: los pigmentos de cono azul, de cono
verde y de cono rojo. Cada tipo de proteína de pigmento visual se
ajusta para absorber luz máximamente a diferentes longitudes de onda.
La rodopsina de barra media la visión escotópica (con poca luz),
mientras que los pigmentos de cono son responsables de la visión
25 fotópica (con luz brillante). Los pigmentos rojo, azul y verde forman



también la base de la vista de color en los seres humanos. Los pigmentos visuales en barras y conos responden a la luz y generan una potencial acción en las células de salida, las neuronas bipolares de barra, lo cual se transmite después por las neuronas de ganglio retinal a fin de producir un estímulo visual en la corteza visual.

En los seres humanos, un cierto número de enfermedades de la retina implican la degeneración progresiva y la muerte eventual de los fotorreceptores, conduciendo inexorablemente a la ceguera. La degeneración de los fotorreceptores, tal como por distrofias retinales heredadas (por ejemplo, retinitis pigmentosa), degeneración macular relacionada con el envejecimiento, y otras maculopatías, o desprendimiento retinal, se caracterizan todas por la atrofia progresiva y pérdida de función de segmentos exteriores fotorreceptores. Además, la muerte de los fotorreceptores o pérdida de la función fotorreceptora da como resultado la desaferentación de neuronas retinales de segundo orden (células bipolares de barra y células horizontales) en pacientes con distrofias retinales, disminuyendo así la eficacia general de la propagación de la señal eléctrica generada por los fotorreceptores. Los cambios de epitelio de pigmento y glial secundarios a la degeneración de los fotorreceptores dan como resultado en cambios vasculares que conducen a la isquemia y gliosis. Los factores tróficos que son capaces de rescatar fotorreceptores derivados de la muerte celular y/o recuperar la función de los fotorreceptores disfuncionales (atróficos o distróficos) puede representar terapias útiles para el tratamiento de tales condiciones.

La progresión de estas condiciones apunta a una pérdida secuencial de las dos clases de fotorreceptores: las barras inicialmente se pierden como resultado directo de una lesión genética o ambiental o desconocida, dando como resultando ceguera nocturna y una reducción en el campo visual seguido inevitablemente de pérdida de conos que conduce a la ceguera total. Consecuentemente, los conos mueren indirectamente debido a que no expresan la lesión primaria.

No se han identificado aún todos los genes asociados con la distrofia retinal. La identificación de tales genes haría posible tanto diagnosticar la enfermedad como identificar las terapias eficaces.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La invención se refiere generalmente a una novedosa familia genética, Factor de Viabilidad de Cono derivado de Barras (Rdcvf). En un primer aspecto, la invención proporciona un polipéptido aislado con una secuencia de aminoácidos como se establece en el NO DE ID DE SEC:2 o NO DE ID DE SEC:4. Tal polipéptido, o fragmentos del mismo, se encuentra en el ojo de los pacientes de distrofias retinales a un grado mucho menor que en el ojo de los individuos sin distrofia retinal. Los fragmentos del polipéptido aislado con una secuencia de aminoácidos como se establece en el NO DE ID DE SEC:2 o NO DE ID DE SEC:4 comprenderá polipéptidos que comprenden desde aproximadamente 5 hasta 10 aminoácidos, preferentemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente desde aproximadamente 20 hasta 100 aminoácidos, y muy preferentemente

desde aproximadamente 20 hasta 50 aminoácidos. De acuerdo con este aspecto de la invención se proporciona un polipéptido novedoso de origen mamífero, y en particular de origen murino o humano así como también fragmentos biológicamente, diagnósticamente o terapéuticamente útiles, variantes y derivados de los mismos. También dentro del alcance de la presente invención se encuentran los polipéptidos que son substancialmente similares al polipéptido con la secuencia de aminoácidos como se establece en el NO DE ID DE SEC:2 o NO DE ID DE SEC:4, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos como se establece en el NO DE ID DE SEC:6, NO DE ID DE SEC:8, NO DE ID DE SEC:10, NO DE ID DE SEC:12 y NO DE ID DE SEC:14. *similares al natural.*

En un segundo aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia nucleótida como se establece en el NO DE ID DE SEC:1 o el NO DE ID DE SEC:3. También dentro del alcance de la presente invención se encuentran los ácidos nucleicos que son substancialmente similares al ácido nucleico con la secuencia nucleótida como se establece en el NO DE ID DE SEC:1 o el NO DE ID DE SEC:3, por ejemplo, las secuencias nucleótidas como se establecen en el NO DE ID DE SEC:5, NO DE ID DE SEC:7, NO DE ID DE SEC:9, NO DE ID DE SEC:11 o NO DE ID DE SEC:13. En una modalidad preferida, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que se codifica para un polipéptido seleccionado de entre el grupo que consiste en los polipéptidos establecidos en el NO DE ID DE SEC:2, NO DE ID DE SEC:4, NO DE ID DE SEC:6, NO DE ID DE SEC:8, NO DE ID DE SEC:10, NO DE ID DE SEC:12 y NO DE ID DE SEC:14. *similares a los naturales*



9
9

SEC:12 y NO DE ID DE SEC:14, por ejemplo, los nucleótidos 45-374 del NO DE ID DE SEC:1, los nucleótidos 26-676 del NO DE ID DE SEC:3, los nucleótidos 24-353 del NO DE ID DE SEC:5, los nucleótidos 46-686 del NO DE ID DE SEC:7, los nucleótidos 265-270 del NO DE ID DE SEC:9, los nucleótidos 300-770 del NO DE ID DE SEC:11 o los nucleótidos 331-378 del NO DE ID DE SEC:13. En una modalidad preferida, el ADN aislado toma la forma de una molécula de vector que comprende el ADN como se establece en el NO DE ID DE SEC:1 o el NO DE ID DE SEC:3.

10 Un tercer aspecto de la presente invención contempla un método para el diagnóstico de la distrofia retinal en un ser humano el cual incluye detectar la transcripción disminuida del ARN mensajero transcrito de ADN de codificación de Rcvf1 o Rcvf2 en el ojo proveniente de un organismo mamífero, preferentemente un ser humano, donde tal

15 transcripción disminuida es diagnóstica de la aflicción de los organismos con distrofia retinal o envejecimiento patológico (ARMD). Otra modalidad del aspecto de la prueba proporciona un método para el diagnóstico de la distrofia retinal en un organismo mamífero, preferentemente un ser humano, el cual requiere medir la cantidad de un

20 polipéptido Rcvf1 o Rcvf2 o fragmentos del mismo en el ojo de un ser humano de quien se sospeche padece distrofia retinal, donde la presencia de una cantidad disminuida del polipéptido o fragmentos del mismo, con relación a la cantidad del polipéptido o fragmentos del mismo en el ojo de una persona que no padece distrofia retinal, es

25 diagnóstico de que el humano padece distrofia retinal.

De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporcionan polinucleótidos anti-detección que regulan la transcripción del gen Rdcvf1 o Rdcvf2; en otra modalidad, el ARN de doble cepa se proporciona de manera que puede regular la transcripción del gen Rdcvf1 o Rdcvf2.

Otro aspecto de la invención proporciona un proceso para producir los polipéptidos anteriormente mencionados, fragmentos de polipéptido, variantes y derivados, fragmentos de las variantes y derivados, y análogos de los anteriores. En una modalidad preferida de este aspecto de la invención se proporcionan métodos para producir los polipéptidos Rdcvf1 anteriormente mencionados que comprenden cultivar células huésped que han incorporado en las mismas un vector de expresión que contiene un polinucleótido de codificación Rdcvf1 o Rdcvf2 derivado exógenamente bajo condiciones suficientes para la expresión de los polipéptidos Rdcvf1 o Rdcvf2 en el huésped y reconvertir después el polipéptido expresado.

producir
recombinante

De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporcionan productos, composiciones, procesos y métodos que utilizan los polipéptidos y polinucleótidos anteriormente mencionados para, *inter alia*, propósitos de investigación, biológicos, clínicos, y terapéuticos.

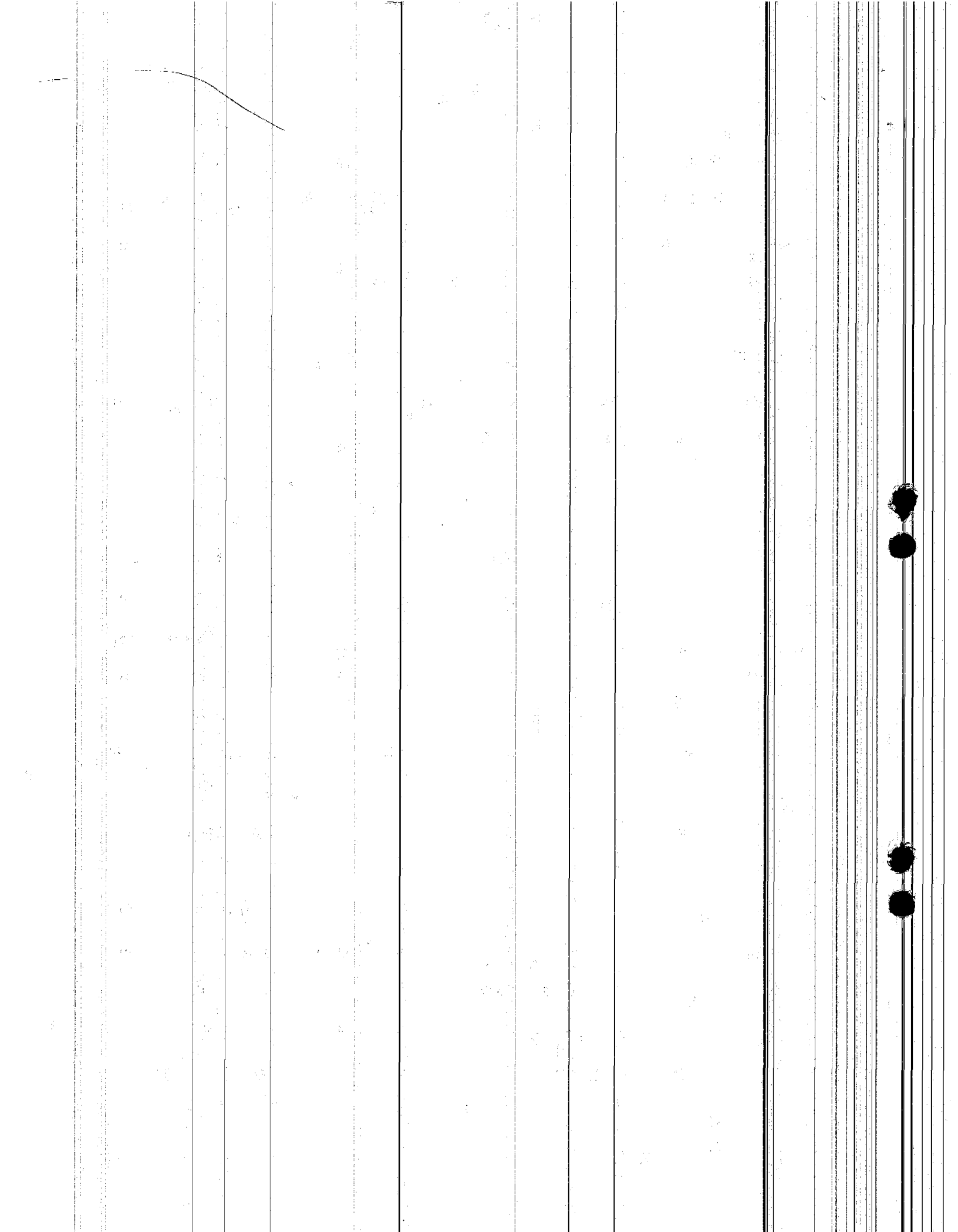
En algunos aspectos preferidos de la invención se proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo el cual se une específicamente a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en el NO DE ID DE SEC:2, NO DE ID DE

11

SEC:4, NO DE ID DE SEC:6 o NO DE ID DE SEC:8, es decir, Rdcvf1, o NO DE ID DE SEC:10, NO DE ID DE SEC:12 o NO DE ID DE SEC:14, es decir, Rdcvf2. En algunos aspectos particularmente preferidos a este respecto, los anticuerpos son altamente selectivos para polipéptidos mamíferos, preferentemente de ratón y en particular Rdcvf1 o Rdcvf2 de humano o porciones de tales polipéptidos de Rdcvf1 o Rdcvf2. En un aspecto relacionado, se proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a un fragmento o porción de la secuencia de aminoácidos establecida en el NO DE ID DE SEC:2, NO DE ID DE SEC:4, NO DE ID DE SEC:6, NO DE ID DE SEC:8, NO DE ID DE SEC:10, NO DE ID DE SEC:12 o NO DE ID DE SEC:14.

En otro aspecto, los métodos de tratamiento de una enfermedad en un paciente, donde la enfermedad se encuentra mediada por o asociada con un cambio en la expresión genética de Rdcvf1 o Rdcvf2, por ejemplo, una disminución en la presencia del polipéptido RDCVF1 o RDCVF2 en el ojo, por la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína RDCVF1 o RDCVF2 como se establece en el NO DE ID DE SEC:2, NO DE ID DE SEC:4, NO DE ID DE SEC:6, NO DE ID DE SEC:8, NO DE ID DE SEC:10, NO DE ID DE SEC:12 o NO DE ID DE SEC:14, o se proporciona una proteína o fragmento o porción de la misma relacionada con el paciente. También se proporcionan los métodos para el diagnóstico de una enfermedad o condición asociada con una disminución en el gen de expresión Rdcvf1 o Rdcvf2 o una disminución en presencia del polipéptido RDCVF1 o RDCVF2 en un paciente, que comprende utilizar un anticuerpo que se

Admon
de la
proteína
natural.



une a un polipéptido con la secuencia de aminoácidos establecida en NO DE ID DE SEC:2, NO DE ID DE SEC:4, NO DE ID DE SEC:6, NO DE ID DE SEC:8, NO DE ID DE SEC:10, NO DE ID DE SEC:12 o NO DE ID DE SEC:14, o un fragmento o porción de las mismas en una inmunopruera.

5 Aún en otro aspecto, la invención proporciona células que puedan propagarse in vitro, preferentemente células vertebradas, las cuales son capaces después del crecimiento en cultivo de producir un polipéptido que comprenda la secuencia de aminoácidos establecida en el NO DE ID DE SEC:2, NO DE ID DE SEC:4, NO DE ID DE SEC:6, NO DE ID DE SEC:8, NO DE ID DE SEC:10, NO DE ID DE SEC:12 o NO DE ID DE SEC:14, o fragmentos de la misma, donde las células contienen secuencias de ADN de control de transcripción, diferentes a las secuencias de control de transcripción de Rdcvf1 o Rdcvf2 humanas, donde las secuencias de control de transcripción controlan la transcripción de ADN que codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de acuerdo con el NO DE ID DE SEC:2, NO DE ID DE SEC:4, NO DE ID DE SEC:6, NO DE ID DE SEC:8, NO DE ID DE SEC:10, NO DE ID DE SEC:12 o NO DE ID DE SEC:14, o fragmentos de la misma.

20 En otro aspecto relacionado, la presente invención proporciona un método para producir los polipéptidos Rdcvf1 o Rdcvf2 el cual comprende cultivar una célula huésped que ha incorporado en ella un vector de expresión que contiene un polinucleótido de codificación Rdcvf1 o Rdcvf2 derivado exógenamente bajo condiciones suficientes para la expresión de los polipéptidos Rdcvf1 o Rdcvf2 en la célula

huésped, ocasionando así la producción de un polipéptido expresado, y recuperando el polipéptido expresado.

En todavía otro aspecto de la presente invención se proporcionan métodos y juegos de prueba que comprenden los
5 componentes necesarios para detectar polinucleótidos o polipéptidos *Diagnose*
Rdcvf1 o Rdcvf2 o fragmentos de los mismos anormales, por ejemplo, debajo de la expresión normal en las muestras de tejido corporal derivadas de un paciente, tal como los juegos que comprenden por ejemplo, anticuerpos que se unen a Rdcvf1 o Rdcvf2 o sondas
10 oligonucleótidas que se hibridizan con polinucleótidos de la invención. En una modalidad preferida, tales juegos comprenden también instrucciones que detallan los procedimientos por los cuales se van a utilizar los componentes del juego.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido
15 Rdcvf1 o Rdcvf2 para su uso en el tratamiento de un cuerpo humano o animal. Un aspecto relacionado se refiere al uso de un polipéptido Rdcvf1 o Rdcvf2 o fragmento del mismo, Rdcvf1 o Rdcvf2 de codificación de nucleótido o un fragmento del mismo, o anticuerpo que se une a Rdcvf1 o Rdcvf2 o un fragmento del mismo en la elaboración
20 de un medicamento para tratar una distrofia retinal.

En otro aspecto, la invención proporciona un agente retinoprotector que comprende un polipéptido seleccionado de entre el grupo que consiste en NO DE ID DE SEC:2, NO DE ID DE SEC:4, NO DE ID DE SEC:6, NO DE ID DE SEC:8, NO DE ID DE SEC:10, NO DE ID DE
25 SEC:12 o NO DE ID DE SEC:14, y opcionalmente, un portador

farmacéuticamente aceptable. En un aspecto relacionado, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido Rdcvf1 o Rdcvf2 o fragmento del mismo, nucleótido que codifica Rdcvf1 o Rdcvf2 o un fragmento del mismo, para el tratamiento

5 de una distrofia retinal. En otro aspecto relacionado, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido seleccionado de entre el grupo que consiste en NO DE ID DE SEC:2, NO DE ID DE SEC:4, NO DE ID DE SEC:6, NO DE ID DE SEC:8, NO DE ID DE SEC:10, NO DE ID DE

10 SEC:12 o NO DE ID DE SEC:14 y un portador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método par el tratamiento de distrofia retinal que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido seleccionado de

15 entre el grupo que consiste en NO DE ID DE SEC:2, NO DE ID DE SEC:4, NO DE ID DE SEC:6, NO DE ID DE SEC:8, NO DE ID DE SEC:10, NO DE ID DE SEC:12 o NO DE ID DE SEC:14, y un portador farmacéuticamente aceptable a un paciente en necesidad del mismo.

control
- sec

En otro aspecto, la invención se refiere a métodos para la

20 identificación de moléculas que pueden unirse a Rdcvf1 o Rdcvf2 y/o modular la actividad de Rdcvf1 o Rdcvf2 o moléculas que pueden unirse a secuencias de ácido nucleico que modulan la transcripción o traducción de Rdcvf1 o Rdcvf2. Tales métodos se describen en, por ejemplo, las Patentes de E.U. Nos. 5,541,070; 5,567,317; 5,593,853;

25 5,670,326; 5,679,582; 5,856,083; 5,858,657; 5,866,341; 5,876,946;

5,989,814; 6,010,861; 6,020,141; 6,030,779; y 6,043,024, las cuales todas se incorporan para referencia en la presente en su totalidad. Las moléculas identificadas por tales métodos caen también dentro del alcance de la presente invención.

5 En todavía otro aspecto, la invención se refiere a los métodos para la introducción de ácidos nucleicos de la invención en uno o más tejidos de un paciente en necesidad de tratamiento con el resultado de que una o más proteínas codificadas por los ácidos nucleicos se expresen y/o se segreguen por células dentro de este
10 tejido.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para proporcionar células fotorreceptoras para implante donde las células fotorreceptoras se cultiven junto con RdCVF1 o RdCVF2.

Otros objetos, características, ventajas y aspectos de la
15 presente invención se volverán aparentes a aquellos expertos en la materia a partir de la siguiente descripción. Sin embargo, debe comprenderse que la siguiente descripción y los ejemplos específicos, aunque indican modalidades preferidas de la invención, se dan solamente a manera de ilustración. Diversos cambios y modificaciones
20 dentro del espíritu y alcance de la invención descrita se volverán aparentes a aquellos expertos en la materia a partir de la lectura de la siguiente descripción y a partir de la lectura de las demás partes de la presente descripción.

Figura 1: secuencia nucleótida Rdcvf1 de ratón derivada de la clonación de expresión y secuencia de aminoácidos de RdCVF1 de ratón.

Figura 2: secuencia nucleótida de Rdcvf1L de ratón, y
5 secuencia de aminoácido.

Figura 3: secuencia de aminoácidos de Rdcvf1 humana y Rdcvf1 humana.

Figura 4: secuencia nucleótida de Rdcvf1L humana, secuencia de aminoácidos de Rdcvf1L humana

10 Figura 5: secuencia nucleótida de Rdcvf2 de ratón y aminoácidos de Rdcvf2 de ratón.

Figura 6: secuencia nucleótida de Rdcvf2L de ratón y aminoácido de Rdcvf2L de ratón.

Figura 7: secuencia nucleótida de Rdcvf2 humana, y
15 secuencia de aminoácidos de Rdcvf2 humana.

Figura 8: representa las alineaciones de un aminoácido de la formas cortas de Rdcvf: (NO DE ID DE SEC:2, 6, 10 y 14) y de las formas largas de Rdcvf: NO DE ID DE SEC:4, 8, 12 y 14).

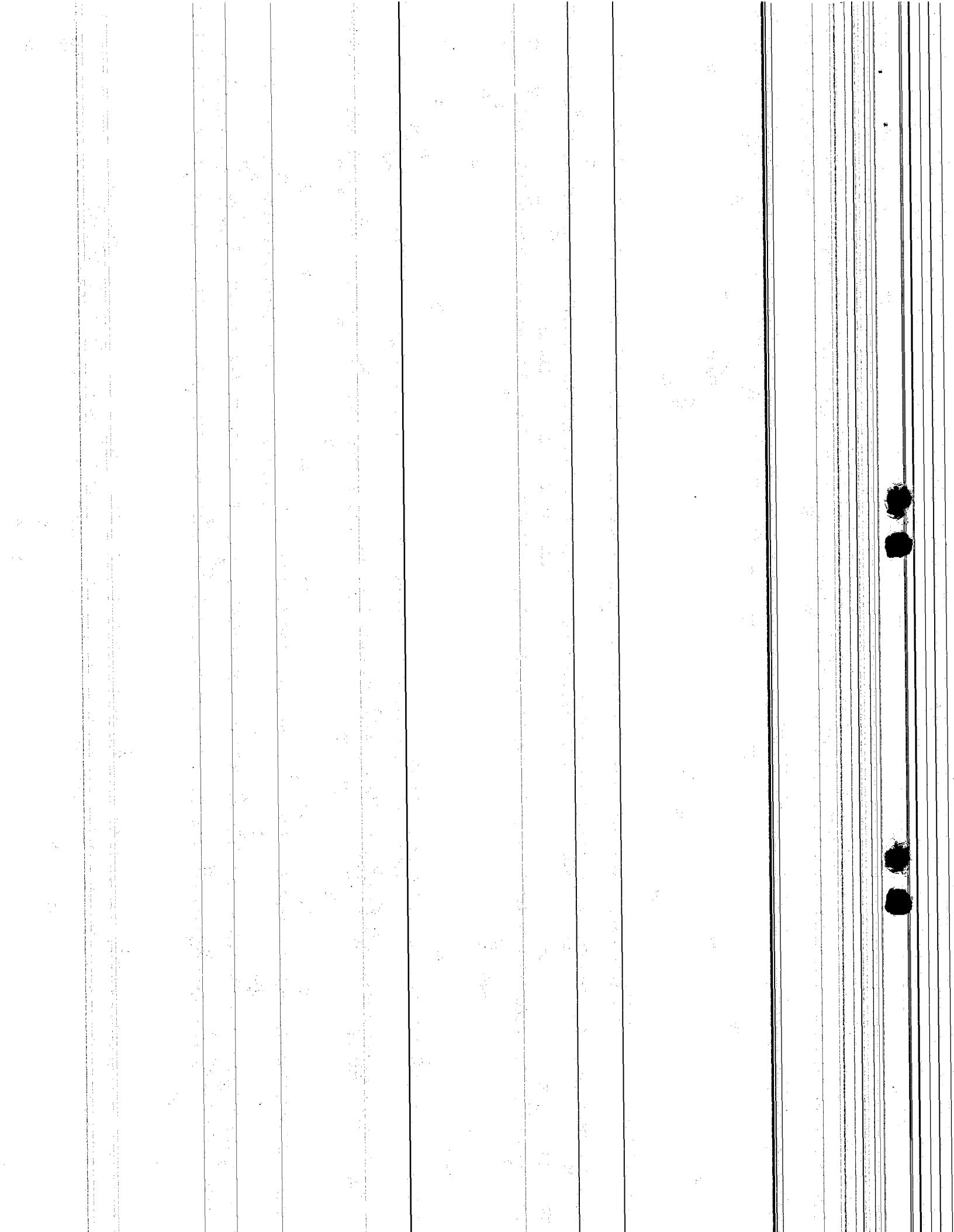
Figura 9: representa los imprimadores para GST-Rdcvf1.

20 Figura 10: Alineación múltiple de RDCVF1/RDCVF2.

Figura 11: Comparación de RDCVF2 de ratón y humana.

Figura 12: Alineación Múltiple de Rdcvf2 de ratón con los clones EST be552141, bi517442, bg707818 y bi603812.

Figura 13: Alineación Múltiple de Rdcvf1 con los clones EST
25 bg299078, ai716631, bg294111, be108041 y bg395178.



17
17

Figura 14: Secuencia EST bg299078 corregida para acoplar a Rdcvf1.

Figura 15: Secuencia EST bg294111 corregida para acoplar a Rdcvf1L.

5 Figura 16: Análisis RT-PCR en tiempo real de la expresión de arrestina de barra (A) y RdCSF1 (B) en retina de C57BL/6@N de 5 semanas (verde) y C3H/HE@N (rojo).

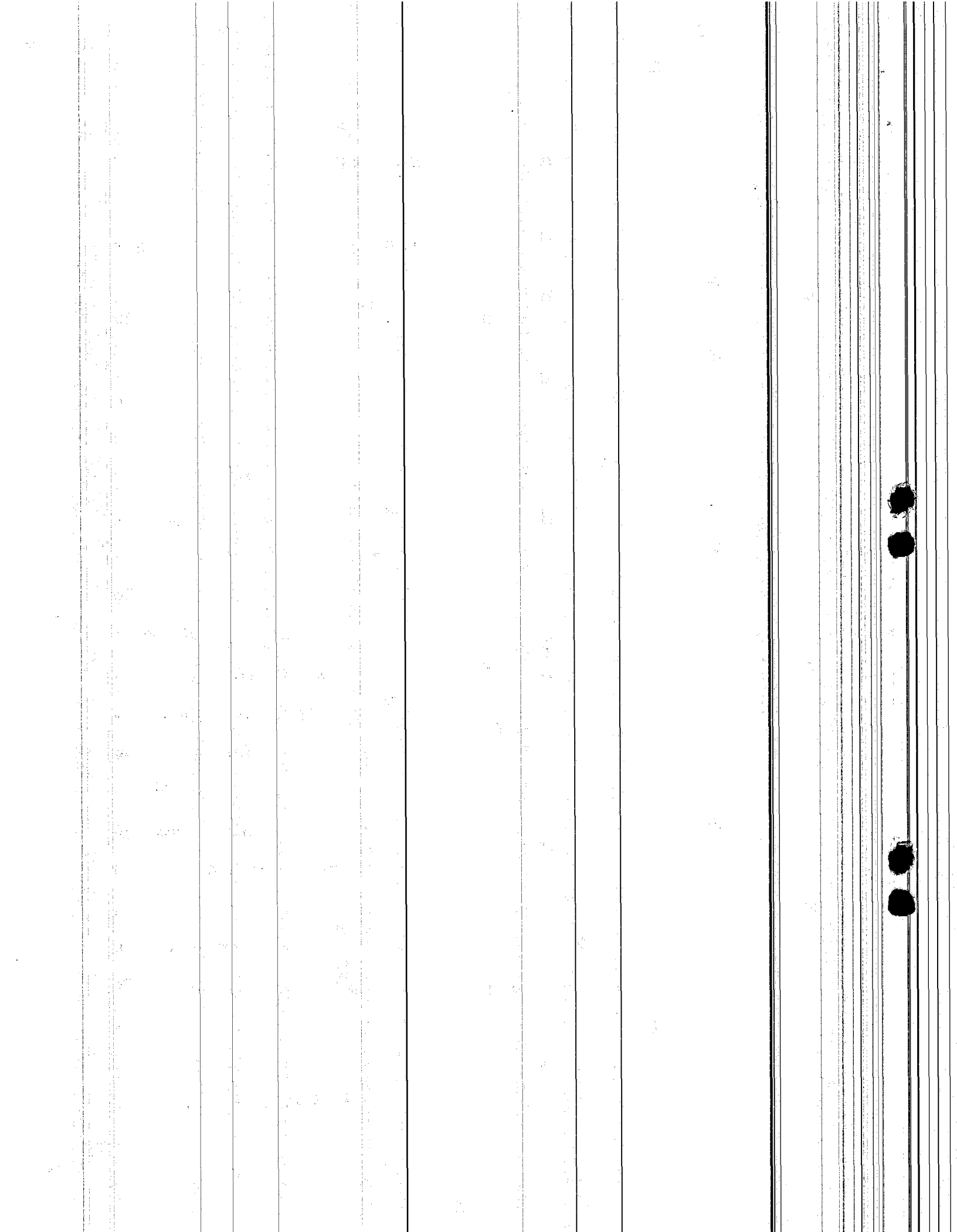
Figura 17: Análisis de RT-PCR que muestra que Rdcvf2 se expresa de manera dependiente a las barras y se expresa en otra parte
10 de la CNS.

Figura 18: Análisis PCR que muestra que Rdcvf1 se expresa de manera dependiente a las barras.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15 Todas las solicitudes, patentes y referencias de literatura citadas en la presente se incorporan aquí para referencia en sus totalidades.

Al practicar la presente invención, se utilizan muchas técnicas convencionales en biología, microbiología molecular, y ADN
20 recombinante. Estas técnicas son bien conocidas y se explican, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology, Volúmenes I, II y III, 1997 (F. M. Ausubel ed.); Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; DNA Cloning: A Practical Approach, Volúmenes I y II, 1985 (D. N. Glover ed.); Oligonucleotide Synthesis,
25



48
18

1984 (M. L. Gait ed.); Nucleic Acid Hybridization, 1985, (Hames and
Higgins eds.); Transcription and Translation, 1984 (Hames and Higgins
eds.); Animal Cell Culture, 1986 (R. I. Freshney ed.); Immobilized Cells
and Enzymes, 1986 (IRL press); Perbal, 1984, A Practical Guide to
5 Molecular Cloning; la serie, Methods in Enzymology (Academic Press,
Inc.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, 1987 (J. H. Miller y
M. P. Calos eds., Cold Spring Harbor Laboratory); y Methods in
Enzymology Vol. 154 y Vol. 155 (Wu y Grossman, y Wu, eds.,
respectivamente).

10 Como se utiliza en la presente, "gen diferencialmente
expresado" se refiere a (a) un gen que contiene al menos una de las
secuencias de AND descritas en la presente (por ejemplo, como se
muestra en la Figura 1 y el NO DE ID DE SEC:1 o como se muestra en
la Figura 2 y el NO DE ID DE SEC:3); o (b) cualquier secuencia de ADN
15 que codifica la secuencia de aminoácidos codificada por las secuencias
de ADN descritas en la presente (por ejemplo, como se muestra en la
Figura 1 y el NO DE ID DE SEC:2 o como se muestra en la Figura 2 y el
NO DE ID DE SEC:4); o (c) cualquier secuencia de ADN que sea
substantialmente similar a las secuencias de codificación descritas en la
20 presente.

 En su sentido más amplio, el término "substantialmente
similar", cuando se utiliza en la presente con respecto a una secuencia
nucleótida, significa una secuencia nucleótida correspondiente a una
secuencia nucleótida de referencia, en la que la secuencia
25 correspondiente codifica un polipéptido que tiene substantialmente la

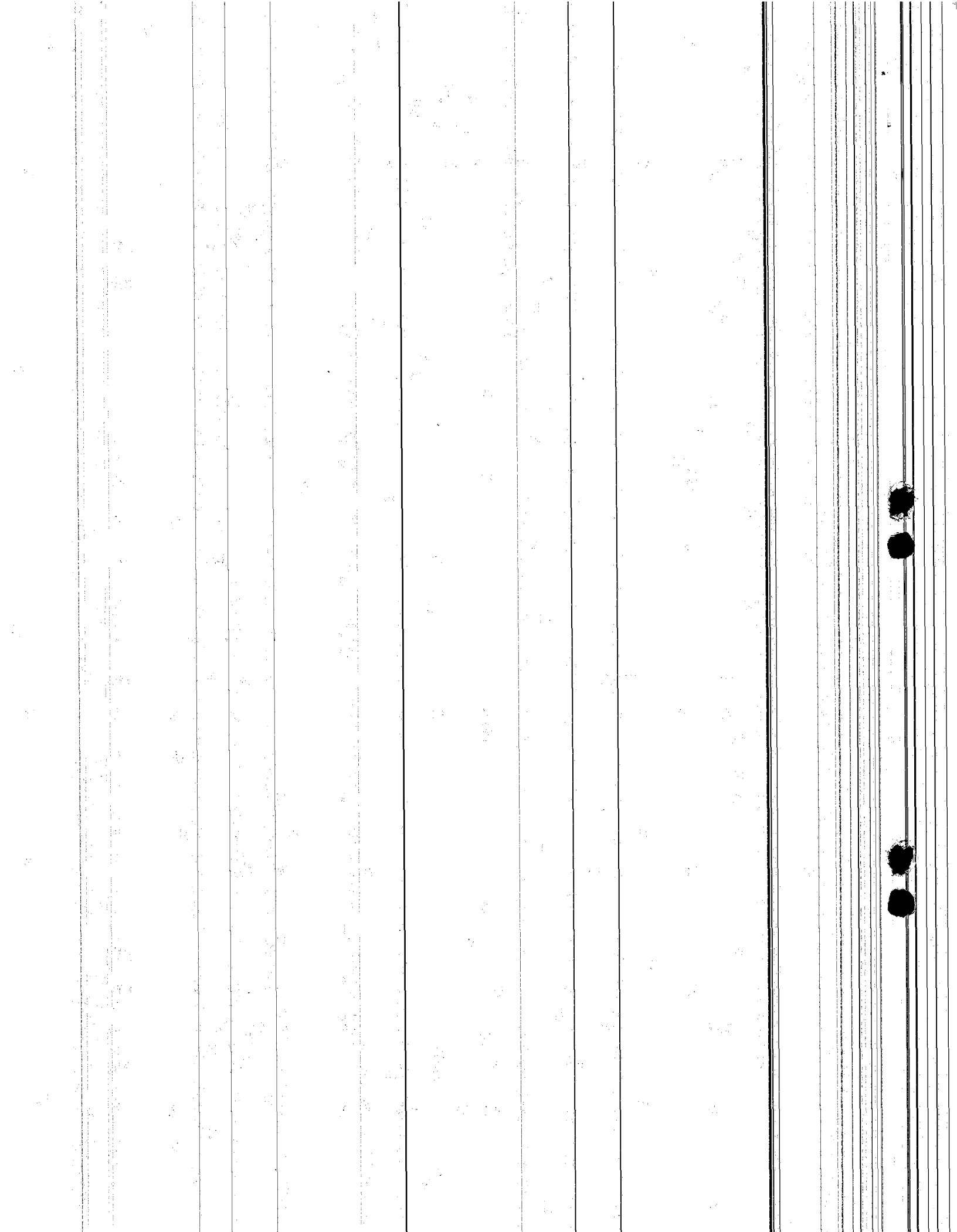


misma estructura y función que el polipéptido codificado por la secuencia nucleótida de referencia, por ejemplo, donde solamente ocurren los cambios en los aminoácidos que no afectan la función del polipéptido. Deseablemente la secuencia nucleótida substancialmente similar codifica el polipéptido codificado por la secuencia nucleótida de referencia. El porcentaje de identidad entre la secuencia nucleótida substancialmente similar y la secuencia nucleótida de referencia se encuentra deseablemente en al menos 90%, más preferentemente al menos 95%, aún más preferentemente al menos 99%. Las comparaciones de secuencia se llevan a cabo utilizando un algoritmo de alineación de secuencia de Waterman (ver por ejemplo, Waterman, M.S. Introduction to Computational Biology: Maps, sequences and genomes. Chapman & Hall. Londres: 1995. ISBN 0-412-99391-0, o en <http://www-hto.usc.edu/software/segaln/index.html>). Se utiliza el programa localS, versión 1.16 con los siguientes parámetros: acoplamiento: 1, penalización por desacoplamiento: 0.33, penalización de hueco abierto: 2, penalización de hueco extendido: 2. Una secuencia nucleótida "substancialmente similar" a la secuencia nucleótida de referencia se hibridiza a la secuencia nucleótida de referencia en sulfato de dodecilo de sodio al 7% (SDS), 0.5 M de NaPO₄, 1mM de EDTA a 50°C con enjuague en 2X SSC, 0.1% de SDS a 50°C, más deseablemente en sulfato de dodecilo de sodio (SDS) al 7%, 0.5 M de NaPO₄, 1 mM de EDTA a 50°C con enjuague en 1X SSC, 0.1% de SDS a 50°C, más deseablemente todavía en sulfato de dodecilo de sodio (SDS) al 7%, 0.5 M de NaPO₄, 1 mM de EDTA a 50°C con enjuague en 0.5X SSC, 0.1% de



SDS a 50°C, preferentemente en sulfato de dodecilo de sodio (SDS) al 7%, 0.5 M de NaPO₄, 1 mM de EDTA a 50°C con enjuague en 0.1X de SSC, 0.1% SDS a 50°C, más preferentemente en sulfato de dodecilo de sodio (SDS) al 7%, 0.5 M de NaPO₄, 1mM de EDTa a 50°C con enjuague
5 en 0.1X de SSC, 0.1% de SDS a 65°C, codifica todavía un producto genético funcionalmente equivalente.

Los genes diferencialmente expresados descritos en la presente se expresan en el tejido del ojo y en particular se producen en células de barras, sin embargo, en un ser humano afligido con una
10 distrofia retinal tal como retinitus pigmentosa, degeneración macular relacionada con el envejecimiento, síndrome de Bardet-Biedel, síndrome de Bassen-Kornzweig, mal de Best, coroidema, atrofia giratoria, amourosis congénita, síndrome de Refsun, mal de Stargardt y síndrome de Usher se produce en cantidades decrecientes relacionadas con, es
15 decir, en un grado menor al de los tejidos correspondientes de los seres humanos que no padecen de distrofia retinal. El ARN mensajero transcrito de los genes expresados diferencialmente, y la proteína traducida de tal mARN, se encuentran presentes en los tejidos de barras y/o asociados con tales tejidos en una cantidad de al menos la mitad,
20 preferentemente al menos aproximadamente cinco veces, más preferentemente al menos una cantidad de diez veces, muy preferentemente al menos aproximadamente 100 veces menos que los niveles de mARN y la proteína encontrada en los tejidos correspondientes encontrados en seres humanos que no padecen de una
25 distrofia retinal. Tal transcripción decreciente de mARN de Rdcvf1 o

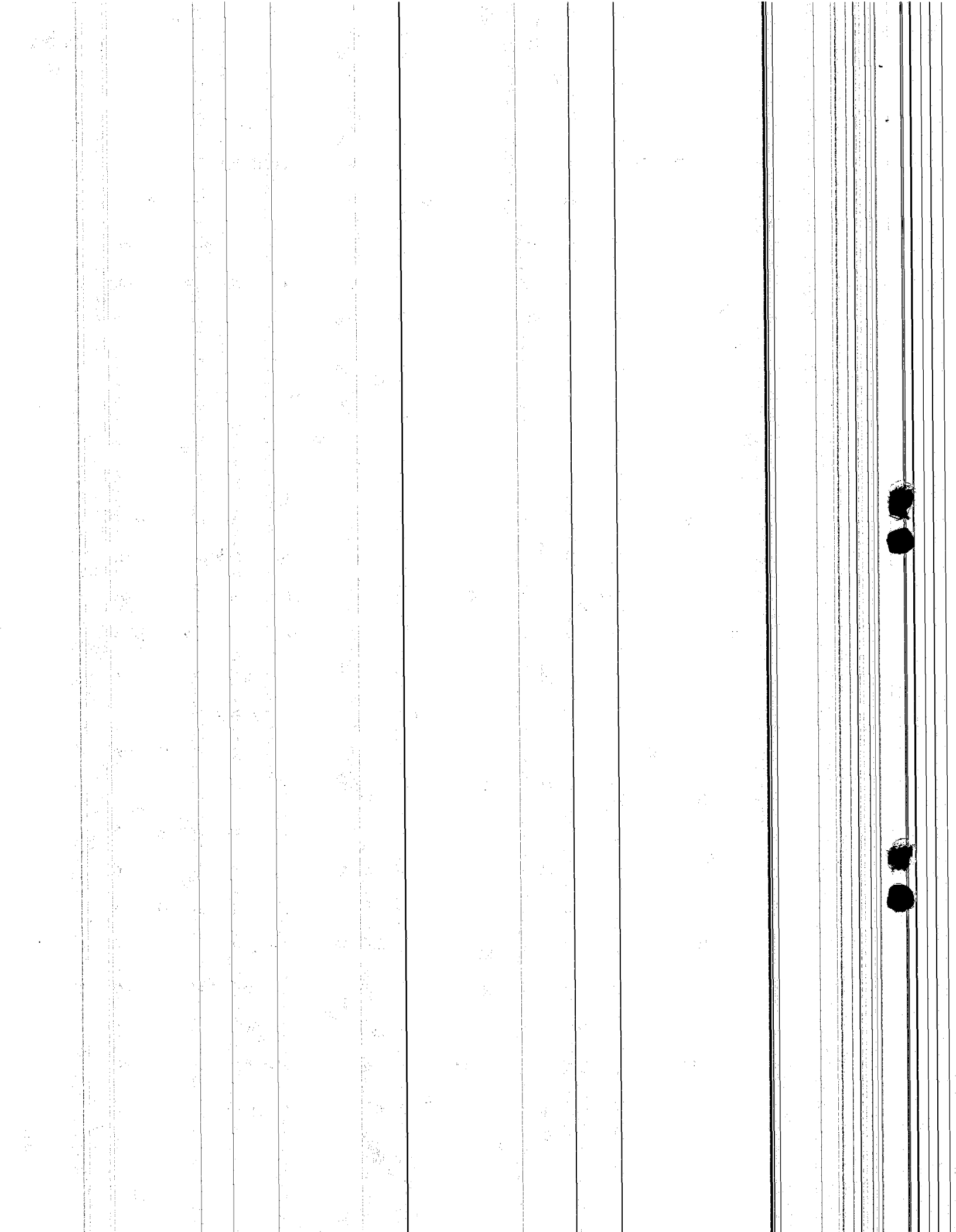


Rdcvf2 se refiere en la presente como "transcripción decreciente".

Una "célula huésped", como se utiliza en la presente, se refiere a una célula procariótica o eucariótica que contiene el ADN heterólogo que se ha introducido en la célula por cualquier medio, por ejemplo, electroporación, precipitación de fosfato de calcio, microinyección, transformación, infección viral, y lo similar.

"Heterólogo" como se utiliza en la presente significa "de origen natural diferente" o representan un estado no natural. Por ejemplo, si una célula huésped se transforma con un ADN o gen derivado de otro organismo, particularmente de otras especies, ese gen es heterólogo con respecto a esa célula huésped y también con respecto a los descendientes de la célula huésped que portan ese gen. De manera similar, heterólogo se refiere a una secuencia nucleótida derivada e insertada en el mismo tipo de célula original, natural, pero que se encuentra presente en un estado no natural, por ejemplo, un número de copia diferente, o bajo el control de diferentes elementos reguladores.

Una molécula de vector es una molécula de ácido nucleico en la cual puede insertarse el ácido nucleico heterólogo el cual puede introducirse en una célula huésped apropiada. Los vectores tienen preferentemente uno o más orígenes de réplica, y uno o más sitios en los cuales puede insertarse el ADN recombinante. Los vectores tienen frecuentemente medios convenientes por los cuales las células con vectores pueden seleccionarse de entre aquellas que no tienen, por ejemplo, codifican genes de resistencia a las drogas. Los vectores



comunes incluyen plásmidos, genomas virales, y (principalmente en levadura y bacterias) "cromosomas artificiales".

Los "plásmidos" generalmente se designan en la presente por una p minúscula precedida y/o seguida de letras mayúsculas y/o
5 números que son familiares con aquellos expertos en la materia. Los plásmidos primos descritos en la presente se encuentran comercialmente disponibles, públicamente disponibles sobre una base no restringida, o pueden construirse a partir de plásmidos disponibles mediante la aplicación rutinaria de procedimientos publicados bien
10 conocidos. Muchos plásmidos y otros vectores de clonación y expresión que pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención son bien conocidos y fácilmente disponibles para aquellos expertos en la materia. Además, aquellos expertos en la materia pueden construir un cierto número de otros plásmidos adecuados para su uso en la invención. Las
15 propiedades, construcción y uso de tales plásmidos, así como también otros vectores, en la presente invención serán fácilmente aparentes para aquellos expertos en la materia a partir de la presente descripción.

El término "aislado" significa que el material se elimina de su ambiente original (por ejemplo, el ambiente natural si se genera de
20 manera natural). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido de generación natural presente en un animal vivo no se encuentra aislado, pero el mismo polinucleótido o polipéptido, separado de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural, se aísla, incluso si se reintroduce subsecuentemente en el sistema natural. Tales
25 polinucleótidos podrían ser parte de un vector y/o tales polinucleótidos o



23

polipéptidos podrían ser parte de una composición, y todavía aislarse porque tal vector o composición no es parte de su ambiente natural.

Como se utiliza en la presente, el término "secuencia de control de transcripción" se refiere a secuencias de ADN, tales como
5 secuencias imitadoras, secuencias reforzadas, y secuencias mejoradoras, las cuales inducen, reprimen, o de otra manera controlan la transcripción de la proteína codificando las secuencias de ácido nucleico a las cuales se enlazan operablemente.

Como se utiliza en la presente, "secuencias de control de transcripción Rdcvf1" o "secuencias de control de transcripción Rdcvf2"
10 son cualquiera de aquellas secuencias de control de transcripción encontradas normalmente asociadas con un gen de Rdcvf1 o Rdcvf2 mamífero, preferentemente con el gen Rdcvf2 como se encuentra en el genoma de ratón o el humano.

15 Como se utiliza en la presente, la "secuencia de control de transcripción no humana" es cualquier secuencia de control de transcripción no encontrada en el genoma humana.

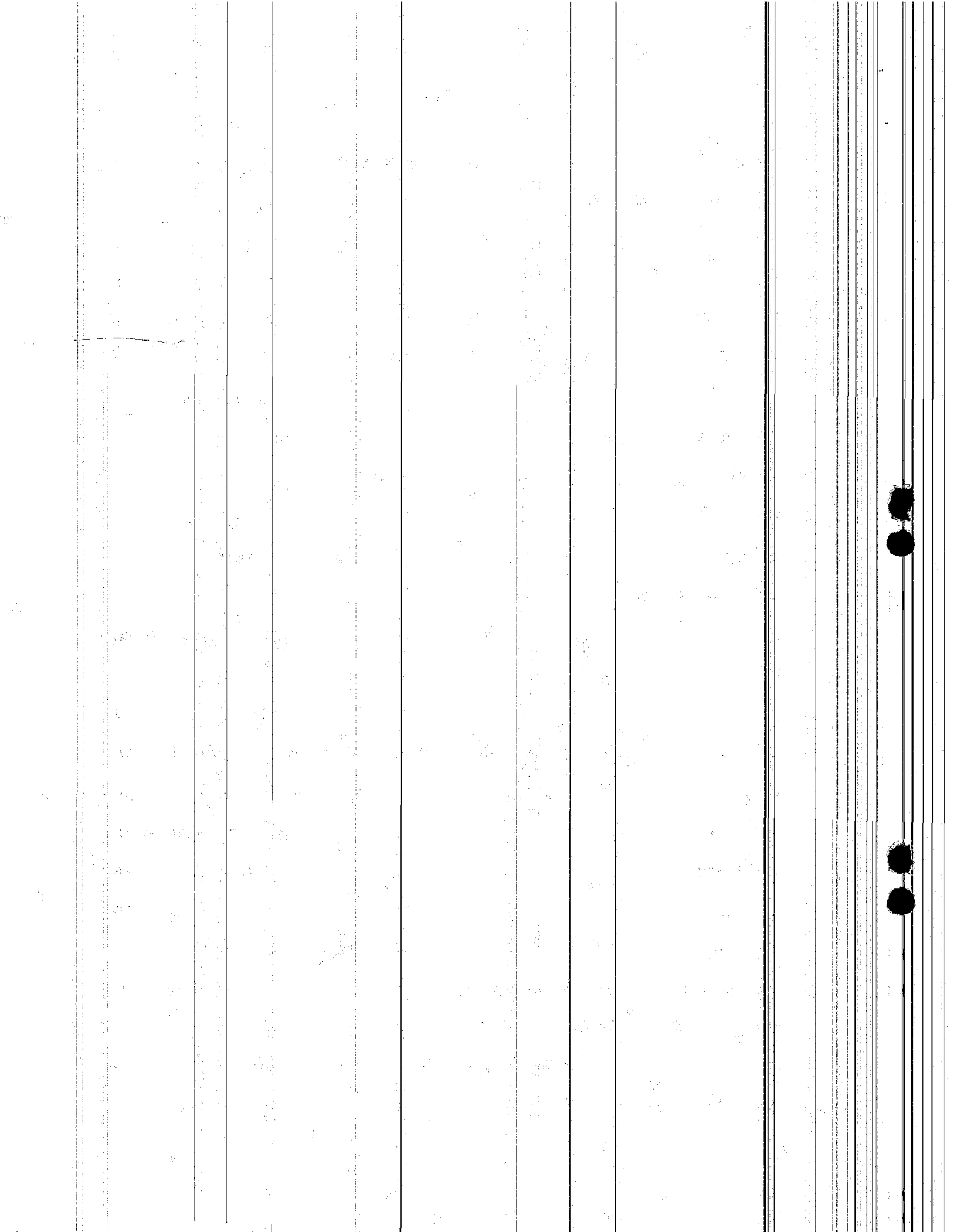
El término "polipéptido" se utiliza intercambiabilmente en la presente con los términos "polipéptidos" y "proteína(s)".

20 Como se utiliza en la presente, un "derivado químico" de un polipéptido de la invención es un polipéptido de la invención que contiene mitades químicas adicionales que normalmente no forman parte de la molécula. Tales mitades pueden mejorar la solubilidad, absorción, vida media biológica, etc, de la molécula. Las mitades pueden disminuir
25 alternativamente la toxicidad de la molécula, eliminar o atenuar

cualquier efecto colateral indeseable de la molécula, etc. Las mitades capaces de mediar tales efectos se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1980).

5 Como se utiliza en la presente, un "agente neuroprotector" es un compuesto que evita o protege las células neuronales de la degeneración. Un "agente neuroprotector" es un compuesto que evita o protege las células retinales de la degeneración.

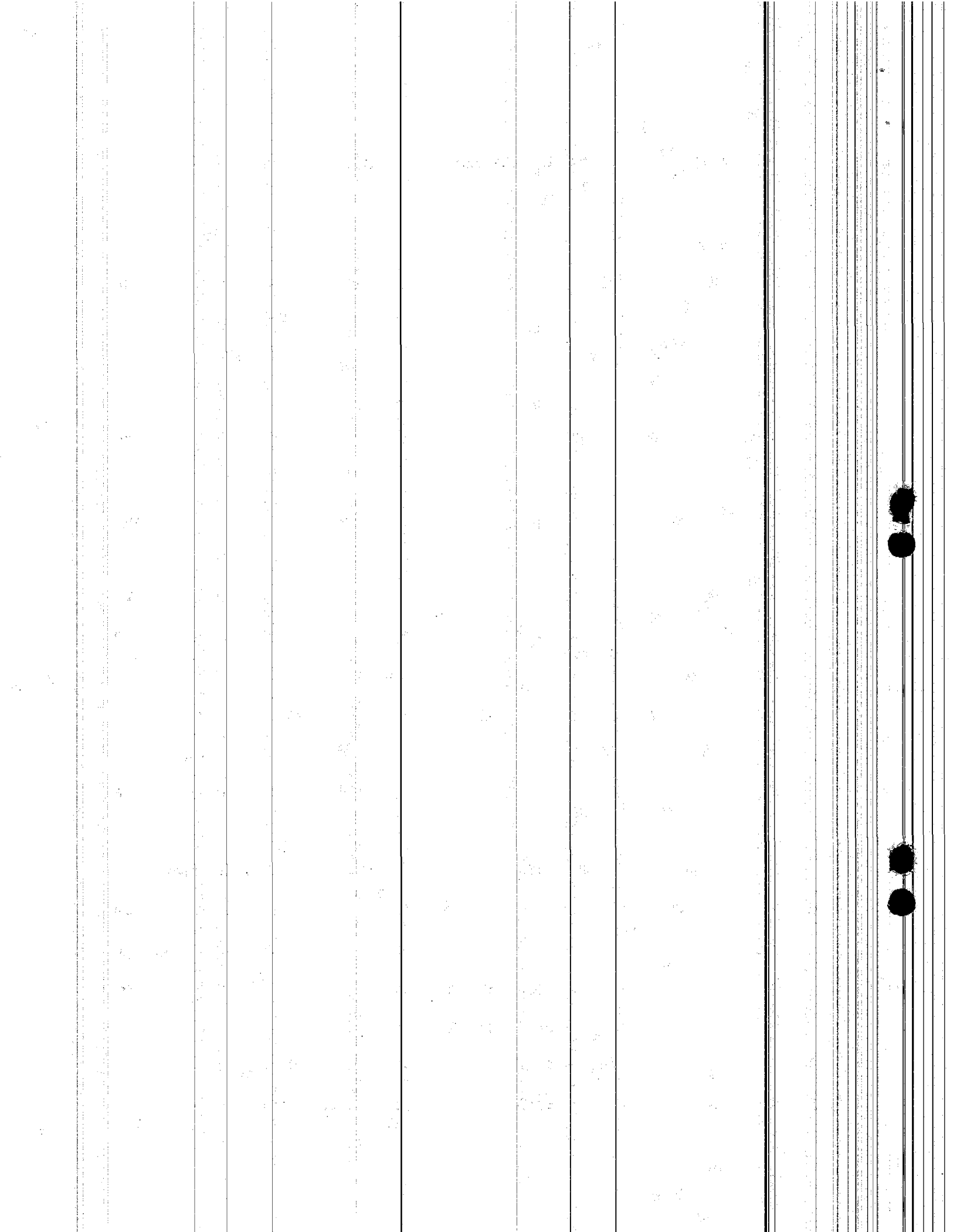
10 La invención incluye moléculas de ácido nucléico, preferentemente moléculas de ADN, tales como (1) una aislada que comprende una secuencia nucleótida como se establece en el NO DE ID DE SEC:1 o NO DE ID DE SEC:3, (2) moléculas de ácido nucléico aisladas que comprenden secuencias de ácido nucléico que se hibridizan bajo condiciones de severidad elevada al ADN aislado como
15 se establece en el NO DE ID DE SEC:1 o NO DE ID DE SEC:3, y (3) secuencias de ácido nucléico que se hibridizan a (1) o (2), anteriormente mencionados. Tales condiciones de hibridización pueden ser altamente severas o menos altamente severas, como se describió con anterioridad. En casos donde las moléculas de ácido nucléico sean
20 desoxioligonucleótidos ("oligos"), las condiciones altamente severas pueden referirse, por ejemplo, a enjuagar en 6X SSC/0.05% pirofosfato de sodio a 37°C (para 14 oligos base), 48°C (para 17 oligos base), 55°C (para 20 oligos base), y 60°C (para 23 oligos base). Los rangos adecuados de tales condiciones de severidad para ácidos nucléicos de
25 composiciones variables se describen en Krause y Aaronson (1991)



Methods in Enzymology, 200:546-556 además de Maniatis et al., anteriormente citado.

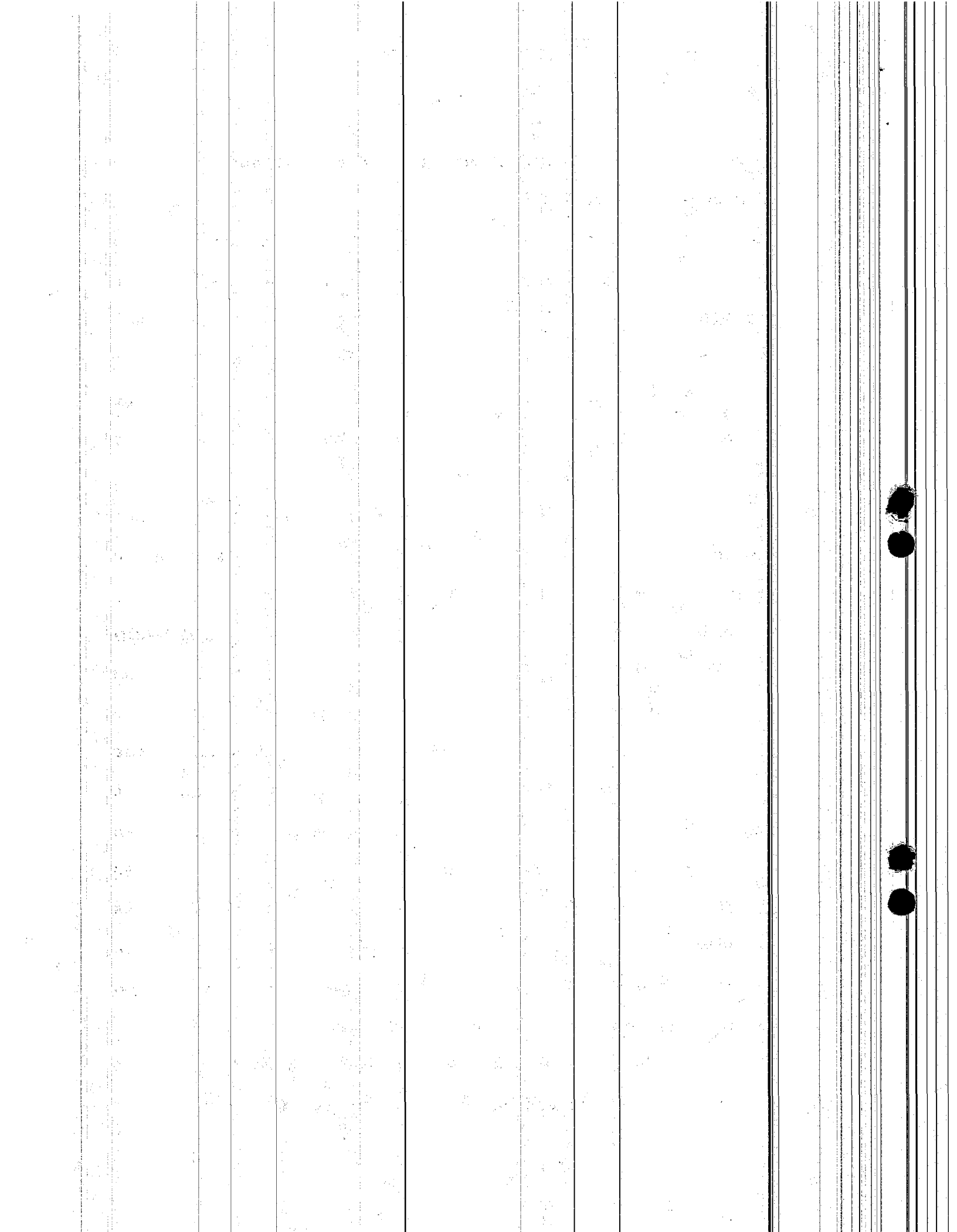
Estas moléculas de ácido nucléico pueden actuar como moléculas antidecección de gen objetivo, útiles, por ejemplo, en la
5 regulación de gen objetivo y/o imprimadores de antidecección en las reacciones de amplificación de las secuencias de ácido nucléico de gen objetivo. Además, tales secuencias pueden utilizarse como parte de secuencias de ribozima y/o triplemente helicoidales, útiles también para la regulación de gen objetivo. Además, tales moléculas pueden
10 utilizarse como componentes de métodos diagnósticos por los cuales puede detectarse la presencia de un alelo RdCVF1 o RdCVF2 causante de enfermedades.

La invención abarca también (a) vectores que contienen cualquiera de las secuencias de codificación anteriores (es decir, antidecección) y/o sus complementos (es decir, antidecección); (b) vectores
15 de expresión que contienen cualquiera de las secuencias de codificación anteriores asociadas operativamente con un elemento regulador que dirige la expresión de las secuencias de codificación; y (c) células huéspedes diseñadas genéticamente que contienen cualquiera de las
20 secuencias de codificación anteriores asociadas operativamente con un elemento regulador que dirige la expresión de las secuencias de codificación en la célula huésped. Como se utiliza en la presente, los elementos reguladores incluyen pero no se limitan a mejoradores, reforzadores, operadores no inducibles y otros elementos conocidos por
25 aquellos expertos en la materia que conducen y regulan la expresión.



La invención incluye fragmentos de cualquiera de la secuencias de ácido nucleico descritas en la presente. Pueden utilizarse fragmentos del gen Rdcvf1 o Rdcvf2 de tramo completo como una sonda de hibridización para una biblioteca de cADN a fin de aislar el gen de tramo completo y para aislar otros genes que tienen una similitud de secuencia elevada con el gen Rdcvf1 o Rdcvf2 y actividad biológica similar. Las sondas de este tipo tienen preferentemente al menos aproximadamente 30 bases y pueden contener, por ejemplo, desde aproximadamente 30 hasta aproximadamente 50 bases, aproximadamente 50 hasta aproximadamente 100 bases, aproximadamente 100 hasta aproximadamente 200 bases, o más de 200 bases (por ejemplo, 300). La sonda puede utilizarse también para identificar un clon de cADN correspondiente a una transcripción de tramo completo y un clon o clones genómicos que contienen el gen Rdcvf1 o Rdcvf2 completo incluyendo las regiones reguladoras y mejoradoras, exones e intrones. Un ejemplo de filtro comprende aislar la región de codificación del gen Rdcvf1 o Rdcvf2 utilizando la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda oligonucleótida o por imprimación aleatoria de la secuencia aislada descrita en la Figura 1 a 8. Los oligonucleótidos etiquetados que tienen una secuencia complementaria a la del gen de la presente invención se utilizan para filtrar una biblioteca de cADN humano, ADN genómico para determinar qué clones individuales de la biblioteca hibridiza la sonda.

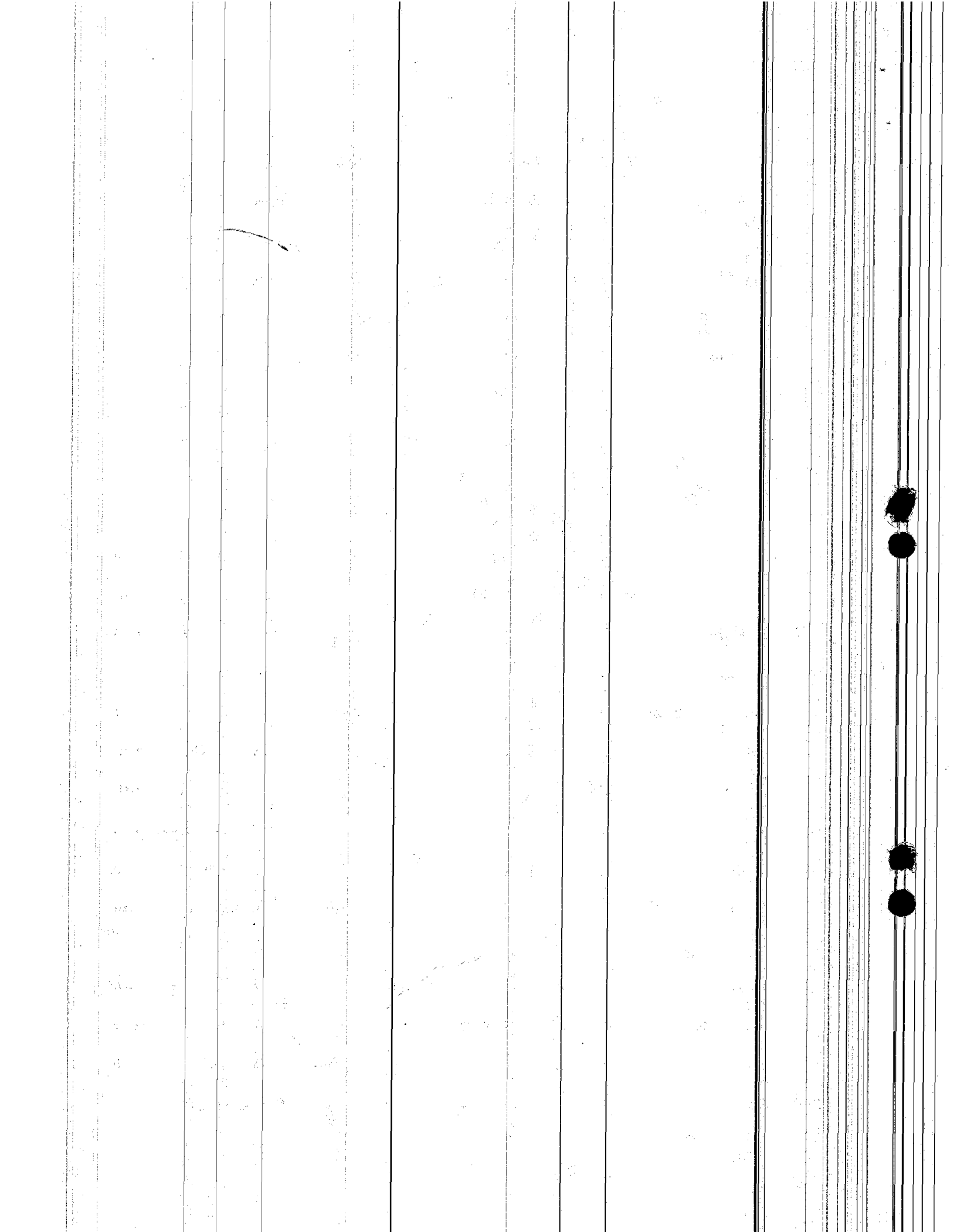
Además de la secuencias genéticas descritas anteriormente, los ortólogos de tales secuencias , como pueden por ejemplo, estar



presentes en otras especies, pueden identificarse y pueden aislarse fácilmente, sin experimentación indebida, por técnicas biológicas moleculares bien conocidas en la materia. Además, pueden existir genes en otros lugares genéticos dentro del genoma que codifican proteínas las cuales tienen homología (homólogos) a uno o más dominios de tales productos genéticos. Estos genes pueden identificarse también mediante técnicas similares. Los ejemplos de ortólogos u homólogos se proporcionan en las Figuras 8, 10, 11, 12 o 13.

10 Por ejemplo, la secuencia genética expresada aislada puede etiquetarse y utilizarse para filtrar una biblioteca de cADN construida a partir de mRNA obtenido del organismo de interés. Las condiciones de hibridación serán de una menor severidad cuando la biblioteca de cADN se haya derivado de un organismo diferente del tipo de organismo del cual se derivó la secuencia etiquetada. Alternativamente, el fragmento etiquetado puede utilizarse para filtrar una biblioteca genómica derivada del organismo de interés, nuevamente, utilizando apropiadamente condiciones de baja severidad. Tales condiciones de baja severidad serán conocidas por aquellos expertos en la materia, y variarán previsiblemente dependiendo de la filogenia de organismos específicos de los cuales se derivan la biblioteca y las secuencias etiquetadas. Para instrucciones referentes a tales condiciones, ver por ejemplo, Sambrook et al., citada anteriormente.

25 Además, puede aislarse una secuencia de tipo genético expresada anteriormente desconocida al realizar PCR utilizando dos



depósitos de imprimadores de oligonucleótido degenerados sobre la base de secuencias de aminoácidos dentro del gen de interés. La plantilla para la reacción puede obtenerse por cADN mediante la transcripción inversa del mRNA preparado derivado de líneas celulares humanas o no humanas o tejido conocido o del que se sospeche expresa un homólogo o variantes de segmentación.

El producto de PCR puede subclonarse y secuenciarse para asegurar que las secuencias amplificadas representan las secuencias de una secuencia de ácido nucleico de tipo genético expresado. El fragmento de PCR puede utilizarse después para aislar un clon de cADN de tramo completo por una variedad de métodos. Por ejemplo, el fragmento amplificado puede etiquetarse y utilizarse para filtrar una biblioteca de cADN bacteriófago. Alternativamente, el fragmento etiquetado puede utilizarse para filtrar una biblioteca genómica.

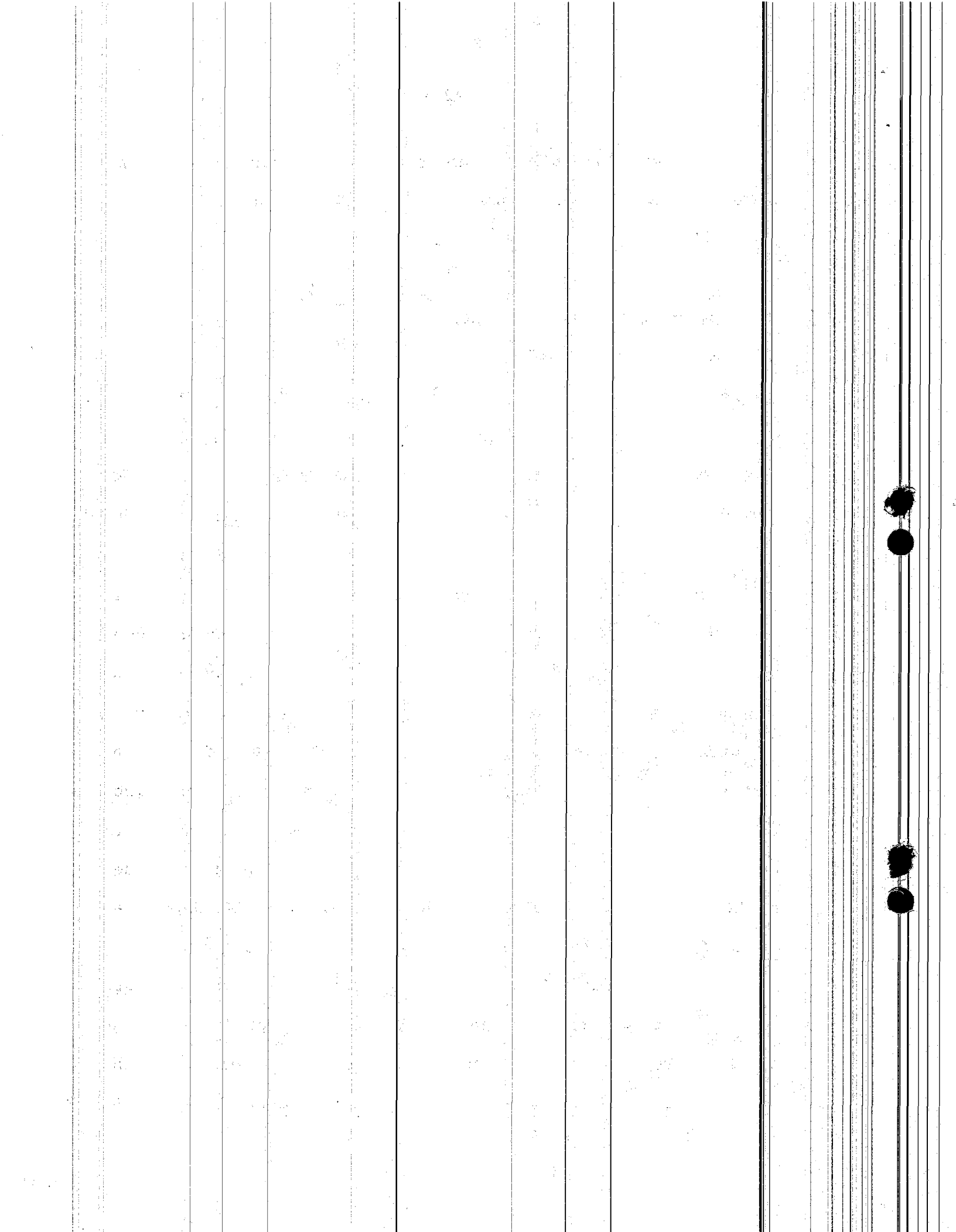
También puede utilizarse la tecnología de PCR para aislar las secuencias de cADN de tramo completo. Por ejemplo, puede aislarse el ARN, siguiendo procedimientos convencionales, derivados de una fuente celular o de tejido apropiada. Puede realizarse una reacción de transcripción inversa en el ARN utilizando un imprimador de oligonucleótido específico para la mayor parte del extremo 5' del fragmento amplificado para la imprimación de la primera síntesis de cepa. Este híbrido resultante ARN/ADN puede "ajustarse" con guaninas utilizando una reacción de transferasa terminal convencional, el híbrido puede digerirse con RNasa H, y después puede imprimirse la segunda síntesis de cepa con un imprimador poli-C. Consecuentemente, las



secuencias de cADN corriente arriba del fragmento amplificado pueden aislarse fácilmente. Para una revisión de las estrategias de clonación que pueden utilizarse, ver por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra.

En casos donde el gen identificado expresado
5 diferencialmente es normal, o gen de tipo silvestre, este gen puede utilizarse para aislar alelos mutantes del gen. Tal aislamiento es preferible en procesos y padecimientos de los cuales se sospecha tienen una base genética. Los alelos mutantes pueden aislarse de individuos conocidos o sospechosos de tener un genotipo que contribuya a
10 síntomas de enfermedad. Los alelos mutantes y los productos de alelo mutante pueden utilizarse después en los sistemas de prueba de diagnóstico descritos a continuación.

Puede aislarse un cADN del gen mutante, por ejemplo, utilizando RT-PCR, una técnica que es bien conocida por aquellos
15 expertos en la materia. En este caso, la primera cepa de cADN puede sintetizarse hibridizando un oligonucleótido de oligo-dT (o hexámeros aleatorios) al mRNA aislado del tejido conocido o sospechosos de expresarse en un individuo que putativamente porta el alelo mutante, y extendiendo la cepa nueva con transcriptasa inversa. La segunda cepa
20 de cADN se sintetiza después utilizando un oligonucleótido que se hibridiza específicamente al extremo 5' del gen normal (o por cualquier otro medio). Utilizar estos dos imprimadores, después el producto se amplifica mediante PCR, se clona en un vector adecuado, y se somete a análisis de secuencia de ADN a través de métodos bien conocidos en la
25 materia. Comparando la secuencia de ADN del gen mutante con el del



30
30

gen normal, pueden averiguarse la(s) mutación(es) responsable(s) de la pérdida o alteración de la función del producto del gen mutante.

Alternativamente, puede construirse y filtrarse una biblioteca de cADN o genómica utilizando ADN o ARN, a partir de un tejido conocido o del que se sospeche expresa el gen de interés en un individuo sospechosa de portar el alelo mutante. El gen normal o cualquier fragmento adecuado del mismo puede etiquetarse y utilizarse después como sonda para identificar el alelo mutante correspondiente en la biblioteca. El clon que contiene este gen puede purificarse después a través de métodos practicados rutinariamente en la materia, y someterse a análisis de secuencia como se describe con anterioridad.

Además, una biblioteca de expresión puede construirse utilizando ADN aislado derivado de o cADN sintetizado de un tejido conocido o sospechoso de expresar el gen de interés en un individuo sospechoso de portar el alelo mutante. De esta manera, los productos genéticos elaborados por el tejido mutante putativamente pueden expresarse y filtrarse utilizando técnicas de filtración de anticuerpo convencionales en conjunto con anticuerpos surgidos contra el producto genético normal, como se describe a continuación. (Para técnicas de filtración, ver, por ejemplo, Harlow, E. y Lane, eds., 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor). En casos donde la mutación da como resultado un producto genético expresado con función alterada (por ejemplo, como resultado de una mutación sin detección), un conjunto policlonal de anticuerpos son propensos a reaccionar con el producto genético mutante. Los clones



de biblioteca detectados a través de su reacción con anticuerpos etiquetados pueden purificarse y someterse a análisis de secuencia como se describe con anterioridad.

Los productos genéticos diferencialmente expresados

5 incluyen esas proteínas codificadas por la secuencia nucleótida establecida en el NO DE ID DE SEC:1, NO DE ID DE SEC:3, NO DE ID DE SEC:5, NO DE ID DE SEC:7, NO DE ID DE SEC:9, NO DE ID DE SEC:11 o NO DE ID DE SEC:13, en particular, un polipéptido que es o

10 incluye el conjunto de secuencias de aminoácido en el NO DE ID DE SEC:2, NO DE ID DE SEC:4, NO DE ID DE SEC:6, NO DE ID DE SEC:8, NO DE ID DE SEC:10, NO DE ID DE SEC:12 o NO DE ID DE SEC:14, o fragmentos de los mismos.

Además, los productos genéticos expresados pueden incluir proteínas que representan productos genéticos funcionalmente

15 equivalentes. Tal producto genético equivalente puede contener eliminaciones, adiciones o sustituciones de residuos de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos codificada por las secuencias genéticas expresadas diferencialmente descritas, anteriormente, pero las cuales dan como resultado un cambio silencioso, produciendo así un

20 producto genético expresado diferencialmente equivalente funcionalmente (polimorfismos). Las sustituciones de aminoácidos pueden hacerse sobre la base de similitud en la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados y en comparación con la secuencia de

25 aminoácidos derivados de otras especies.



Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrofóbicos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofano, y metionina; los aminoácidos neutrales polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, y glutamina; los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina, e histidina; y los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. "Funcionalmente equivalente", como se utiliza en la presente, puede referirse a una proteína o polipéptido capaz de exhibir una actividad *in vivo* o *in vitro* substancialmente similar como los productos genéticos expresados diferencialmente endógenos codificados por las secuencias genéticas expresadas diferencialmente descritas con anterioridad. "Funcionalmente equivalente" puede referirse también a proteínas o polipéptidos capaces de interactuar con otras moléculas celulares y extracelulares de manera similar al modo en que lo haría la porción correspondiente del producto genético expresado diferencialmente endógeno. Por ejemplo, un péptido "funcionalmente equivalente" sería capaz, en una inmunoprueba, de disminuir la unión de un anticuerpo al péptido correspondiente (es decir, la secuencia de aminoácidos peptídica que fue modificada para lograr el péptido funcionalmente equivalente") de la proteína endógena, o a la proteína endógena misma, donde surgió el anticuerpo contra el péptido correspondiente de la proteína endógena. Una concentración equimolar del péptido funcionalmente equivalente disminuirá la unión anteriormente mencionada del péptido correspondiente en al menos aproximadamente



33
33

5%, preferentemente entre aproximadamente 5% y 10%, más preferentemente entre aproximadamente 10% y 25%, aún más preferentemente entre aproximadamente 25% y 50%, y muy preferentemente entre aproximadamente 40% y 50%.

5 Los productos genéticos expresados diferencialmente pueden producirse por tecnología de ADN recombinante utilizando técnicas bien conocidas en la materia. Consecuentemente, los métodos para preparar los polipéptidos y péptidos genéticos expresados diferencialmente de la invención expresando secuencias genéticas

10 expresadas diferencialmente de codificación de ácido nucleico se describen en la presente. Los métodos que son bien conocidos por aquellos expertos en la materia pueden utilizarse para construir vectores de expresión que contienen secuencias de codificación de proteína genética expresada y señales de control de transcripción/traducción

15 apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinantes in vitro, técnicas sintéticas y recombinación in vivo/recombinación genética. Ver, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al., 1989, supra, y Ausubel et al., 1989, supra. Alternativamente, el ARN o cADN capaz de codificar secuencias de

20 proteína genética expresada puede sintetizarse químicamente utilizando, por ejemplo, sintetizadores. Ver, por ejemplo, las técnicas descritas en "Oligonucleotide Synthesis", 1984, Grait, M. J. Ed., IRL Press, Oxford, que se incorpora para referencia en la presente en su totalidad.

Puede utilizarse una variedad de sistemas vectoriales de

25 expresión de huésped para expresar las secuencias de codificación



genética expresadas diferencialmente de la invención. Tales sistemas de expresión de huésped representan vehículos por los cuales las secuencias de codificación de interés pueden producirse y subsecuentemente purificarse, pero representan también células las

5 cuales pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias de codificación nucleótidas apropiadas, expresar la proteína genética expresada diferencialmente de la invención *in situ*. Estas incluyen pero no se limitan a microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. Subtilis*) transformadas con ADN bacteriófago recombinante,

10 ADN plásmido o vectores de expresión de ADN cósmido con contenido de secuencias de codificación de proteína genética expresada diferencialmente; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinante con contenido de secuencias de codificación de proteína genética expresada

15 diferencialmente; sistemas celulares de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, baculovirus) con contenido de las secuencias de codificación de proteína de gen expresado diferencialmente; sistemas celulares vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, virus mosaico de coliflor, CaMV; virus mosaico de tabaco, TMV) o transformados con

20 vectores de transformación plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) con contenido de secuencias de codificación de proteína genética expresada diferencialmente; o sistemas celulares mamíferos (por ejemplo, COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que albergan construcciones

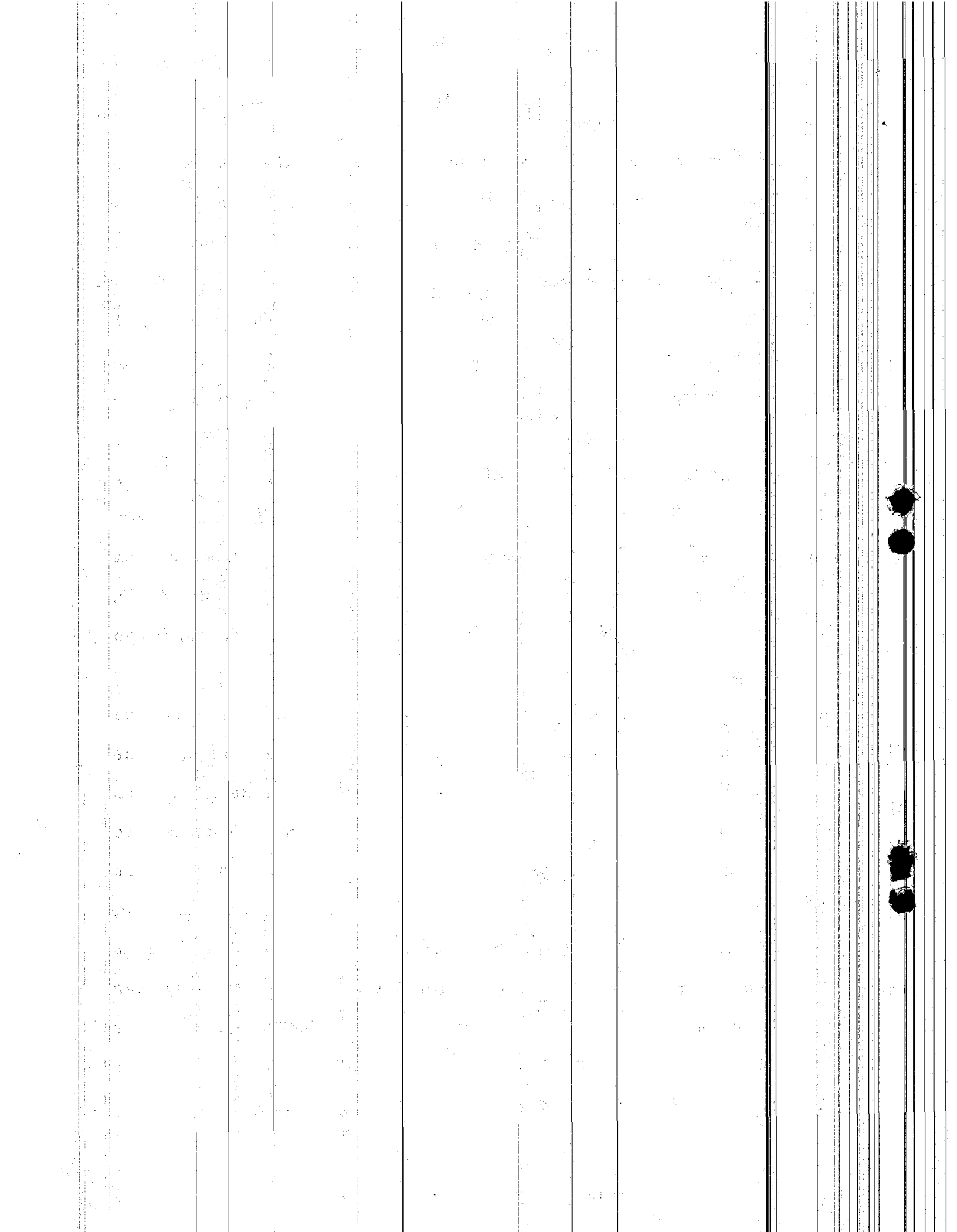
25 de expresión recombinante con contenido de mejoradores derivados del



genoma de las células mamíferas (por ejemplo, mejorador de metalotioneína) o de virus mamíferos (por ejemplo, el mejorador tardío del adenovirus; el virus de las vacunas mejoradora 7.5K; mejorador genético inicial Citomegalovirus).

5 También puede realizarse la expresión de RDCVF1 o RDCVF2 por una célula derivada de un gen *Rdcvf1* o *Rdcvf2* que es nativo a la célula. Los métodos para tal expresión se detallan, por ejemplo, en las Patentes de E.U. Nos. 5,641,670; 5,733,761; 5,968,502; y 5,994,127, las cuales se incorporan todas expresamente para
10 referencia en la presente en sus totalidades. Las células que se han inducido para expresar RDCVF1 o RDCVF2 por los métodos de cualquiera de las Patente de E.U. Nos. 5,641,670; 5,733,761; 5,968,502; y 5,994,127 pueden implantarse en un tejido deseado en un animal vivo con objeto de aumentar la concentración local de RDCVF1 o RDCVF2 en
15 el tejido.

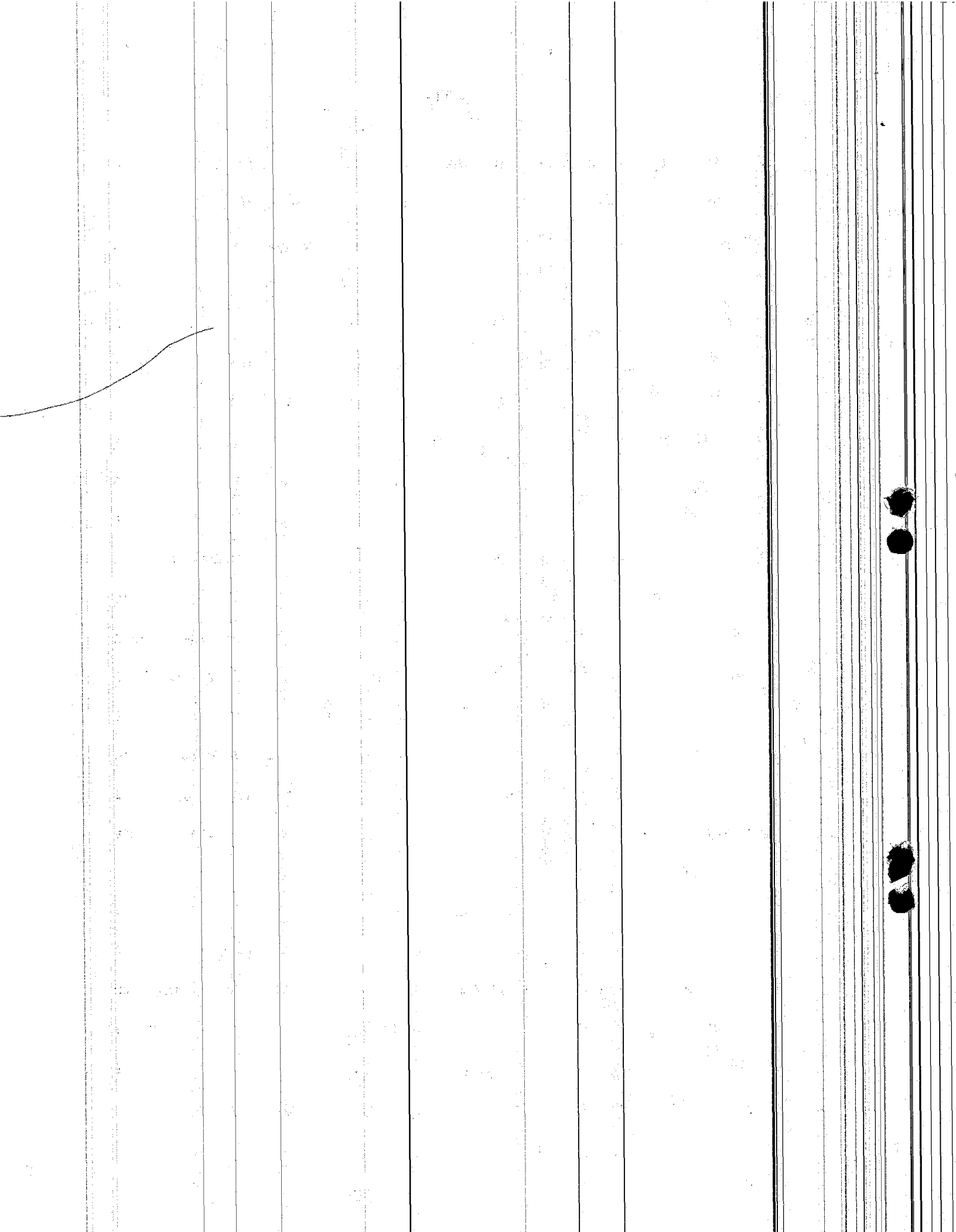
 En sistemas bacterianos, pueden seleccionarse un cierto número de vectores de expresión ventajosamente dependiendo del uso destinado para la proteína de gen expresado diferencialmente que se expresa. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de tal
20 proteína, para la generación de anticuerpos o para filtrar bibliotecas, por ejemplo, pueden ser deseables los vectores que dirigen la expresión de niveles elevados de productos de proteína de fusión que se purifican fácilmente. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, el vector de expresión *E. coli* pUR278 (Ruther et al., 1983, EMBO J. 2:1791), en el
25 cual la secuencia de codificación de proteína de gen expresado



24
36

diferencialmente puede ligarse individualmente con el vector en cuadro con la región de codificación lac Z de modo que se produce una proteína de fusión; los vectores pIN (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 264:5503-5509); y lo similar. Los vectores PGEX también pueden utilizarse para expresar polipéptidos foráneos como proteínas de fusión con S-transferasa de glutatona (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células sometidas a lisis por absorción de cuentas de glutatona-asefagarosa seguido de elución en presencia de glutatona libre. Los vectores PGEX se encuentran diseñados para incluir sitios de segmentación de trombina o proteasa de factor Xa de manera que la proteína de gen seleccionada como objetivo clonada puede liberarse de la mitad de GST utilizando estas endopeptidasas.

15 Las regiones mejoradoras pueden seleccionarse a partir de cualquier gen deseado utilizando vectores que contienen una unidad de transcripción relatora que carece de una región mejoradora, tal como una transferasa de acetilo de cloroanfenicol ("cat") o unidad de transcripción de luciferasa, corriente abajo del sitio o sitios de restricción para introducir un fragmento mejorador candidato; es decir, un fragmento que puede contener un mejorador. Como se sabe, la introducción en el vector de un fragmento con contenido de mejoradora en el sitio de restricción corriente arriba de la cat o producción de engendros de gen de luciferasa de CAT o de actividad de luciferasa, que pueden detectarse por pruebas CAT convencionales o luminometría.



Los vectores adecuados para este fin son bien conocidos y se encuentran fácilmente disponibles. Tres de tales vectores son pKK232-8, -pCM7 y pGL3 (Promega, E1751, Genebank Ass n° u47295). Consecuentemente, los mejoradores para expresión de polinucleótidos de la presente invención incluyen no solamente mejoradores bien conocidos y fácilmente disponibles, sino también mejoradores que puedan obtenerse fácilmente por la técnica anterior, utilizando una prueba de gen relator.

Entre los mejoradores bacterianos conocidos adecuados para la expresión de polinucleótidos y polipéptidos de acuerdo con la presente invención se encuentran los mejoradores lacI y lacZ de E. coli, los mejoradores T3 y T7, el mejorador T5 tac, los mejoradores PR, PL lambda y el mejorador trp. Entre los mejoradores eucarióticos conocidos adecuados a este respecto se encuentran el mejorador inicial intermedio CMV, el mejorador de quinasa de timidina HSV, los mejoradores SV40 inicial y tardío, los mejoradores de LTRs retrovirales, tales como aquellos del virus de sarcoma de Rous ("RSV"), y los mejoradores de metalotioneína, tales como el mejorador de metalotioneína-I de ratón.

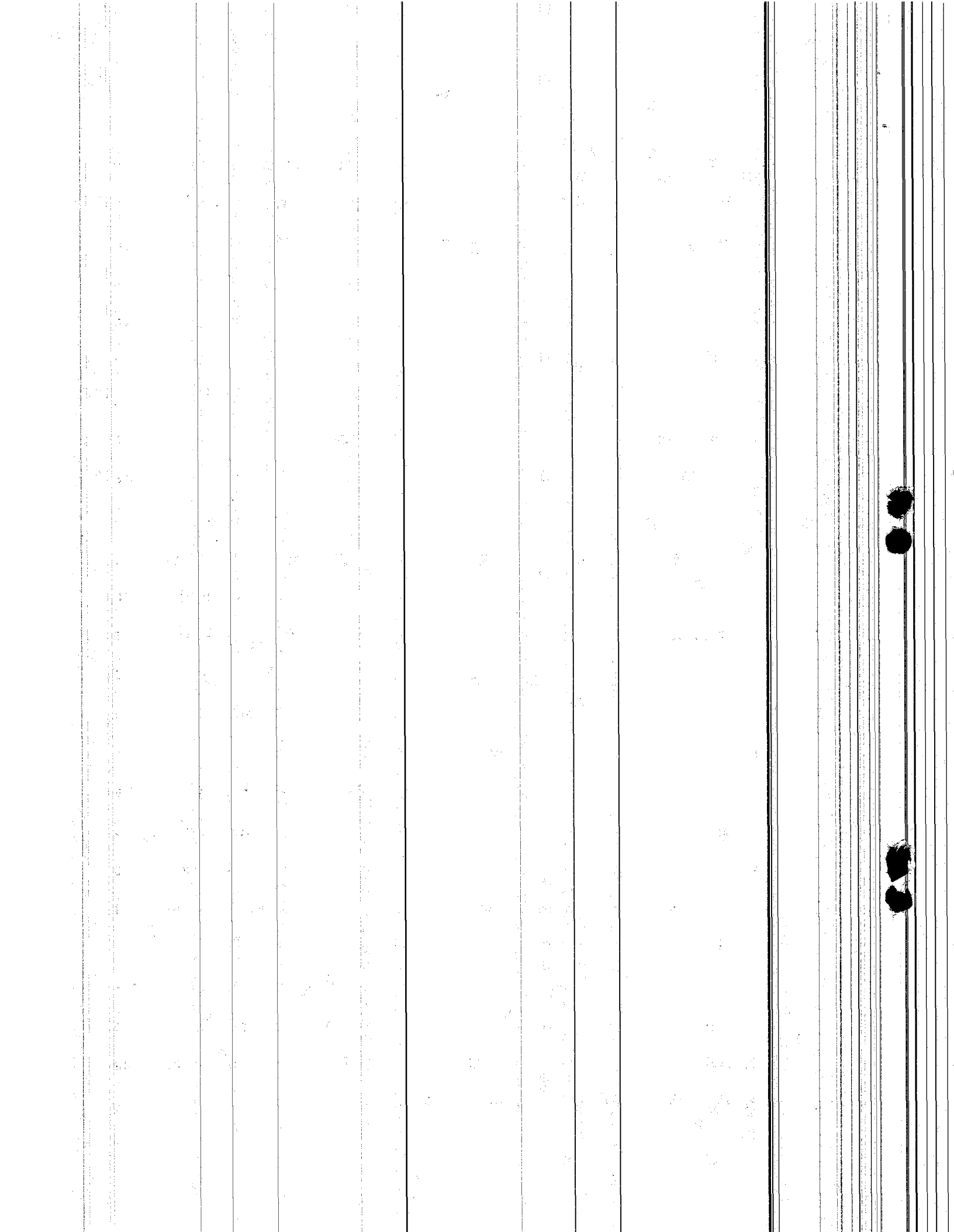
En un sistema de insecto, el virus de polihedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) es uno de varios sistemas de insecto que pueden utilizarse como vector para expresar genes foráneos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia de codificación de gen expresado diferencialmente puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de



34
23

polihedrina) del virus y colocarse bajo control de un mejorador AcNPV (por ejemplo, el mejorador de polihedrina). La inserción exitosa de la secuencia de codificación de gen expresado diferencialmente dará como resultado la inactivación del gen de polihedrina y la producción del virus recombinante no ocluida (es decir, el virus que carece del recubrimiento proteináceo codificado para el gen de polihedrina). Estos virus recombinantes se utilizan después para infectar células de *Spodoptera frugiperda* en las cuales se expresa el gen insertado. (Por ejemplo, ver Smith, et al., 1983, J. Virol. 46:584; Smith, Patente de E.U. No. 4,215,051).

En las células huésped mamíferas, puede utilizarse un cierto número de sistemas de expresión basados en virus. En los casos donde se utiliza un adenovirus como un vector de expresión, la secuencia de codificación de gen expresado diferencialmente de interés puede ligarse a un complejo de control de transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el mejorador tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede insertarse después en el genoma de adenovirus por una recombinación in vivo o in vitro. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, la región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la proteína de gen expresado diferencialmente en huéspedes infectados. Por ejemplo, Ver Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659). Las señales de inicio específico pueden requerirse también para la traducción eficiente de secuencias de codificación de gen expresadas diferencialmente. Estas señales incluyen el codón de



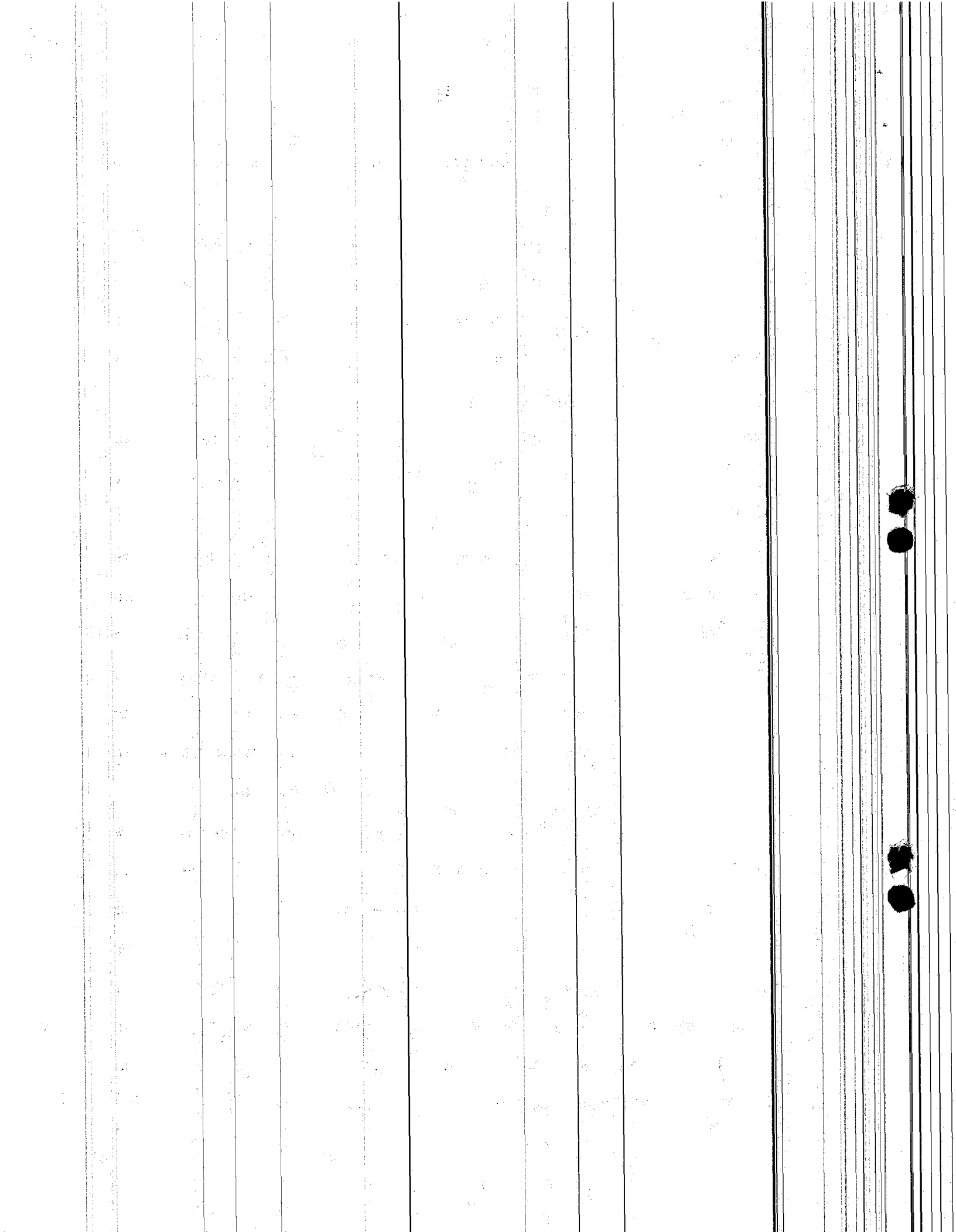
39
39

inicio de ATG y secuencias adyacentes. En los casos donde un gen expresado diferencialmente, incluyendo su propio codón de inicio y secuencias adyacentes, se inserta en el vector de expresión apropiado, puede no necesitarse ninguna señal de control de traducción adicional.

5 Sin embargo, en los casos donde solo se inserta una porción de la secuencia de codificación gen expresado diferencialmente, deben proporcionarse las señales de control de traducción exógenas, incluyendo, quizá, el codón de inicio ATG. Además, el codón de inicio debe estar en fase con el cuadro de lectura de la secuencia de
10 codificación deseada para asegurar la traducción de todo el inserto. Estas señales de control de traducción exógenas (secuencia de Kozack) y los codones de inicio pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de la expresión puede reforzarse mediante la inclusión de elementos reforzadores de
15 transcripción apropiados, terminadores de transcripción, etc. (ver Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:516-544).

La selección de los vectores y mejoradores apropiados para la expresión en una célula huésped es un procedimiento bien conocido y las técnicas solicitadas para la construcción del vector de expresión, la
20 introducción del vector en el huésped y la expresión en el huésped per se son rutinarias para el experto en la materia.

Generalmente, los vectores de expresión recombinante incluirán los orígenes de una réplica, un mejorador derivado de un gen altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia
25 estructural corriente abajo, y un marcador seleccionable para permitir el

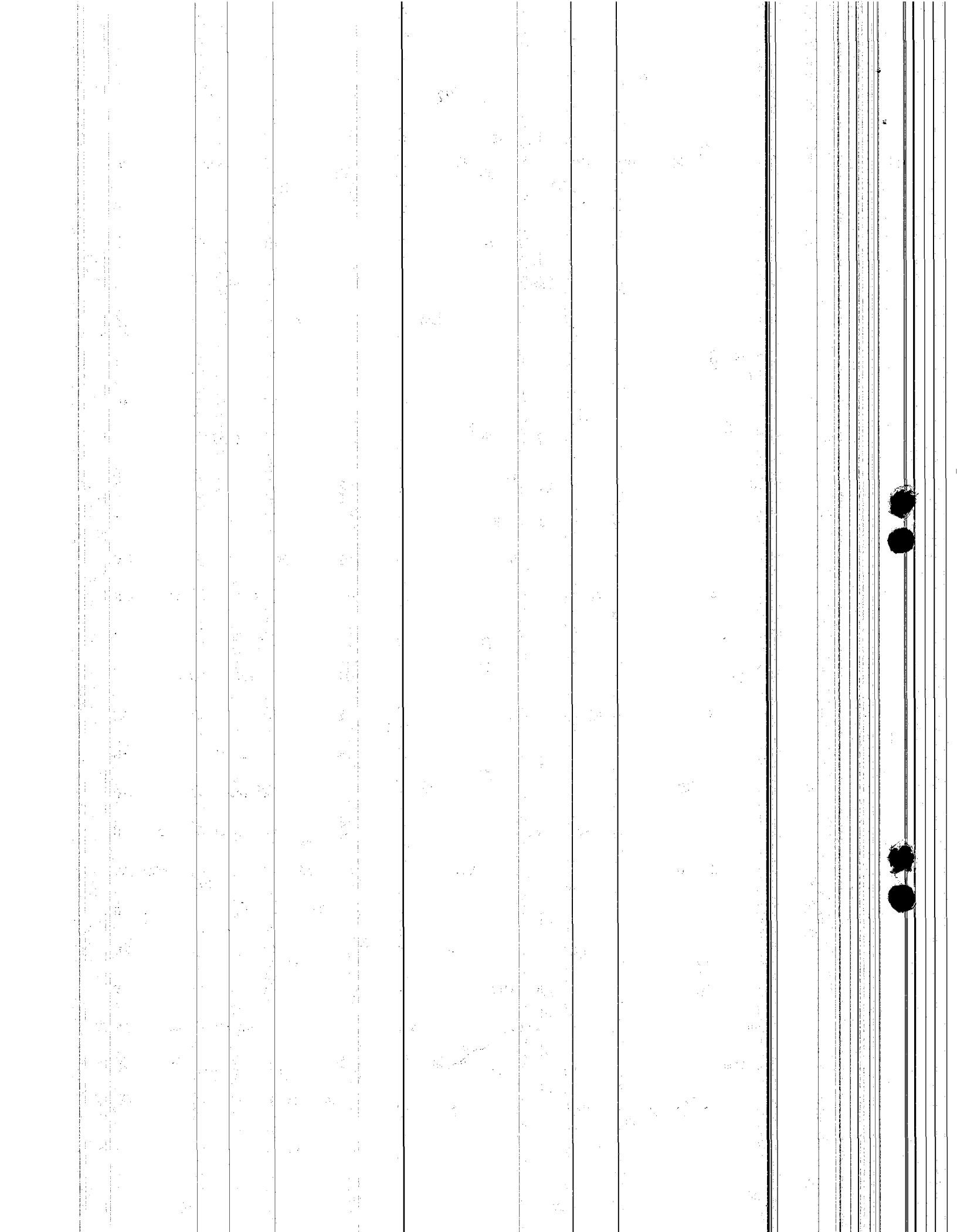


40
40

aislamiento de células con contenido de vector tras la exposición al vector.

Además, puede seleccionarse una cepa de célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y
5 procesa el producto genético de la manera específica deseada. Tales modificaciones (por ejemplo, glucosilación) y procesamiento (por ejemplo, segmentación) de productos de proteína pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y
10 la modificación post-traducción de las proteínas. Las líneas celulares apropiadas o sistemas huésped pueden seleccionarse para asegurar la modificación y procesamiento correctos de la proteína foránea expresada. Para este fin, pueden utilizarse las células huésped eucarióticas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento
15 apropiado de la transcripción, glucosilación, y fosforilación primarias del producto. Tales líneas celulares mamíferas incluyen pero no se limitan a CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38, etc.

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteína recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo,
20 pueden diseñarse las líneas celulares que expresan establemente la proteína expresada diferencialmente. En lugar de utilizar vectores de expresión que contengan orígenes virales de réplica, las células huésped pueden transformarse con ADN controlado por los elementos de control de expresión apropiados (por ejemplo, reforzadores, secuencias,
25 terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un



41
41

marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN foráneo, puede dejarse crecer a las células diseñadas durante 1-2 días en un medio enriquecido, y después cambiarlo a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere

5 resistencia a la selección y permite que las células integren establemente el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos los cuales a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede utilizarse ventajosamente para diseñar

10 líneas celulares las cuales expresan la proteína expresada diferencialmente. Tales líneas celulares diseñadas pueden ser particularmente útiles en la filtración y evaluación de compuestos que afecten la actividad endógena de la proteína expresada diferencialmente. Estas líneas celulares estables pueden utilizarse a manera de terapia celular directamente o después de la encapsulación.

15 Puede utilizarse un cierto número de sistemas de selección, incluyendo pero no limitándose a la quinasa de timidina del virus herpes simplex (Wigler, et al., 1977, Cell 11:223), fosforibosiltransferasa de hipoxantinoguanino (Szybalska & Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026), y los genes de fosforibosiltransferasa de adenina (Lowy, et al., 1980, Cell 22:817) pueden emplearse en las células tk', hgprt', o

20 aprt', respectivamente. También, puede utilizarse la resistencia de antimetabolito como la base de selección para dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler, et al., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Hare, et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); gpt,

25 que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan & Berg, 1981,



Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); neo, que confiere resistencia al aminoglucosido G-418 (Colbarre—Garapin, et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1); e higro, que confiere resistencia al gen de la higromicina (Santerre, et al., 1984. Gene 30:147).

5 Un sistema de proteínas de fusión alternativo para la pronta purificación de proteínas de fusión no desnaturalizadas expresadas en líneas celulares humanas (Janknecht, et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8972-8976). En este sistema, el gen de interés se subclona en un plásmido de recombinación de vacunas de manera tal que el marco
10 de lectura abierto del gen se fusiona con la traducción en una etiqueta amino-terminal que consiste de seis residuos de histidina. Los extractos derivados de las células infectadas con virus de vacunas recombinantes se cargan en columna de agarosa-ácido nitriloacético de Ni^{2+} y las proteínas etiquetadas de histidina se eluden selectivamente con
15 reguladores con contenido de imidazola.

 Cuando se utiliza como componente en sistemas de análisis tales como los descritos a continuación, puede etiquetarse la proteína expresada diferencialmente, sea directamente o indirectamente, para facilitar la detección de un complejo formado entre la proteína
20 expresada diferencialmente y una sustancia de prueba. Puede utilizarse cualquiera de entre una variedad de sistemas de etiquetación adecuados incluyendo pero no limitándose a radioisótopos tales como ^{125}I ; sistemas de etiquetación de enzimas que generan una señal calorimétrica detectable o luz cuando se exponen al sustrato; y
25 etiquetas fluorescentes.



Donde se utiliza tecnología de ADN recombinante para producir la proteína expresada diferencialmente para tales sistemas de prueba, puede ser ventajoso diseñar proteínas de fusión que puedan facilitar la etiquetación, inmovilización, y/o detección.

5 La etiquetación indirecta implica el uso de una proteína, tal como un anticuerpo etiquetado, el cual se une específicamente a un producto genético expresado diferencialmente. Tales anticuerpos incluyen pero no se limitan a, fragmentos policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena individual, Fab y fragmentos producidos por una
10 biblioteca de expresión de Fab.

En otra modalidad, los ácidos nucleicos que comprenden una secuencia que codifica la proteína RDCVF1 o RDCVF2 o un derivado funcional de la misma, se administran para mejorar la función del cono, a manera de terapia genética. La terapia genética se refiere a
15 la terapia realizada por la administración de un ácido nucleico a un paciente. En esta modalidad de la invención, el ácido nucleico produce su proteína codificada que media un efecto terapéutico mejorando la función de cono.

Cualquiera de los métodos para la terapia genética
20 disponibles en la materia pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención. Los métodos a manera de ejemplo se describen a continuación.

En un aspecto preferido, la terapéutica comprende un ácido nucleico Rdcvf1 o Rdcvf2 que es parte de un vector de expresión que
25 expresa la proteína RDCVF1 o RDCVF2 o fragmento o proteína

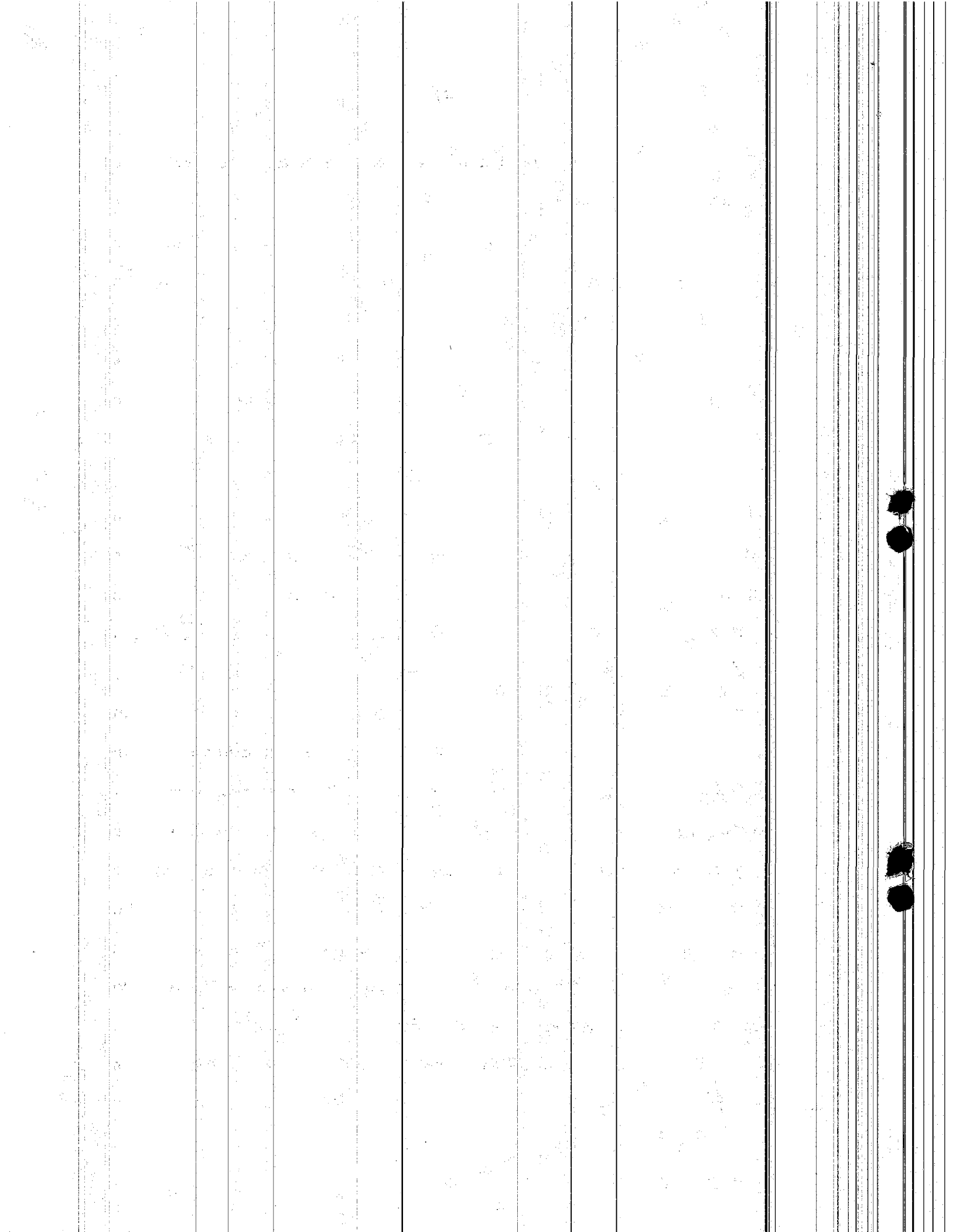


quimérica de la misma en un huésped adecuado. En particular, tal ácido
nucleico tiene un mejorador/enlazado operablemente a la región de
codificación Rdcvf1 o Rdcvf2, siendo dicho mejorador inducible o
constitutivo, y, opcionalmente, de tejido específico. En otra modalidad
5 particular, se utiliza una molécula de ácido nucleico en la cual las
secuencias de codificación Rdcvf1 o Rdcvf2 y cualquier otra secuencia
deseada se encuentran flanqueadas por regiones que mejoran la
recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma,
proporcionando así la expresión intracromosómica del ácido nucleico
10 Rdcvf1o Rdcvf2 (Koller y Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA
86:8932-8935; Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438).

El suministro del ácido nucleico a un paciente puede ser
directo, en cuyo caso el paciente se expone directamente al ácido
nucleico o vector que porta el ácido nucleico, o indirecto, en cuyo caso,
15 la células se transforman primero con el ácido nucleico in vitro,
transplantadas después al paciente. Estos dos planteamientos son
conocidos, respectivamente, como terapia genética *in vivo* o *ex vivo*.

En una modalidad específica, el ácido nucleico se
administra directamente *in vivo*, donde se expresa para producir el
20 producto codificado. Esto puede realizarse por cualquiera de entre
numerosos métodos conocidos en la materia, por ejemplo,
construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico
apropiado y administrándolo de manera que se vuelva intracelular, por
ejemplo, por infección utilizando un retroviral defectuosos o atenuado u
25 otro vector viral (adenovirus, virus adeno-asociados y lentivirus) (ver,

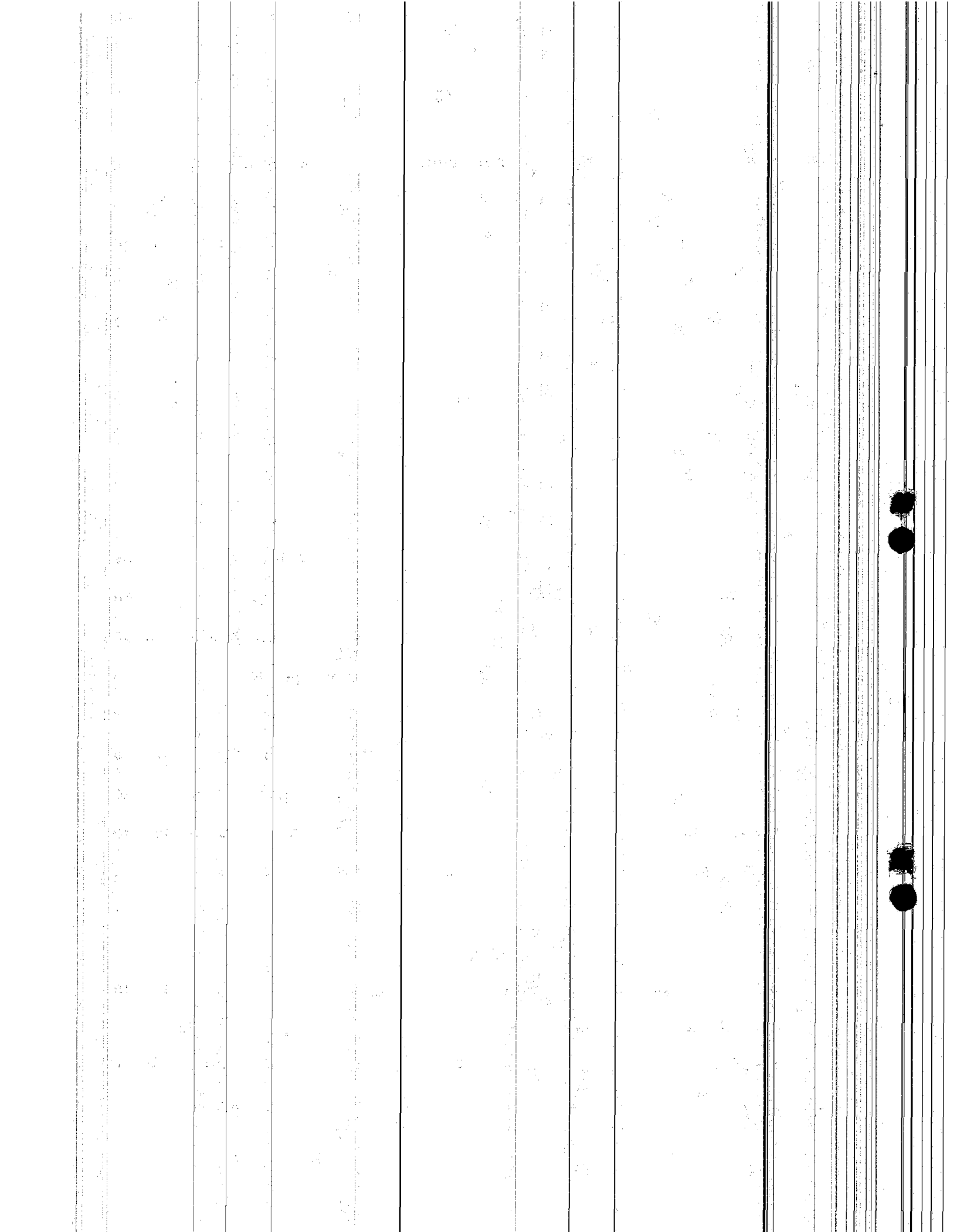
por ejemplo, la Patente de E.U. No. 4,980,286 y otras mencionadas *infra*), o por inyección directa de ADN puro, o por el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una goma genética; Biolistic, Dupont), o recubriendo con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, encapsulación en liposomas, micropartículas, o microcápsulas, o administrándolo en enlace con un péptido el cual es conocido por ingresar al núcleo, administrándolo en enlace con un ligante sujeto a la endocitosis mediada por receptor (ver, por ejemplo, las Patentes de E.U. Nos. 5,166,320; 5,728,399; 5,874,297; y 6,030,954, las cuales se incorporan todas para referencia en la presente en sus totalidades) (que pueden utilizarse para seleccionar como objetivo tipos celulares que expresen específicamente los receptores), etc. En otra modalidad, puede formarse un complejo ligante de ácido nucleico en el cual el ligante comprende un péptido viral fusogénico para interrumpir los endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosomal. En todavía otra modalidad, el ácido nucleico puede seleccionarse como objetivo in vivo para la captación y expresión específicas de células, seleccionando como objetivo un receptor específico (ver, por ejemplo, las Publicaciones PCT WO 92/06180; WO 92/22635; WO92/20316; WO93/14188; y WO 93/20221). Alternativamente, el ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de célula huésped para expresión, para la recombinación homóloga (ver, por ejemplo, las Patentes de E.U. Nos. 5,413,923; 5,416,260; y 5,574,505; y Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438).



En una modalidad específica, se utiliza un vector viral que contiene el ácido nucleico Rdcvf1 o Rdcvf2. Por ejemplo, puede utilizarse un vector retroviral (ver, por ejemplo, Patentes de E.U. No. 5,219,740; 5,604,090; y 5,834,182). Estos vectores retrovirales se han modificado para eliminar secuencias retrovirales que no sean necesarios para el empaquetamiento del genoma viral y la integración en ADN de célula huésped. El ácido nucleico Rdcvf1 o Rdcvf2 a utilizarse en la terapia genética se clona en el vector, lo cual facilita el suministro del gen en un paciente.

Los adenovirus son otros vectores virales que pueden utilizarse en la terapia genética. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos para suministrar genes a los epitelios respiratorios. Los adenovirus infectan de manera natural los epitelios respiratorios donde ocasionan una enfermedad moderada. Otros objetivos para los sistemas de suministro basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, las células endoteliales, y el músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaces de infectar células de no división. Los métodos para llevar a cabo la terapia genética basada en adenovirus se describen por ejemplo, en las Patentes de E.U. Nos. 5,824,544; 5,868,040; 5,871,722; 5,880,102; 5,882,877; 5,885,808; 5,932,210; 5,981,225; 5,994,106; 5,994,132; 5,994,134; 6,001,557; y 6,033,8843, las cuales se incorporan todas para referencia en la presente en su totalidad.

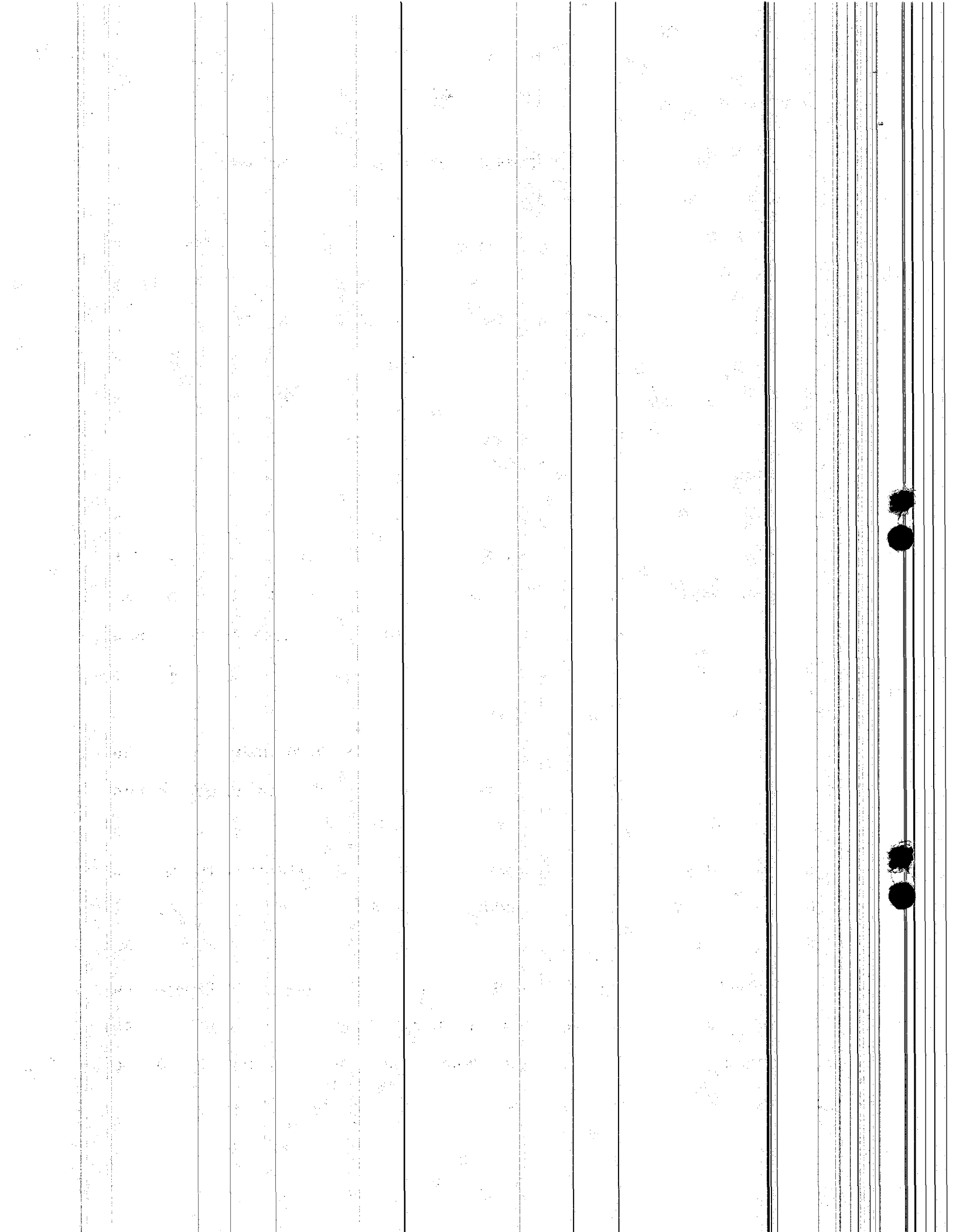
Los virus adeno-asociados (AAV) se han propuesto también para su uso en la terapia genética. Los virus adeno-asociados son



vehículos especialmente atractivos para suministrar genes a la retina. Los métodos para producir y utilizar AAV se describen, por ejemplo, en las Patentes de E.U. Nos. 5,173,414; 5,252,479; 5,552,311; 5,658,785; 5,763,416; 5,773,416; 5,773,289; 5,843,742; 5,869,040; 5,942,496; y 5,948,675, las cuales se incorporan todas para referencia en la presente en sus totalidades.

Otro planteamiento a la terapia genética implica transferir un gen a las células en cultivo de tejidos por métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada con fosfato de calcio, o infección viral. Generalmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Las células se colocan después bajo selección para aislar aquellas células que han sido tomadas y que se encuentran expresando el gen transferido. Esas células se suministran después a un paciente directamente o después de la encapsulación.

En esta modalidad, el ácido nucleico se introduce en una célula antes de la administración in vivo de la célula recombinante resultante. Tal introducción puede llevarse a cabo por cualquier método conocido en la materia, incluyendo pero no limitándose a la transfección, electroporación, microinyección, infección con un viral o vector bacteriófago con contenido de las secuencias de ácido nucleicas, fusión celular, transferencia de gen mediada por cromosomas, transferencia de gen mediada por microcélulas, fusión esferoplástica, etc. Se conocen diversas técnicas en la materia para la introducción de genes foráneos en células y pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención, a



condición de que las funciones de desarrollo y fisiológicas necesarias de las células de recipiente no se interrumpan. La técnica debe proporcionarse para la transferencia estable del ácido nucléico a la célula, de manera que el ácido nucléico sea expresable por la célula y
5 preferentemente heredable y expresable por su progenie celular.

Las células recombinantes resultantes pueden suministrarse a un paciente por diversos métodos conocidos en la materia. En una modalidad preferida, se inyectan las células epiteliales, por ejemplo, subcutáneamente. En otra modalidad, las células de piel recombinantes
10 pueden aplicarse como injerto de piel al paciente. Las células sanguíneas recombinantes (por ejemplo, de tallo hematopoyético o las células progenitoras) se administran preferentemente intravenosamente. La cantidad de células contempladas para su uso depende del efecto deseado, estado del paciente, etc., y puede determinarse por el experto
15 en la materia.

Las células en las cuales puede introducirse un ácido nucléico para propósitos de terapia genética abarcan cualquier tipo celular deseado, disponible, e incluyen pero no se limitan a, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células
20 musculares, hepatocitos; células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células germinales o progenitoras, en particular células germinales o progenitoras hematopoyéticas, por ejemplo, como se obtiene a partir de la médula
25 ósea, la sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc.



En una modalidad preferida, la célula utilizada para la terapia genética es autóloga al paciente.

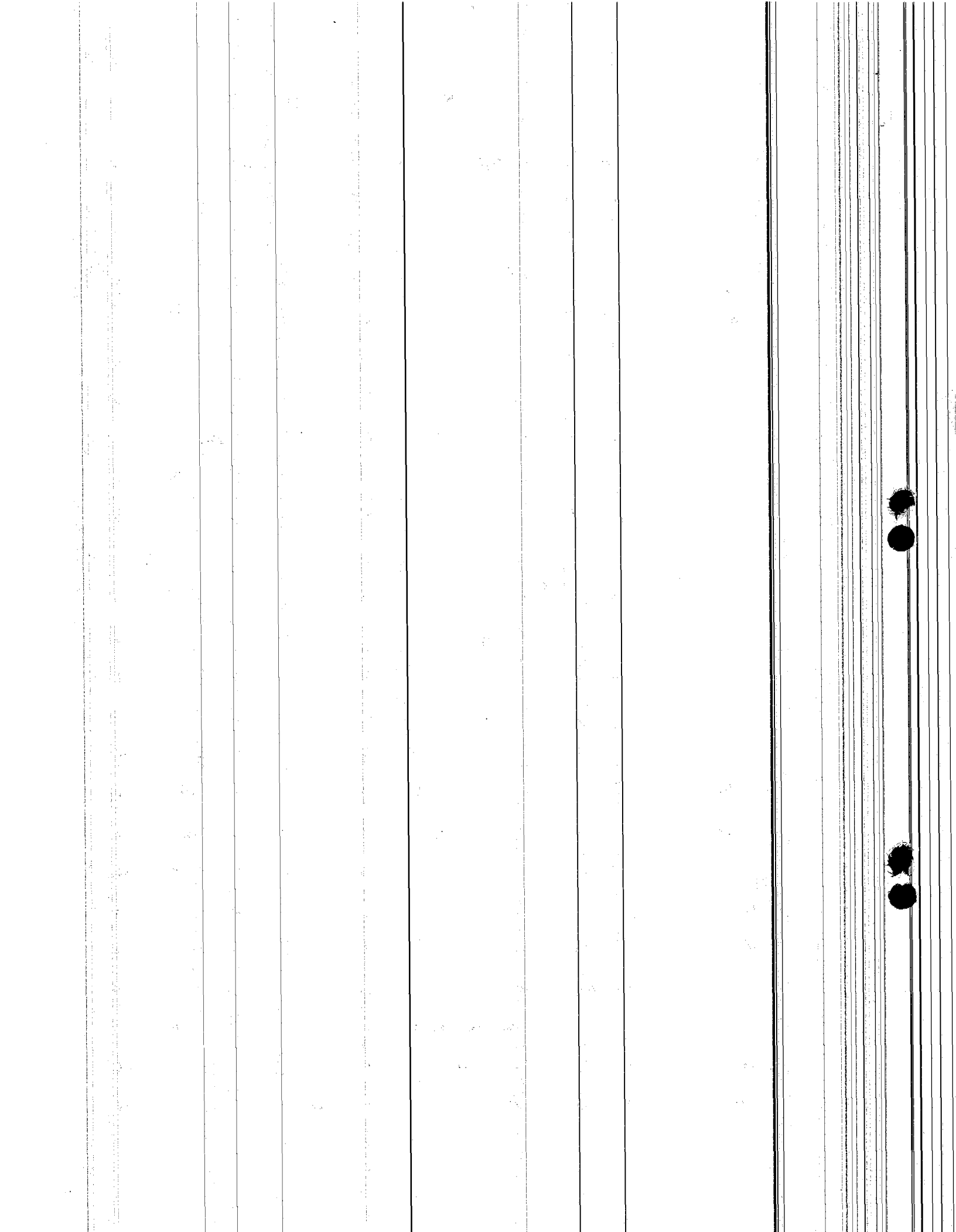
En una modalidad en la cual se utilizan las células recombinantes en la terapia genética, se introduce un ácido nucleico
5 Rdcvf1 o Rdcvf2 en las células de manera tal que es expresable por las células o su progenie, y las células recombinantes se administran después in vivo para efecto terapéutico. En una modalidad específica, se utilizan células germinales o progenitoras. Cualquier célula germinal y/o progenitora que pueda aislarse y mantenerse in vitro puede utilizarse
10 potencialmente de acuerdo con esta modalidad de la presente invención. Tales células germinales incluyen, pero no se limitan a, células germinales hematopoyéticas (HSC), células germinales de tejidos epiteliales tales como la piel y el revestimiento del intestino, células musculares de corazón embrionario, células germinales de hígado (ver,
15 por ejemplo, WO 94/08598), y células germinales neurales (Stemple y Anderson, 1992, Cell 71:973-985).

Las células germinales epiteliales (ESCs) o queratinocitos pueden obtenerse a partir de tejidos tales como la piel y el revestimiento del intestino por procedimientos conocidos (Rheinwald, 1980, Meth. Cell.
20 Bio. 21A:229). En el tejido epitelial estratificado tal como la piel, ocurre la renovación por mitosis de las células germinales dentro de la capa germinal. La capa más cercana a la lámina basal. Las células germinales dentro del revestimiento del intestino se proporcionan para una velocidad de renovación rápida de este tejido. Las ESCs o
25 queratinocitos obtenidos a partir de la piel o revestimiento del intestino



de un paciente o donador puede crecer en el cultivo de tejido (Pittelkow y Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771). Si las ESCs se proporcionan por un donador, puede utilizarse también un método para la supresión del huésped contra la reactividad del injerto (por ejemplo, irradiación, administración de droga o anticuerpo para mejorar la inmunosupresión moderada). Las células germinales retinales (Tropepe et al., 2000, Science, 287:2032).

Con respecto a las células germinales hematopoyéticas (HSC), puede utilizarse en esta modalidad de la invención cualquier técnica que se proporcione para el aislamiento, propagación, y mantenimiento in vitro de HSC. Las técnicas por las cuales puede realizarse esto incluyen (a) el aislamiento y establecimiento de cultivos de HSC a partir de células de médula ósea aisladas del futuro huésped, o un donador, o (b) el uso de cultivos de HSC a largo plazo establecidos anteriormente, los cuales pueden ser alogénicos o xenogénicos. Las HSC no autólogas se utilizan preferentemente en conjunto con un método para suprimir las reacciones inmunes del transplante del futuro huésped/paciente. En una modalidad particular de la presente invención, las células de médula ósea humana pueden obtenerse a partir de la cresta iliaca posterior por aguja con aspiración (ver, por ejemplo, Kodo et al., 1984, J. Clin. Invest. 73:1377-1384). En una modalidad preferida de la presente invención, las HSCs pueden elaborarse altamente enriquecidas o en forma substancialmente pura. Este enriquecimiento puede realizarse antes, durante, o después de cultivos a largo plazo, y puede realizarse por cualquier técnica conocida



que pueden producirse por digestión de pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab que pueden generarse reduciendo los puentes de disulfuro de los fragmentos $F(ab')_2$. Alternativamente, pueden construirse las bibliotecas de expresión Fab (Huse et al., 1989, Science, 246:1275-1281) para permitir la rápida y fácil identificación de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada.

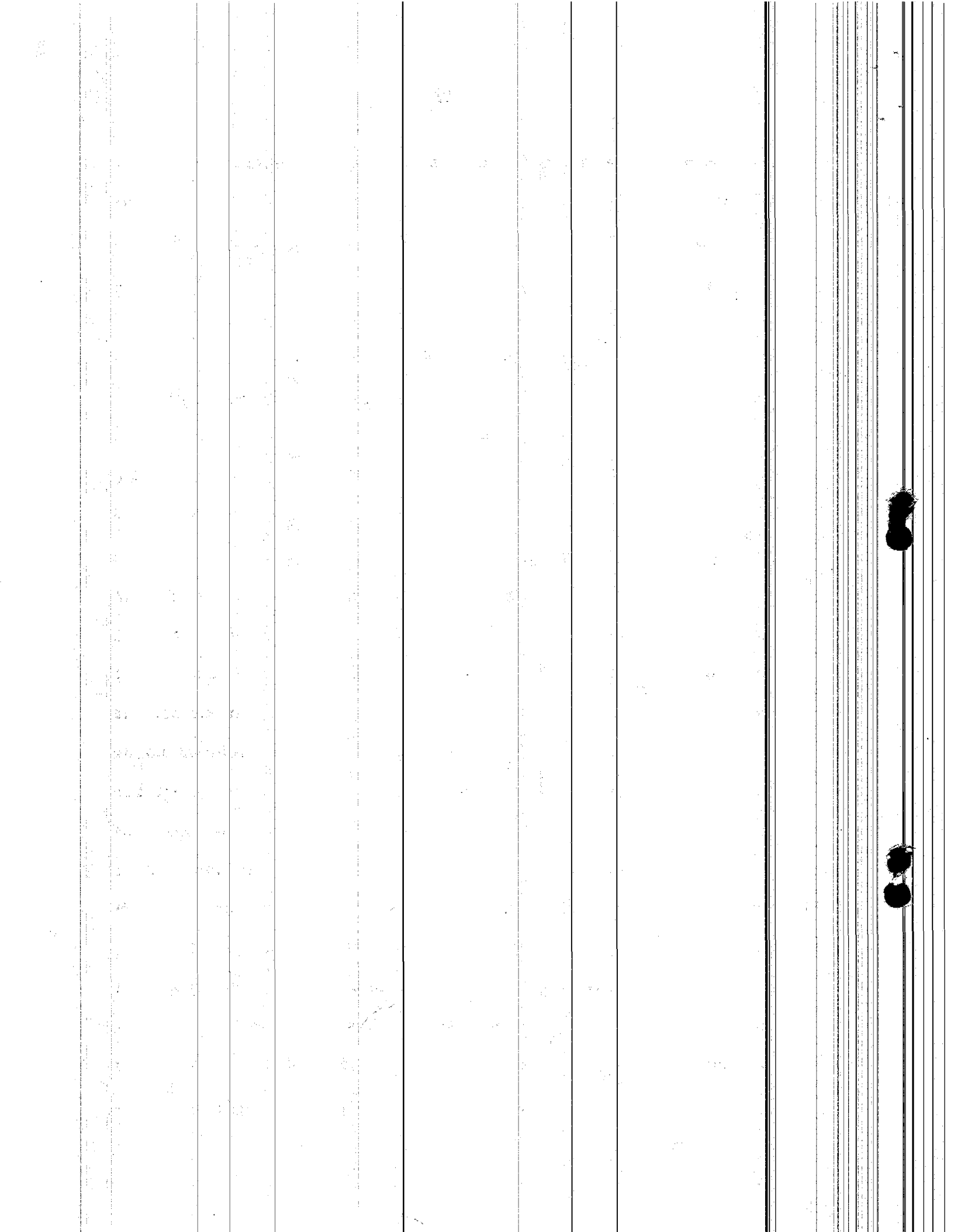
Particularmente preferida, para facilidad de detección, es la prueba del sándwich, de la cual existe un cierto número de variaciones, las cuales pretenden todas ser abarcadas por la presente invención.

10 Por ejemplo, en un prueba directa típica, se inmoviliza el anticuerpo no etiquetado en un sustrato sólido y la muestra a probarse se pone en contacto con la molécula de unión. Después de un periodo adecuado de incubación, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo binario anticuerpo-antígeno. En
15 este punto, un segundo anticuerpo, etiquetado con una molécula relatora capaz de inducir una señal detectable, se agrega e incuba después, permitiendo el tiempo suficiente para la formación de un complejo ternario de anticuerpo-antígeno-anticuerpo etiquetado. Se enjuaga cualquier material no reaccionado, y la presencia del antígeno se
20 determina por observación de una señal, o puede cuantificarse comparando con una muestra de control que contiene cantidades conocidas de antígeno. Las variaciones en la prueba directa incluyen la prueba simultánea, en la cual ambas muestra y anticuerpo se agregan simultáneamente al anticuerpo de unión, o una prueba inversa en la cual
25 el anticuerpo etiquetado y la muestra a probarse se combinan



primeramente, se incuban y agregan al anticuerpo de unión de superficie no etiquetado. Estas técnicas son bien conocidas por aquellos expertos en la materia, y la posibilidad de variaciones menores será fácilmente aparente. Como se utiliza en la presente, "prueba de sándwich" pretende abarcar todas las variaciones en la técnica básica de dos sitios. Para las inmunopruebas de la presente invención, el único factor limitante es que los anticuerpos no etiquetados y etiquetados sean un anticuerpo específico a Rdcvf1 o Rdcvf2.

Las moléculas relatoras más comúnmente utilizadas en este tipo de prueba son cualquiera de entre enzimas o moléculas con contenido de fluorofeno o radionucleido. En el caso de una inmunoprueba de enzima se conjuga una enzima al segundo anticuerpo, generalmente por medio de glutaraldehído o periodato. Sin embargo, como se reconocerá, existe una amplia variedad de diferentes técnicas de ligación, las cuales son bien conocidas por los expertos en la materia. Las enzimas comúnmente utilizadas incluyen peroxidasa de rábano picante, oxidasa de glucosa, beta-galactosidasa y fosfatasa alcalina, entre otras. Los substratos a utilizarse con las enzimas específicas se seleccionan generalmente para la producción, tras la hidrólisis por la enzima correspondiente de un cambio de color detectable. Por ejemplo, el fosfato de p-nitrofenilo es adecuado para su uso con conjugados de fosfatasa alcalina; para conjugados de peroxidasa, se utilizan comúnmente 1,2-fenilenodiamina o toluidina. También es posible emplear substratos fluorogénicos, los cuales entregan un producto fluorescente en lugar de los substratos



5 cromogénicos anteriormente observados. Una solución que contiene el sustrato apropiado se agrega después al complejo terciario del anticuerpo etiquetado RDCVF1 o RDCVF2. El sustrato reacciona con la enzima enlazada al segundo anticuerpo, entregando una señal visual cualitativa, la cual puede cuantificarse adicionalmente, generalmente espectrofotométricamente, para entregar una evaluación de la cantidad de Rdcvf1 o Rdcvf2 que se encuentra presente en la muestra de suero.

10 Alternativamente, los compuestos fluorescentes, tales como la fluoresceína y la rodamina, pueden acoplarse químicamente a los anticuerpos alterando su capacidad de unión. Cuando se activa por iluminación con la luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo etiquetado con flurocromas absorbe la energía de la luz, induciendo un estado de excitabilidad en la molécula, seguido de emisión de la luz a una longitud de onda más larga característica. La emisión aparece
15 como un color característico visualmente detectable con un microscopio de luz. Las técnicas de inmunofluorescencia y EIA se establecen ambas muy bien en la materia y son particularmente preferidas para el método presente. Sin embargo, también pueden emplearse otras moléculas relatoras, tales como radioisótopos, moléculas quimioluminiscentes o
20 bioluminiscentes. Será fácilmente aparente para los expertos en la materia variar el procedimiento para adecuar el uso requerido.

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



establecidos en el NO DE ID DE SEC:2, NO DE ID DE SEC:4, NO DE ID DE SEC:6, NO DE ID DE SEC:8, NO DE ID DE SEC:10, NO DE ID DE SEC:12 y NO DE ID DE SEC:14 la cual se encuentran asociados con una disfunción proporcionará una herramienta de diagnóstico que pueda
5 agregarse a, o definir, un diagnóstico de una enfermedad, o susceptibilidad a una enfermedad, que es resultado de la sub-expresión, sobre-expresión o expresión espacial alterada o temporal del gen. Los individuos que portan mutaciones en el gen pueden detectarse en el nivel de ADN por una variedad de técnicas.

- 10 Los ácidos nucleicos para diagnósticos pueden obtenerse a partir de células del paciente, tales como las derivadas de la sangre, orina, saliva, material de biopsia o autopsia de tejido. El ADN genómico puede utilizarse directamente para la detección o puede amplificarse enzimáticamente utilizando PCR u otras técnicas de amplificación antes
15 del análisis. El ARN o cADN pueden utilizarse también de manera similar. Pueden detectarse eliminaciones o inserciones por un cambio en el tamaño del producto amplificado en comparación con el genotipo normal. Las mutaciones de punto pueden identificarse al hibridizar ADN amplificado a secuencias nucleótidas etiquetadas. Las secuencias
20 perfectamente acopladas pueden distinguirse de dúplexes no acoplados por digestión de RNAasa o por diferencias en las temperaturas de fusión. Pueden detectarse las diferencias de secuencia de ADN por alteraciones en la movilidad electroforética de los fragmentos de ADN en geles, con o sin agentes desnaturalizantes (SSCP), o mediante
25 secuencias de ADN directas (por ejemplo, Myers et al., Science (1985))



230:1242). Los cambios de secuencia en posiciones específicas pueden revelarse también por pruebas de protección de nucleasa, tales como protección de Rnasa y S1 o el método de segmentación química (ver Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 85: 4397-4401). En otra

5 modalidad, puede construirse un arreglo de sondas oligonucleótidas que comprende la secuencia nucleótida Rdcvf1o Rdcvf2 o fragmentos de la misma para llevar a cabo la filtración eficiente de por ejemplo, mutaciones genéticas. Los métodos de tecnología de arreglos son bien conocidos y tienen aplicabilidad general y pueden utilizarse para

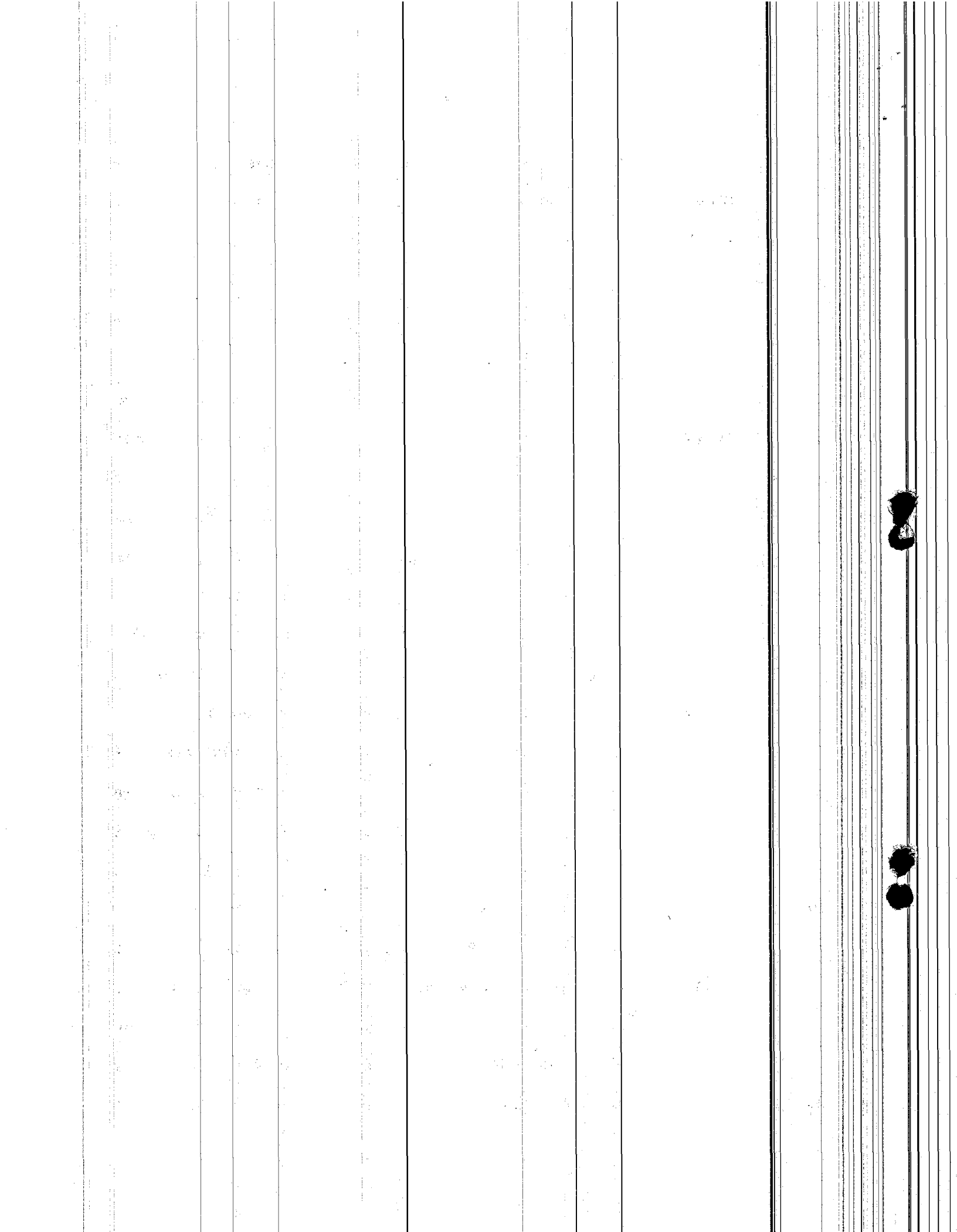
10 abordar una variedad de cuestiones en genética molecular incluyendo expresión genética, enlace genético, y variabilidad genética (ver por ejemplo: M. Chee et al., Science, Vol 274, págs. 610-613 (1996)).

Las pruebas de diagnóstico ofrecen un proceso para diagnosticar o determinar una susceptibilidad a la enfermedad a través

15 de la detección de mutaciones en el gen Rdcvf1o Rdcvf2 por los métodos descritos. Además, tales enfermedades pueden diagnosticarse por métodos que comprenden determinar a partir de una muestra derivada de un paciente una expresión Rdcvf1o Rdcvf2 anormal. La expresión puede medirse al nivel de ARN utilizando cualquiera de los

20 métodos bien conocidos en la materia para la cuantificación de polinucleótidos, tales como, por ejemplo, amplificación de ácido nucléico, por ejemplo PCR, RT-PCR, protección de Rnasa, análisis sanguíneo Northern y otros métodos de hibridación. Las técnicas de prueba que pueden utilizarse para determinar los niveles de una

25 proteína, tales como un polipéptido de la presente invención, en una



muestra derivada de un huésped son bien conocidas por aquellos expertos en la materia. Tales métodos de prueba incluyen radioinmunopuebas, pruebas de unión competitiva, análisis Western-Blot y pruebas ELISA.

5 Consecuentemente en otro aspecto, la presente invención se refiere a un juego de diagnóstico el cual comprende:

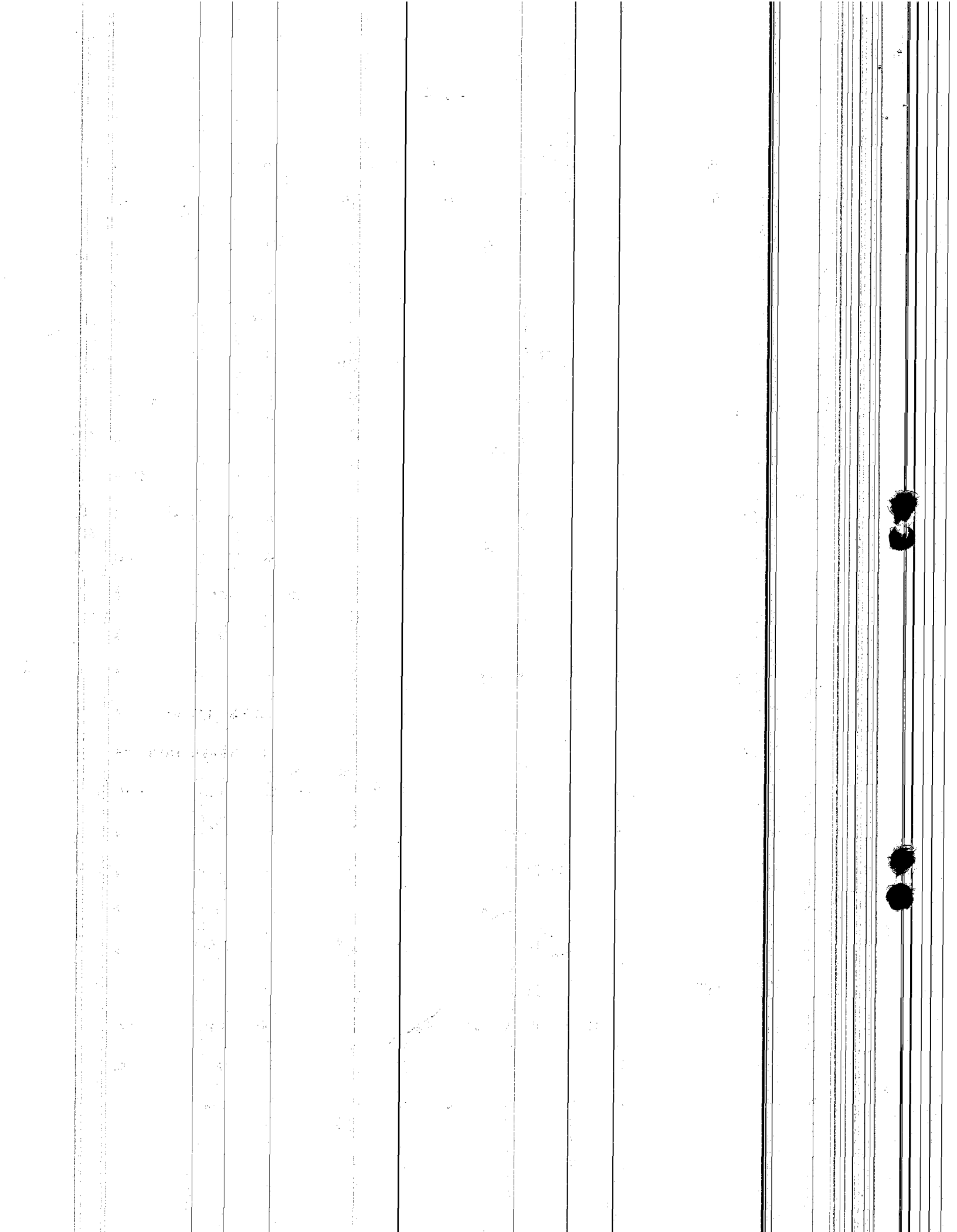
 (a) un polinucleótido de la presente invención, preferentemente la secuencia nucleótida que codifica un polipéptido seleccionado de entre el grupo que consiste en los polipéptidos
10 establecidos en el NO DE ID DE SEC:2, NO DE ID DE SEC:4, NO DE ID DE SEC:6, NO DE ID DE SEC:8, NO DE ID DE SEC:10, NO DE ID DE SEC:12 y NO DE ID DE SEC:14, o un fragmento de los mismos;

 (b) una secuencia nucleótida complementaria a la de (a);

 (c) un polipéptido de la presente invención,
15 preferentemente el polipéptido de o un fragmento del mismo; o

 (d) un anticuerpo a un polipéptido de la presente invención, preferentemente a un polipéptido seleccionado de entre el grupo que consiste en los polipéptidos establecidos en el NO DE ID DE SEC:2, NO DE ID DE SEC:4, NO DE ID DE SEC:6, NO DE ID DE SEC:8,
20 NO DE ID DE SEC:10, NO DE ID DE SEC:12 y NO DE ID DE SEC:14.

 Se apreciará que en cualquier juego, (a), (b), (c) o (d) puede estar comprendido un componente substancial. Tal juego será de uso para diagnosticar una enfermedad o susceptibilidad a una enfermedad, particularmente la retinitis pigmentosa, degeneración macular
25 relacionada con el envejecimiento, síndrome de Bardet-Biedel, síndrome



de Bassen-Kornzweig, mal de Best, coroidema, atrofia giratoria, amourosis congénita, síndrome de Refsun, mal de Stargardt y síndrome de Usher. Las secuencias nucleótidas de la presente invención son valiosas también para la localización de cromosomas. La localización cromosómica puede obtenerse por PCR o ADN preparado a partir de un panel de líneas celulares híbridas (ratón-hamster). La localización cromosómica del gen humano puede predecirse a partir de la localización del gen de ratón por sintenia (McCarthy et al. (1997), Genome research, 7, 1153). La secuencia se selecciona como objetivo específicamente, y puede hibridizarse con, una posición particular en un cromosoma individual, incluyendo un ratón o un cromosoma humano. El mapeo de secuencias relevantes a cromosomas de acuerdo con la presente invención es un primer paso importante para correlacionar esas secuencias con enfermedad asociada al gen. Una vez que se ha mapeado la secuencia a una posición cromosómica precisa, la posición física de la secuencia en el cromosoma puede correlacionarse con los datos de mapa genética. Tales datos se encuentran por ejemplo, en V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (disponible en línea a través de la Biblioteca Médica Welch de la Universidad John Hopkins, ReNet). La relación entre los genes y las enfermedades que se han mapeado a la misma región cromosómica se identifican después a través de análisis de enlace (coherencia de los genes físicamente adyacentes).

También pueden determinarse las diferencias en la secuencia genómica o cADN entre individuos afectados y no afectados. Si se observa una mutación en algunos o todos los individuos no



afectados pero no en cualquier individuo normal, entonces la mutación es propensa a ser el agente causante de la enfermedad.

Una modalidad adicional de la invención se relaciona a la administración de una composición farmacéutica, en conjunto con un portador farmacéuticamente aceptable, para cualquiera de los efectos terapéuticos anteriormente descritos. Tales composiciones farmacéuticas pueden consistir de Rdcvf1o Rdcvf2, imitadores o agonistas. Las composiciones pueden administrarse solas o en combinación con al menos otro agente, tal como un compuesto estabilizador, el cual puede administrarse en cualquier portador farmacéuticamente biocompatible, estéril, que incluye, pero que no se limita a, salmuera, salmuera regulada, dextrosa, y agua. Las composiciones pueden administrarse a un paciente solamente, o en combinación con otros gantes, drogas, u hormonas.

Las composiciones farmacéuticas abarcadas por la invención pueden administrarse por cualquier número de rutas: por ejemplo, Transscleral delivery of biorective protein to the choroid and retina Ambati et al. (2000) Investigative Ophthalmology and Visual Science, 41, 1186. La formulación de preparaciones oftálmicas tópicas, que incluyen soluciones oftálmicas, suspensiones y ungüentos es bien conocida por aquellos expertos en la materia (ver Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, Capítulo 86, páginas 1581-1592 Mack Publishing Company, 1990). Se encuentran disponibles otros modos de administración, incluyendo las inyecciones intracamarales (las cuales pueden elaborarse directamente en la cámara anterior o



directamente en la cámara vítrea), inyecciones subconjuntivas e inyecciones retrobulbares, y los métodos y medios para producir preparaciones oftálmicas adecuadas para tales modos de administración son también conocidos.

5 Como se utiliza en esta solicitud, "extraocular" se refiere a la superficie ocular y al espacio (externo) entre el globo ocular y el párpado. Los ejemplos de regiones extraoculares incluyen la bóveda del párpado o cavidad ocular, la superficie conjuntiva y la superficie córnea. Esta posición es externa a todo el tejido ocular y no se requiere que un
10 procedimiento invasivo accese a esta región. Los ejemplos de los sistemas extraoculares incluyen insertos y drogas aplicadas "tópicamente", geles o ungüentos los cuales pueden utilizarse para suministrar material terapéutico a estas regiones. Los dispositivos extraoculares son generalmente fácilmente extraíbles, incluso por el
15 paciente.

Las siguientes patentes describen sistemas extraoculares los cuales se utilizan para administrar drogas a las regiones extraoculares. Higuchi et al. describe en las Patentes de E.U. Nos. 3,981,303, 3,986,510 y 3,995,635, un inserto ocular biodegradable el
20 cual contiene una droga. El inserto puede hacerse en diferentes formas para la retención en la cavidad ocular del globo ocular, el espacio extraocular entre el globo ocular y el párpado. Se describen diversos polímeros biocompatibles comunes como adecuados para el uso en la fabricación de este dispositivo. Estos polímeros incluyen alginato de
25 cinc, poli (ácido láctico), poli (alcohol vinílico), poli (anhídridos) y poli



(ácido glicólico). Las patentes describen también dispositivos recubiertos con membrana con permeación reducida a la droga y cámaras huecas que sujetan la formulación de droga.

Theeuwes, Patente de E.U. No. 4,217,898, describe depósitos microporosos que se utilizan para el suministro de droga controlado. Estos dispositivos se colocan extraocularmente en la cavidad ocular. Entre los sistemas poliméricos de interés se incluyen los copolímeros de poli(vinilcloruro)-co-poli(acetato de vinilo). Kaufman describe en las Patentes de E.U. Nos. 4,865,846 y 4,882,150 un sistema de suministro de droga oftálmico el cual contiene al menos un material bio-erosionable o portador de ungüento para la cavidad conjuntival. La patente describe sistemas poliméricos, tal como, poli(láctido), poli(glicólido), poli(alcohol vinílico) y colágeno degradado, como sistemas de suministro adecuados.

En el uso actualmente descrito del producto de proteína RDCVF1 o RDCVF2 para el tratamiento de enfermedades retinales o heridas también es ventajoso que una formulación oftálmica aplicada tópicamente incluya un agente para mejorar la penetración o transporte del agente terapéutico en el eje. Tales agentes son conocidos en la materia. Por ejemplo, Ke et al., Patente de E.U. No. 5,221,696 describe el uso de materiales para mejorar la penetración de las preparaciones oftálmicas a través de la cornea.

Los sistemas intraoculares son aquellos sistemas que son adecuados para su uso en cualquier compartimiento de tejidos dentro, entreo alrededor de las capas de tejido del ojo mismo. Estas posiciones



incluyen subconjuntival (bajo la membrana mucosa ocular adyacente al globo ocular), orbital (detrás del globo ocular), e intracamara (dentro de las cámaras del mismo globo ocular). En contraste con los sistemas extraoculares, se requiere de un procedimiento invasivo que consiste de
5 inyección o implante para acceder a estas regiones.

Las siguientes patentes describen dispositivos intraoculares.

Wong, Patente de E.U. No. 4,853,224, describe drogas microencapsuladas para la introducción del ojo en la cámara. Los polímeros que se utilizan en este sistema incluyen poliésteres y
10 poliéteres. Lee, Patente de E.U. No. 4,863,457, describe un dispositivo biodegradable el cual se implanta quirúrgicamente intraocularmente para la liberación sostenida de agentes terapéuticos. El dispositivo se encuentra diseñado para el implante quirúrgico bajo la conjuntiva (membrana mucosa del globo ocular). Krezancaki, Patente de E.U. No.
15 4,188,373, describe un vehículo farmacéutico el cual se gelifica a la temperatura corporal humana. Este vehículo es una suspensión acuosa de la droga y gomas o derivados sintéticos derivados de la celulosa. Halsam et al. describe en las Patentes de E.U. Nos. 4,474,751 y 4,474,752, un sistema de polímero-droga que es líquido a temperatura
20 ambiente y se gelifica a la temperatura corporal. Los polímeros adecuados utilizados en este sistema incluyen un propileno de polioxietileno y polioxi. Davis et al., describen en la Patente de E.U. No. 5,384,333 un polímero de suministro de droga inyectable biodegradable el cual proporciona liberación de droga a largo plazo. La composición
25 de droga se encuentra hecha de un agente farmacéuticamente activo en



una matriz de polímero biodegradable, donde la matriz de polímero es sólida a temperaturas en el rango de 20 grados a 37 grados C y es fluida a temperaturas en el rango de 38 grados a 52 grados C. El polímero de suministro de droga no se encuentra limitado al suministro de formulaciones de droga solubles o líquidas. Por ejemplo, el polímero puede utilizarse como una matriz para estabilizar y mantenerse en el sitio de microesferas con contenido de droga para inyección, liposomas u otras drogas de unión particulada.

Un vehículo particularmente adecuado para la inyección intraocular es agua destilada estéril en la cual se formula el producto de proteína RDCVF1 o RDCVF2 como una solución isotónica, estéril, preservada apropiadamente. Aún otra preparación oftálmica puede involucrar la formulación del producto de proteína RDCVF1 o RDCVF2 con un agente, tal como microesferas o liposomas inyectables, que se proporciona para la liberación lenta o sostenida de la proteína que puede suministrarse después como inyección de depósito. Otro medio adecuado para la introducción intraocular del producto de proteína RDCVF1 o RDCVF2 incluye, dispositivos de suministro de droga implantables o que contienen el producto de proteína RDCVF1 o RDCVF2.

Las preparaciones oftálmicas de la presente invención, particularmente las preparaciones tópicas, pueden incluir otros componentes, por ejemplo, conservadores oftálmicamente aceptables, agentes de tonicidad, cosolventes, agentes humectantes, agentes complejantes, agentes reguladores, antimicrobianos, antioxidantes, y



67
69

agentes tensioactivos, son bien conocidas en la materia. Por ejemplo, los agentes reforzadores adecuados de tonicidad incluyen haluros de metal alcali (preferentemente cloruro de sodio o de potasio), manitol, sorbitol y lo similar. El agente reforzador de tonicidad suficiente se

5 agrega ventajosamente de manera que la formulación a implantarse dentro del ojo sea hipotónica o substancialmente isotónica. Los conservadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, cloruro de benzalconio, timerosal, alcohol de fenetilo, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico y lo similar. El peróxido de

10 hidrógeno puede utilizarse también como conservador. Los cosolventes adecuados incluyen, pero no se limitan a, glicerina, propilenglicol y polietilenglicol. Los agentes complejantes adecuados incluyen cafeína, polivinilpirruidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina. Los agentes tensioactivos o agentes humectantes adecuados incluyen,

15 pero no se limitan a, ésteres de sorbitano, polisorbatos tales como polisorbato 80, tromoetamina, lecitina, colesterol, tiloxapol y lo similar. Los reguladores pueden ser reguladores convencionales tales como borato, citrato, fosfato, bicarbonato, o Tris-HCl.

Los componentes de formulación se encuentran presentes

20 en concentraciones que son aceptables al sitio extraocular o intraocular de administración. Por ejemplo, se utilizan reguladores para mantener la composición con un pH fisiológico o un pH ligeramente menor, típicamente dentro de un rango de pH desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 8. Los componentes de formulación adicionales

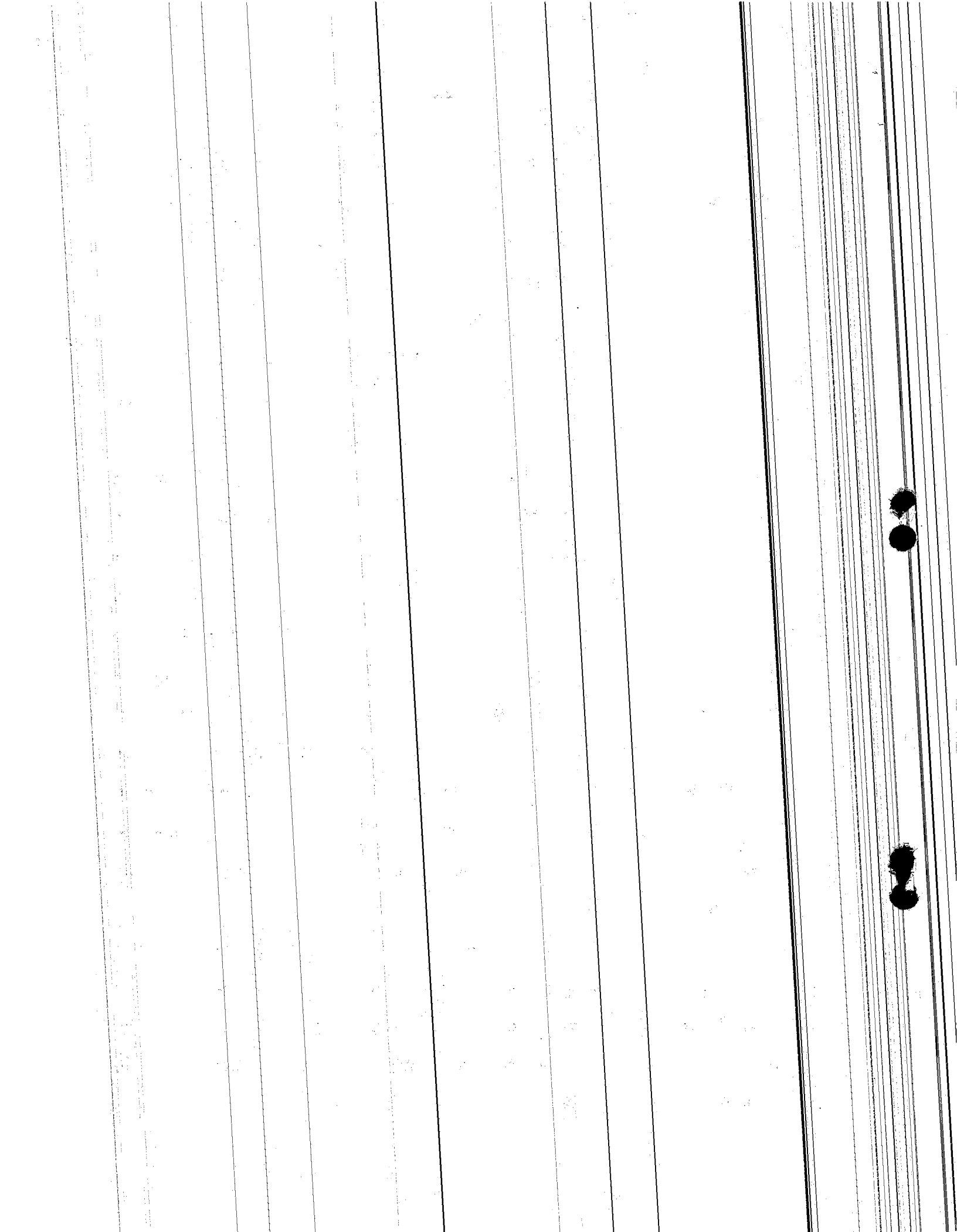
25 pueden incluir materiales los cuales se proporcionan para la residencia



en la materia. Los cultivos de margo plazo de las células de médula ósea pueden establecerse y mantenerse utilizando, por ejemplo, técnicas de cultivo celular de Dexter modificado (Dexter et al., 1977, J. Cell Physiol. 91:335) o técnicas de cultivo de Witlock-Witte (Witlock y
5 Witte, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:3608-3612).

En una modalidad específica, el ácido nucléico a introducirse para propósitos de terapia genética comprende un mejorador inducible enlazado operablemente a la región de codificación, de manera tal que la expresión del ácido nucléico sea controlable al
10 controlar la presencia o ausencia del inductor de transcripción apropiado.

En la presente se describen los métodos para la producción de anticuerpos capaces de reconocer específicamente uno o más epítopes de gen expresados diferencialmente. Tales anticuerpos
15 pueden incluir, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAbs), anticuerpos humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena individual, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id), y fragmentos de
20 unión de epítipo de cualquiera de los anteriores. Tales anticuerpos pueden utilizarse, por ejemplo, en la detección de un huella dactilar, objetivo, gen en una muestra biológica, o, alternativamente, como método para la inhibición de la actividad de gen objetivo anormal. Consecuentemente, tales anticuerpos pueden utilizarse como parte de
25 métodos de tratamiento de enfermedad, y/o pueden utilizarse como parte



de técnicas de diagnóstico mediante la cuales los pacientes pueden verificar si tienen niveles anormales de Rdcvf1 o Rdcvf2, o para la presencia de formas anormales de Rdcvf1 o Rdcvf2 muestreando el humor acuoso y/o vítreo por métodos familiares para aquellos expertos en la materia (por ejemplo, Forster, RK, Abbott, RL, Gelender, H. (1980) Management of infectious endophtalmitis Ophthalmology 87, 313-319)].

Para la producción de anticuerpos en un gen expresado diferencialmente, pueden inmunizarse diversos animales huésped por inyección con una proteína expresada diferencialmente, o una porción de la misma o por inmunización de ADN. Tales animales huésped pueden incluir pero no se limitan a, conejos, ratones y ratas, por nombrar solo unos cuantos. Pueden utilizarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de las especies huésped, incluyendo pero no limitándose a Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias activas de superficie tales como lisolecitina, polioles plurónicas, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa de Keyhole, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo Calmette-Guerin) y Corynebacterium parvum.

Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterógenas de moléculas de anticuerpo derivadas de los sueros de animales inmunizados con un antígeno, tal como producto genético objetivo, o un derivado funcional antigénico del mismo. Para la producción de anticuerpos policlonales. Los animales huésped tales como los



descritos anteriormente, pueden inmunizarse por inyección con producto genético expresado diferencialmente complementado con adyuvantes como los también descritos con anterioridad.

Los anticuerpos monoclonales, los cuales son poblaciones
5 homogéneas de anticuerpos a un antígeno particular, pueden obtenerse por cualquier técnica que se proporcione para la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen, pero no se limitan a, la técnica del hibridoma de Kohler y Milstein, (1975, Nature 256:495-497; y la Patente de E.U. No.
10 4,376,110), la técnica de hibridoma de células B humana (Kosbor et al., 1983, Immunology Today 4:72; Cole et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030), y la técnica de hibridom EBV (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss. Inc., págs. 77-96). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de
15 inmunoglobulina que incluya IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de los mismos. El hibridoma que produce el mAB de esta invención puede cultivarse in vitro o in vivo. La producción de valoraciones elevadas de mAbs in vivo hace de este el método actualmente preferido de producción.

20 Además, pueden utilizarse las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricas" (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851-6855; Neuberger et al., 1984, Nature, 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature, 314:452-454) segmentando los genes derivados de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de
25 antígeno apropiada junto con los genes derivados de una molécula de



anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la cual se derivan diferentes porciones de diferentes especies animales, tal como aquellas que tienen una región variable o hipervariable derivada de un mAb murina y una región constante de inmunoglobulina humana.

Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena individual (Patente de E.U. No. 4,946,778; Bird, 1988, Science 242:423-426; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883; y Ward et al., 1989, Nature, 334:544-546) pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena individual de gen expresado diferencialmente. Los anticuerpos de cadena individual se forman enlazando los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv a través de un puente de aminoácidos, dando como resultado un polipéptido de cadena individual.

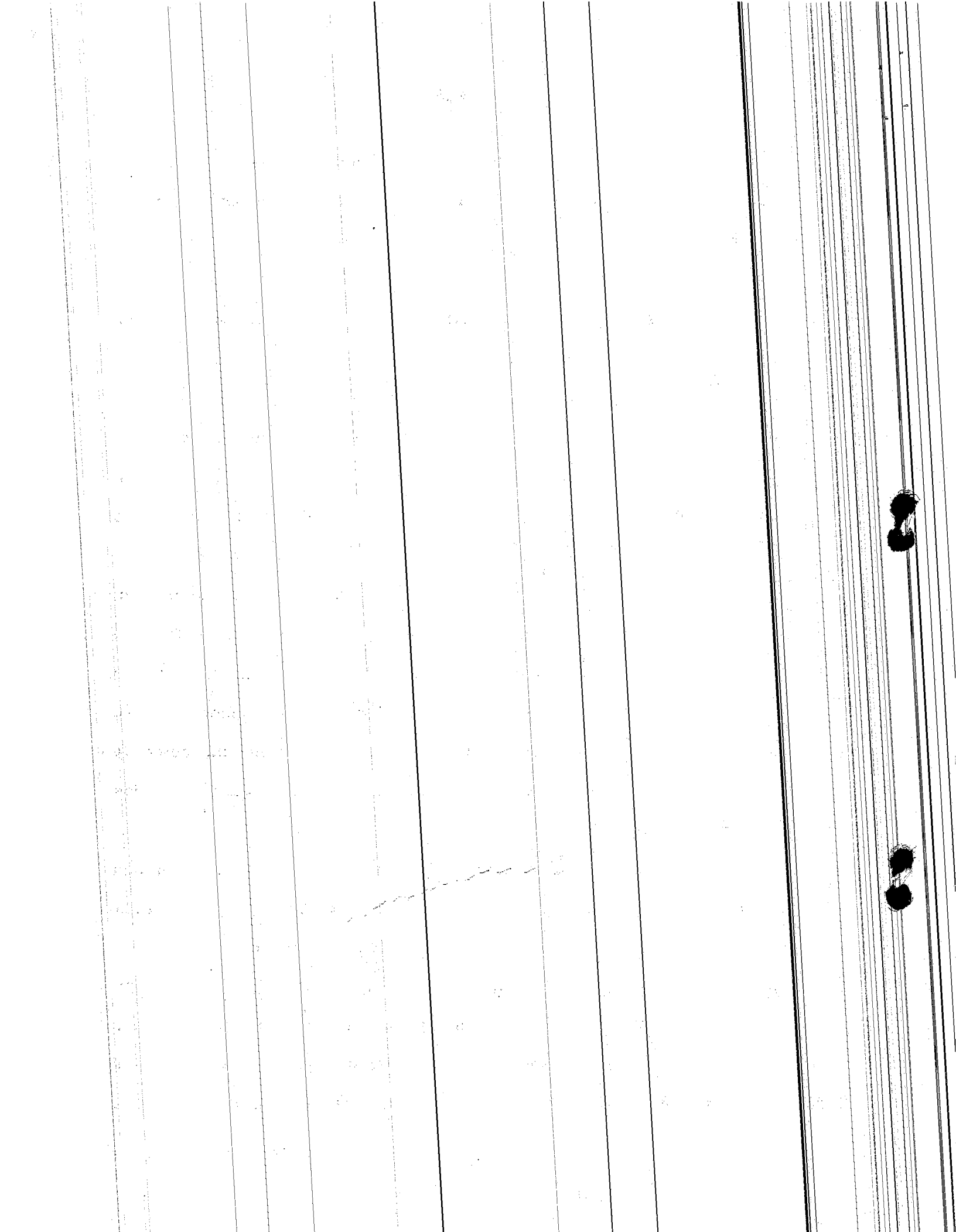
Muy preferentemente, las técnicas útiles para la producción de "anticuerpos humanizados" puede adaptarse para producir anticuerpos a los polipéptidos, fragmentos, derivados, y equivalentes funcionales descritos en la presente. Tales técnicas se describen en las Patentes de E.U. Nos. 5,932,448; 5,693,762; 5,693,761; 5,585,089; 5,530,101; 5,910,771; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,545,580; 5,661,016; y 5,770,429, descripciones de las cuales se incorporan todas para referencia en la presente en sus totalidades.

Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítopes específicos pueden generarse por técnicas conocidas. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen pero no se limitan a: los fragmentos F(ab')₂

ocular prolongada del agente terapéutico administrado extraocularmente a fin de maximizar el contacto tópico y mejorar la absorción. Los materiales adecuados incluyen los polímeros o materiales de formación de gel los cuales se proporcionan para una viscosidad creciente de la
5 preparación oftálmica. El quitosano es un material particularmente adecuado como un agente de control de velocidad de liberación ocular en formulaciones de droga oftálmica líquida de liberación sostenida (ver Patente de E.U. No. 5,422,116, Yen , et al.). La conveniencia de las formulaciones de la presente invención para liberación controlada (por
10 ejemplo, suministro sostenido y prolongado) de un agente de tratamiento oftálmico en el ojo puede determinarse por diversos procedimientos conocidos en la materia, por ejemplo, como se describe en Journal of Controlled Release, 6:367-373, 1987, así como también variaciones de los mismos.

15 Además de los ingredientes activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener portadores farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y auxiliares los cuales facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden utilizarse farmacéuticamente. Los detalles
20 adicionales sobre técnicas para la formulación y administración pueden encontrarse en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, Pa.).

Las composiciones farmacéuticas para la administración oral pueden formularse utilizando portadores farmacéuticamente aceptables
25 bien conocidas en la materia en dosis adecuadas para la administración



oral. Tales portadores le permiten a las composiciones farmacéuticas para formularse como tabletas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas aguadas, suspensiones, y lo similar, para la ingestión por el paciente.

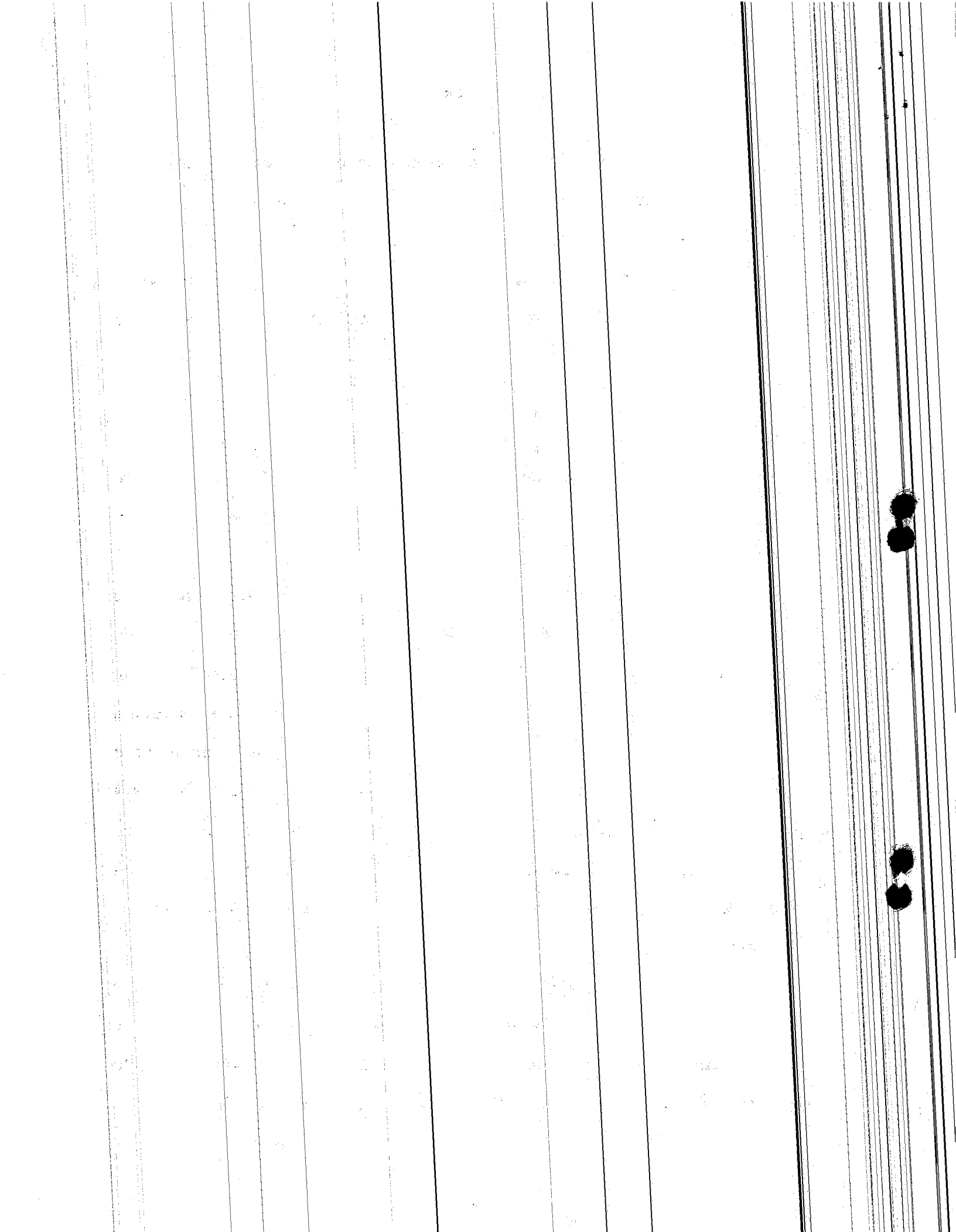
- 5 Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse a través de la combinación de compuestos activos con excipiente sólido, opcionalmente moliendo una mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, agregando después los auxiliares adecuados, si se desea, para obtener tabletas o núcleos de grageas.
- 10 Los excipientes adecuados son materiales de relleno de carbohidrato o proteína, tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, papa, u otros vegetales; celulosa, tal como celulosa de metilo, hidroxipropilmetilcelulosa, o carboximetilcelulosa de sodio; gomas que incluyen arábica y tragacanto;
- 15 y proteínas tales como gelatina y colágeno. Si se desea, pueden agregarse los agentes desintegrantes o solubilizantes, tal como la pirrolidona de polivinilo degradado, ágar, ácido algínico, o una sal de los mismos, tal como alginato de sodio.

- Los núcleos de gragea pueden utilizarse en conjunto con
- 20 recubrimientos adecuados, tales como soluciones de azúcar concentrado, las cuales pueden contener también goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de Carbopol, polietilenglicol, y/o dióxido de titanio, soluciones de laca, y solventes orgánicos adecuados o mezclas de solvente. Pueden agregarse materias colorantes o pigmentos a las
- 25 tabletas o recubrimientos de gragea para la identificación de producto o

para caracterizar la cantidad de compuesto activo, es decir, la dosis.

Las preparaciones farmacéuticas que pueden utilizarse oralmente incluyen cápsulas de ajuste suave hechas de gelatina, así como también cápsulas suaves, selladas, hechas de gelatina y un recubrimiento, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste suave pueden contener ingredientes activos mezclados con un material de relleno o aglutinantes, tales como lactosa o almidones, lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio, y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas suaves, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, líquidos, o polietilenglicol líquido con o sin estabilizadores.

Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en reguladores fisiológicamente compatibles tales como la solución de Hank, solución de Ringer, o salmuera regulada fisiológicamente. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias las cuales aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como celulosa de carboximetilo de sodio, sorbitol, o dextrano. Además, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como suspensiones aceitosas de inyección. Los solventes lipofílicos o vehículos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácido graso sintético, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Los amino polímeros policatiónicos no lípidos pueden utilizarse también para suministro. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizadores adecuados o



agentes los cuales aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Para la administración tópica o nasal, los penetrantes apropiados a la barrera particular a permearse se utilizan en la formulación. Tales penetrantes son conocidos generalmente en la materia.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden elaborarse de manera conocida en la materia, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, elaboración de grageas, levigación, emulsificación, encapsulación, entrapamiento, o liofilización.

La composición farmacéutica puede proporcionarse como una sal y puede formarse con muchos ácidos, que incluyen pero no se limitan a, hidrocórico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en solventes acuosos u otros solventes protónicos que las formas base libre correspondientes. En otros casos, la preparación preferida puede ser un polvo liofilizado el cual puede contener cualquiera o todos de los siguientes: 1-50 mM de histidina, 0.1%-2% de sacarosa, y 2-7% de manitol, con un rango de pH de 4.5 a 5.5, que se combina con regulador antes de su uso.

Después de que se han preparado las composiciones farmacéuticas, pueden colocarse en un recipiente apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una condición indicada. Para la administración de Rdcvf1 o Rdcvf2, tal etiquetación incluiría cantidad,

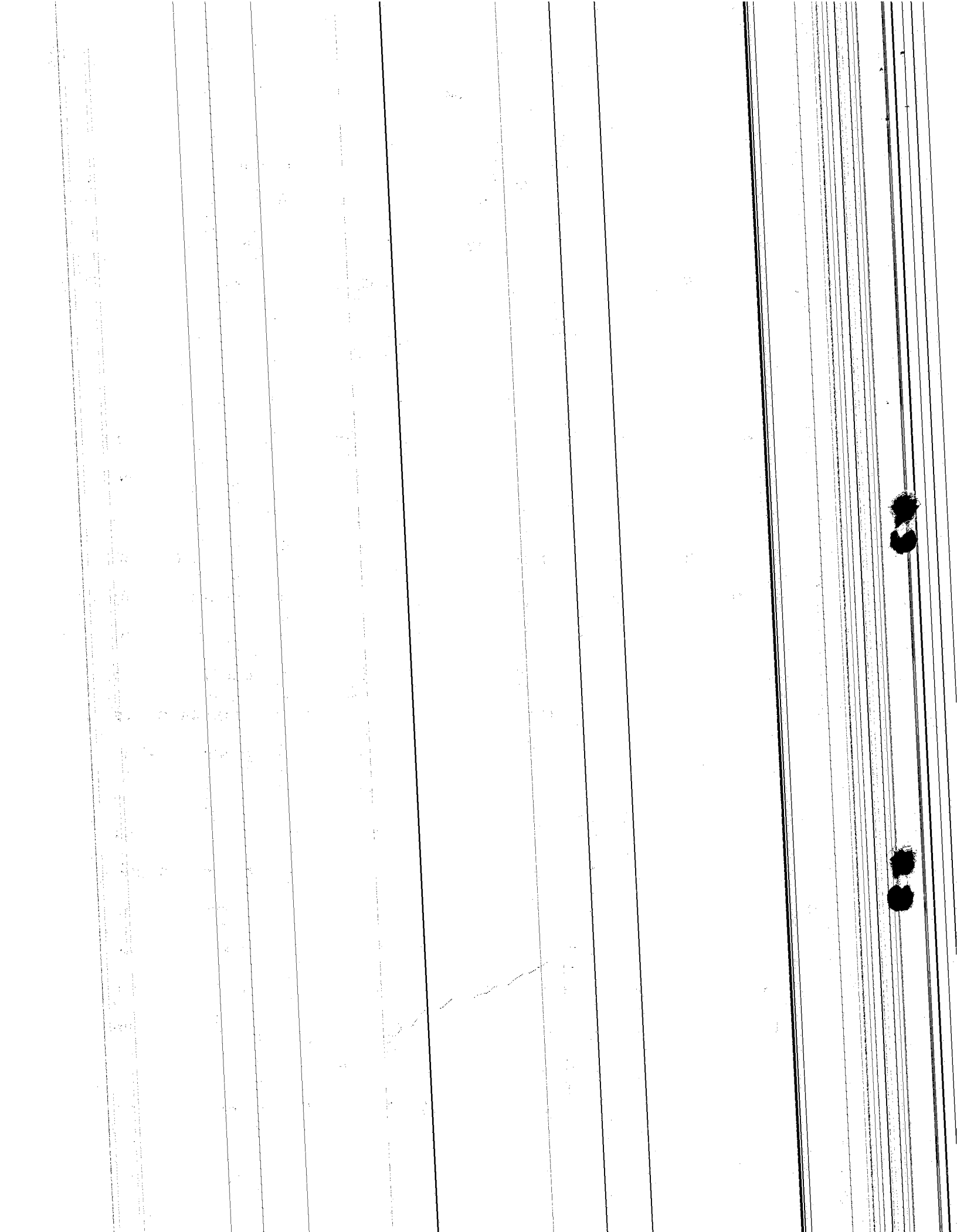


frecuencia, y método de administración.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en la invención incluyen composiciones donde los ingredientes activos se encuentran contenidas en una cantidad eficaz para alcanzar el propósito pretendido. La determinación de una dosis eficaz se encuentra dentro de la capacidad de aquellos expertos en la materia.

Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz puede calcularse inicialmente en pruebas de cultivo celular, por ejemplo, de células neoplásticas, o en modelos animales, generalmente ratones, conejos, perros, o cerdos. También puede utilizarse el modelo animal para determinar el rango concentrado apropiado y la ruta de administración. Tal información puede utilizarse entonces para determinar dosis y rutas para administración útiles en seres humanos.

Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de ingrediente activo, por ejemplo Rdcvf1 o Rdcvf2 o fragmentos de los mismos, anticuerpos para Rdcvf1, agonistas, la cual mejora los síntomas o condición. La eficacia y toxicidad terapéutica pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en 50% de la población) y LD50 (la dosis letal a 50% de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxico y terapéutico es el índice terapéutico, y puede expresarse como la proporción, LD50/ED50. Se prefieren las composiciones farmacéuticas que exhiben grandes índices terapéuticos. Los datos obtenidos de las pruebas de cultivo celular y estudios animales se utilizan para formular un rango de

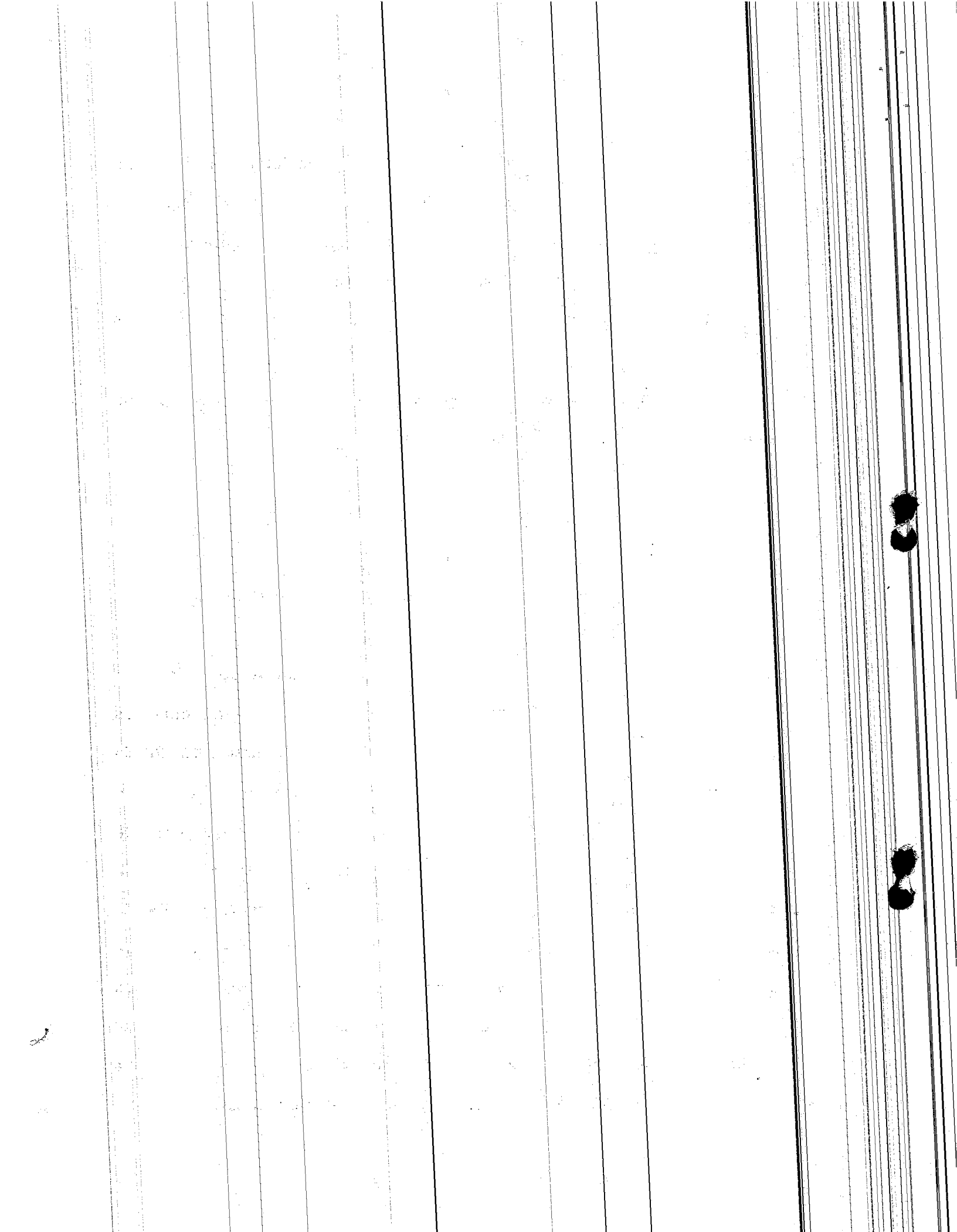


73
73

dosis para uso humano. La dosis contenida en tales composiciones se encuentra preferentemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen el ED50 con poca o sin toxicidad. La dosis varía dentro de este rango dependiendo de la forma de dosis empleada, 5 sensibilidad del paciente, y la ruta de administración.

La dosis exacta se determinará por el practicante, a la luz de factores relacionados con el paciente que requiera el tratamiento. La dosis y administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes de la mitad activa o para mantener el efecto deseado. Los factores que 10 pueden tomarse en cuenta incluyen la severidad del estado de enfermedad, salud general del paciente, edad, peso, y género del paciente, dieta, fecha y frecuencia de administración, combinación(es) de droga, sensibilidades de reacción, y terapia/respuesta a la terapia. Las composiciones farmacéuticas de larga actuación pueden 15 administrarse cada 3 a 4 días, cada semana, o una vez cada dos semanas dependiendo de la vida media y tasa de despeje de la formulación particular.

Las cantidades de dosis normal pueden variar desde 0.1 hasta 100,000 microgramos, hasta una dosis total de aproximadamente 20 1 g, dependiendo de la ruta de administración. Las instrucciones referentes a las dosis particulares y métodos de suministro se proporcionan en la literatura y generalmente se encuentran disponibles para los practicantes en la materia. Aquellos expertos en la materia emplearán diferentes formulaciones para los nucleótidos que para las 25 proteínas o sus inhibidores. De manera similar, el suministro de



74
74

polinucleótidos o polipéptidos será específico a células, condiciones, posiciones particulares, etc. Se describen las formulaciones farmacéuticas adecuadas para administración oral de proteína, por ejemplo, en las Patentes 5,008,114; 5,505,962; 5,641,515; 5,681,811; 5,700,486; 5,766,633; 5,792,451; 5,853,748; 5,972,387; 5,976,569; y 6,051,561.

Los siguientes Ejemplos ilustran la presente invención, sin limitar de manera alguna el alcance de la misma.

10

EJEMPLOS

1. Clonación de expresión:

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

La biblioteca de cADN se construyó a partir de retinas de ratones C57BL/6@N de cinco semanas de edad generalmente de acuerdo con el método de Glissin et al (1974), Biochemistry, 13, 2633-2637. Brevemente, después de matar a los animales, éstos se enuclearon y los ojos se colocaron primero en Salmuera Reguladora de Fosfato (PBS) complementada con PiroCarbonato de DiEtilo (DEPC) al 0.1%. La retina neural se disecó rápidamente (se omitió el epitelio pigmentado retinal en la preparación de este tejido). Rápidamente después de cada disección, los tejidos se homogenizaron en 6M de Cloruro de Guanidio fresco. Se depositaron diez retinas en 2.4 ml de GC en tubos estériles de 4ml, y el tejido se interrumpió completamente por homogenización fuerte durante 1 minuto a tempera ambiente.

75
73

Purificación de ARN mensajero (mARN) de retina de ratón normal de cinco semanas:

Se aisló el mARN en cuentas porosas recubiertas de oligo-
5 dT (Oligotex, Qiagen) bajo condiciones de severidad de acuerdo con el
método de Kuribayashi et al., (1988). Nucleic Acid. Res. Symposium
series, 19, 61-64. Brevemente, se mezclaron 100-150 µg de ARN de
retina de ratón total con 15 µl de cuentas oligo-dT en Regulador de
Unión [10 mM de Tris con pH de 7.5; 0.3 M de NaCl; 0.1 M de EDTA;
10 0.5% de Sulfato de Duodecilo de Sodio (SDS) al 0.5% p/v] y se incubó 6
minutos a 65°C en 0.5 l de becher de agua, se enfrió progresivamente a
temperatura ambiente durante aproximadamente 3-4 horas, se centrifugó
después a temperatura ambiente para recuperar las cuentas de agarosa.
Después se enjuagaron dos veces incubando 10 minutos en 0.4 ml de
15 (0.1 M de Tris con un pH de 7.5; 0.1 M de NaCl; 1 mM de EDTA; SDS al
0.5% en p/v). Se eludió ARN unido (mARN) en dos etapas con 50 µl de
agua libre de RNAasa calentada a 70°C, se precipitó con 10 µl de
Acetato de Sodio con un pH de 5.2 y 0.25 ml de etanol y se incubó 12
horas a -70°C. Se recogió mARN por centrifugación (1 hora a 15,000
20 rpm, seguido de dos enjuagues con etanol al 70%) y se volvió a
suspender en 20 µl de agua libre de RNAasa. La concentración de mARN
se midió a 260 rpm y se verificó la ausencia de combinaciones de rARN
por electrofóresis de gel bajo condición desnaturizante como se
menciona con anterioridad.



7E
76

Síntesis de cADN:

se llevó a cabo de acuerdo con el método de Okayama y Berg. (1982), Mol. Cell. Biol.. 2, 161-170. Se imprimió la primera síntesis de cepa con 2.5 µg de oligonucleótido de adaptador NotI (5'TGTTACCAATCTGAAGTGGGAGCGGCCGACAA(T)₁₈ 3') y se incubó durante 2 horas con 50 unidades de transcriptasa inversa de virus de Leucemia Murina de Moloney (M-MLV) (Superscript, II, Life Technology) bajo las condiciones recomendadas por el proveedor. Para la segunda síntesis de cepa, se inicio la reacción 4 horas a 14°C con 4 unidades de RNAsaH y 100 unidades de polimerasa I de ADN en Regulador SS [40 mM de Tris con un pH de 7.2; 85 mM de Cloruro de Potasio; 4.4 mM de Cloruro de Magnesio; 3 mM de DTT; 5 µg/ml de Albúmina de Suero Bovino (BSA)] en un volumen final de 0.25 ml. Los adaptadores EcoRI (5'-OHAATCGGCACGAGG 3'-OH/3'-OH GCCGTGCTCC5'-PO₄) se ligaron a ambos extremos del cADN de doble cepa en 14 horas a 16°C utilizando 40 unidades de ligasa de ADN T4 (Promeg, Madison, EUA) en un volumen total de 20 µl bajo las condiciones recomendadas por el proveedor. Los productos de esta reacción son dscDNA que tienen medio sitio de EcoRI en 5' y medio sitio de NotI en 3' que puede orientarse en el vector de clonación.

Ligación de dscDNA en pcDNA3:

se llevó a cabo de acuerdo con Maniatis T. (1992), Molecular cloning: a laboratory manual, 2ª ed., utilizando 10 µg de plásmido de pcDNA3 (Invitrogen) preparado al cortar con EcoRI y NotI

(Promega, Madison, EUA) bajo las condiciones especificadas por el proveedor.

Propagación de clones recombinantes:

- 5 se llevó a cabo generalmente de acuerdo con el método de Bimboim et al. (1979), Nucleic Acids Res., 7, 1513-1523. Brevemente, con objeto de hacer depósitos de 100 clones primarios, modificamos ligeramente el protocolo de transformación XL1 Gold (Stratagene) (proporcionado por Stratagene) como se explica a continuación.
- 10 Después de la incubación en el medio de crecimiento, la reacción e transformación aportó glicerol al 20% (vol./vol.) y albúmina de suero de caballo (HAS, Life Technologies) al 8% (vol./vol.). La HAS y el glicerol evitan la muerte seguida de descongelamiento. Se realizó una titulación al colocar en placas de agar (100 µg/ml de ampicilina) un volumen
- 15 creciente de cada reacción de transformación para calcular el volumen entregando 100 colonias, mientras que la reacción de transformación masiva se almacenó a -80°C. Los plásmidos recombinantes derivados de la biblioteca se purificaron por 96 a la vez. Con objeto de preparar 96 depósitos de 100 clones, el volumen calculado correspondiente a 100
- 20 clones se colocó en agar y creció 20 horas a 37°C. El ADN se purificó directamente a partir de colonias despojadas de las placas de agar. Se almacenó un inventario de cada cultivo con glicerol al 23% a -80°C. El ADN se purifico utilizando Qiaell ultra (Qiage) usando un protocolo recomendado por el proveedor. Típicamente, se obtuvieron 10 µg de
- 25 plásmido purificado, la concentración de cada preparación se midió

utilizando densidad óptica a 260 nm. Para sub-dividir los depósitos seleccionados en 100 depósitos de 10, 50 µl de una dilución de 1/250,000 del inventario de glicerol del depósito original se colocó en placas de agar a 100 µg/ml de ampicilina. Después de 16 horas de crecimiento a 37°C, se replicaron 160 colonias individuales en 16 placas de agar (10 por placa) y se dejaron crecer durante 16 horas a 37°C. Se cosecharon las 10 colonias de cada placa y se dejaron crecer en un medio líquido [Luria Broth (LB), 100 µg/ml de ampicilina] durante 3 horas a 37°C. Se almacenó un inventario de estos cultivos con glicerol al 30% a -80°C. Se preparó el ADN plásmido como se explicó con anterioridad. Para dividir los sub-depósitos de 10 en clones individuales, se colocaron 50 µl de una dilución de 1/250,000 del inventario de glicerol de los sub-depósitos de 10 en placas de agar con 100 µg/ml de ampicilina. Después de 16 horas de crecimiento a 37°C, se recogieron 16 colonias individuales y se dejaron crecer 16 horas en 2 ml de LB 100 µg/ml de ampicilina. Se almacenó un inventario de estos cultivos con glicerol al 30% a -80°C. Se preparó el ADN plásmido como se explicó con anterioridad.

20

Transfección transitoria en células Cos-1:

Se llevó a cabo utilizando el método de Chen y Okayama , (1987). Transformación de alto rendimiento de las células mamíferas por ADN plásmido (Mol. Cell. Biol., 7, 2745-2572).

25

Cultivos retinales de embrión de polluelo:



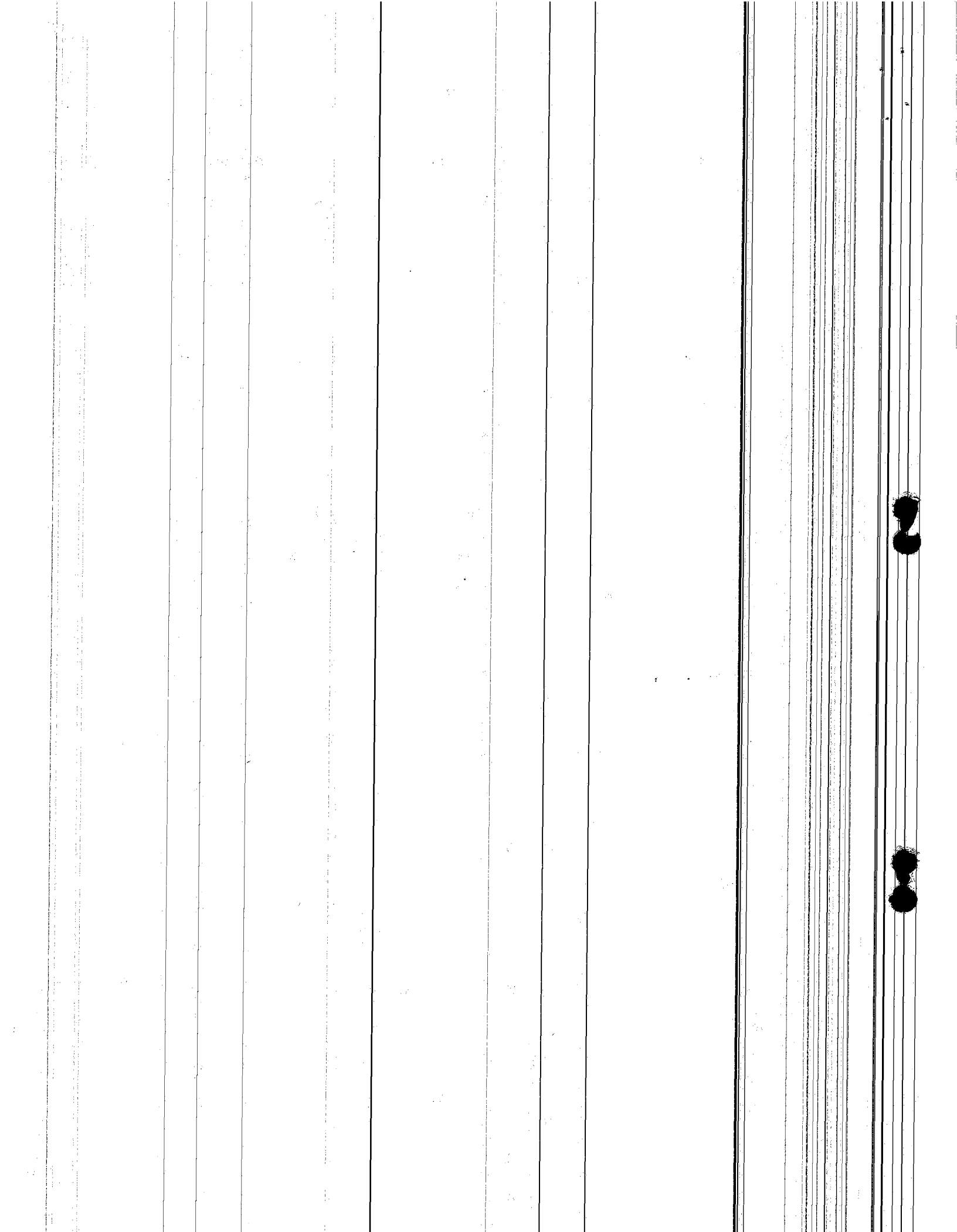
99

El protocolo se adaptó por Adler y Hatlee [(1989) Science, 243, 391]. La retina embrionica de polluelo (6 días *in ovo*) se disocia y coloca en placas en cultivo de monocapa. Bajo estas condiciones de cultivo con la ausencia de señales de diferenciación, los conos representan 60-80% de las células. Hemos producido anticuerpos policlonales en conejo contra visinina (un marcador de cono de pollo, número de acceso de Genbank M84729) y se verifica que la proporción de conos en nuestro cultivos es de 60-80%. El ambiente sencillo de nuestro modelo (medio definido químicamente, ausencia de contactos célula a célula) además de la facilidad y velocidad del método lo hacen un sistema muy apropiado para estudiar factores tróficos implicados en la supervivencia de cono. Brevemente, las retinas provenientes de embriones surgidas de un control aislado de progenitoras, se disecan después de seis días de desarrollo en células *in ovo*, se disocian la células y se colocan en placas a baja densidad (10^5 células/cm²). Durante diez días se siguió la viabilidad celular (60-80% de conos) utilizando la prueba VIVO/MUERTO (Molecular probes, Eugene, EUA), una prueba que cuantifica las células vivas y muertas. El número de células vivas disminuye hasta 8% del número de células iniciales después de siete días en cultivo en un medio definido químicamente. Cuando se realiza en presencia de medios condicionados a partir de células COS1 transfectadas con depósitos de clones provenientes de la biblioteca, las células vivas se contabilizan después de siete días *in vitro*.

Los progenitores de pollo (cepa 657 etiqueta roja) se



mantuvieron en un compartimiento separado para el propósito de este experimento en instalaciones de incubación a 25 km del laboratorio. Los huevos fertilizados obtenidos de manera natural se recogieron semanalmente, y se mantuvieron a 17°C (su cero biológico) en el laboratorio después de la incubación. Diariamente, se incuban 5 huevos durante 24 horas a 20°C, después 136 horas a 37°C con inversión intermitente de la inclinación de los huevos en una cámara humidificada. El día del cultivo, la superficie de los huevos se enjuaga con Mucocit-A, después se quiebra, los embriones de pollo se transfieren en PBS. Se verifica que la etapa de desarrollo de cada embrión sea la 29ª por comparación visual con Hamburger y Hamilton (1951), en (Essential Development Biology, Stern y Holland Ed.). Se seleccionaron y enuclearon dos de los embriones, se transfirieron los ojos en un medio independiente CO₂ (Life Technologies). Las retinas se disecaron y transfirieron en un regulador de Ringer y se enjuagaron dos veces. Las retinas se cortan en pequeñas piezas y se trataron 20 minutos a 37°C con una solución de tripsina (0.25 % p/v). La reacción se detuvo por la adición de medio de cultivo (M199, Life Technologies) complementada con FCS inactivada al 10%. La suspensión celular se trató durante uno minutos en 25 µl de DNAasa I (1 mg/ml, Sigma). La suspensión celular se enjuagó después dos veces en el Medio de Cultivo Definido Químicamente [CDCM, volúmenes iguales de medios DMEM y M199 (Life Technologies) y AB con Complementos (5 µg/ml de Insulina; 5 µg/ml de Transferring; 64 nM de Progesterona; 0.1 mM de Putrescina; 5 ng/ml de Selenio; 3 mM de Taurina; 2.7 µM de 5'-difisfoetanolamina de citidina;



5.2 μM de 5'-difosfocolina de citidina; 0.2 $\mu\text{g/ml}$ de hidrocortisona; 30 nM de 3,3'-5-triiodo-L-tronina; 1 mM de Piruvato de Sodio), 0.3 μM de Prostaglandina D₂; 0.1 mg/ml de ácido linoléico] con objeto de eliminar la FCS. La concentración de células teñidas con tripano azul se mide con células Mallassez y se aportan dos concentraciones (5.6 y $1.12 \cdot 10^5$ células/ml) correspondientes a las dos densidades de colocación de placas (2 y $4 \cdot 10^5$ células/cm²).

Los medios condicionados derivados de las células transfectadas Cos-1 se descongelan en hielo y 50 μl transferidos a dos placas negras de 96 cavidades tratadas con cultivo de tejido (Corning Costar) que han recubierto una solución de 100 $\mu\text{g/ml}$ de Poli-L-lisina (Sigma) de acuerdo con el plan:

Primera ronda de la filtración:

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

Donde los números se refieren al número de depósitos de



100 clones, C a medios condicionados de células Cos-1 transfectadas con el vector vacío (pcDNA3) y P un control positivo (medios condicionados transfectados con pcDNA-ratónGNF.

5

Segunda y tercera ronda de la filtración:

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

Donde x(segunda ronda) y y (tercera ronda) representan el nº de depósitos seleccionados en la primera y segunda ronda respectivamente. .01 a 16 representan los sub-depósitos utilizados. x(y) representa el depósito padre del que se derivaron 16 depósitos. C es como es en la primera ronda. P se modificó como pCMVScript-CNTF en la segunda ronda y progresivamente a pcDNA-939.09.08 en la tercera ronda. 0 representa las células de cono de pollo en medios CDCM solamente. C57 y C3H, medios condicionados de tejidos extirpados de retinas preparadas como se describe en (medios condicionados preparados a partir de tejidos extirpados de retinas de ratón) de retinas.



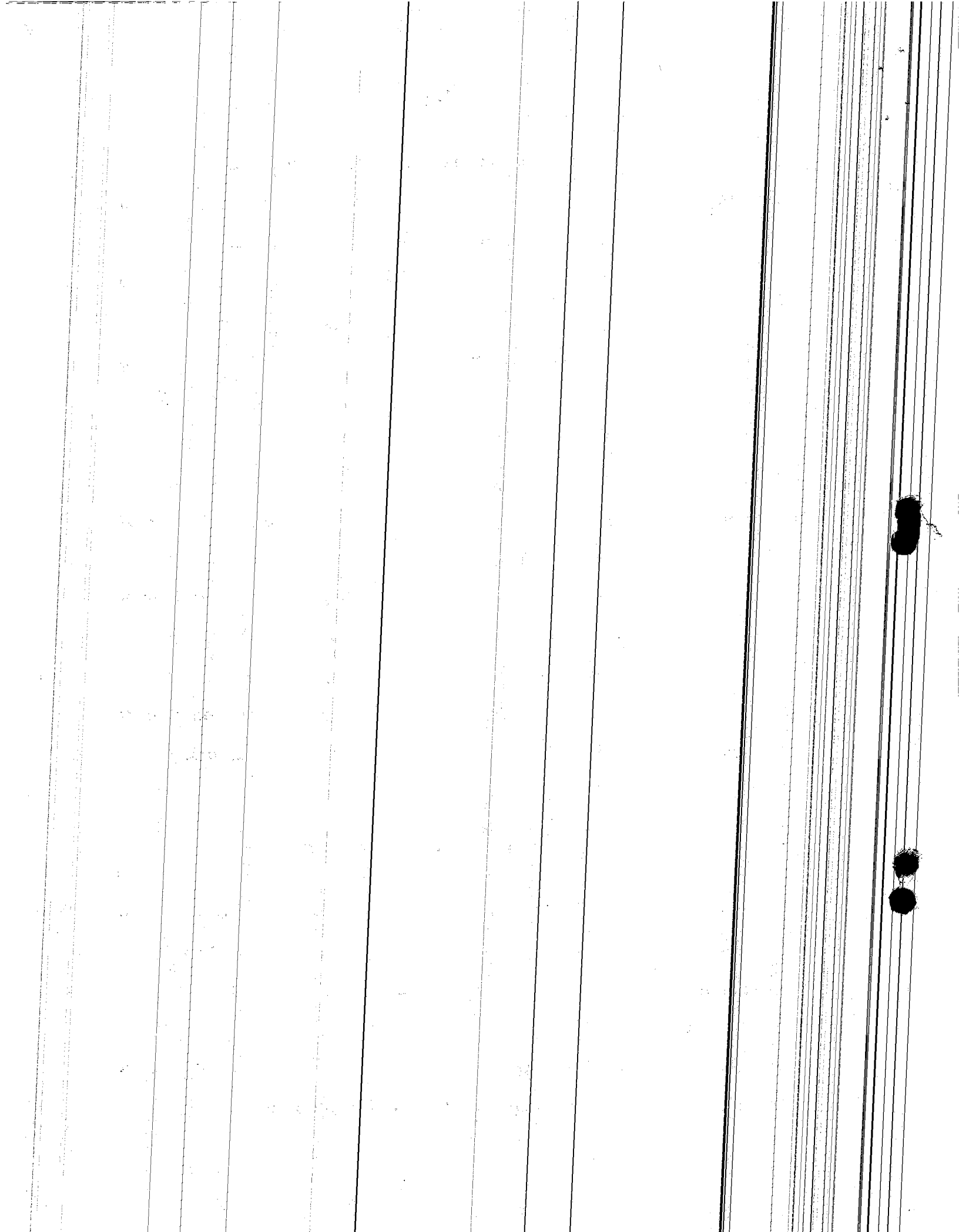
de ratón C57BL/6@N y C3H/He@N de 5 semanas de edad respectivamente.

Se agregaron 50 μ l de suspensiones celulares correspondientes a dos densidades (2 y 4×10^5 células/cm²) a la cavidad de los medios condicionados con las dos placas de 96 cavidades rellenas con una pipeta motorizada de 8 canales (Biohit) con objeto de minimizar los errores experimentales. Las células se incubaron durante 7 días a 37°C en CO₂ al 5%.

10 **Preparar medios condicionados a partir de tejidos extirpados de retinas de ratón:**

La segunda y tercera rondas de filtración incluyeron controles positivos adaptados de Mohand-Saïd et al. (1998). Se sacrificaron y enuclearon ratones 5C57BL/6@N (tipo silvestre) y C3H/He@N (*rd1*) de cinco semanas de edad. Se disecaron dos retinas y se incubaron 24 horas a 37°C en CO₂ al 5% en 1.5 ml de CDCM en placas de 12 cavidades. Los medios condicionados se recuperaron y concentraron por un factor de 40 por ultra-filtración en Vivaspina (Sartorius, punto de corte en 10 kDa). Los medios condicionados se frizaron en nitrógeno líquido y se almacenaron en alícuotas a -20°C antes de utilizarse. El día de uso, los medios condicionados se descongelaron en hielo, se diluyeron 10 veces en CDCM y se esterilizaron en un filtro de 0.22 μ m (Acrodisk 13, Gelman Sciences).

25 **Prueba funcional, prueba Vivo/Muerto:**



La prueba funcional se basa en el número de células
retinales de pollo vivas después de 7 días de incubación *in vitro*.
Utilizamos un juego de pruebas Vivo/Muerto (Molecular probes, Eugene,
EUA) que se basa en el uso de dos tintas fluorogénicas (Calcein AM y
5 dímero Etidio) que tiñen las células vivas y muertas respectivamente.
Una célula que está viva procesa una actividad metabólica (aquí una
actividad de esterasa) que cubre el substrato (Calceína AM) en su
producto fluorescente emitido a 520 nm. La permeabilidad de
membrana de una célula muerta se altera y permite que el tñido de
10 ADN del núcleo por el dímero Etidio se emita a 635 nm. Una célula está
viva: emitiendo a 520 nm después de la excitación a 485 nm, o muerta:
emitiendo a 635 nm después de una excitación a 520 nm. Utilizando
microscopía de epifluorescencia, pueden visualizarse los dos tipos de
células fluorescentes separadamente. Después de 7 días se incubaron
15 las células *in vitro* durante 30 minutos a temperatura ambiente en la
oscuridad con 2.7 μ M de Calceína-AM y 0,3 mM de dímero Etidio.

Adquisición de imagen:

Brevemente, la adquisición de imagen consiste de
20 autoenfocar cada cavidad, contar automáticamente las células en las
dos fluorescencias seguido del procesamiento de los datos en bruto
utilizando un software especialista, or ejemplo, Metamorph (Universal
Imaging Corporation, West Chester, EUA) para obtener imágenes
digitalizadas de cada cavidad de la placa. Utilizamos un microscopio
25 invertido (Nikon TE 200) equipado con una lámpara epifluorescente de

