

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 900 486**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.12.2016 PCT/IB2016/057266**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.06.2017 WO17093934**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2016 E 16809181 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.09.2021 EP 3384033**

54 Título: **SynP160, un promotor para la expresión específica de genes en los fotorreceptores de los bastones**

30 Prioridad:

03.12.2015 EP 15197900

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

17.03.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 900 486 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

SynP160, un promotor para la expresión específica de genes en los fotorreceptores de los bastones

5 Campo de la invención

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

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

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

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

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

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

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

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

60 Tal secuencia aborda la necesidad que hay en la técnica de promotores específicos para células retinianas con el fin de desarrollar sistemas para el estudio de trastornos neurodegenerativos, restauración de la visión, descubrimiento de fármacos, terapias tumorales y diagnóstico de trastornos.

COMPENDIO DE LA INVENCION

65 Los inventores de la presente han combinado epigenética, bioinformática y neurociencia para encontrar promotores que, cuando se encuentran en el ojo, impulsan la expresión de genes únicamente en los fotorreceptores de los bastones.

La secuencia de ácido nucleico de la secuencia de la invención es:

GGTTGGTGGTTTGCACCTGCTGTGGTACAGAAGGGGAGAGAAAGGGCTGGCAGGATGG
 AGCCAGGTGGGTATGGAGGGTGAAGAAATGAGAGAAGGGGTTGGCTGAGGTGGGAATCA
 GGACACAAAGGGAAGCCAAAGGTGCTCAGCAAACACTTGGGTTGTCCAATGTTAGCCAA
 GCTTCTAGGACCTGACTCAACGAGCTTCTACCCTGTAATGTTCTCATGGACCGTTTCTC
 CAGAAGGCTTTGGGCAACCAGAAAACCAGATGGCTGGTACGGCTCTCTTCTTCTCTGA
 GGCAGGGGGATTTTGTAGAGGATTCTGCTGACTGAGAAGTGGTTCCTCACTTCAGAAA
 (SEQ ID NO:1).

5

La presente invención proporciona, por lo tanto, una molécula de ácido nucleico aislado que comprende, o está constituida por, la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de ácido nucleico de al menos 300 pb que tiene al menos un 80 % de identidad respecto a dicha secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1, donde dicha molécula de ácido nucleico aislado da lugar específicamente a la expresión en los fotorreceptores de los bastones de un gen ligado operablemente a dicha secuencia de ácido nucleico que codifica dicho gen. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico es de al menos 300 pb, y tiene al menos un 85 % de identidad respecto a dicha secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico es de al menos 300 pb, y tiene al menos un 90 % de identidad respecto a dicha secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico es de al menos 300 pb, y tiene al menos un 95 % de identidad respecto a dicha secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico es de al menos 300 pb, y tiene al menos un 96 % de identidad respecto a dicha secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico es de al menos 300 pb, y tiene al menos un 97 % de identidad respecto a dicha secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico es de al menos 300 pb, y tiene al menos un 98 % de identidad respecto a dicha secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico es de al menos 300 pb, y tiene al menos un 99 % de identidad respecto a dicha secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico es de al menos 300 pb, y tiene un 100 % de identidad respecto a dicha secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1.

10

15

20

25

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

30

También se proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que se hibrida en condiciones rigurosas con una molécula de ácido nucleico aislado de la invención tal como se ha descrito anteriormente.

35

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

40

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

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

45

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

50

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

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

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

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

5

Figura 1: Imágenes de microscopio confocal con barrido láser de la expresión de EGFP a partir del promotor con la SEQ ID NO: 1, 3 semanas después de la inyección subretiniana de AAV-synP160-ChR2-EGFP en ojos de ratón adulto C57BL/6 como proyección lateral y vista superior en una capa de fotorreceptores. Se puede observar la expresión inducida en las células de fotorreceptores de los bastones. Verde = EGFP impulsado por la SEQ ID NO: 1, Rojo = mCAR, Blanco = Hoeschst.

10

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15 Los inventores de la presente han combinado epigenética, bioinformática y neurociencia para encontrar promotores que, cuando se encuentran en el ojo, impulsan la expresión de genes únicamente en los fotorreceptores de los bastones.

La secuencia de ácido nucleico de la secuencia de la invención es:

GGTTGGTGGTTTGCACCTGCTGTGGTACAGAAGGGGAGAGAAAGGGCTGGCAGGATGG
 AGCCAGGTGGGTATGGAGGGTGAGAAATGAGAGAAGGGGTTGGCTGAGGTGGGAATCA
 GGACACAAAGGGAAGCCAAAGGTGCTCAGCAAACACTTGGGTTGTCCAATGTTAGCCAA
 GCTTCTAGGACCTGACTCAACGAGCTTCCCTACCCTGTAATGTTCTCATGGACCGTTTCTC
 CAGAAGGCTTTGGGCAACCAGAAAACCAGATGGCTGGTACGGCTCTCTTCTTCTCTGA
 GGCAGGGGGATTTTGTAGAGGATTCTGCTGACTGAGAAGTGGTTCCTCACTTCAGAAA

20

(SEQ ID NO:1).

La presente invención proporciona, por lo tanto, una molécula de ácido nucleico aislado que comprende, o está constituida por, la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de ácido nucleico de al menos 300 pb que tiene al menos un 80 % de identidad respecto a dicha secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1, donde dicha molécula de ácido nucleico aislado da lugar específicamente a la expresión en los fotorreceptores de los bastones de un gen ligado operablemente a dicha secuencia de ácido nucleico que codifica dicho gen. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico es de al menos 300 pb, y tiene al menos un 85 % de identidad respecto a dicha secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico es de al menos 300 pb, y tiene al menos un 90 % de identidad respecto a dicha secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico es de al menos 300 pb, y tiene al menos un 95 % de identidad respecto a dicha secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico es de al menos 300 pb, y tiene al menos un 96 % de identidad respecto a dicha secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico es de al menos 300 pb, y tiene al menos un 97 % de identidad respecto a dicha secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico es de al menos 300 pb, y tiene al menos un 98 % de identidad respecto a dicha secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico es de al menos 300 pb, y tiene al menos un 99 % de identidad respecto a dicha secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico es de al menos 300 pb, y tiene un 100 % de identidad respecto a dicha secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1.

40

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

45

También se proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que se hibrida en condiciones rigurosas con una molécula de ácido nucleico aislado de la invención tal como se ha descrito anteriormente.

50

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

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

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

5 La presente invención proporciona además un método *in vitro* o *ex vivo* para expresar un gen en los fotorreceptores de los bastones que comprende los pasos de transfectar una célula aislada, una línea celular o una población celular (por ejemplo, un tejido) con un casete de expresión de la invención, donde el gen que se va a expresar será expresado por la célula aislada, la línea celular o la población celular si dicha célula es, o dichas células comprenden, fotorreceptores de los bastones. En algunas realizaciones, la célula aislada, la línea celular o la población celular o el tejido es humano.

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

15 Un gen típico que se puede ligar operablemente al promotor de la invención es un gen que codifica una halorrodopsina o un canalrodopsina.

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

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

30 Los casetes de expresión se introducen habitualmente en un vector que facilita la entrada del casete de expresión en una célula hospedadora y el mantenimiento del casete de expresión en la célula hospedadora. Dichos vectores se utilizan normalmente y son muy conocidos por los expertos en la técnica. Numerosos vectores de este tipo están comercializados, por ejemplo, por Invitrogen, Stratagene, Clontech, etc., y se describen en numerosas guías tales como Ausubel, Guthrie, Strathem, o Berger, todas mencionadas anteriormente. Tales vectores habitualmente incluyen promotores, señales de poliadenilación, etc., junto con múltiples sitios de clonación, así como también elementos adicionales tales como orígenes de replicación, genes marcadores seleccionables (por ejemplo, LEU2, URA3, TRP 1, HIS3, GFP), secuencias centroméricas, etc.
35

Los vectores víricos, por ejemplo, un AAV, un PRV o un lentivirus, son adecuados para dirigir y suministrar genes a los fotorreceptores de los bastones utilizando un promotor de la invención.

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

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

50 Además, los métodos *in vitro* o *ex vivo* que utilizan los promotores de la invención también se pueden utilizar para la evaluación *in vitro* de la restauración de la visión, comprendiendo dicho método los pasos de poner en contacto fotorreceptores de los bastones que expresan uno o más transgenes bajo el control de un promotor de la invención con un agente, y comparar al menos una señal de salida obtenida después del contacto con dicho agente con la misma señal de salida obtenida antes de dicho contacto con dicho agente.
55

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

65 La halorrodopsina es una bomba de iones activada por la luz, específica para los iones cloruro, y se encuentra en las «bacterias» antiguas desde un punto de vista filogenético (arqueas), conocidas como halobacterias. Es una proteína con

siete dominios transmembrana de la familia de proteínas de retinilideno, homóloga a la bomba de protones activada por la luz, bacteriorodopsina, y similar en su estructura terciaria (pero no en la estructura de la secuencia primaria) a las rodopsinas de vertebrados, los pigmentos que detectan la luz en la retina. La halorodopsina también comparte similitud secuencial con la canalrodopsina, un canal iónico activado por la luz. La halorodopsina contiene el derivado todo-*trans* retiniano de la vitamina A isomerizable por la luz esencial. La halorodopsina es una de las pocas proteínas de membrana cuya estructura cristalina se conoce. Las isoformas de halorodopsina se pueden detectar en múltiples especies de halobacterias, incluidas *H. salinarum* y *N. pharaonis*. Una gran cantidad de investigaciones en curso explora estas diferencias y las utiliza para discernir las propiedades de fotociclo y de bomba. Después de la bacteriorodopsina, la halorodopsina puede ser la mejor opsina de tipo I (microbiana) estudiada. La absorbancia máxima del complejo retiniano de halorodopsina es de aproximadamente 570 nm. Recientemente, la halorodopsina se ha convertido en una herramienta en optogenética. Al igual que el canal de iones activado por la luz azul canalrodopsina-2 permite activar células excitables (tales como neuronas, células musculares, células pancreáticas y células inmunitarias) con pulsos breves de luz azul, la halorodopsina permite silenciar las células excitables con pulsos breves de luz amarilla. Por tanto, la halorodopsina y la canalrodopsina posibilitan juntas la activación, silenciamiento y desincronización ópticos con múltiples colores de la actividad neural, lo que crea un poderoso grupo de herramientas de neuroingeniería.

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

Los vectores víricos adecuados para la invención son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, un AAV, un PRV o un lentivirus, son adecuados para dirigirse y suministrar genes a los fotorreceptores de los bastones.

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

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

Se puede utilizar cualquier fuente de células retinales para la presente invención. En algunas realizaciones de la invención, las células retinales proceden de una retina humana o se encuentran en ella. En otras realizaciones, la retina es de un animal, por ejemplo, de origen bovino o de roedor. La retina humana se puede obtener fácilmente a partir de bancos de córnea, donde dichas retinas normalmente se desechan después de la disección de la córnea. La retina humana adulta tiene una gran superficie (aproximadamente 1100 mm²) y, por tanto, se puede separar fácilmente en una serie de subregiones experimentalmente. Además, las retinas también se pueden utilizar como un modelo excelente para la comunicación sináptica, debido a que la retina tiene sinapsis que son idénticas al resto del cerebro.

Tal como se utiliza en la presente, el término «animal» se utiliza en la presente para incluir todos los animales. En algunas realizaciones de la invención, el animal no humano es un vertebrado. Son ejemplos de animales los seres humanos, ratones, ratas, vacas, cerdos, caballos, pollos, patos, ocas, gatos, perros, etc. El término «animal» también incluye un animal individual en todas las etapas del desarrollo, incluidas las etapas embrionaria y fetal. Un «animal modificado genéticamente» es cualquier animal que contenga una o más células que porten información genética alterada o recibida, directa o indirectamente, mediante manipulación genética deliberada a un nivel subcelular tal como mediante recombinación dirigida, microinyección o infección con virus recombinantes. No se pretende que la expresión «animal modificado genéticamente» englobe el cruce clásico o la fertilización *in vitro*, sino que se pretende que englobe los animales en los que una o más células son alteradas por una molécula de ADN recombinante o la reciben. Esta molécula de ADN recombinante se puede dirigir específicamente a un locus genético definido, se puede integrar aleatoriamente dentro de un cromosoma o puede ser un ADN que se replica de forma extracromosómica. La expresión «animal modificado genéticamente en la línea germinal» se refiere a un animal modificado genéticamente en el que la alteración genética o información genética se introdujo en células germinales, con lo cual confiere la capacidad para transferir la información genética a su descendencia. Si dicha descendencia posee realmente algo o todo de esa alteración o información genética, son también animales modificados genéticamente.

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

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

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

Hay técnicas disponibles para inactivar o alterar cualquier región genética respecto a cualquier mutación deseada utilizando recombinación homóloga dirigida para insertar cambios específicos en los alelos cromosómicos.

Tal como se utiliza en la presente, un «gen dirigido» es una secuencia de ADN introducida en la línea germinal de un animal no humano por medio de la intervención humana, que incluye, sin carácter limitante, los métodos descritos en la presente. Los genes dirigidos de la invención incluyen secuencias de ADN que se diseñan para que alteren específicamente alelos endógenos análogos.

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

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

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

«Condiciones de hibridación rigurosas» se refiere a una incubación durante la noche a 42 grados C en una solución que comprende un 50 % de formamida, 5x SSC (NaCl 750 mM, citrato trisódico 75 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5x, 10 % de sulfato de dextrano y 20 µg/mL de ADN espermático de salmón sometido a cizallamiento y desnaturalizado, seguida de lavado de los filtros en SSC 0,1x a aproximadamente 50 grados C. Los cambios en la rigurosidad de la hibridación y la detección de señales se consiguen principalmente mediante la manipulación de la

concentración de formamida (porcentajes inferiores de formamida dan lugar a una rigurosidad menor); condiciones salinas o temperatura. Por ejemplo, unas condiciones de rigurosidad moderadamente elevada incluyen una incubación durante la noche a 37 grados C en una solución que comprende SSPE 6X (SSPE 20X = NaCl 3M; NaH₂PO₄ 0,2 M; EDTA 0,02 M, pH 7,4), 0,5 % de SDS, 30 % de formamida, 100 µg/mL de ADN bloqueante espermático de salmón; seguida de lavados a 50 grados C con SSPE 1X, 0,1 % de SDS. Además, para lograr una rigurosidad aún menor, se pueden llevar a cabo lavados realizados después de la hibridación rigurosa con concentraciones salinas superiores (por ejemplo, SSC 5X). Se pueden conseguir variaciones de las condiciones anteriores mediante la inclusión y/o la sustitución de reactivos bloqueantes alternativos utilizados para suprimir el fondo en los experimentos de hibridación. Los reactivos bloqueantes habituales incluyen el reactivo de Denhardt, BLOTTO, heparina, ADN espermático de salmón desnaturalizado y formulaciones patentadas comercializadas. La inclusión de reactivos bloqueantes específicos puede requerir la modificación de las condiciones de hibridación descritas anteriormente, debido a problemas con la compatibilidad.

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

El término «gen» se refiere al segmento de ADN que participa en la producción de una cadena polipeptídica; incluye regiones que preceden y siguen a la región codificante «líder y no traducida (*trailer*)», así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones).

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

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

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

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

Como cuestión práctica, se puede determinar si cualquier molécula de ácido nucleico o polipéptido particular es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de la presente invención de forma convencional utilizando programas informáticos conocidos. Un método preferido para determinar la mejor coincidencia total entre una secuencia problema (una secuencia de la presente invención) y una

secuencia objeto, también denominado alineamiento de secuencias global, se puede determinar utilizando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.* (*Comp. App. Biosci.* (1990) 6:237-245). En un alineamiento de secuencias, las secuencias problema y objeto son ambas secuencias de ADN. Se puede comparar una secuencia de ARN convirtiendo los U en T. El resultado de dicho alineamiento de secuencias global es en identidad porcentual. Los parámetros preferidos utilizados en un alineamiento FASTDB de secuencias de ADN para calcular la identidad porcentual son: Matriz=Unitaria, k-tupla=4, Penalización por apareamiento erróneo--1, Penalización por unión--30, Longitud del grupo de aleatorización=0, Puntuación de corte=1, Penalización por hueco--5, Penalización por tamaño de hueco 0,05, Tamaño de la ventana=500 o la longitud de la secuencia de nucleótidos objeto, lo que sea más corto. Si la secuencia objeto es más corta que la secuencia problema debido a deleciones en 5' o 3', no debido a deleciones internas, se debe llevar a cabo una corrección manual de los resultados. Esto es debido a que el programa FASTDB no considera los truncamientos en 5' y 3' de la secuencia objeto al calcular la identidad porcentual. Para las secuencias objeto truncadas en los extremos 5' o 3', respecto a la secuencia problema, la identidad porcentual se corrige calculando el número de bases de la secuencia problema que están en posición 5' y 3' de la secuencia objeto, que no están apareadas/alineadas, como porcentaje de las bases totales de la secuencia problema. El hecho de si un nucleótido está apareado/alineado se determina mediante los resultados del alineamiento de secuencias FASTDB. A continuación, este porcentaje se sustrae de la identidad porcentual, calculada con el programa FASTDB anterior utilizando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación de identidad porcentual final. Esta puntuación corregida es lo que se utiliza para los fines de la presente invención. Solamente las bases fuera de la región 5' y 3' de la secuencia objeto, tal como muestra el alineamiento FASTDB, que no están apareadas/alineadas con la secuencia problema, se calculan a efectos de ajustar manualmente la puntuación de identidad porcentual. Por ejemplo, una secuencia objeto de 90 bases se alinea respecto a una secuencia problema de 100 bases para determinar la identidad porcentual. Las deleciones tienen lugar en el extremo 5' de la secuencia objeto y, por lo tanto, el alineamiento FASTDB no muestra ningún apareamiento/alineamiento de las 10 primeras bases en el extremo 5'. Las 10 bases afectadas representan un 10 % de la secuencia (número de bases en los extremos 5' y 3' no apareadas/número total de bases en la secuencia problema) de modo que se sustrae un 10 % de la puntuación de identidad porcentual calculada con el programa FASTDB. Si las 90 bases restantes estuvieran perfectamente apareadas, la identidad porcentual final sería de un 90 %. En otro ejemplo, se compara una secuencia objeto de 90 bases con una secuencia problema de 100 bases. Esta vez, las deleciones son deleciones internas de modo que no hay bases en la región 5' o 3' de la secuencia objeto que no estén apareadas/alineadas con la secuencia problema. En este caso, la identidad porcentual calculada por FASTDB no se corrige manualmente. Una vez más, solamente se corrigen manualmente las bases 5' y 3' de la secuencia objeto que no están apareadas/alineadas con la secuencia problema.

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

Como cuestión práctica, se puede determinar de forma convencional utilizando programas informáticos conocidos si cualquier polipéptido particular es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntico a, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos mostradas en una secuencia o a la secuencia de aminoácidos codificada por un clon de ADN depositado. Un método preferido para determinar el mejor apareamiento total entre una secuencia problema (una secuencia de la presente invención) y una secuencia objeto, también denominado alineamiento de secuencias global, se puede determinar utilizando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.* (*Comp. App. Biosci.* (1990) 6:237-245). En un alineamiento de secuencias, las secuencias problema y objeto son ambas secuencias de nucleótidos o ambas secuencias de aminoácidos. El resultado de dicho alineamiento de secuencias global es en identidad porcentual. Los parámetros preferidos utilizados en un alineamiento de aminoácidos FASTDB son: Matriz=PAM 0, k-tupla=2, Penalización por apareamiento erróneo--1, Penalización por unión=20, Longitud del grupo de aleatorización=0, Puntuación de corte=1, Tamaño de la ventana=longitud de la secuencia, Penalización por hueco--5, Penalización por tamaño de hueco--0,05, Tamaño de la ventana=500 o la longitud de la secuencia de aminoácidos objeto, lo que sea más corto. Si la secuencia objeto es más corta que la secuencia problema debido a deleciones N- o C-terminales, no debido a deleciones internas, se debe llevar a cabo una corrección manual de los resultados. Esto es debido a que el programa FASTDB no considera los truncamientos N- y C-terminales de la secuencia objeto al calcular la identidad porcentual global. Para las secuencias objeto truncadas en los extremos N y C, en relación con la secuencia problema, la identidad porcentual se corrige calculando el número de residuos de la secuencia problema que están en posición N- y C-terminal de la secuencia objeto, que no están apareados/alineados con un residuo objeto correspondiente, como porcentaje de las bases totales de la secuencia problema. El que un residuo esté apareado/alineado se determina mediante los resultados del alineamiento de secuencias FASTDB. A continuación, este porcentaje se sustrae de la identidad porcentual, calculada con el programa FASTDB anterior utilizando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación de identidad porcentual final. Esta puntuación de identidad porcentual final es lo que se utiliza para los

5 fines de la presente invención. A efectos del ajuste manual de la puntuación de identidad porcentual, solamente se consideran residuos en los extremos N y C de la secuencia objeto, que no están apareados/alineados con la secuencia problema. Es decir, solamente las posiciones de residuos problema fuera de los residuos N- y C-terminales más lejanos de la secuencia objeto. Solamente se corrigen manualmente las posiciones de residuos fuera de los extremos N- y C-terminales de la secuencia objeto, como se muestra en el alineamiento FASTDB, que no están apareados/alineados con la secuencia problema. No se han de hacer otras correcciones manuales para los fines de la presente invención.

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

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

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

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

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

40 La «proteína fluorescente verde» (GFP, por sus siglas en inglés) es una proteína, compuesta por 238 aminoácidos (26,9 kDa), aislados originalmente a partir de la medusa *Aequorea victoria/Aequorea aequorea/Aequorea forskalea* que emite fluorescencia verde cuando se expone a luz azul. La GFP de *A. victoria* tiene un pico de excitación principal a una longitud de onda de 395 nm y uno secundario a 475 nm. Su pico de emisión se encuentra a 509 nm, que está en la parte verde inferior del espectro visible. La GFP del Pensamiento del mar (*Renilla reniformis*) tiene un único pico de excitación principal a 498 nm. Debido al potencial para el uso generalizado y las necesidades en evolución de los investigadores, se han producido mediante ingeniería genética muchas mutaciones diferentes de GFP. La primera mejora principal fue una mutación puntual (S65T) publicada en 1995 en *Nature* por Roger Tsien. Esta mutación mejoró de forma drástica las características espectrales de GFP, lo que dio como resultado una mayor fluorescencia, fotoestabilidad y un desplazamiento del pico de excitación principal hasta 488 nm mientras se mantenía el pico de emisión a 509 nm. La adición de la mutación puntual (F64L) de la eficacia de plegamiento a 37 °C a esta estructura principal proporcionó GFP potenciada (EGFP). EGFP tiene un coeficiente de extinción (denotado ϵ), también conocido como su sección transversal óptica de $9,13 \times 10^{-21}$ m²/molécula, que también se indica como 55 000 L/(mol·cm). La GFP con superplegamiento, una serie de mutaciones que permiten que la GFP se pliegue y madure rápidamente incluso cuando se fusiona con péptidos que se pliegan de forma deficiente, se describió en 2006.

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

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

65 Un «virus» es un agente infeccioso submicroscópico que no es capaz de crecer o reproducirse fuera de una célula hospedadora. Cada partícula vírica, o virión, está constituido por material genético, ADN o ARN, dentro de un recubrimiento proteico protector denominado cápside. La forma de la cápside varía de formas helicoidales e icosaédricas simples

(polihédricas o cuasiesféricas), a estructuras más complejas con colas o una envoltura. Los virus infectan formas de vida celulares y se agrupan en tipos animales, vegetales y bacterianos, de acuerdo con el tipo de hospedador infectado.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 Los compuestos se pueden formular para la administración parenteral por inyección, por ejemplo, mediante inyección embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis, donde se ha añadido un conservante.

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

15 Los compuestos también se pueden formular para una aplicación tópica tal como una crema o loción.

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

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

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

30 La invención también proporciona kits para llevar a cabo los regímenes terapéuticos de la invención. Tales kits comprenden cantidades terapéutica o profilácticamente eficaces de las composiciones en forma farmacéuticamente aceptable en uno o más recipientes.

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

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

45 Los fotorreceptores de los bastones, las células de tipo bastón o los bastones, son las células fotorreceptoras en la retina del ojo que pueden actuar en una luz menos intensa que el otro tipo de fotorreceptor visual, las células de tipo cono. Los bastones se concentran en los bordes externos de la retina y se usan en la visión periférica. De promedio, hay aproximadamente 90 millones de células de tipo bastón en la retina humana. Más sensibles que las células de tipo cono, las células de tipo bastón son responsables casi en su totalidad de la visión nocturna. Sin embargo, debido a que tienen solamente un tipo de pigmento sensible a la luz, en lugar de los tres tipos que tienen las células humanas de tipo cono, los bastones desempeñan una función pequeña, en caso de que la desempeñen, en la visión cromática.

50 A menos que se defina lo contrario, todas las expresiones y los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado con el que los entiende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente en la puesta en práctica o evaluación de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Ejemplos

60 *Constructo génico*

65 Se generaron mapas hologenómicos de metilación del ADN de resolución elevada en el tipo celular de interés (bastón) para identificar regiones reguladoras candidato. Se seleccionaron los potenciadores candidato en función de la presencia de hipometilación de ADN específica del tipo celular. Los elementos seleccionados de esta manera se cribaron en función

de la expresión utilizando un ensayo indicador de gran capacidad *in vivo* en conos y bastones. A continuación, se sintetizaron los elementos de la secuencia específicos de los bastones y se clonaron delante de una secuencia promotora mínima

ATCCTCACATGGTCCTGCTGGAGTTAGTAGAGGGTATATAATGGAAGCTCGACTTCCAGCTATCACATCCACTGTGT
 5 TGGTGTGAACTGGAATCCACTATAGGCCA (SEQ ID NO:2). Se insertó la secuencia que codifica ChR2-eGFP inmediatamente después de este promotor y la secuencia de Kozak optimizada (GCCACC), y después se colocó un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE, por sus siglas en inglés) y el sitio de poliadenilación de SV40. Se eligió como diana neuronas retinianas utilizando el serotipo 2/8 de AAV con una concentración en el intervalo de $3,43E+11$ a $1,75E+12$ GC/mL.

10 *Transfección vírica y preparación de tejidos*

Para la administración de AAV, los ojos de los animales anestesiados se perforaron en la esclerótica cerca del cristalino con una aguja de calibre 30 aguda. Se inyectaron 2 microL de suspensión de partículas de AAV a nivel subretiniano con una jeringa de Hamilton. Después de 3 semanas, las retinas aisladas se fijaron durante 30 min en un 4 % de PFA en PBS, 15 seguido de un paso de lavado en PBS a 4° C. Se trataron las retinas enteras con un 10 % de suero de burro normal (NDS, por sus siglas en inglés), 1 % de BSA, 0,5 % de Triton X-100 en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. El tratamiento con anticuerpo monoclonal de rata anti-GFP (Molecular Probes Inc.; 1:500) y anticuerpo policlonal de conejo anti-arrestina de cono de ratón (Millipore: 1:200) en un 3 % de NDS, 1 % de BSA, 0,5 % de Triton X-100 en PBS se llevó a cabo durante 20 5 días a temperatura ambiente. El tratamiento con Ab secundario de burro anti-rata Alexa Fluor-488 (Molecular Probes Inc.; 1:200), anti-conejo Alexa Fluor-633 y Hoechst, se llevó a cabo durante 2 h. Los cortes se lavaron, se montaron con reactivo ProLong Gold para evitar la pérdida de color (Molecular Probes Inc.) en portaobjetos de vidrio y se fotografiaron utilizando un microscopio confocal con barrido láser LSM 700 Axio Imager Z2 de Zeiss (Carl Zeiss Inc.).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research

<120> SynP160, un promotor para la expresión específica de genes en los fotorreceptores
5 de los bastones.

<130> PAT057173

<160> 2

10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 352

15

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 1

ggttggtggt ttgcacctgc tgtggtacag aaggggagag aaagggctgg caggatggag	60
ccaggtgggt atggaggggtg agaaatgaga gaagggggtg gctgaggtgg gaatcaggac	120
acaaagggaa gccaaaggtg ctcagcaaac acttggggtg tccaatgta gccaaagcttc	180
taggacctga ctcaacgagc ttcctaccct gtaatgttct catggaccgt ttctccagaa	240
ggctttgggc aaccagaaaa ccagatggct ggtacggctc tcttcttctct ctgaggcagg	300
gggattttgt agaggattct gctgactgag aagtggttcc tcacttcaga aa	352

20

<210> 2

<211> 106

<212> ADN

<213> Mus musculus

25

<400> 2

atcctcacat ggtcctgctg gagttagtag agggatatata atggaagctc gacttccagc	60
tatcacatcc actgtgttgt tgtgaactgg aatccactat aggcca	106

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico aislado que comprende o está constituida por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1, o que comprende o está constituida por una secuencia de ácido nucleico de al menos 300 pb que tiene al menos un 80 % de identidad respecto a dicha secuencia de la SEQ ID NO: 1, donde dicha molécula de ácido nucleico aislado da lugar a la expresión específica de un gen en los fotorreceptores de los bastones cuando se liga operablemente una secuencia de ácido nucleico que codifica dicho gen a dicha molécula de ácido nucleico aislado.
- 10 2. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, que comprende además un promotor mínimo, por ejemplo, el promotor mínimo de la SEQ ID NO: 2.
- 15 3. Un casete de expresión que comprende, como un elemento que promueve la expresión génica en células específicas, un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde dicho ácido nucleico aislado está ligado operablemente a al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen que se va a expresar específicamente en los fotorreceptores de los bastones.
- 20 4. Un vector que comprende el casete de expresión de la reivindicación 3.
5. El vector de la reivindicación 4, donde dicho vector es un vector vírico.
6. El vector de la reivindicación 4 o 5, donde dicho vector es un vector vírico adenoasociado.
- 25 7. Uso de un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, un casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 3 o un vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-6 para la expresión de un gen en los fotorreceptores de los bastones, donde dicho uso es *in vitro* o *ex vivo*.
- 30 8. Un método *in vitro* o *ex vivo* para expresar un gen en los fotorreceptores de los bastones que comprende el paso de transfectar una célula aislada, una línea celular o una población celular con un casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 3, donde el gen que se va a expresar será expresado específicamente por la célula aislada, la línea celular o la población celular si dicha célula aislada, dicha línea celular o dicha población celular comprende un fotorreceptor de los bastones.
- 35 9. Una célula aislada que comprende el casete de expresión de la reivindicación 3 o el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 4-6.
- 40 10. La célula aislada de la reivindicación 9, donde el casete de expresión o vector se integra de forma estable en el genoma de dicha célula aislada.
- 45 11. La molécula de ácido nucleico aislado de la reivindicación 1 o 2, el casete de expresión de la reivindicación 3, el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, el uso de la reivindicación 7, el método de la reivindicación 8 o la célula de la reivindicación 9 o 10, donde el producto del gen es una molécula sensible a la luz, por ejemplo, halorrodopsina o una canalrodopsina.
12. Un kit para expresar un gen en los fotorreceptores de los bastones, comprendiendo dicho kit una molécula de ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.

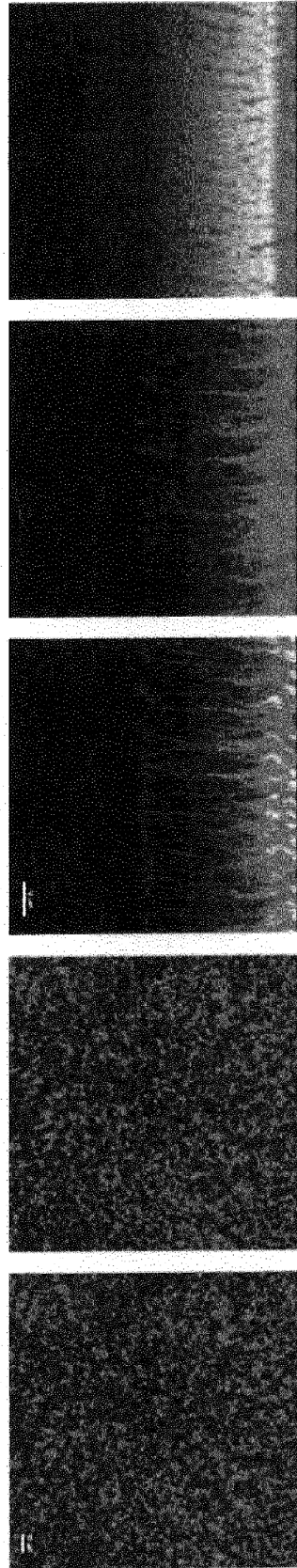


Fig. 1