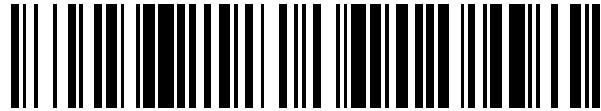


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 474 721**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**C07K 14/215** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2009 E 09731569 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014 EP 2271369**

54 Título: **Nuevas herramientas terapéuticas y métodos para tratar la ceguera**

30 Prioridad:

**18.04.2008 EP 08154828**

**09.05.2008 EP 08155942**

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

**09.07.2014**

73 Titular/es:

**NOVARTIS FORSCHUNGSSTIFTUNG,  
ZWEIGNIEDERLASSUNG FRIEDRICH MIESCHER  
INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH  
(100.0%)**

**Maulbeerstrasse 66  
4058 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BALYA, DAVID;  
BUSSKAMP, VOLKER;  
LAGALI, PAMELA y  
ROSKA, BOTOND**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 474 721 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

Nuevas herramientas terapéuticas y métodos para tratar la ceguera

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a métodos para tratar la ceguera. La presente invención también se refiere a construcciones génicas para el uso en el tratamiento de la ceguera, así como a su uso en la fabricación de un medicamento para tratar la ceguera.

Antecedentes de la Invención

10 La ceguera es un problema sanitario principal que incapacita a millones de personas en el mundo. La causa más común de la ceguera es la disfunción de la retina. Las tres formas más comunes de ceguera retiniana son la retinitis pigmentosa (RP), la degeneración macular (MD, por sus siglas en inglés) y el glaucoma (G). En la RP y la MD el principal problema es la degeneración de los fotorreceptores y la consiguiente pérdida de fotosensibilidad. Así, hay una necesidad de obviar los problemas asociados con tal degeneración de los fotorreceptores.

15 Un enfoque ha sido desarrollar una prótesis retiniana, un chip "guía" con tantos como 1.000 electrodos minúsculos, para ser implantado en el ojo. Esto tendría el potencial de ayudar a las personas que han perdido la vista a recuperar una visión suficiente para manejarse independientemente, pero el número de electrodos simplemente es insuficiente para conseguir que se obtenga un alto grado o nivel de vista. Por otra parte, hay problemas asociados con la inserción de cuerpos extraños en el ojo. Recientemente, se ha aislado y/o manipulado un número de genes que cuando se expresan pueden hacer a las células sensibles a la luz. En algunos casos, también son necesarios factores no genéticos adicionales para hacer a las células sensibles a la luz.

20 Una propuesta de Eli en 2001 fue usar las proteínas que contienen clorofila de la espinaca para tratar la pérdida de visión. Estas proteínas emiten un pequeño voltaje eléctrico después de capturar la energía de fotones de luz entrantes. No obstante, la investigación ha mostrado que los centros de reacción del fotosistema I se pueden incorporar a un liposoma y se muestra que son funcionales, ya que produce el equivalente experimental de un voltaje cuando la luz está brillando sobre él, hasta ahora no se ha observado que esto funcione en una célula retiniana.

30 Otro trabajo del neurobiólogo Richard Kramer en UC Berkeley ha considerado volver a genomanipular un canal de potasio para que sea sensible a la luz en lugar de al voltaje, a fin de permitir la inserción de un conmutador activado por luz en células cerebrales normalmente insensibles a la luz. Sin embargo, el canal se tiene que mutar de modo que siempre permanezca abierto y se proporciona un "tapón" químico, unido al canal, que es sensible a la luz de modo que cuando se ilumina con luz UV de longitud de onda larga, el tapón se libere del canal, expulsando el potasio del canal. La luz de una longitud de onda más larga hace que el tapón se inserte de nuevo en el canal y detenga la liberación de potasio. Sin embargo, se apreciará que tal sistema es extremadamente complejo y es probable que surjan problemas si el canal se aporta al tipo equivocado de células retinianas.

35 Bi y cols. (Neuron, 50, 2006, p23-33) divulga el uso de rodopsina de tipo microbiano para restaurar respuestas visuales en ratones con degeneración de fotorreceptores. Sin embargo, es probable que la expresión del gen de rodopsina se haya producido en una variedad de tipos de célula del ojo, lo que es potencialmente indeseable y/o problemático. También parece que la intensidad luminosa umbral requerida para producir respuestas es muy superior que para fotorreceptores normales de los bastones y los conos, pero no hay una enseñanza de cómo se puede tratar esto en, por ejemplo, ambientes de poca luz.

40 Un método alternativo ha sido descrito por algunos de los presentes inventores en el documento WO-A-2008/022772, en el que, p. ej. canalrodopsina 2 se dirige, p. ej., a células de encendido ("ON"). Sin embargo, este método tiene la desventaja de no ser óptimo con células de apagado ("OFF").

Entre los objetivos de la presente invención está obviar y/o mitigar al menos una de las desventajas susodichas.

45 También es un objetivo de la presente invención proporcionar un sistema adecuado para el uso en la prevención y/o el tratamiento de la ceguera en un sujeto.

Sumario de la Invención

50 Para estudiar esta necesidad, los presentes inventores investigaron la capacidad de un sensor de luz hiperpolarizante filogenéticamente antiguo, tal como la halorrodopsina procedente del arquea (arqueobacteria) *Natronomas pharaonis* (NpHR), expresado específicamente en fotorreceptores de los bastones y los conos para restaurar la visión en un modelo experimental para ceguera. Sorprendentemente, los inventores apreciaron que este

receptor por sí mismo, cuando se introduce en fotorreceptores de los bastones y los conos, podrían estimular el sistema tanto de encendido como de apagado, y restaurar algo de visión por sí mismo, esto es, sin la necesidad de cualquiera de los otros numerosos componentes de la cascada de transducción de luz habitualmente encontrados en fotorreceptores de los bastones y los conos.

5 Por lo tanto, la presente invención abarca una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un gen de halorrodopsina procedente de un arquea o un fragmento fotoactivo de dicho gen, bajo el control de un promotor específico de los conos para el uso en el tratamiento o la mejora de la ceguera. El gen de halorrodopsina puede ser de *Natronomas pharaonis* (NpHR).

10 La molécula de ácido nucleico aislada de la invención se puede usar mediante la administración y la expresión en conos, conos bipolares de encendido, conos bipolares de apagado. Por lo tanto, la molécula de ácido nucleico aislada de la invención puede comprender un promotor específico de células, por ejemplo promotor de rodopsina humano, promotor de opsina roja humano que controla la expresión del gen del canal o la bomba iónicos regulados por luz.

15 La presente invención abarca además un vector recombinante que comprende un ácido nucleico de la invención o una célula huésped que comprende dicho vector.

Además, la presente invención también abarca un estuche que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención, un vector recombinante que comprende dicha molécula o una célula huésped que comprende dicho vector.

#### Descripción de las Figuras

20 Figura 1: vector genómico AAV2-Rho-NpHR-EYFP

Figura 2: Curva de afinación espectral (número medio total de picos durante el encendido de luz normalizado para cada célula y nivel de luz) de retinas infectadas con AAV-NpHR (gris) y retinas de control no tratadas (negro) de ratones (por favor, nótese que los ratones normalmente no poseen un receptor sensible a la luz roja).

#### Descripción Detallada de la Invención

25 Para estudiar esta necesidad, los presentes inventores investigaron la capacidad de un sensor de luz hiperpolarizante filogenéticamente antiguo, tal como la halorrodopsina procedente de la arquea (arqueobacteria) *Natronomas pharaonis* (NpHR), expresado específicamente en fotorreceptores de los bastones y los conos para restaurar la visión en un modelo experimental para la ceguera. Sorprendentemente, los inventores apreciaron que este receptor por sí mismo, cuando se introduce en fotorreceptores de los bastones y los conos, podría estimular el sistema tanto de encendido como de apagado, y restaurar algo de visión por sí mismo, esto es, sin la necesidad de cualquiera de los otros numerosos componentes de la cascada de transducción de luz habitualmente encontrados en fotorreceptores de los bastones y los conos

30

35 Por lo tanto, la presente invención abarca una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un gen de halorrodopsina procedente de un arquea o un fragmento fotoactivo de dicho gen, bajo el control de un promotor específico de los conos para el uso en el tratamiento o la mejora de la ceguera. El gen de halorrodopsina puede ser de *Natronomas pharaonis* (NpHR).

40 La molécula de ácido nucleico aislada de la invención se puede usar mediante la administración y la expresión en conos, conos bipolares de encendido, conos bipolares de apagado. Por lo tanto, la molécula de ácido nucleico aislada de la invención puede comprender un promotor específico de células, por ejemplo promotor de rodopsina humano, promotor de opsina roja humano que controla la expresión del canal iónico o el gen de bombeo regulados por luz.

La presente invención abarca además un vector recombinante que comprende un ácido nucleico de la invención o una célula huésped que comprende dicho vector.

45 Además, la presente invención también abarca un estuche que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención, un vector recombinante que comprende dicha molécula o una célula huésped que comprende dicho vector.

Por otra parte, la presente invención también abarca un método para tratar la ceguera usando las moléculas de ácido nucleico aisladas o los vectores de la invención.

También son abarcadas por la presente invención composiciones que comprenden las moléculas de ácido nucleico de la invención. Dichas composiciones pueden ser composiciones farmacéuticamente aceptables.

5 Por otra parte, las moléculas de ácido nucleico de la invención se pueden usar para fabricar medicamentos y/o para tratar a los pacientes. De ahí que la presente invención también abarque métodos de tratamiento que usan las moléculas de ácido nucleico de la invención

Se debe entender que el medicamento generalmente se usa terapéuticamente, pero se puede usar en un sentido profiláctico, cuando se haya identificado que un sujeto es propenso a sufrir ceguera, pero la pérdida real de visión todavía no se ha producido o se ha producido solo mínimamente.

10 Por "ceguera" se entiende una pérdida total o parcial de visión. Típicamente, el medicamento se puede usar para tratar ceguera asociada con degeneración macular, glaucoma y/o retinitis pigmentosa. Sin embargo, se debe apreciar que cualquier enfermedad o afección que conduzca a la degeneración o la falta de funcionamiento de fotorreceptores del ojo se puede tratar usando el medicamento. Por otra parte, sin querer limitarse por una teoría, se cree que la presente invención será particularmente eficaz para curar la ceguera en las fases previas de la degeneración retiniana (rd, por sus siglas en inglés) cuando se pierde la función de los fotorreceptores pero la sinapsis de fotorreceptor a célula bipolar todavía puede estar intacta.

Un "fragmento activo del canal o la bomba iónicos regulados por luz" es un fragmento que cuando se expresa genera un polipéptido que todavía es capaz de funcionar como una molécula que captura luz que provoca un flujo posterior de iones dentro o fuera de la célula en la que se sitúa el canal y un cambio consiguiente en el voltaje.

20 Por "hiperpolarización" se entiende disminuir el potencial membranario de una célula. Por "despolarización" se entiende incrementar el potencial membranario de una célula.

25 Se apreciará que la presente invención también se extiende a métodos para tratar profilácticamente o terapéuticamente la ceguera administrando a un paciente que sufra o predispuesto a desarrollar ceguera una construcción de ADN según la invención que comprende una secuencia génica de canal o bomba iónicos regulados por luz o un fragmento activo de la misma, secuencia génica o fragmento de la misma que es capaz de expresar una o más copias de una proteína de canal o bomba iónicos regulados por luz en una célula retiniana, con lo que la expresión de dichas una o más copias de la proteína de canal o bomba iónicos regulados por luz hace a la célula fotosensible de modo que permite el tratamiento o la mejora de la ceguera.

30 Típicamente, la secuencia génica del canal o la bomba iónicos regulados por luz de la invención o el fragmento de la misma se puede administrar a un sujeto en la forma de una molécula recombinante que comprende dicha secuencia génica del canal iónico regulado por luz o el fragmento activo bajo controles de la transcripción/traducción para permitir la expresión de dicha proteína de canal o bomba iónicos regulados por luz cuando se administre a células retinianas de un sujeto. Se apreciará que la secuencia o el fragmento del canal o la bomba iónicos regulados por luz puede estar bajo el control de un promotor adecuado, tal como un promotor constitutivo y/o controlable.

35 Por lo tanto, la presente invención también proporciona una molécula recombinante de la invención que comprende una secuencia génica de canal o bomba iónicos regulados por luz o un fragmento activo de la misma para el uso en terapia. La molécula recombinante puede estar en la forma de un plásmido, un fagémido o un vector viral. Por otra parte, la proteína del canal o la bomba iónicos regulados por luz recombinantemente expresada o sintetizada químicamente, o fragmentos funcionalmente importantes de la misma, se pueden producir y aplicar al ojo a través de una pomada adecuada u otro vehículo farmacéutico, como una medida de tratamiento o profiláctica para tratar 40 dichas enfermedades mencionadas anteriormente.

45 Se conocen muchos vectores virales y no virales diferentes y métodos para su aporte, para el uso en terapia génica, tales como vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados, vectores de retrovirus, vectores lentivirales, vectores de herpesvirus, liposomas, administración de ADN simple y similares. Una revisión detallada de posibles técnicas para transformar genes en células deseadas del ojo es mostrada por Wright (Br J Ophthalmol, 1997; 81: 620-622) que se incorpora en la presente memoria mediante referencia. Por otra parte, también es posible usar tecnología de células encapsuladas como la desarrollada por Neurotech, por ejemplo.

50 Preferiblemente, las células a las que se ha de administrar el medicamento o el vector, y en las que el gen se va a expresar, son conos bipolares de encendido, conos bipolares de apagado. Por otra parte, las propias células fotorreceptoras (bastones y conos) que han perdido fotosensibilidad pero que no están "muertas" se pueden usar para expresar el gen del canal o la bomba iónicos regulados por luz. Por otra parte, la expresión del gen del canal o la bomba iónicos regulados por luz en fotorreceptores puede servir para prevenir o frenar la degeneración.

Se debe entender que es preferible que la expresión del gen del canal iónico regulado por luz de la invención se controle por medio de un promotor específico de una célula. Así, un promotor específico de una célula se puede usar

para asegurar que el gen del canal iónico regulado por luz solo se exprese en un tipo de célula específico.

Una vez expresada en una célula retiniana apropiada, la proteína del canal o la bomba iónicos regulados por luz se inserta dentro de la membrana plasmática de la célula, haciendo a la célula fotosensible y capaz de provocar transporte iónico, catiónico o aniónico, en respuesta a la luz. No obstante, aunque se sabe que la retina es sensible a intervalos muy amplios de intensidades de luz debido a la naturaleza adaptiva de los fotorreceptores, los canales o las bombas iónicos regulados por luz pueden no ser capaces de adaptarse y por lo tanto pueden responder solo a un estrecho intervalo de intensidades de luz. Si este es el caso, tal limitación se puede mitigar mediante el uso de intensificadores de imágenes y/o convertidores de imágenes conocidos en la especialidad. Por ejemplo, un paciente que ha sido tratado mediante el método descrito anteriormente puede utilizar intensificadores/mejoradores de imágenes montados, por ejemplo, en las gafas o similares.

A modo de ejemplo, un dispositivo intensificador de imágenes, tal como los suministrados por Telesensory (<http://www.telesensory.com>), se puede combinar con un dispositivo de barrido retiniano (RSD, por sus siglas en inglés) como el desarrollado por Microvision (<http://www.microvision.com/milprod.html>), para proporcionar un aparato utilizado en la cabeza capaz de aportar una imagen intensificada brillante directamente a la retina de un paciente con visión deteriorada (<http://www.telesensory.com/home8.html>). Brevemente, un RSD proyecta imágenes sobre la retina de modo que un individuo pueda ver una imagen grande en total movimiento sin la necesidad de pantallas o monitores adicionales. Así, proyectando una imagen intensificada directamente en la retina de un individuo con visión deteriorada, es posible mejorar la visión en los que se considera que son ciegos.

En el caso de expresar el canal o la bomba iónicos regulados por luz en células bipolares retinianas o ganglionares, se pueden perder algunos aspectos de las capacidades de procesamiento en red de la retina. Por ejemplo la inhibición lateral mediada por células horizontales se puede perder si la luz activa células bipolares o ganglionares. En estos casos, un procesador similar a la retina (D. Balya y B. Roska: "Retina model with real time implementation", International Symposium on Circuits and Systems ISCAS 2005, Kobe, Japón, mayo, pp. 5222-5225., véanse también <http://www.anafocus.com/> y <http://www.eutecus.com/>) se puede combinar con el sistema Microvision.

Si el canal o la bomba iónicos regulados por luz se expresa en fotorreceptores como se mencionó anteriormente, la polaridad de la respuesta luminosa en los fotorreceptores se puede invertir. Eso se puede corregir invirtiendo la polaridad de la imagen proyectada: los píxeles oscuros se vuelven claros y los píxeles claros se vuelven oscuros.

Estos y otros aspectos de la presente invención deben ser evidentes para los expertos en la especialidad, a partir de las enseñanzas de la presente memoria.

Por comodidad, también se proporciona posteriormente el significado de ciertos términos y expresiones empleados en la memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas.

Las formas singulares "un", "uno(a)" y "el/la" incluyen la referencia plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa.

Las "Archaea" son un grupo de microorganismos procarióticos y unicelulares. En esto, son similares a las bacterias pero estos dos grupos evolucionaron de forma diferente, y se clasifican como diferentes dominios en el sistema de tres dominios. Originalmente, estos organismos se denominaron arqueobacterias. Aunque todavía hay dudas en la filogenia, Archaea, Eukaryota y Bacteria se introdujeron como las clasificaciones fundamentales en el sistema de tres dominios de Carl Woese en 1977. Como procariontes, las arqueas también se clasifican en el reino Monera en la taxonomía tradicional de cinco reinos de Linneo. Aunque su estructura celular procariótica es similar a las bacterias, los genes de Archaea y varias de sus rutas metabólicas están más estrechamente relacionado con los de los eucariotas. Un modo de considerar esto es agrupar las arqueas y los eucariotas juntos en la clase Neomura, que podría haber surgido de las bacterias grampositivas. Por otra parte, otros estudios han sugerido que Archaea puede en cambio ser el linaje más antiguo del mundo, divergiendo de este grupo las bacterias y los eucariotas. Archaea se describieron originalmente en ambientes extremos, pero se han encontrado después en todos los hábitats y pueden suponer hasta el 20% de la biomasa total. Estas células son particularmente comunes en los océanos, y las arqueas del plancton pueden ser uno de los grupos de organismos más abundantes del planeta. Un solo individuo o una especie procedente de este dominio se denomina un arqueonte (a veces escrito "arqueon"), mientras que la forma adjetivada es arqueónico.

La "halorrodopsina" es una bomba iónica accionada por luz, específica para iones cloruro, y se encuentra en "bacterias" filogenéticamente antiguas (arqueas), conocidas como halobacterias. Es una proteína transmembranaria siete de la familia de proteínas de retinilideno, homóloga a la bacteriorrodopsina de bomba protónica accionada por luz, y similar en la estructura terciaria (pero no la estructura de secuencia primaria) a rodopsinas, los pigmentos que son sensibles a la luz en la retina, de los vertebrados. La halorrodopsina también comparte similitud de secuencia con la canalrodopsina, un canal iónico accionado por luz. La halorrodopsina contiene el derivado de vitamina A isomerizable por luz esencial totalmente transretiniano. La halorrodopsina es una de las pocas proteínas

membranarias cuya estructura cristalina es conocida. Isoformas de halorrodopsina se pueden encontrar en múltiples especies de halobacterias, incluyendo *H. salinarum* y *N. pharaonis*. Muchas investigaciones en marcha están explorando estas diferencias, y usándolas para analizar las propiedades de los fotociclos y las bombas. Después de la bacteriorrodopsina, la halorrodopsina puede ser la mejor opsina de tipo I (microbiana) estudiada. La absorbancia máxima del complejo retiniano de halorrodopsina es aproximadamente 570 nm. Recientemente, la halorrodopsina se ha convertido en una herramienta en la optogenética. Justo como el canal iónico activado por luz azul, la canalrodopsina 2 crea la capacidad para activar células excitables (tales como neuronas, células musculares, células pancreáticas y células inmunitarias) con breves pulsos de luz azul, la halorrodopsina crea la capacidad para silenciar células excitables con breves pulsos de luz amarilla. Así, la halorrodopsina y la canalrodopsina juntas permiten la activación óptica de múltiples colores, el silenciamiento y la desincronización de la actividad neural, creando un potente conjunto de herramientas de neuroingeniería.

"Polinucleótido" y "ácido nucleico", usados intercambiamente en la presente memoria, se refieren a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, bien ribonucleótidos o bien desoxirribonucleótidos. Así, estos términos incluyen, pero no se limitan a, ADN o ARN monocatenario, bicatenario o multicatenario, ADN genómico, cADN, híbridos de ADN-ARN, o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina u otras bases nucleotídicas naturales, modificadas químicamente o bioquímicamente, no naturales o derivadas. Estos términos incluyen, pero no se limitan a, mARN o cADN que comprenden secuencias intrónicas. La cadena principal del polinucleótido puede comprender azúcares y grupos fosfato (que se pueden encontrar típicamente en ARN o ADN), o un azúcar o grupos fosfato modificados o sustituidos. Alternativamente, la cadena principal del polinucleótido puede comprender un polímero de subunidades sintéticas tales como fosforamiditas y así puede ser un fosforamidato de oligodesoxinucleósido o un oligómero mixto de fosforamidato-fosfodiéster. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos nucleotídicos, uracilo, otros azúcares, y grupos de conexión tales como fluororribosa y tioato, y ramificaciones nucleotídicas. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido se puede modificar adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente de marcaje. Otros tipos de modificaciones incluidos en esta definición son protecciones terminales, la sustitución de uno o más nucleótidos naturales por un análogo, y la introducción de medios para unir el polinucleótido a proteínas, iones metálicos, componentes de marcaje, otros polinucleótidos o un soporte sólido. El término "polinucleótido" también abarca ácidos nucleicos peptídicos, PNA y LNA. Los polinucleótidos pueden comprender además ADN genómico, cADN o híbridos de ADN-ARN.

"Identidad de secuencia" se refiere a un grado de similitud o complementariedad. Puede haber identidad parcial o identidad completa. Una secuencia parcialmente complementaria es una que inhibe al menos parcialmente a una secuencia idéntica de la hibridación a un polinucleótido diana; se refiere a usar el término funcional "sustancialmente idéntico". La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente complementaria a la secuencia diana se puede examinar usando un ensayo de hibridación (transferencia Southern o Northern, hibridación en solución y similares) bajo condiciones de baja restricción. Una secuencia o sonda sustancialmente idéntica competirá contra e inhibirá la unión (es decir, la hibridación) de una secuencia o sonda completamente idéntica a la secuencia diana bajo condiciones de baja restricción. Esto no es decir que las condiciones de baja restricción sean tales que se permita la unión no específica; las condiciones de baja restricción requieren que la unión de dos secuencias entre sí sea una interacción específica (es decir, selectiva). La ausencia de unión no específica se puede probar mediante el uso de una segunda secuencia diana que carece incluso de un grado parcial de complementariedades (p. ej., menos de aproximadamente 30% de identidad); en ausencia de unión no específica, la sonda no se hibridará a la segunda secuencia diana no complementaria.

Otro modo de observar la identidad de secuencias en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico o polipéptido incluye la referencia a residuos de las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una correspondencia máxima a lo largo de una región especificada. Según se usa en la presente memoria, porcentaje de identidad de secuencias significa el valor determinado comparando dos secuencias alineadas óptimamente a lo largo de un margen de comparación, en donde la porción de la secuencia polinucleotídica en el margen de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntica se presenta en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en el margen de comparación y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencias.

"Gen" se refiere a una secuencia polinucleotídica que comprende secuencias de control y codificantes necesarias para la producción de un polipéptido o precursor. El polipéptido puede ser codificado por una secuencia codificante de longitud completa o por cualquier porción de la secuencia codificante. Un gen puede constituir una secuencia codificante no interrumpida o puede incluir uno o más intrones, unidos por las conexiones de empalme apropiadas. Por otra parte, un gen puede contener una o más modificaciones en las regiones bien codificantes o bien no traducidas que podrían afectar a la actividad biológica o la estructura química del producto de expresión, la velocidad de expresión o el modo de control de la expresión. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, mutaciones,

inserciones, eliminaciones y sustituciones de uno o más nucleótidos. A este respecto, tales genes modificados se pueden denominar "variantes" del gen "natural".

5 "Expresión" se refiere generalmente al procedimiento por el cual una secuencia polinucleotídica sufre una transcripción y una traducción satisfactorias de modo que se expresen niveles detectables de la secuencia de aminoácidos o la proteína. En ciertos contextos de la presente memoria, expresión se refiere a la producción de mRNA. En otros contextos, expresión se refiere a la producción de proteína.

"Tipo de célula" se refiere a una célula procedente de una fuente dada (p. ej., tejido u órgano) o una célula en un estado de diferenciación dado, o una célula asociada con una patología o un carácter genético dados.

10 "Polipéptido" y "proteína", usados intercambiamente en la presente memoria, se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que puede incluir aminoácidos traducidos, no traducidos, químicamente modificados, bioquímicamente modificados y derivados. Un polipéptido o proteína puede ser natural, recombinante o sintético, o cualquier combinación de estos. Por otra parte, un polipéptido o proteína puede comprender un fragmento de una proteína o un péptido naturales. Un polipéptido o proteína puede ser una sola molécula o puede ser un complejo multimolecular. Además, tales polipéptidos o proteínas pueden tener cadenas principales peptídicas modificadas. Los términos incluyen proteínas de fusión, incluyendo proteínas de fusión con una secuencia de aminoácidos heteróloga, fusiones con secuencias líder heterólogas y homólogas, con o sin residuos de metionina N-terminales, proteínas inmunológicamente etiquetadas, y similares.

20 Un "fragmento de una proteína" se refiere a una proteína que es una porción de otra proteína. Por ejemplo, los fragmentos de proteínas pueden comprender polipéptidos obtenidos digiriendo una proteína de longitud completa aislada de células cultivadas. En una realización, un fragmento de proteína comprende al menos aproximadamente 6 aminoácidos. En otra realización, el fragmento comprende al menos aproximadamente 10 aminoácidos. En otra realización más, el fragmento de proteína comprende al menos aproximadamente 16 aminoácidos.

Un "producto de expresión" o "producto génico" es una biomolécula, tal como una proteína o mRNA, que se produce cuando un gen en un organismo se transcribe o traduce o se modifica postraduccionalmente.

25 "Célula huésped" se refiere a un microorganismo, una célula procariótica, una célula eucariótica o una línea celular cultivada como una entidad unicelular que se puede usar, o haberse usado, como un receptor para un vector recombinante u otra transferencia de polinucleótidos, e incluye la progenie de la célula original que se ha transfectedo. La progenie de una sola célula puede no ser necesariamente idéntica en la morfología o en el complemento de ADN genómico o total al progenitor original debido a mutación natural, accidental o deliberada.

30 El término "equivalente funcional" está destinado a incluir los "fragmentos", "mutantes", "derivados", "alelos", "híbridos", "variantes", "análogos" o "derivados químicos" del gen o virus natural.

"Aislado" se refiere a un polinucleótido, un polipéptido, una inmunoglobulina, un virus o una célula huésped que está en un ambiente diferente de aquel en el que está presente naturalmente el polinucleótido, el polipéptido, la inmunoglobulina, el virus o la célula huésped.

35 "Sustancialmente purificado" se refiere a un compuesto que se retira de su ambiente natural y está al menos aproximadamente 60% libre, al menos aproximadamente 65% libre, al menos aproximadamente 70% libre, al menos aproximadamente 75% libre, al menos aproximadamente 80% libre, al menos aproximadamente 83% libre, al menos aproximadamente 85% libre, al menos aproximadamente 88% libre, al menos aproximadamente 90% libre, al menos aproximadamente 91% libre, al menos aproximadamente 92% libre, al menos aproximadamente 93% libre, al menos aproximadamente 94% libre, al menos aproximadamente 95% libre, al menos aproximadamente 96% libre, al menos aproximadamente 97% libre, al menos aproximadamente 98% libre, al menos aproximadamente 99% libre, al menos aproximadamente 99,9% libre, o al menos aproximadamente 99,99% o más libre de otros componentes con los que está asociado naturalmente.

45 "Diagnóstico" y "diagnosticar" incluye generalmente una determinación de una susceptibilidad de un sujeto a una enfermedad o un trastorno, una determinación en cuanto a si un sujeto está actualmente afectado por una enfermedad o un trastorno, un pronóstico de un sujeto afectado por una enfermedad o un trastorno (p. ej., identificación de estados cancerosos premetastáticos o metastáticos, estados de cáncer o sensibilidad del cáncer a la terapia), y Therametrics (p. ej., verificación de la condición de un sujeto para proporcionar información sobre el efecto o la eficacia de la terapia).

50 "Muestra biológica" abarca una variedad de tipos de muestra obtenidos de un organismo que se pueden usar en un ensayo de diagnóstico o verificación. El término abarca muestras de sangre y otros líquidos de origen biológico, muestras de tejidos sólidos, tales como un espécimen de biopsia, o cultivos tisulares o células derivados de los mismos y su progenie. El término abarca específicamente una muestra clínica, y además incluye células en un

cultivo celular, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, orina, fluido amniótico, fluidos biológicos y muestras de tejidos. El término también abarca muestras que se han manipulado de cualquier modo después de la obtención, tal como un tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento en ciertos componentes.

5 "Individuo", "sujeto", "enfermo" y "paciente", usados intercambiamente en la presente memoria, se refieren a cualquier sujeto mamífero para el que se desea un diagnóstico, un tratamiento o una terapia. En una realización preferida, el individuo, sujeto, enfermo o paciente es un ser humano. Otros sujetos pueden incluir, pero no se limitan a, ganado bovino, caballos, perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, primates y ratones.

10 "Hibridación" se refiere a cualquier procedimiento por el que una secuencia polinucleotídica se une a una secuencia complementaria a través de apareamiento de bases. Las condiciones de hibridación se pueden definir, por ejemplo, por las concentraciones de sal o formamida en las soluciones de prehibridación e hibridación, o por la temperatura de hibridación, y son muy conocidas en la técnica. La hibridación se puede producir bajo condiciones de diversa restricción.

15 "Condiciones restrictivas" se refiere a condiciones bajo las que una sonda se puede hibridar a una secuencia polinucleotídica diana, pero no a otras secuencias. Las condiciones restrictivas dependen de la secuencia (p. ej., las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas superiores). Generalmente, las condiciones restrictivas se seleccionan para que sean aproximadamente 5°C inferiores que el punto de fusión térmica (T<sub>m</sub>) para la secuencia específica a una fuerza iónica y un pH definidos. La T<sub>m</sub> es la temperatura (bajo una fuerza iónica, un pH y una concentración de polinucleótido definidos) a la que 50% de las sondas complementarias a la secuencia diana se hibridan a la secuencia diana en equilibrio. Típicamente, las condiciones restrictivas serán aquellas en las que la concentración de sal es al menos una concentración de iones sodio (u otras sales) de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1,0 M a de aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (p. ej., de 10 a 50 nucleótidos).

Las condiciones restrictivas también se pueden conseguir con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida.

25 Una "biomolécula" incluye polinucleótidos y polipéptidos.

30 "Actividad biológica" se refiere al comportamiento biológico y los efectos de una proteína o péptido. La actividad biológica de una proteína puede estar afectada a nivel celular y a nivel molecular. Por ejemplo, la actividad biológica de una proteína puede estar afectada por cambios a nivel molecular. Por ejemplo, un oligonucleótido antisentido puede evitar la traducción de un mRNA particular, inhibiendo de ese modo la actividad biológica de la proteína codificada por el mRNA. Además, una inmunoglobulina se puede unir a una proteína particular e inhibir la actividad biológica de la proteína.

35 "Oligonucleótido" se refiere a una secuencia polinucleotídica que comprende, por ejemplo, de aproximadamente 10 nucleótidos (nt) a aproximadamente 1000 nt. Oligonucleótidos para el uso en la invención tienen, por ejemplo, de aproximadamente 15 nt a aproximadamente 150 nt, por ejemplo de aproximadamente 150 nt a aproximadamente 1000 nt de longitud. El oligonucleótido puede ser un oligonucleótido natural o un oligonucleótido sintético.

40 "Oligonucleótido modificado" y "polinucleótido modificado" se refieren a oligonucleótidos o polinucleótidos con una o más modificaciones químicas al nivel molecular de las estructuras moleculares naturales de todos o cualquiera de las bases, los restos sacáricos, los enlaces fosfato internucleosídicos, así como a moléculas que tienen sustituciones añadidas o una combinación de modificaciones en estos puntos. Los enlaces fosfato internucleosídicos pueden ser enlaces internucleotídicos fosfodiéster, fosfotriéster, fosforamidato, siloxano, carbonato, carboximetiléster, acetamidato, carbamato, tioéter, fosforamidato de puente, fosfonato de metileno de puente, fosforotioato, metilfosfonato, fosforoditioato, fosforotioato de puente o sulfona, o enlaces 3'-3', 5'-3' o 5'-5', y combinaciones de tales enlaces similares. El enlace fosfodiéster se puede reemplazar por un enlace sustituto, tal como fosforotioato, metilamino, metilfosfonato, fosforamidato y guanidino, y la subunidad de ribosa de los polinucleótidos también se puede sustituir (p. ej., fosfodiéster de hexosa; ácidos nucleicos peptídicos). Las modificaciones pueden ser internas (simples o repetidas) o en el extremo o los extremos de la molécula de oligonucleótido, y pueden incluir adiciones a la molécula de los enlaces fosfato internucleosídicos, tales como modificaciones de desoxirribosa y fosfato que escinden o se reticulan a las cadenas opuestas o a enzimas asociadas u otras proteínas. Los términos "oligonucleótidos modificados" y "polinucleótidos modificados" también incluyen oligonucleótidos o polinucleótidos que comprenden modificaciones en los restos sacáricos (p. ej., ribonucleótidos o monómeros de desoxirribonucleótido sustituidos en 3'), cualquiera de los cuales están unidos entre sí a través de enlaces 5' a 3'.

50 "Secuencia biomolecular" o "secuencia" se refiere a la totalidad o una porción de una secuencia polinucleotídica o polipeptídica.

El término "detectable" se refiere a un patrón de expresión de polinucleótido que es detectable a través de las



técnicas estándar de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), PCR con transcriptasa inversa (RT, por sus siglas en inglés), presentación diferencial y análisis Northern, que son bien conocidos por los expertos en la técnica. De forma similar, los patrones de expresión de polipéptidos se pueden "detectar" a través de técnicas estándar incluyendo inmunoensayos tales como transferencias Western.

5 Un "gen diana" se refiere a un polinucleótido, a menudo derivado de una muestra biológica, para el que se diseña una sonda oligonucleotídica para que se hibride específicamente. Lo que se ha de detectar es bien la presencia o bien la ausencia del polinucleótido diana, o lo que se ha de cuantificar es la cantidad del polinucleótido diana. El polinucleótido diana tiene una secuencia que es complementaria con la secuencia polinucleotídica de la sonda correspondiente dirigida a la diana. El polinucleótido diana también se puede referir a la subsecuencia específica de un polinucleótido mayor al que se dirige la sonda o a la secuencia global (p. ej., gen o mRNA) cuyo nivel de expresión se desea detectar.

15 Una "proteína diana" se refiere a un polipéptido, a menudo derivado de una muestra biológica, al que se hibrida o se une específicamente un agente de captura de proteína. Lo que se ha de detectar es bien la presencia o bien la ausencia de la proteína diana, o lo que se ha de cuantificar es la cantidad de la proteína diana. La proteína diana tiene una estructura que es reconocida por el agente de captura de proteína correspondiente dirigido a la diana. La proteína o el aminoácido diana también se puede referir a la estructura específica de una proteína mayor a la que se dirige el agente de captura de proteína o a la estructura global (p. ej., gen o mRNA) cuyo nivel de expresión se desea detectar.

20 "Complementario" se refiere a la compatibilidad topológica o coincidencia de las superficies interactivas de una molécula de sonda y su diana. La diana y su sonda se pueden describir como complementarias y, por otra parte, las características de las superficies de contacto son complementarias entre sí. La hibridación o el apareamiento de bases entre nucleótidos o ácidos nucleicos, tal como, por ejemplo, entre las dos cadenas de una molécula de ADN bicatenario o entre una sonda oligonucleotídica y una diana son complementarios.

25 "Marcador" se refiere a agentes que son capaces de proporcionar una señal detectable, bien directamente o bien a través de interacción con uno o más miembros adicionales de un sistema de producción de señales. Marcadores que son directamente detectables y pueden encontrar uso en la invención incluyen marcadores fluorescentes. Fluoróforos específicos incluyen fluoresceína, rodamina, BODIPY, colorantes de cianina y similares.

30 El término "proteína de fusión" se refiere a una proteína compuesta por dos o más polipéptidos que, aunque típicamente no están ligados en su estado natural, se ligan por sus respectivos extremos amino y carboxilo a través de un enlace peptídico para formar un solo polipéptido continuo. Se entiende que los dos o más componentes del polipéptido se pueden bien ligar directamente o bien ligar indirectamente a través de un conector/espaciador peptídico.

35 El término "condiciones fisiológicas normales" significa condiciones que típicamente están dentro de un organismo o una célula vivos. Aunque algunos órganos u organismos proporcionan condiciones extremas, el ambiente interior del organismo e intracelular normalmente varía alrededor de pH 7 (es decir, de pH 6,5 a pH 7,5), contiene agua como el disolvente predominante, y existe a una temperatura por encima de 0°C y por debajo de 50°C. La concentración de diversas sales depende del órgano, el organismo, la célula o el compartimento celular usado como referencia.

"BLAST" se refiere a Basic Local Alignment Search Tool, una técnica para detectar subsecuencias sin huecos que coinciden con una secuencia interrogante dada.

40 "BLASTP" es un programa BLAST que compara una secuencia de aminoácidos interrogante con una base de datos de secuencias de proteínas. "BLASTX" es un programa BLAST que compara los productos de traducción conceptuales de seis marcos de una secuencia nucleotídica interrogante (ambas cadenas) con una base de datos de secuencias de proteínas.

45 Una "cds" se usa en una entrada de secuencia de ADN del GenBank para referirse a la secuencia codificante. Una secuencia codificante es una subsecuencia de una secuencia de ADN que se supone que codifica un gen.

Un "consenso" o "secuencia contigua", según se entiende en la presente memoria, es un grupo de secuencias solapadas ensambladas, particularmente entre secuencias en una o más de las bases de datos de la invención.

50 Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención se pueden producir mediante un virus que aloja un ácido nucleico que codifica la secuencia génica de interés. El virus puede comprender elementos capaces de controlar y/o mejorar la expresión del ácido nucleico. El virus puede ser un virus recombinante. El virus recombinante también puede incluir otros elementos funcionales. Por ejemplo, los virus recombinantes se pueden diseñar de modo que los virus se repliquen autónomamente en la célula diana. En este caso, elementos que induzcan la replicación del ácido nucleico se pueden requerir en un virus recombinante. El virus recombinante también puede comprender un

promotor o regulador o mejorador para controlar la expresión del ácido nucleico según se requiera. Se pueden usar elementos promotores/mejoradores específicos para tejidos para regular la expresión del ácido nucleico en tipos de células específicos. El promotor puede ser constitutivo o inducible.

Un "promotor" es una región de ADN que generalmente está situada aguas arriba (hacia la región 5') del gen que es necesario transcribir. El promotor permite la activación o represión apropiadas del gen que controla. Ejemplos de promotores que son adecuados para la invención son el promotor de rodopsina humano (Allocca y cols., Novel AAV serotypes efficiently transduce murine photoreceptors, *J Virol.* (2007)), el promotor de opsina roja humano (Nathan y cols., *Science*. 11 de abril de 1986, 232(4747):193-202), el promotor de opsina roja de los conos, el promotor arr3 (Zhu, X. y cols. Mouse cone arrestin gene characterization: promoter targets expression to cone photoreceptors. *FEBS Letters* 524, 116-122 (2002)) o el promotor Grm6 (Masu, M. y cols. Specific deficit of the ON response in visual transmission by targeted disruption of the mGluR6 gene. *Cell* 80, 757-765 (1995)).

Componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los métodos y las composiciones de la invención, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. Normalmente, un agente aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación. En una realización, el agente se purifica hasta al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 88%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, al menos aproximadamente 99,9% o al menos aproximadamente 99,99% en peso.

"Expresar" una proteína en una célula significa asegurar que la proteína esté presente en la célula, p. ej., con el propósito de un procedimiento de interés. En numerosas realizaciones, "expresar" una proteína comprenderá introducir un transgén en una célula que comprende un polinucleótido que codifica la proteína, conectado operablemente a un promotor, en donde el promotor es un promotor constitutivo, o un promotor inducible cuando se crean las condiciones suficientes para la inducción, así como una secuencia de localización. Sin embargo, una célula que, p. ej., expresa naturalmente una proteína de interés se puede usar sin manipulación y se considera que "expresa" la proteína.

Una "sonda fluorescente" se refiere a cualquier compuesto con la capacidad de emitir luz de una cierta longitud de onda cuando se activa por luz de otra longitud de onda.

"Fluorescencia" se refiere a cualquier característica detectable de una señal fluorescente, incluyendo intensidad, espectro, longitud de onda, distribución intracelular, etc.

"Detectar" fluorescencia se refiere a evaluar la fluorescencia de una célula usando métodos cualitativos o cuantitativos. Por ejemplo, la fluorescencia se determina usando medios cuantitativos, p. ej., midiendo la intensidad de fluorescencia, el espectro o la distribución intracelular, permitiendo la comparación estadística de valores obtenidos bajo diferentes condiciones. El nivel también se puede determinar usando métodos cualitativos, tales como el análisis y la comparación visual por un ser humano de múltiples muestras, p. ej., muestras detectadas usando un microscopio fluorescente u otro detector óptico (p. ej., un sistema de análisis de imágenes, etc.). Una "alteración" o "modulación" en la fluorescencia se refiere a cualquier diferencia detectable en la intensidad, la distribución intracelular, el espectro, la longitud de onda u otro aspecto de la fluorescencia bajo 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 usando instrumentación estándar, tal como un microscopio fluorescente, CCD o cualquier otro detector fluorescente, y se pueden detectar usando un sistema automatizado, tales como los sistemas integrados, o pueden reflejar una detección subjetiva de una alteración por un observador humano.

Un ensayo realizado en un "formato homogéneo" significa que el ensayo se puede realizar en un solo recipiente, sin que se requiera la manipulación o purificación de ningún componente para determinar el resultado del ensayo, p. ej., un agente de prueba se puede añadir a un sistema de ensayo y medirse directamente cualquier efecto. A menudo, tales ensayos de "formato homogéneo" comprenderán al menos un componente que se "extingue" o se modifica de otro modo en presencia o ausencia de un agente de prueba.

Se puede usar en la presente invención cualquiera de un número de tipos de célula. Por ejemplo, se puede usar cualquier célula eucariótica, incluyendo células vegetales, animales y fúngicas. En algunas realizaciones, se usará una neurona. Según se usa en la presente memoria, las "células" pueden incluir células enteras (células no tratadas), células permeabilizadas, mitocondrias aisladas y proteoliposomas, p. ej., proteoliposomas reconstituidos con una UCP u otra proteína de interés. El cuidado y el mantenimiento de las células, incluyendo células de levadura, es muy conocido por los expertos en la técnica y se puede encontrar en cualquiera de una variedad de fuentes, tales como Freshney (1994) *Culture of Animal Cells. Manual of Basic Technique*, Wiley-Liss, Nueva York,

Guthrie & Fink (1991), Guthrie y Fink, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Academic Press, Ausubel y cols. (1999) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, y otros.

5 Las células se pueden usar en cualquiera de un amplio intervalo de densidades, dependiendo del colorante, el agente de prueba y las condiciones de ensayo particulares. Por ejemplo, se usa una densidad de aproximadamente  $OD_{600}=0,01$  a 1, por ejemplo entre aproximadamente 0,05 y 0,5, p. ej. aproximadamente 0,1.

10 Métodos para expresar proteínas heterólogas en células son muy conocidos por los expertos en la técnica y se describen, p. ej., en Ausubel (1999), Guthrie y Fink (1991), Sherman, y cols. (1982) Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratories, Freshney, y otros. Típicamente, en tales realizaciones, un polinucleótido que codifica una proteína heteróloga de interés se conectará operablemente a una secuencia de control de la expresión apropiada para la célula huésped particular en la que se ha de expresar la proteína heteróloga. Cualquiera de un gran número de promotores muy conocidos se puede usar en tal método. La elección del promotor dependerá de los niveles de expresión que se van a alcanzar y de la especificidad celular deseada. Elementos adicionales tales como señales de poliadenilación, secuencias no traducidas 5' y 3', etc. también se describen en libros de referencia muy conocidos.

15 En las células de los metazoos (animales que tienen el cuerpo compuesto por células diferenciadas en tejido y órganos), se usan comúnmente promotores y otros elementos para expresar proteínas heterólogas y son muy conocidos por los expertos. Véase, p. ej., Cruz & Patterson (1973) Tissue Culture, Academic Press; Meth. Enzymology 68 (1979), Academic Press; Freshney, 3ª Edición (1994) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques, Wiley-Liss. Promotores y secuencias de control para tales células incluyen, p. ej., los promotores tempranos y tardíos usados comúnmente procedentes de virus simio 40 (SV40), u otros promotores virales tales como los procedentes de poliovirus, adenovirus 2, papilomavirus bovino o sarcomavirus aviario, la familia de herpesvirus (p. ej., citomegalovirus, virus del herpes simple o virus de Epstein-Barr), o promotores de inmunoglobulina y promotores del choque térmico (véase, p. ej. Sambrook, Ausubel, Meth. Enzymology Pouwells, y cols., anteriormente (1987)). Además, también se pueden usar promotores regulados, tales como metalotioneína, (es decir, MT-1 y MT-2), glucocorticoide o "conmutadores" de genes de antibióticos. También se pueden usar regiones mejoradoras de tales promotores.

30 Los casetes de expresión se introducen típicamente en un vector que facilita la entrada del casete de expresión en una célula huésped y el mantenimiento del casete de expresión en la célula huésped. Tales vectores se usan comúnmente y son muy conocidos por los expertos en la especialidad. Muchos de tales vectores están disponibles comercialmente, p. ej., de Invitrogen, Stratagene, Clontech, etc., y se describen en numerosas guías, tales como Ausubel, Guthrie, Strathern o Berger, todos anteriormente. Tales vectores incluyen típicamente promotores, señales de poliadenilación, etc. junto con múltiples puntos de clonación, así como elementos adicionales tales como orígenes de replicación, genes marcadores seleccionables (p. ej., LEU2, URA3, TRP 1, HIS3, GFP), secuencias centrómeras, etc.

35 Para la expresión en células de mamífero, se puede usar cualquiera de un número de vectores, tales como pSV2, pBC12BI y p91023, así como vectores de virus líticos (p. ej., virus variolovacunal, adenovirus, baculovirus), vectores de virus episómicos (p. ej., papilomavirus bovino) y vectores retrovirales (p. ej., retrovirus murinos).

Según se usa en la presente memoria, el término "trastorno" se refiere a una dolencia, un enfermedad, una afección, un proceso clínico o un proceso patológico.

40 Según se usa en la presente memoria, el término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un medio portador que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo, es químicamente inerte y es atóxico para el paciente al que se administra.

45 Según se usa en la presente memoria, el término "derivado farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier homólogo, análogo o fragmento de un agente, p. ej. identificado usando un método de identificación sistemática de la invención, que sea relativamente atóxico para el sujeto.

El término "agente terapéutico" se refiere a cualquier molécula, compuesto o tratamiento que ayude en la prevención o el tratamiento de trastornos o complicaciones de trastornos.

Composiciones que comprenden tal agente formulado en un portador farmacéutico compatible se pueden preparar, envasar y etiquetar para el tratamiento.

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

Alternativamente, si el complejo resultante tiene poca solubilidad en disolventes acuosos, entonces se puede

formular con un tensioactivo atóxico tal como Tween o polietilenglicol. Así, los compuestos y sus solvatos fisiológicamente aceptables se pueden formular para la administración mediante inhalación o insuflación (a través bien de la boca o bien de la nariz) o la administración oral, bucal, parenteral, rectal o, en el caso de tumores, inyectarse directamente en un tumor sólido.

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

Las preparaciones para administración oral se pueden formular adecuadamente para dar una liberación controlada del compuesto activo.

- 20 Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formulados de modo convencional.

Para la administración por inhalación, los compuestos para el uso según la presente invención convenientemente se aportan en la forma de una presentación para pulverización de aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para aportar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, p. ej., gelatina para el uso en un inhalador o insuflador que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

- 30 Los compuestos se pueden formular para la administración parenteral mediante inyección, p. ej., mediante inyección en embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, p. ej., en ampollas o en recipientes de múltiples dosis, con un conservante añadido.

Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado, p. ej., agua estéril libre de pirógenos, antes del uso.

Los compuestos también se pueden formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, p. ej., que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

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

- 40 Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos también se pueden formular como una preparación de reserva. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implantación (por ejemplo, subcutáneamente o intramuscularmente) o mediante inyección intramuscular.

Así, 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 poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble. Los liposomas y las emulsiones son ejemplos muy conocidos de vehículos de aporte o portadores para fármacos hidrófilos.

- Si se desea, las composiciones se pueden presentar en un envase o un dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. Por ejemplo, el envase puede comprender una hoja de metal o plástico, tal como un blíster. El envase o el dispositivo dispensador puede estar acompañado por instrucciones para la administración.

La invención también proporciona estuches para llevar a cabo los regímenes terapéuticos de la invención. Tales estuches comprenden en uno o más recipientes cantidades terapéuticamente o profilácticamente eficaces de las

composiciones en forma farmacéuticamente aceptable.

La composición en un vial de un estuche puede estar en la forma de una solución farmacéuticamente aceptable, p. ej., en combinación con solución salina estéril, solución de dextrosa o solución tamponada, u otro fluido estéril farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, el complejo puede estar liofilizado o desecado; en este caso, el estuche comprende opcionalmente además en un recipiente una solución farmacéuticamente aceptable (p. ej., solución salina, solución de dextrosa, etc.), preferiblemente estéril, para reconstituir el complejo para formar una solución con propósitos de inyección.

En otra realización, un estuche comprende además una aguja o una jeringa, preferiblemente envasada de forma estéril, para inyectar el complejo, y/o una torunda con alcohol envasada. Opcionalmente se incluyen instrucciones para la administración de las composiciones por un médico o por el paciente.

En una realización, una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un gen hiperpolarizante del canal o la bomba iónicos regulados por luz procedente de una arquea, o un fragmento activo frente a la luz de dicho gen, se expresará, eventualmente junto con una canalrodopsina, p. ej. canalrodopsina 2 (ChR2), exclusivamente en células bipolares de encendido, mientras que una canalrodopsina que conduce cationes, p. ej. la vChR1 derivada de *Volvox carteri* (Zhang y cols., Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*, Nat Neurosci. 23 de abril de 2008; doi:10.1038/nn.2120) se expresará exclusivamente en células bipolares de apagado. Sin querer limitarse por una teoría, se cree que esta expresión dirigida de tres neuromoduladores dará como resultado una excitación de la ruta de encendido por luz azul (componente ChR2) y una inhibición de dicha ruta de encendido por luz roja (componente NpHR) mientras que la ruta de apagado será excitada por luz roja (componente vChR1). De ahí que la luz azul se mimetizaría con la luz encendida y la luz roja se mimetizaría con la luz apagada. Se cree que la ventaja de este sistema es que las células bipolares de apagado serían directamente excitadas (esto es despolarizadas) por vChR1. Sin querer limitarse por una teoría, se cree que esta expresión combinada y dirigida de, p. ej., ChR2, NpHR y vChR1, podría mejorar el espectro de fotorreceptores artificiales después de la pérdida en la cantidad de fotorreceptor (más células bipolares y diferentes, de encendido y apagado) y podría establecer una visión bicromática (azul = blanco y rojo = negro).

Además, se cree que la combinación de ChR2/NpHR en células bipolares de encendido podría ayudar a establecer un límite exacto entre estos dos tipos de fotorreceptores artificiales ya que podría cortar la señal de encendido cuando la luz roja está encendida y la ruta de apagado estará accionada. Según se explica en la presente memoria, el promotor Grm6 (Masu, M. y cols. Specific deficit of the ON response in visual transmission by targeted disruption of the mGluR6 gene. Cell 80, 757-765 (1995).) es un promotor ejemplar que se podría usar para conducir la expresión de ChR2/NpHR en células bipolares de encendido.

A menos que se especifique otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto normal en la especialidad a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o la prueba de la presente invención, métodos y materiales adecuados se describen posteriormente. En caso de conflicto, se impondrá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, los métodos y los ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

## Ejemplos

### Enfoques genéticos:

Los presentes inventores expresaron la bomba de cloruro sensible a luz roja NpHR (Zhang y cols., Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry, Nature Vol 466 (2007)) en fotorreceptores de ratones C57BU6 usando transferencia génica mediada por vectores de virus adenoasociados, AAV2/7 (Allocca y cols., Novel AAV serotypes efficiently transduce murine photoreceptors, J Virol. (2007)). NpHR se condujo a partir del promotor de rodopsina humano.

### 45 **Detección de NpHR en retinas infectadas:**

AAV2/7-Rho-NpHR-EYFP (5,35E+12 partículas/ml) se inyectó subretinariamente en ratones C57BU6 adultos. Las retinas de los animales infectados se prepararon en diferentes momentos después de la inyección. Estas retinas se tiñeron con anticuerpo con respecto a EYFP para marcar células que expresan NpHR y con DAPI para visualizar todas las células en la capa nuclear externa (ONL, por sus siglas en inglés). Se realizaron registros microscópicos confocales y estos se analizaron usando el paquete informático Imaris (5.7.2) de Bitplane.

La cuantificación de fotorreceptores infectados se realizó contando células que expresan NpHR con relación a células marcadas con DAPI en cortes confocales.

**Registros con series de múltiples electrodos de retinas infectadas con AAV:**

5 Los fotorreceptores de retinas infectadas con AAV se estimularon usando luz de longitudes de onda e intensidades definidas. La producción de impulsos de células ganglionares se registró mediante MEA. La curva de afinación espectral de retinas infectadas con AAV mostraba una sensibilidad a la luz significativamente superior a longitudes de onda mayores en comparación con retinas no tratadas de control (Figura 2).

**Resultados:**

10 Con estos experimentos, los presentes inventores fueron capaces de mostrar que AAV2/7 en combinación con el promotor de rodopsina humano es una excelente herramienta para el aporte de NpHR a fotorreceptores. El comienzo de la expresión de NpHR era muy rápido (6 días después de la inyección) y estable durante un período largo. Según se presentó anteriormente, las partículas de AAV2/7 penetran en toda la capa nuclear externa independientemente del punto de inyección y la profundidad de la ONL (Li y cols., Cone-specific expression using a human red opsin promoter in recombinant AAV, Vision Research 48 (2008)). Las infecciones con AAV en P0 eran menos eficaces y probablemente restringidas a los bastones. Se encontró que la bomba de cloruro sensible a luz roja NpHR era funcional en explantes retinianos. Los resultados obtenidos demuestran que NpHR puede modular la actividad de los fotorreceptores hacia longitudes de onda superiores (Jacobs y cols., Emergence of novel color vision in mice engineered to express a human cone photopigment, Science, VOL 315 (2007)).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un gen de halorrodopsina procedente de una arquea o un fragmento activo frente a la luz de dicho gen, bajo el control de un promotor específico de los conos para el uso en el tratamiento o la mejora de la ceguera.
2. La molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 1, en la que el gen de halorrodopsina es de *Natronomas pharaonis* (NpHR).
- 10 3. La molécula de ácido nucleico aislada según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende el promotor de rodopsina humano o el promotor de opsina roja humano que controla la expresión del gen de halorrodopsina.
4. La molécula de ácido nucleico aislada según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende el promotor arr3 que controla la expresión del gen de halorrodopsina.
5. Un vector recombinante que comprende el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Una célula huésped que comprende el vector según la reivindicación 5.
- 15 7. Un estuche que comprende un ácido nucleico aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un vector recombinante según la reivindicación 5 o una célula huésped según la reivindicación 6.



FIG. 1

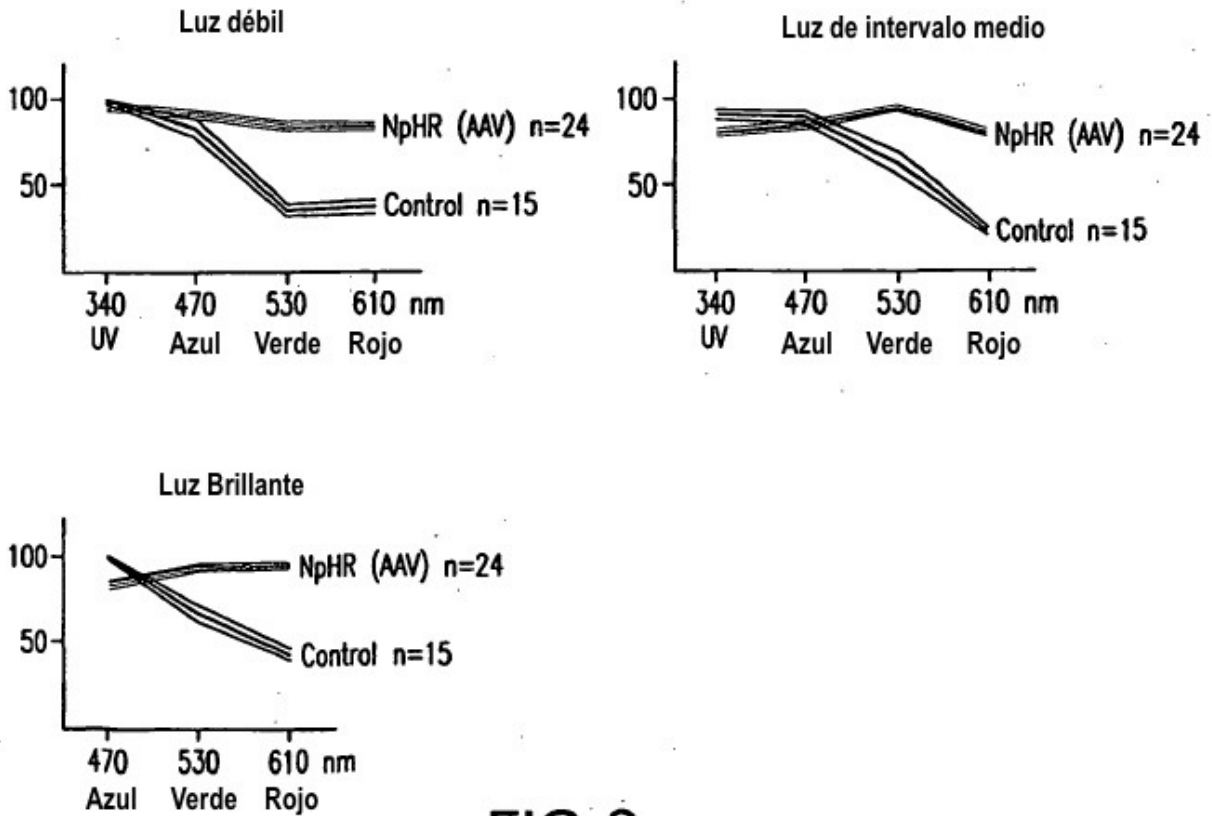


FIG. 2