

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 468**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/33 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2009 E 09800733 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 2315833**

54 Título: **Vectores para la administración de proteínas sensibles a la luz y métodos para su utilización**

30 Prioridad:

20.05.2008 US 54571 P
14.11.2008 US 199241 P
26.11.2008 US 200430 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.06.2015

73 Titular/es:

EOS NEUROSCIENCE, INC. (50.0%)
2307 Van Ness Avenue
San Francisco, CA 94109-1880, US y
UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH
FOUNDATION, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

HORSAGER, ALAN;
HAUSWIRTH, WILLIAM y
LIU, JIANWEN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 538 468 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

Vectores para la administración de proteínas sensibles a la luz y métodos para su utilización

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Una terapia de entrega de genes para tratar una enfermedad o trastorno independiente del tratamiento de una mutación subyacente podría tener un valor potencial. Los métodos capaces de controlar, regular, y / o conducir los circuitos neuronales específicos así como para mediar respuestas neuronales naturalistas y percepción de alta resolución y de control también podrían ser de enorme valor terapéutico potencial. Las neuronas son un ejemplo de un tipo de célula que utiliza las corrientes eléctricas creadas por la despolarización para generar señales de comunicación (por ejemplo, los impulsos nerviosos). Otras células eléctricamente excitables incluyen el músculo esquelético, músculo cardíaco, y las células endocrinas. Las neuronas utilizan la despolarización rápida para transmitir señales por todo el cuerpo y para diversos fines, tales como el control motor (por ejemplo, contracciones musculares), las respuestas sensoriales (por ejemplo, el tacto, el oído y otros sentidos) y funciones de cálculo (por ejemplo, las funciones cerebrales). Al facilitar o inhibir el flujo de iones positivos o negativos a través de las membranas celulares, la célula puede despolarizarse brevemente, despolarizarse y mantenerse en ese estado, o hiperpolarizarse. Por lo tanto, el control de la despolarización de las células puede ser beneficioso para un número de propósitos diferentes, incluyendo el control visual, muscular y sensorial. Los canales de proteínas sensibles a la luz, bombas, y receptores pueden permitir un control óptico de precisión de milisegundos a las células. Aunque las proteínas sensibles a la luz en combinación con la luz se pueden utilizar para controlar el flujo de iones a través de membranas celulares, la focalización y entrega aún no se han abordado para enfermedades específicas, trastornos y circuitos.

25 Un artículo de Lagali, P.S. et al (2008) titulado, "Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration" en nature neuroscience vol. 11, nº 6, páginas 667-675 describe un estudio en el que los autores seleccionan genéticamente un canal catiónico activado por luz, canalrodopsina-2, a neuronas de segundo orden, células bipolares ON, de retinas degenerados in vivo en el modelo de ratón Pde6b^{rd1} (también conocidos como RD1).

30 La WO2007 / 131180 describe vectores de ácidos nucleicos que codifican los canales de membrana selectivos de cationes activados por luz, en particular canalrodopsina-2 (Chop2), neuronas de retina interiores convertidas en células fotosensibles en la retina degenerada en fotorreceptores en un modelo animal.

35 Un artículo de Bi A et al (2006) titulado "Ectopic Expression of a Microbial-Type Rhodopsin Restores Visual Responses in Mice with Photoreceptor Degeneration" en la revista Neuron vol. 50, nº 1, páginas 23-33, describe que la entrega por un vector viral adeno-asociado resulta en la expresión a largo plazo de una rodopsina de tipo microbiana, canalrodopsina-2 (ChR2) se puede lograr en neuronas de la retina interna de roedores in vivo.

40 RESUMEN DE LA INVENCION

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un ácido nucleico recombinante tal como se expone en la reivindicación 1. En una realización, la proteína sensible a la luz se puede seleccionar del grupo que consiste de ChR1, ChR2, VChR1, ChR2 C128A, ChR2 C128S, ChR2 C128T, híbridos / quimeras ChR1-ChR2, Chd, ChEF, ChF, ChIEF, NpHR, eNpHR, melanopsina. En otra realización, la proteína sensible a la luz es ChR2 o una proteína sensible a la luz que es al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90% o al menos aproximadamente 95% idéntica a ChR2. En otra realización, el fragmento de secuencia reguladora mGluR6 comprende menos de aproximadamente 1000, menos de aproximadamente 750, menos de aproximadamente 500, menos de aproximadamente 250, o menos de aproximadamente 100 pares de bases. En una realización relacionada, la secuencia reguladora mGluR6 o fragmento de la misma es un promotor o potenciador de mGluR6. En una realización relacionada específica el ácido nucleico comprende además una proteína fluorescente verde.

55 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención se obtendrá por referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos de los mismos:

- 60 La Figura 1 describe la secuencia de ácido nucleico de ChR1.
- La Figura 2 describe la secuencia de ácido nucleico de ChR2.
- La Figura 3 describe la secuencia de ácido nucleico de NpHR.
- La Figura 4 describe la secuencia de ácido nucleico de melanopsina.
- 65 La Figura 5 describe la secuencia de ácido nucleico de ChR2 que está optimizado al codón de mamífero y que codifica una ChR2 fusionada con la proteína fluorescente verde (GFP).

La Figura 6 describe un fragmento de la secuencia de ácido nucleico regulador de la GRM6 (receptor de glutamato metabotrópico 6) capaz de regular la expresión de una manera específica de la célula bipolar.

La Figura 7 describe una secuencia de ácido nucleico regulador smCBA.

5 La Figura 8 describe: neuronas que expresan ChR2 y su activación. (A) neuronas que expresan ChR2 con estimulación de la luz; (B) neuronas activadas en respuesta a trenes de alta velocidad de los pulsos de luz azul.

10 La Figura 9 describe: entrega de AAV a las células bipolares de la retina. La columna 1 muestra la expresión de GFP en células bipolares de la retina después de una inyección subretiniana con el vector de AAV7-CBAGFP después de 8 semanas de edad. La columna 2 muestra la tinción PKCa (un anticuerpo que es específico para células bipolares), la columna 3 muestra la tinción DAPI para los núcleos celulares, y la columna 4 muestra imágenes fusionadas de la expresión de GFP, tinción de PKCa y DAPI. La primera fila es magnificación 20X y la segunda fila es magnificación 40X.

15 La Figura 10 describe: Expresión de la proteína fusionada ChR2-GFP en células bipolares de la retina rd1, rho $-/-$, y rd16. En cada imagen se muestra el epitelio del pigmento retiniano (RPE), células bipolares o capa nuclear interna (INL), la capa plexiforme interna (IPL), y la capa de células ganglionares (GCL). Las áreas blancas brillantes muestran la expresión de GFP. Hay rizos de expresión en las células bipolares de la INL (excepto para la inyección intravítrea de AAVS).

20 La Figura 11 describe: el análisis de la expresión de EGFP en las secciones de retina congeladas mediante inmunohistoquímica 1 mes después de las inyecciones subretinianas con los vectores AAV mutantes de tirosina. Ejemplos de las secciones que representan la propagación y la intensidad de fluorescencia de EGFP en toda la retina después de la transducción con el serotipo 2 Y444 (a) o serotipo 8 Y733 (b). Las imágenes están orientadas con el vítreo hacia la parte inferior y la capa de fotorreceptores hacia la parte superior. Fluorescencia EGFP en los fotorreceptores, células RPE y ganglionares ojos de ratón inyectados subretinalmente con el serotipo 2 Y444 (c) fluorescencia EGFP en fotorreceptores, células de Muller y RPE después de la administración del serotipo 8 Y733 (d) procesos de detección de células de Muller (rojo) por inmunotinción con un anticuerpo de glutaminasintetasa (GS) (e) imagen fusionada que muestra la colocación de fluorescencia EGFP (verde) y la tinción GS (rojo) en las secciones de la retina de los ojos tratados con serotipo 8 Y733 (f) Barra de calibración 1001 μ m. gcl, capa de células ganglionares; ipl, capa plexiforme interna; inl, capa nuclear interna; onl, nuclear externa; os, segmento externo; rpe, epitelio pigmentario de la retina.

30 La Figura 12 describe: entrenamiento de ratones en un laberinto de agua. (A) Un diagrama esquemático del laberinto de agua utilizado para medir el umbral escotópico (Hayes y Balkema, 1993). (B) Tiempo que tardó cada grupo de ratones (retina degenerada - tratada, retina degenerada - no tratada, y de tipo salvaje) para encontrar el objetivo (plataforma negra + matriz de LED) como función de las sesiones de entrenamiento. (C) Tiempo que tardó cada grupo de ratones (tratados con rd1, tratados con rd16, tratados con rho $-/-$, retina degenerada no tratada, y el tipo salvaje) para encontrar el objetivo (plataforma negra + matriz de LED) como función de las diferentes intensidades de luz.

35 La Figura 13 describe: dispositivo similar a gafas asociado a un elemento de generación/ producción de luz (sistema láser / matriz de LED) que puede desencadenar la expresión de proteínas sensibles a la luz.

40 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Proteínas sensibles a la luz

45 La presente descripción proporciona ácidos nucleicos recombinantes que codifican las proteínas sensibles a la luz, vectores virales y no virales para la administración de ácidos nucleicos recombinantes que codifican las proteínas sensibles a la luz, y los métodos para la administración de las proteínas sensibles a la luz.

50 Las proteínas sensibles a la luz son proteínas que pertenecen a la familia opsina e incluyen rodopsinas de vertebrados (animal) e invertebrados. Los opsinas, rodopsinas animales son receptores acoplados a proteína G (GPCR) con 7 hélices transmembrana que pueden regular la actividad de los canales iónicos. Las rodopsinas de invertebrados por lo general no son GPCR, pero son bombas iónicas o canales iónicos sensibles a la luz o activados por la luz.

55 Una opsina de algas como la canalrodopsina (ChR2) de *Chlamydomonas reinhardtii* permite acciones inducidas por luz azul potenciales que se activarán con la precisión de milisegundos en las células debido a la despolarización de flujo de cationes a través de un poro controlado por luz. Una opsina archaea como la halorodopsina de *Natronomonas pharaonis* permite el bombeo de cloruro activado por la luz; la bomba puede estar hiperpolarizada e inhibida de disparar potenciales de acción cuando se expone a la luz amarilla. El uso de tales opsinas sensibles a la luz permite una regulación temporal y espacial de la actividad de la descarga neuronal.

60 Como se hace referencia en el presente documento, una proteína "sensible a la luz" incluye canalrodopsinas (ChR1, ChR2), halorodopsinas (NpHR), melanopsinas, opsinas pineales, bacteriorrodopsina. Una proteína sensible a la luz de esta invención se puede producir de forma natural en plantas, animales, arqueobacterias, algas, o células bacterianas, o alternativamente puede crearse a través de técnicas de laboratorio.

65 Las canalrodopsinas ChR1 (número de acceso de GenBank AB058890 / AF385748; Figura 1) y ChR2 (número de

acceso de GenBank AB058891 / AF461397; Figura 2) son dos rodopsinas del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Nagel, 2002; Nagel, 2003). Ambos son canales sensibles a la luz que, cuando se expresa y se activa en el tejido neural, permiten que una célula se despolarice cuando se estimula con luz (Boyden, 2005).

5 En algunas realizaciones una canalrodopsina híbrida o quimérica puede crearse y utilizarse mediante la combinación de diferentes partes de las proteínas ChR1 y ChR2.

10 En un aspecto una canalrodopsina quimérica o híbrida puede crearse y utilizarse mediante la sustitución de los segmentos N-terminales de ChR2 con los homólogos de ChR1 (y viceversa). En algunos aspectos de realizaciones las canalrodopsinas híbridas dan lugar a un cambio de sensibilidad en un espectro de longitud de onda diferente (por ejemplo, en el espectro de longitudes de onda de color rojo) con la desensibilización insignificante y cinéticas de encendido y apagado enlentecidas.

15 En otro aspecto, un híbrido / quimera de ChR1 (aminoácidos 1-345) y ChR2 (aminoácidos 1-315) puede ser creado y utilizado.

20 En aún otro aspecto pueden crearse y utilizarse los híbridos / quimeras de ChR1-ChR2 que retienen la porción N-terminal de ChR1 y sustituyen la porción C-terminal con el segmento ChR2 correspondiente. Por otra parte, los híbridos / quimeras de ChR1 y ChR2 pueden ser construidos y utilizados incluyendo residuos mutantes alrededor de los bolsillos de unión de la retina de las quimeras. Los siguientes quimeras pueden crearse y utilizarse:

- 25 a. ChD: un híbrido / quimera de una porción N-terminal de ChR1 y una porción C-terminal de ChR2, donde el sitio de cruce está en un punto de homología en la hélice D de las dos canalrodopsinas.
- b. ChEF: un híbrido / quimera de una porción N-terminal de ChR1 y una porción C-terminal de ChR2, donde el sitio de cruce está en el bucle entre las hélices E y F de las dos canalrodopsinas.
- c. ChIEF: una variante de la quimera ChEF con la isoleucina 170 mutado a valina.
- d. ChF: un híbrido / quimera de una porción N-terminal de ChR1 y una porción C-terminal de ChR2, donde el sitio de cruce está en el extremo de la hélice F de las dos canalrodopsinas.

30 Las quimeras pueden retener la inactivación reducida de ChR1 en presencia de luz persistente, pero pueden permitir la penetración de iones de sodio y de potasio, además de protones. Las quimeras también pueden mejorar la cinética del canal mediante la mejora de la tasa de cierre del canal después de la estimulación.

35 En algunos aspectos otras variantes de ChR1 y ChR2 pueden ser modificadas. En realizaciones específicas las mutaciones puntuales simples o múltiples a la proteína ChR2 pueden resultar en variantes de ChR2. Las mutaciones en la ubicación C128 de ChR2 pueden dar lugar a propiedades alteradas del canal, es decir, C128A, C128S, y las mutaciones C128T ChR2 pueden resultar en una tiempos de apertura generales mayores (Berndt, 2009). En algunos aspectos, las variantes ChR2 pueden resultar en una cinética alterada.

40 En otra realización, se puede utilizar un VChR1 (GenBank número de acceso EU622855).

En realizaciones específicas se utiliza una versión optimizada de codón de mamíferos de ChR2 (Figura 5).

45 NpHR (halorodopsina) (número de acceso GenBank EF474018; Figura 3) es del archaea haloalcalifílico *Natronomonas pharaonis*. Pueden crearse variantes de NpHR. En algunos aspectos mutaciones puntuales simples o múltiples a la proteína NpHR pueden resultar en variantes de NpHR, tales como por ejemplo, puede utilizarse una versión optimizada de codón de mamíferos de NpHR.

50 En un aspecto se utilizan variantes de NpHR. En una realización específica se utiliza eNpHR (NpHR mejorado). La adición de los aminoácidos FCYENEV al C-terminal de NpHR junto con el péptido señal de la subunidad β del receptor nicotínico de acetilcolina al N-terminal de NpHR resulta en la construcción de eNpHR.

55 La melanopsina (número de acceso GenBank 6.693.702; Figura 4) es un fotopigmento que se encuentra en las células ganglionares fotosensibles especializadas de la retina que están involucradas en la regulación de los ritmos circadianos, reflejo pupilar a la luz, y otras respuestas no visuales a la luz. En la estructura, la melanopsina es una opsina, una variedad de proteínas retinilideno de receptor acoplado a proteína G. La melanopsina se asemeja a opsinas de invertibrados en muchos aspectos, incluyendo su secuencia de aminoácidos y la cascada de señalización corriente abajo. Como las opsinas de invertibrados, la melanopsin parece ser un fotopigmento biestable, con actividad fotoisomerasa intrínseca. En ciertos aspectos se pueden crear variantes de melanopsina. En algunos aspectos mutaciones puntuales simples o múltiples a la proteína melanopsina pueden resultar en variantes de melanopsina.

60 Las proteínas sensibles a la luz también pueden incluir proteínas que son al menos aproximadamente un 10%, al menos aproximadamente un 20%, al menos aproximadamente un 25%, al menos aproximadamente un 30%, al menos aproximadamente un 35%, al menos aproximadamente un 40%, al menos aproximadamente un 45%, al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 55%, al menos aproximadamente un 60%, al

menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, o al menos alrededor del 99% idéntica a las proteínas sensibles a la luz ChR1, ChR2, NpHR y melanopsina. Por ejemplo, la proteína ChR2 puede incluir proteínas que son al menos aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 90% o al menos aproximadamente un 95% idéntica a ChR2. Además, estas proteínas pueden incluir ChR2 que es fotosensible y puede ser activado por longitudes de onda específicas de luz de alta intensidad.

Las proteínas sensibles a la luz pueden modular la señalización dentro de los circuitos neuronales y controlar bidireccionalmente el comportamiento de conductancia iónica en el nivel de una sola neurona. En algunos aspectos, la neurona es una neurona de la retina, una célula bipolar de la retina (por ejemplo, células bipolares de la retina ON u OFF; células bipolares de conos y bastones), una célula ganglionar de la retina, una célula fotorreceptora, o una célula amacrina de la retina.

Vectores virales adenoasociados

La presente invención proporciona vectores virales que comprenden ácidos nucleicos que codifican una proteínas sensibles a la luz y métodos de uso, tal como se define por las reivindicaciones.

Un virus adenoasociado (AAV) es un virus pequeño (25 nm), sin envoltura que empaqueta un genoma de DNA de una cadena lineal de 4,7 Kb. El pequeño tamaño del genoma del AAV se debe a los efectos potenciales de Rep en la expresión de genes celulares que conducen a la construcción de vectores AAV que no codifican Rep y que carecen de la EEI activa en cis, que se requiere para la integración específica de sitio frecuente. Los ITR se mantienen porque son las señales cis requeridas para el empaquetamiento. Por lo tanto, los vectores actuales AAV recombinantes (rAAV) persisten principalmente como elementos extracromosómicos.

Una variedad de vectores recombinantes virales adenoasociados (rAAV) puede usarse para suministrar genes de interés a una célula y para efectuar la expresión de un gen de interés, por ejemplo, un gen que codifica una proteína sensible a la luz. Por ejemplo, rAAV se puede utilizar para expresar proteínas sensibles a la luz, por ejemplo, ChR1, ChR2, VChR1, ChR2 C128A, ChR2 C128S, ChR2 C128T, híbridos / quimeras ChR1-ChR2, ChD ChEF, CHF, ChIEF, NpHR, eNpHR, melanopsina, y variantes de las mismas o cualquier proteína sensible a la luz descrita aquí, en una célula diana. A veces en este documento, "transgén" se utiliza para referirse a un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés, en el que el polinucleótido está encapsidado en un vector viral (por ejemplo, rAAV).

Los virus adenoasociados son virus pequeños de DNA, de una sola cadena que requieren de un virus auxiliar para facilitar una replicación eficiente. El genoma de 4,7 kb del AAV está caracterizado por dos repeticiones terminales invertidas (ITR) y dos marcos de lectura abiertos que codifican las proteínas Rep y las proteínas Cap, respectivamente. El marco de lectura Rep codifica cuatro proteínas de peso molecular 78 kD, 68 kD, 52 kD y 40 kD. Estas proteínas funcionan principalmente en la regulación de la replicación del AAV y el rescate y la integración del AAV en los cromosomas de una célula huésped. El marco de lectura Cap codifica tres proteínas estructurales de peso molecular 85 kDa (VP1), 72 kD (VP2) y 61 kD (VP3) (Berns, antes citada) que forman la cápside del virión. Más del 80% de las proteínas totales en el virión de AAV comprenden VP3.

El genoma de rAAV comprende generalmente: (1) una ITR de virus 5' adenoasociado, (2) una secuencia de codificación (por ejemplo, transgén) para el producto génico deseado (por ejemplo, una proteína sensible a la luz) operativamente unida a una secuencia que regula su expresión en una célula (por ejemplo, una secuencia promotora tal como un mGluR6 o fragmento del mismo), y (3) una repetición terminal invertida de virus 3' adenoasociado. Además, el vector de rAAV puede contener preferiblemente una secuencia de poliadenilación.

Generalmente, los vectores de rAAV tienen una copia de la ITR de AAV en cada extremo del transgén o gen de interés, con el fin de permitir la replicación, el empaquetado, y la integración eficiente en los cromosomas celulares. La ITR se compone de los nucleótidos 1 a 145 en el extremo 5' del genoma de DNA del AAV, y los nucleótidos 4.681 a 4.536 (es decir, la misma secuencia) en el extremo 3' del genoma de DNA del AAV. El vector de rAAV también puede incluir al menos 10 nucleótidos tras el final de la ITR (es decir, una porción de la "región D").

La secuencia de transgén (por ejemplo, el polinucleótido que codifica una proteína sensible a la luz) puede ser de aproximadamente 2 a 5 kb de longitud (o alternativamente, el transgén puede contener adicionalmente un "stuffer" o una secuencia "de relleno" para alcanzar el tamaño total de la secuencia de ácido nucleico entre las dos ITR de entre 2 y 5 kb). Alternativamente, el transgén puede estar compuesto de copias repetidas de las mismas secuencias heterólogas o similares varias veces (por ejemplo, dos moléculas de ácido nucleico que codifican una o más proteínas sensibles a la luz separadas por un ribosoma de lectura, o alternativamente, por un sitio de entrada interna del ribosoma o "IRES"), o varias secuencias heterólogas diferentes (por ejemplo, ChR2 y NpHR separadas por un ribosoma de lectura o un IRES; o cualquiera de dos o más de las proteínas sensibles a la luz descritas en este documento incluyendo, pero sin limitarse a ChR1, ChR2, VChR1, ChR2 C128A, ChR2 C128S, ChR2 C128T, híbridos/ quimeras ChR1-ChR2, ChD, ChEF, CHF, ChIEF, NpHR, eNpHR, melanopsina, y variantes de los mismos).

Los vectores recombinantes de AAV de la presente descripción pueden ser generados a partir de una variedad de

virus adenoasociados, incluyendo, por ejemplo, cualquiera de los serotipos 1 a 12, tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, se espera que las ITR de cualquier serotipo de AAV tengan estructuras y funciones similares con respecto a la replicación, integración, escisión y los mecanismos de transcripción.

5 En algunos aspectos un promotor específico de tipo de célula (u otra secuencia reguladora tal como un promotor) se emplea para conducir la expresión de un gen de interés, por ejemplo, una proteína sensible a la luz, ChR2, etc., en uno o más tipos de células específicos. En otros casos, la expresión del transgén sensible a la luz puede llevarse a cabo por un promotor separado (por ejemplo, un promotor viral, eucariota, u otro que facilita la expresión de una secuencia unida operativamente en una célula eucariota, particularmente una célula de mamífero). Los ejemplos representativos de promotores adecuados a este respecto incluyen un promotor mGluR6, un promotor GNA01, un promotor CBA / smCBA (fusión del potenciador temprano inmediato de CMV y promotor de la actina beta bovina más las conexiones intro1-exon1), el promotor de CBA (beta actina de pollo), promotor de CMV, promotor de RSV, promotor SV40, el promotor de MoMLV, o derivados, mutantes y / o fragmentos de los mismos. Los promotores y otras secuencias reguladoras se describen adicionalmente en este documento.

15 Otros promotores que pueden ser utilizados de manera similar en el contexto de la presente descripción incluyen promotores específicos de tejido o células (por ejemplo, un promotor derivado de bastón, cono, o ganglios), o promotores inducibles. Los ejemplos representativos de promotores inducibles adecuados incluyen promotores inducibles sensibles a un antibiótico, por ejemplo, promotores que responden a tetraciclina, tales como promotores "tet-on" y / o "tet-off". Los promotores inducibles también pueden incluir promotores sensibles a productos químicos distintos de los antibióticos.

20 El vector de rAAV también puede contener secuencias adicionales, por ejemplo de un adenovirus, que ayudan a efectuar una función deseada para el vector. Tales secuencias incluyen, por ejemplo, aquellos que ayudan a empaquetar el vector de rAAV en partículas de virus.

25 Pueden producirse líneas celulares de empaquetamiento adecuadas para la producción de vectores virales adenoasociados mediante técnicas disponibles (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5,872,005). Los métodos para construir y empaquetar vectores rAAV1 se describen en, por ejemplo, el documento WO 00/54813.

30 Flanqueando los marcos de lectura abiertos rep y cap en los extremos 5' y 3' hay repeticiones terminales invertidas 145 pb (ITR), los primeros 125 pb de los cuales son capaces de formar estructuras dúplex con forma de Y o T. Las dos ITR son los únicos elementos cis esenciales para la replicación del AAV, rescate, empaquetamiento y la integración del genoma de AAV. Hay dos conformaciones de ITR de AAV llamados "flip" y "flop". Estas diferencias en la conformación se originaron a partir del modelo de replicación de virus adenoasociado que utiliza la ITR para iniciar y reiniciar la replicación (R.O. Snyder et al, 1993, J. Virol., 67: 6.096-6.104 (1993); K.I. Berns, 1990 Microbiological Reviews, 54: 316-329). Los dominios enteros rep y cap pueden escindir y reemplazarse con un transgén terapéutico o marcador.

35 En algunos aspectos se utilizan vectores AAV auto-complementarios. Los vectores auto-complementarios se han desarrollado para eludir la tasa de síntesis limitante de la segunda cadena en los genomas de vectores de AAV de una sola cadena y para facilitar la fuerte expresión del transgén en una dosis mínima. En aspectos específicos de un AAV auto-complementario de cualquier serotipo o serotipo híbrida o serotipo mutante, o serotipo híbrido mutante aumenta la expresión de una proteína sensible a la luz, como ChR1, ChR2, VChR1, ChR2 C128A, ChR2 C128S, ChR2 C128T, híbridos / quimeras ChR1-ChR2, ChD, ChEF, ChF, ChIEF, NpHR, eNpHR, melanopsina y variantes de los mismos por lo menos un 10%, al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 35 %, al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85 %, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 100%, al menos un 125%, al menos un 150%, al menos un 175%, al menos un 200%, o más de un 200%, en comparación con un rAAV no autocomplementaria del mismo serotipo.

Serotipos virales adenoasociados

40 El vector comprende un AAV recombinante de un serotipo particular, como se define en las reivindicaciones.

45 Se han encontrado AAV en muchas especies animales, incluyendo primates, canes, aves y humanos.

50 Los serotipos virales son cepas de microorganismos que tienen un conjunto de antígenos reconocibles en común. Hay varios serotipos conocidos de AAV, y la eficacia de la transfección o transducción dentro de la retina pueden variar en función del serotipo específico y la naturaleza de las células diana. El rAAV o un serotipo específico de rAAV o AAV, pueden proporcionar tropismo específico de tejido específico o de tipo celular para la administración de genes a las células bipolares de la retina (por ejemplo, células bipolares de la retina ON u OFF; bastones y conos bipolares). Mientras que rAAV y / o AAV es probablemente un método relativamente seguro para liberar un transgén a un tejido diana, la eficacia de la entrega, y posiblemente, la seguridad de la entrega, puede depender de las proteínas de la cubierta de la AAV. La cubierta proteica o cápside, determina que las células pueden tomar la carga viral. Los diferentes serotipos de AAV, es decir, virus que difieren en sus cubiertas o proteínas de la cápside, pueden

diferir en su tropismo tisular y la capacidad de transducir células dianas. Los transgenes pueden ser empaquetados dentro de partículas de AAV con muchas proteínas de la cubierta funcionalmente diferentes, o cápsides. Estas diferentes cápsides son las que definen el serotipo y pueden contribuir (totalmente o en parte) a su capacidad para transducir tipos de células particulares. La entrada del vector viral comienza con la interacción de la cápside y las proteínas de la superficie de la célula diana. Sin desear estar limitado por la teoría, es en este punto en la ruta de transducción que diferentes serotipos pueden influir significativamente en la eficacia de la entrega del transgén.

En ciertos aspectos el vector de AAV es de un serotipo o variante / mutante de la misma incluyendo, pero sin limitarse a: AAV1 (GenBank número de acceso AY724675), AAV2 (GenBank número de acceso AF043303), AAV3, AAV4, AAV5 (GenBank número de acceso M61166), AAV6, AAV7 (GenBank número de acceso AF513851), AAV8 (GenBank número de acceso AF513852), AAV9 (GenBank número de acceso AX753250), AAV10, AAV11 (GenBank número de acceso AY631966), o AAV12 (GenBank número de acceso DQ813647), o mutantes, híbridos, o fragmentos de los mismos. En ciertos aspectos el vector de AAV comprende uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, o cinco o más de los siguientes serotipos: AAV1 (GenBank número de acceso AY724675), AAV2 (GenBank número de acceso AF043303), AAV3, AAV4, AAV5 (GenBank número de acceso M61166), AAV6, AAV7 (GenBank número de acceso AF513851), AAV8 (GenBank número de acceso AF513852), AAV9 (GenBank número de acceso AX753250), AAV10, AAV11 (GenBank número de acceso AY631966), o AAV12 (GenBank número de acceso DQ813647), o mutantes, híbridos, o fragmentos de los mismos. En otros aspectos, el vector de AAV es de un serotipo natural o variante / mutante del mismo, hasta ahora aún no descubierto y no caracterizado.

En ciertos aspectos, el AAV recombinante es de un híbrido combinatorio de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más serotipos o mutantes de los mismos.

El vector de AAV se puede usar para transducir específicamente un tipo celular específico, por ejemplo, células de la retina o células bipolares de la retina (por ejemplo, en células bipolares de la retina ON u OFF; células bipolares de conos y bastones). En algunos casos, un serotipo específico, por ejemplo, AAV2, AAV5, AAV7 o AAV8, puede ser mejor que otros serotipos en la transducción de un determinado tipo de células (por ejemplo, células bipolares de la retina (por ejemplo, en células bipolares de la retina ON u OFF; células bipolares de conos y bastones), las neuronas) o tejido. Por ejemplo, un serotipo específico AAV como AAV2, AAV5, AAV7 o AAV8 puede transducir un tipo específico de células, por ejemplo, las células bipolares de la retina (por ejemplo, en células bipolares de la retina ON u OFF; células bipolares de conos y bastones), con un aumento en la eficiencia de transducción de al menos un 10%, al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 35%, al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 100%, al menos un 125%, al menos un 150%, al menos un 175%, al menos un 200%, o más de 200%, en comparación con un serotipo AAV diferente. En algunos casos, por ejemplo, un serotipo específico, AAV2, AAV5, AAV7 o AAV8, puede permitir la transducción de al menos un 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90% de las células de un tipo de célula particular, por ejemplo, células bipolares de la retina (por ejemplo, en células bipolares de la retina ON u OFF; células bipolares de conos y bastones), o de células dentro de un tejido particular, por ejemplo, tejido de la retina.

Existe una necesidad en la técnica de serotipos de AAV que pueden transducir eficazmente células bipolares de la retina (por ejemplo, en células bipolares de la retina ON u OFF; células bipolares de conos y bastones), particularmente cuando dicha transducción permite la administración y la expresión de una proteína sensible a la luz, por ejemplo, ChR2. Una terapia importante para el tratamiento de trastornos oculares o enfermedades (por ejemplo, deficiencia visual, ceguera), puede implicar el uso de un serotipo de AAV en particular para expresar proteínas sensibles a la luz, como ChR2 en células bipolares de la retina (por ejemplo, en células bipolares de la retina ON u OFF; células bipolares de conos y bastones). Por ejemplo, los serotipos AAV5 o AAV7 se utilizan para dirigir la expresión de un gen de interés (por ejemplo, una proteína sensible a la luz, ChR2, etc.) en las células de la retina, por ejemplo, células bipolares de la retina (por ejemplo, en células bipolares de la retina ON u OFF; células bipolares de conos y bastones). En algunos casos, AAV5 y / o AAV7 pueden transducir células de la retina de manera más eficiente, por ejemplo, células bipolares de la retina (por ejemplo, en células bipolares de la retina ON u OFF; células bipolares de conos y bastones), que otros serotipos de AAV. Por ejemplo, los serotipos AAV5 y / o AAV7, pero no el serotipo AAV1, se utilizan para transducir células bipolares de la retina (por ejemplo, en células bipolares de la retina ON u OFF; células bipolares de conos y bastones). En otros casos los serotipos AAV2 y / o AAV8 se utilizan para transducir células bipolares de la retina (por ejemplo, en células bipolares de la retina ON u OFF; células bipolares de conos y bastones). En algunos casos, un serotipo específico, por ejemplo, AAV2, AAV5, AAV7 o AAV8, se puede aplicar en general a un tejido, por ejemplo, tejido de la retina, pero luego transduce preferentemente en un tipo de célula específica sobre otro tipo de célula.

En algunos casos, un AAV por ejemplo, AAV2, AAV5, AAV7 o AAV8, que se introduce en la retina puede preferentemente transducir células bipolares de la retina (por ejemplo, en células bipolares de la retina ON u OFF; células bipolares de conos y bastones) de modo que el transgén se expresa más altamente en células bipolares de la retina en comparación con otras células de la retina. En algunos casos, el serotipo particular, por ejemplo, AAV2, AAV5, AAV7 o AAV8, del AAV puede ser la causa o contribuir a la causa de tal transducción preferencial. En algunos casos, sólo un pequeño subconjunto de las células bipolares son transducidas.

Un serotipo específico de AAV, por ejemplo, AAV5 y / o AAV7 (o cualquier otro serotipo de AAV o mutante descrito en este documento) que comprende un promotor de tipo no específico de la célula se utiliza para dirigir la expresión de una proteína sensible a la luz en un tipo de célula particular. En algunos casos, un serotipo específico de AAV que se ha demostrado que transduce preferentemente un tipo de célula particular se usa junto con un promotor específico de tipo celular para dirigir la expresión de una proteína de interés, por ejemplo, una proteína sensible a la luz en un tipo celular específico.

Las secuencias de ITR de AAV y otras secuencias de AAV empleadas en la generación de los minigenes, vectores y cápsides, y otras construcciones utilizadas se pueden obtener a partir de una variedad de fuentes. Por ejemplo, las secuencias pueden proporcionarse por tipos de AAV humanos identificados en la actualidad y los serotipos de AAV aún no se ha identificado. De manera similar, los AAV conocidos por infectar otros animales también pueden proporcionar estas ITR empleadas en las moléculas o las construcciones de esta invención. Del mismo modo, las cápsides de una variedad de serotipos de AAV pueden "mezclarse y emparejarse" con los otros componentes del vector. Ver, por ejemplo, la Publicación de Patente Internacional N° WO01 / 83692, publicada el 8 de noviembre de 2001. Una variedad de estos serotipos virales y cepas están disponibles en la American Type Culture Collection, Manassas, Va., o están disponibles de una variedad de fuentes académicas o comerciales. Alternativamente, puede ser deseable sintetizar secuencias utilizadas en la preparación de los vectores y los virus de la invención usando técnicas conocidas, que pueden utilizar secuencias de AAV que se publican y / o están disponibles de una variedad de bases de datos.

Virus adenoasociados y mutaciones de residuos expuestos en superficie

Los vectores de virus adenoasociados recombinantes están en uso en varios ensayos clínicos, pero se necesitan dosis relativamente grandes de vectores para lograr beneficios terapéuticos. Las dosis grandes de vector también puede desencadenar una respuesta inmune ya que una fracción significativa de los vectores puede fallar en su viaje de manera eficiente hacia el núcleo y puede ser blanco de la maquinaria de degradación del proteasoma de la célula huésped. Se ha descrito que la proteína tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR-PTK) de señalización afecta negativamente la transducción por los vectores de serotipo AAV2 por alterar el transporte nuclear de los vectores (Zhong 2007). Los vectores de AAV2 fosforilados en tirosina entran pero no transducen eficazmente, en parte debido a la ubiquitinización de las cápsides de AAV seguido de la degradación mediada por proteasoma. Las mutaciones puntuales en tirosinas en AAV2 pueden conducir a la transducción de alta eficiencia en títulos bajos de virus (Zhong 2008). En una realización, se utilizan AAV mutados en tirosina por ejemplo, AAV2 o AAV8, con el fin de mejorar la eficiencia de transducción de las células de la retina, por ejemplo, células bipolares de la retina (Figuras 9-12). Las mutaciones de los residuos de tirosina expuestos en la superficie de la cápside de rAAV permiten a los vectores evadir la fosforilación y la posterior ubiquitinización y, por tanto, prevenir la degradación mediada por proteasoma, lo que lleva a una mayor transducción y la posterior expresión de los genes de las proteínas sensibles a la luz.

En aspectos relacionados uno cualquiera o más residuos expuestos en la superficie distintos de la tirosina se pueden mutar para mejorar la eficacia de transducción, el tropismo a tejido / tipo de célula, características de expresión, y los títulos necesarios para una infección eficaz.

Tal como se describe aquí, la modificación y cambios en la estructura de los polinucleótidos y polipéptidos de vectores de rAAV de tipo salvaje puede resultar en la mejora de viriones de rAAV que poseen características deseables. Por ejemplo, los vectores de rAAV mutados pueden mejorar la administración de construcciones de genes sensibles a la luz a células de mamífero seleccionadas, tejidos y órganos para el tratamiento, prevención y profilaxis de diversas enfermedades y trastornos. Tal enfoque también puede proporcionar un medio para la mejora de los síntomas de dichas enfermedades, y para facilitar la expresión de polipéptidos terapéuticos y / o profilácticos exógenos de interés a través de la terapia génica mediada por vectores rAAV. Los vectores de rAAV mutados pueden codificar una o más proteínas, por ejemplo, las proteínas sensibles a la luz, por ejemplo, ChR2, que se describen en este documento. La creación (o inserción) de una o más mutaciones en secuencias específicas de polinucleótidos que codifican una o más de las proteínas sensibles a la luz codificadas por las construcciones de rAAV descritas se proporcionan en el presente documento. En ciertas circunstancias, la secuencia del polipéptido resultante sensible a la luz se ve alterada por estas mutaciones, o en otros casos, la secuencia del polipéptido se ha modificado por una o más mutaciones en el polinucleótido que codifica para producir vectores modificados con propiedades mejoradas para efectuar la terapia génica en sistemas de mamíferos. Como se describe en este documento, la optimización de codón del polinucleótido que codifica la proteína sensible a la luz también puede mejorar la eficiencia de transducción.

La vía ubiquitina-proteasoma juega un papel en el tráfico intracelular de AAV. La sustitución de residuos de tirosina expuestos en la superficie, por ejemplo, cápsides AAV2 o AAV8 permite a los vectores bien tener una ubiquitinización limitada o escapar de la ubiquitinización por completo. La reducción o ausencia de ubiquitinización puede ayudar a prevenir a la cápside de someterse a la degradación mediada por el proteasoma. Las cápsides de AAV o rAAV pueden fosforilarse en residuos de tirosina por EGFR-PTK en un ensayo de fosforilación in vitro, y las cápsides de AAV fosforilados conservan su integridad estructural. Aunque los vectores AAV fosforilados pueden

entrar en las células tan eficientemente como sus homólogos no fosforilados, su eficiencia de transducción puede verse afectada de manera significativa.

5 En algunos casos, un vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) comprende una proteína de la cápside con un residuo de tirosina mutado, que permite al vector tener una eficiencia de transducción mejorada para una célula diana, por ejemplo, una célula bipolar de la retina (por ejemplo, células bipolares de la retina ON u OFF; células bipolares de conos y bastones). En algunos casos, el rAAV comprende además un promotor (por ejemplo, mGluR6, o fragmento del mismo) capaz de dirigir la expresión de una proteína de interés en la célula diana.

10 En algunos casos, la expresión en un tipo celular específico se consigue además mediante la inclusión de un promotor específico de tipo celular descrito en este documento dentro del vector rAAV.

15 En un aspecto, un vector viral adenoasociado recombinante (rAAV) comprende al menos una primera proteína de la cápside que comprende al menos un primer residuo de aminoácido tirosina fosforilado, y en donde dicho vector comprende además al menos un primer segmento de ácido nucleico que codifica una proteína sensible a la luz unida operativamente a un promotor capaz de expresar dicho segmento en una célula huésped.

20 Se puede realizar una mutación en uno o más de los residuos de tirosina de la proteína de la cápside de AAV 1-12 o AAV híbridos. En realizaciones específicas estos residuos de tirosina están expuestos en la superficie. En una realización relacionada los residuos de tirosina son parte de la proteína de la cápside VP1, VP2, o VP3. La mutación puede efectuarse en uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos de una proteína de la cápside AAV-VP3: Tyr252, Tyr272, Tyr444, Tyr500, Tyr700, Tyr704, Tyr730; Tyr275, Tyr281, Tyr508, Tyr576, Tyr612, Tyr673 o Tyr720. Ejemplos de mutaciones son mutaciones de tirosina a fenilalanina, incluyendo, pero sin limitarse a, Y252F, Y272F, Y444F, Y500F, Y700F, Y704F, Y730F, Y275F, Y281F, Y508F, Y576F, Y612G, Y673F e Y720F. En una realización específica, una mutación se hace en el serotipo AAV2 y comprende una mutación Y444F un serotipo de AAV8 comprende una mutación Y733F, en el que 444 y 733 indican la ubicación de un punto de mutación de la tirosina de la cápside viral. En realizaciones adicionales, tales serotipos AAV2 y AAV8 mutados codifican una proteína sensible a la luz, por ejemplo, Chr2, y también pueden comprender una secuencia reguladora (por ejemplo, mGluR6) para dirigir la expresión de dicha proteína sensible a la luz.

30 En aspectos relacionados, 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 mutaciones se realizan en el residuo de tirosina en un serotipo AAV1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o serotipo híbrido, por ejemplo, 3 tirosinas se mutan para crear un serotipo de AAV con una triple mutación que consiste en: Y444F, Y500F, e Y730F.

35 Los vectores de rAAV de la descripción pueden estar comprendidos dentro de una partícula viral adenoasociada o virión rAAV infeccioso, incluyendo, por ejemplo, los viriones seleccionados del grupo que consiste de un serotipo de AAV1, un serotipo de AAV2, un serotipo de AAV3, un serotipo de AAV4, un serotipo de AAV5 y un serotipo de AAV6, un serotipo de AAV7, un serotipo AAV8, un serotipo de AAV9, un serotipo de AAV10, un serotipo de AAV11, un serotipo de AAV12, o un serotipo AAV híbrido .

40 Estos vectores rAAV descritos también puede estar comprendidos dentro de una célula huésped de mamífero aislado, incluyendo, por ejemplo, células huésped de humanos, primates, murinas, felinas, caninas, porcinas, ovinas, bovinas, equinas, caprinas y lupinas. Los vectores rAAV pueden estar comprendidos dentro de una célula huésped de mamífero aislado tal como una célula endotelial humana, epitelial, vascular, hepática, pulmonar, del corazón, pancreática, intestinal, renal, muscular, ósea, neural, de la sangre o del cerebro.

45 La eficacia de transducción de AAV que comprende una proteína de la cápside mutada (por ejemplo, una mutación de un residuo de tirosina se describe en este documento) que expresa una proteína sensible a la luz, como Chr1, Chr2, VChr1, Chr2 C128A, Chr2 C128S, Chr2 C128T, híbridos / quimeras Chr1-Chr2, las ChD, ChEF, ChF, ChIEF, NpHR, eNpHR, melanopsina, y variantes de los mismos se incrementa en al menos un 10%, al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 30% , al menos un 35%, al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80% , al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 100%, al menos un 125%, al menos un 150%, al menos un 175%, al menos un 200%, o más de 200%, en comparación con un AAV de tipo salvaje que expresa una proteína sensible a la luz. Esta descripción también proporciona vectores de rAAV mutados (por ejemplo, el vector de AAV2 Y444F o el vector AAV8Y733F) capaz de transducir al menos un 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de células bipolares (por ejemplo, células bipolares de la retina ON u OFF; células bipolares de conos y bastones). La mejora en la transducción creada por la cápside mutada puede permitir la transducción de las células bipolares mediante inyección intravítrea. Por ejemplo, se introduce un vector de rAAV mutado o un vector híbrido de serotipo combinatorio de rAAV o un vector híbrido de serotipo combinatorio de rAAV mutado que pueden ser capaces de transducir al menos un 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90% de las células bipolares de la retina (por ejemplo, células bipolares de la retina ON u OFF; células bipolares de conos y bastones) en la retina mediante inyección intravítrea. En una realización específica, sólo un subconjunto de las células bipolares de la retina se transduce. En una realización específica son transducidas sólo las células bipolares de alta sensibilidad.

En ciertos aspectos, la degradación mediada por ubiquitina o proteasoma de un AAV que comprende una proteína de la cápside con una mutación que expresa una proteína sensible a la luz, como ChR1, ChR2, VChR1, ChR2 C128A, ChR2 C128S, ChR2 C128T, híbridos / quimeras ChR1-ChR2, ChD, ChEF, ChF, ChIEF, NpHR, eNpHR, melanopsina, y variantes de los mismos, se reduce en al menos un 10%, al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 35%, al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, o al menos un 90%, cuando se compara con un AAV de tipo salvaje que expresa una proteína sensible a la luz.

10 Otros vectores de administración de genes

Se describe cualquiera de una variedad de otros vectores adecuados para la expresión de ChR1, ChR2, VChR1, ChR2 C128A, ChR2 C128S, ChR2 C128T, híbridos / quimeras ChR1-ChR2, ChD, ChEF, ChF, ChIEF, NpHR, eNpHR, melanopsina, y variantes de las mismas o cualquier proteína sensible a la luz en una célula del ojo, en particular dentro de una célula de la retina, más particularmente dentro de una célula no fotorreceptora (por ejemplo, células amacrinas, células ganglionares de la retina, células bipolares de la retina, (células bipolares ON u OFF de la retina; células bipolares de conos y bastones)). Los vectores de administración de genes pueden ser virales (por ejemplo, derivados de o que contienen secuencias de DNA o RNA viral, preferiblemente empaquetados dentro de una partícula viral), o no viral (por ejemplo, no empaquetados dentro de una partícula viral, incluyendo polinucleótidos "desnudos", ácidos nucleicos asociados con una partícula transportadora, tal como un liposoma o molécula diana, y similares).

Otros vectores de administración de genes a modo de ejemplo se describen a continuación.

25 Vectores adenovirales recombinantes (Ad): Pat. U.S. nº 6,245,330 describe adenovirus recombinantes. Los vectores Ad no se integran en el genoma de la célula huésped, particularmente preferidos cuando se requiere un gen a corto plazo, por lo general alrededor de 14 días. Por lo tanto, el uso de vectores Ad puede requerir repetidas inyecciones intraoculares para tratar una enfermedad de la retina, que continúa durante décadas en el paciente promedio.

30 El tropismo viral de Ad y AAV en la retina puede ser diferente. El subconjunto de células que son transducidas por el vector es generalmente un evento mediado por receptor. Los vectores Ad han demostrado principalmente transducir células de Muller retinianas y células epiteliales del pigmento retiniano después de la inyección. Los vectores AAV son muy eficientes en la transferencia de su carga genética a las células fotorreceptoras de la retina y no fotorreceptoras cuando se inyecta en el ojo.

35 Vectores retrovirales de administración de genes: los vectores de administración de genes pueden ser un vector retroviral de administración de genes adaptados para expresar un gen seleccionado o secuencia de interés (por ejemplo, ChR1, ChR2, VChR1, ChR2 C128A, ChR2 C128S, ChR2 C128T, híbridos / quimeras ChR1-ChR2, ChD, ChEF, ChF, ChIEF, NpHR, eNpHR, melanopsina, y variantes de los mismos). Los vectores de administración de genes retrovirales pueden construirse fácilmente a partir de una amplia variedad de retrovirus, incluyendo por ejemplo, retrovirus de tipo B, C, y D, así como espumavirus y lentivirus. Por ejemplo, en algunos casos, un retrovirus, por ejemplo, un lentivirus, es pseudotipado con una proteína de la cubierta u otra proteína viral para facilitar la entrada en las células diana. En algunos casos, un lentivirus es pseudotipado con la proteína g del virus de la estomatitis vesicular. (Ver RNA Tumor Viruses, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985). Tales retrovirus pueden obtenerse fácilmente a partir de depositarios o colecciones tales como la American Type Culture Collection ("ATCC"; Rockville, Maryland), o aislarse a partir de técnicas conocidas proporcionada en este documento, y técnicas recombinantes estándar (por ejemplo, Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Kunkel, PNAS 52: 488,1985).

50 Además, las porciones de los vectores de administración de genes retrovirales puede derivar de diferentes retrovirus. Por ejemplo, en una realización de la invención, los LTR de retrovirus pueden derivar de un virus del sarcoma murino, un sitio de unión a tRNA de un virus del sarcoma de rous, una señal de empaquetamiento de un virus de la leucemia murina, y un origen de síntesis de la segunda hebra de un virus de la leucosis aviar.

55 Las construcciones de vectores retrovirales se proporcionan comprenden un LTR 5', un sitio de unión a tRNA, una señal de empaquetamiento, una o más secuencias heterólogas, un origen de síntesis de la segunda cadena de DNA y un LTR 3', en el que la construcción del vector carece de secuencias de codificación gag, pol o env.

60 Se pueden utilizar del mismo modo otros vectores de administración de genes retrovirales, y son bien conocidos en la técnica.

Las líneas celulares de empaquetamiento adecuadas para su uso con lo descrito anteriormente se pueden preparar fácilmente construcciones de vectores retrovirales de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, y se utilizan para crear líneas celulares productoras para la producción de partículas de vectores recombinantes.

65 Vectores de administración de alfavirus: los vectores de administración de genes adecuados para su uso también

pueden basarse en los vectores de alfavirus. Por ejemplo, el virus Sindbis es el miembro prototipo del género alfavirus de la familia togavirus. El RNA genómico no segmentado (RNA 49S) del virus de Sindbis es de aproximadamente 11.703 nucleótidos de longitud, contiene un cap 5' y una cola 3' poli-adenilada, y muestra polaridad positiva. El virus con cubierta Sindbis infeccioso se produce mediante el montaje de las proteínas de la nucleocápside viral en el RNA genómico viral en el citoplasma y en ciernes a través de la membrana celular incrustado con glicoproteínas codificadas en el virus. La entrada de virus en las células se realiza mediante endocitosis a través de fosos recubiertos de clatarina, la fusión de la membrana viral con la del endosoma, la administración de la nucleocápside, y el descubrimiento del genoma viral. Durante la replicación viral el RNA 49S genómico sirve como molde para la síntesis de la cadena negativa complementaria. Esta cadena negativa a su vez sirve como plantilla para el RNA genómico y un RNA 26S subgenómico iniciado internamente.

Las proteínas virales Sindbis no estructurales se traducen a partir del RNA genómico mientras que las proteínas estructurales se traducen del RNA 26S subgenómico. Todos los genes virales se expresan como una poliproteína y se procesan en proteínas individuales mediante escisión proteolítica postraduccion. La secuencia de empaquetamiento reside dentro de la región codificante no estructural, por lo tanto, sólo el RNA 49S genómico se empaqueta en viriones.

Varios sistemas de vectores Sindbis diferentes pueden ser contruidos y utilizados. Ejemplos representativos de tales sistemas incluyen los descritos en las Patentes Estadounidenses N° 5.091.309 y 5.217.879, y la Publicación PCT N° WO 95/07994.

Otros vectores de administración de genes virales. Además de los vectores retrovirales y vectores de alfavirus, también pueden utilizarse numerosos sistemas de vectores virales diferentes como vectores de administración de genes. Los ejemplos representativos de tales vectores de administración de genes incluyen virus tales como el virus de la viruela, tales como el virus de la viruela del canario o virus vaccinia

Vectores no virales de administración de genes: además de los anteriores vectores basados en virus, pueden igualmente utilizarse numerosos vectores de administración de genes no virales. Los ejemplos representativos de tales vectores de administración de genes incluyen la entrega directa de vectores de expresión de ácido nucleico, DNA desnudo (por ejemplo, el DNA no contenido en un vector viral) (WO 90/11092), el DNA condensado policatiónico ligado o sin forro a adenovirus muerto (Curiel et al., Hum. Gene Ther. 3: 147-154, 1992), ligando de DNA unido a un ligando con o sin uno de los pares de alta afinidad descritos anteriormente (Wu et al, R of Biol. Chem. (264: 16985-16987, 1989), liposomas que contienen ácidos nucleicos (por ejemplo, WO 95/24929 y WO 95/12387) y ciertas células eucarióticas.

Secuencias reguladoras

Se utilizan secuencias o elementos reguladores para permitir la focalización específica en el tipo de célula o tipo de tejido de ChR1, ChR2, VChR1, ChR2 C128A, ChR2 C128S, ChR2 C128T, híbridos / quimeras ChR1-ChR2, ChD, ChEF, ChF, ChIEF, NpHR, eNpHR, melanopsina, y variantes de los mismos. En aspectos relacionados los elementos reguladores se utilizan para dirigirse específicamente a las neuronas de la retina, o células bipolares de la retina (por ejemplo, células bipolares de la retina ON u OFF; células bipolares de conos y bastones), o células ganglionares de la retina, o células fotorreceptoras, o células amacrinas. Ejemplos de secuencias reguladoras o elementos incluyen, pero no se limitan a las secuencias de promotor, silenciador, potenciador, y de aislantes.

En algunos aspectos las secuencias reguladoras tales como promotores adecuados para su uso en la presente descripción incluyen promotores constitutivos, promotores fuertes (por ejemplo, promotores de CMV), promotores inducibles y promotores específicos de tejido o específicos de la célula (por ejemplo, promotores que facilitan preferentemente la expresión en un número limitado de tejidos o tipos de células (por ejemplo, los tejidos del ojo, la retina, células de la retina, células fotorreceptoras, y similares).

Se puede utilizar cualquiera de una variedad de secuencias reguladoras en los vectores de administración de genes para proporcionar un nivel adecuado o patrón de expresión de la proteína sensible a la luz de interés. Las secuencias reguladoras derivan generalmente de secuencias reguladoras eucariotas.

Se pueden usar elementos reguladores específicos no celulares. En un aspecto, el promotor comprende (desde 5' a 3') un promotor viral (un promotor temprano inmediato de CMV), y un promotor de beta-actina (elemento promotor exón 1-intrón 1 beta-actina bovino o de pollo) o, el promotor comprende (a partir de 5' a 3') potenciador temprano inmediato de CMV (381 pb) / elemento promotor exón 1-intrón 1 beta-actina bovino o de pollo (CBA) (1352 pb), que en conjunto se denominan en el presente documento "promotor CBA "(Figura 7). En algunos casos un ácido nucleico que codifica una proteína sensible a la luz se libera a una célula usando un vector viral tal como AAV que lleva un DNA que codifica el transgén sensible a la luz seleccionado regulado mediante un promotor específico no celular y / o otras secuencias reguladoras que expresan el producto de DNA. En algunos aspectos el promotor no específico de la célula es un promotor general tal como un promotor basado en ubiquitina, por ejemplo, un promotor de ubiquitina C.

Por otra parte, una proteína sensible a la luz se libera a un tipo de célula o tipo de tejido de interés utilizando un vector viral como AAV que lleva un DNA seleccionado codificado por un transgén sensible a la luz regulado por un promotor y / u otras secuencias reguladoras que expresa el producto de DNA en células seleccionadas de la retina de un sujeto. En aspectos específicos, la expresión está dirigida a determinados tipos de células dentro de la retina a través del uso de una secuencia promotora de nucleótidos específica y / o otras regiones reguladoras, tales como secuencias de silenciador, potenciador, o aislante que se diseñan en el vector. También diferentes secuencias reguladoras se pueden utilizar para dirigir la expresión de diferentes genes diseñados en diferentes poblaciones de células.

En otros casos se utilizan secuencias reguladoras específicos de células bipolares de retina como secuencias de promotor, potenciador, silenciador, y aislantes. En casos específicos las células bipolares ON son las dianas. En otros casos, las células bipolares OFF son las dianas. Además, las células bipolares de bastones son las dianas. En otros aspectos las células bipolares de conos son las dianas.

En un aspecto específico la expresión de una proteína sensible a la luz en las células bipolares ON está dirigida usando una proteína sensible a la luz como ChR1, ChR2, VChR1, ChR2 C128A, ChR2 C128S, ChR2 C128T, híbridos / quimeras ChR1-ChR2, ChD, ChEF, ChF, ChIEF, NpHR, eNpHR, melanopsina, y variantes del mismo operativamente ligado a una secuencia reguladora GRM6 (receptor de glutamato metabotrópico 6, mGluR6) o un fragmento del mismo. En una realización se utiliza la secuencia reguladora mGluR6 de longitud completa.

En otro aspecto específico la expresión de una proteína sensible a la luz en las células bipolares ON está dirigida usando una proteína sensible a la luz, como ChR1, ChR2, VChR1, ChR2 C128A, ChR2 C128S, ChR2 C128T, híbridos / quimeras ChR1-ChR2, ChD, ChEF, ChF, ChIEF, NpHR, eNpHR, melanopsina, y sus variantes operativamente ligado a un fragmento de secuencia reguladora mGluR6. En un aspecto específico, el fragmento de secuencia reguladora mGluR6 es la secuencia presentada en la Figura 6. En un aspecto relacionado el fragmento de secuencia reguladora mGluR6 es sustancialmente la misma que la secuencia presentada en la Figura 6, o es aproximadamente 60% idéntica, o es aproximadamente un 70 % idéntica, o es aproximadamente un 80% idéntica, o es aproximadamente un 90% idéntica, o es aproximadamente un 95% idéntica a la secuencia presentada en la Figura 6.

Muchos promotores conocidos son demasiado grandes para caber en el genoma del AAV. De hecho, la secuencia reguladora específica de la célula original para mGluR6 (Dhingra, 2008) era demasiado grande (aproximadamente 10,5 Kb) para ser utilizado en AAV. En una realización preferida de la presente invención, se utiliza un fragmento de secuencia reguladora mGluR6, uno que es lo suficientemente pequeño para ser utilizado en la administración mediada por AAV. En realizaciones relacionadas el fragmento de secuencia reguladora mGluR6 es menos de aproximadamente 2000 pares de bases, menos de aproximadamente 1000 pares de bases, menos de aproximadamente 750 pares de bases, menos de aproximadamente 500 pares de bases, menos de aproximadamente 250 pares de bases, o menos de aproximadamente 100 bases pares de longitud. En otra realización relacionada, el fragmento de secuencia reguladora mGluR6 es una variante de la secuencia presentada en la Figura 6.

En otro aspecto, la expresión específica de proteínas sensibles a la luz en las células bipolares ON está dirigido usando una proteína sensible a la luz, como ChR1, ChR2, VChR1, ChR2 C128A, ChR2 C128S, ChR2 C128T, híbridos / quimeras ChR1-ChR2, ChD, ChEF, ChF, ChIEF, NpHR, eNpHR, melanopsina, y variantes de los mismos unidos operativamente a una secuencia reguladora GNA01 (proteína de unión a nucleótidos de guanina (proteínas G), polipéptido O con actividad activadora alfa). En un aspecto relacionado la secuencia reguladora es sustancialmente la misma que la secuencia GNA01, o es aproximadamente un 60% idéntica, o es aproximadamente un 70% idéntica, o es aproximadamente un 80% idéntica, o es aproximadamente un 90% idéntica, o es aproximadamente un 95% idéntica a la secuencia GNA01.

Células bipolares de la retina y localización

Aunque sólo una fracción del sistema visual humano, la retina es un sistema complejo que filtra, amplifica, y modula la señal visual antes de que se envíe al resto del sistema visual (Wassle 2004). La gran mayoría de este procesamiento sucede dentro de la capa plexiforme interna (IPL) donde un sistema de células bipolares y amacrinas refinan la señal visual en sus componentes primarios (por ejemplo, movimiento, contraste, resolución) (Mills 1999; Roska 2001). Algunos grupos están actualmente dirigidos a ChR2 en la capa de células ganglionares, que se salta el poder de procesamiento del IPL y el sistema de células amacrinas (Bi 2006; Greenberg 2007; Tomita 2007). Estos grupos han presentado muy pocos cambios en su comportamiento.

La mayoría de las células de la retina son de tipo ON-centro (aumento de la tasa de disparos, como resultado de un incremento gradual de contraste en el centro del campo receptivo) o de tipo OFF-centro (aumento de la tasa de disparos, como resultado de una disminución gradual de contraste en el centro del campo receptivo), trabajando de manera inhibitoria en forma de acción-reacción (Wassle 2004). A fin de mantener esta relación entre las dos vías, estas dos vías pueden accionarse de forma independiente. Los canales de información ON y OFF viajan de células bipolares a ganglionares están modulados parcialmente a través de una red de células amacrinas inhibitorias dentro

de la capa nuclear interna (Roska 2001). Esta red bipolar amacrina produce canales paralelos de información distintos temporalmente: neuronas con actividad sostenida, por ejemplo, mantiene la actividad a lo largo del paso de luz, mientras que las neuronas con actividad transitoria tienen actividad sólo en la activación o desactivación. Estos distintos patrones codifican la respuesta para la información visual, luminancia, forma, bordes, y movimiento (Wassle 2004). En algunas realizaciones, las células que son pre-sinápticas a las células ganglionares de la retina están dirigidas genéticamente para mantener el naturalismo de estas vías y provocar la activación naturalista de las células ganglionares.

En algunos casos, las células bipolares de la retina (por ejemplo, células bipolares de la retina ON u OFF; células bipolares de conos y bastones) están localizadas genéticamente. La localización de células bipolares de la retina puede permitir responder a la retina a la luz externa y, sobre todo, transmitir información de la imagen significativa al cerebro, incluso en ausencia de fotorreceptores naturales.

Condiciones susceptibles de tratamiento

En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona AAV para su uso en métodos de tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad o trastorno como se define por las reivindicaciones. Las composiciones y métodos descritos aquí pueden ser utilizados para tratar enfermedades y trastornos del sistema nervioso central y periférico.

En un aspecto, las composiciones de esta invención se utilizan para tratar enfermedades fotorreceptoras. Las enfermedades fotorreceptoras como la retinitis pigmentosa (RP) y la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE) causa la ceguera (Congdon 2004) en 15 millones de personas en el mundo (Chadcr 2002), un número que se incrementa con la edad de la población. Ha habido intentos de restaurar la función visual básica a través de la terapia de reemplazo de genes o trasplante celular (Acland 2001, Acland 2005, Batten 2005, Pawlyk 2005, Aguirre 2007, MacLaren 2006). Sin embargo, los enfoques actuales están fundamentalmente limitados en alcance y la magnitud del impacto potencial, ya que intentan corregir mecánicamente distintas vías genéticas en una base de uno cada vez (Punzo 2007). Enfermedades de fotorreceptores son genéticamente diversas, con más de 160 mutaciones diferentes que conducen a la degeneración (Punzo 2007). También ha habido esfuerzos en la utilización de la estimulación eléctrica con implantes prótesis retinales agudos, semi-agudos y de largo plazo en sujetos humanos (de Balthasar, 2008; Horsager, 2009). Han mostrado un progreso elemental pero no son específicas de gen, la estimulación eléctrica sólo ofrece especificidad bruta e indiscriminadamente impulsa canales visuales de información mediados por tipos de células únicas. La activación de neuronas de la retina requiere grandes electrodos de disco (al menos 20 veces el diámetro de una célula ganglionar de la retina), lo que lleva a la estimulación de amplias áreas de la retina de una manera no selectiva, lo que limita en gran medida la resolución visual alcanzable (Winter 2007). En este aspecto, las composiciones y métodos de esta invención consisten en la introducción de un gen que codifica una proteína sensible a la luz (por ejemplo, ChR1, ChR2, VChR1, ChR2 C128A, ChR2 C128S, ChR2 C128T, híbridos / quimeras ChR1-ChR2, CHD, Chef, CHF, Ch1EF, NpHR, eNpHR, melanopsina, y variantes de los mismos) para inducir sensibilidad a la luz en las neuronas de segundo orden (por ejemplo, células bipolares) liberadas usando un vector viral tal como un AAV8 con una sola mutación de tirosina a fenilalanina, bajo el control de un elemento regulador (por ejemplo, GRM6). La activación de estas proteínas sensibles a la luz podría estar controlado por la luz ambiental o a través de un dispositivo de liberación de luz tal como las gafas descritas en la Figura 13.

Los métodos de la descripción pueden usarse para tratar (por ejemplo, antes o después de la aparición de los síntomas) a un sujeto susceptible o sujeto diagnosticado con una variedad de enfermedades de los ojos. La enfermedad de los ojos puede ser resultado del medio ambiente (por ejemplo, daño químico, daño térmico, y similares), daño mecánico (por ejemplo, lesión por accidente o cirugía), o factores genéticos. El sujeto que tiene la afección puede tener uno o ambos ojos afectados, y la terapia puede ser administrada de acuerdo con la invención en el ojo afectado o para un ojo en riesgo de degeneración de los fotorreceptores debido a la presencia de una condición tal en el otro ojo.

La presente descripción proporciona usos que generalmente comprenden la etapa de administrar intraocularmente (por ejemplo, por inyección subretiniana o por inyección intravítrea) un vector de administración de genes que dirige la expresión de una proteína sensible a la luz a los ojos para tratar, prevenir, o inhibir la aparición o progresión de una enfermedad ocular. Según se utiliza aquí, se debe entender que los términos "tratado, prevenido o inhibido" se refiere a la alteración de un inicio de la enfermedad, curso, o el progreso de una manera estadísticamente significativa.

Otra condición susceptible de tratamiento mediante los AAV de la invención es la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE). La mácula es una estructura cerca del centro de la retina que contiene la fovea. Esta parte especializada de la retina es responsable de la visión de alta resolución que permite actividades tales como la lectura. La pérdida de la visión central en la DMAE es devastador. Los cambios degenerativos a la mácula (maculopatía) pueden ocurrir en casi cualquier momento en la vida, pero son mucho más frecuentes con la edad. Los tratamientos convencionales son de corta duración, debido a la neovascularización coroidea recurrente. La DMAE tiene dos procesos patológicos principales, la neovascularización coroidea (CNV) y la muerte de las células fotorreceptoras de la mácula.

Los ejemplos de condiciones de particular interés que son susceptibles de tratamiento usando los AAV de la invención incluyen, pero no se limitan necesariamente a, retinitis pigmentosa (RP), retinopatía diabética y glaucoma, incluyendo glaucoma de ángulo abierto (por ejemplo, glaucoma primario de ángulo abierto), glaucoma de ángulo cerrado, y glaucomas secundarios (por ejemplo, glaucoma pigmentario, glaucoma pseudoexfoliativo y glaucomas resultantes de traumas y enfermedades inflamatorias).

Otros ejemplos de condiciones susceptibles de tratamiento usando los AAV de la invención incluyen, pero no se limitan necesariamente a, desprendimiento de retina, maculopatías relacionadas con la edad u otras maculopatías, retinopatías fótica, retinopatías inducidas por cirugía, retinopatías tóxicas, retinopatía prematura, retinopatías debido a trauma o lesiones penetrantes del ojo, degeneraciones de la retina heredadas, retinopatías inducida por cirugía, retinopatías tóxicas, retinopatías debido a trauma o lesiones penetrantes del ojo.

Ejemplos específicos de condiciones heredadas de interés para el tratamiento utilizando los AAV de la invención incluyen, pero no se limitan necesariamente a, síndrome de Bardet-Biedl (autosómica recesiva); Amaurosis congénita (autosómica recesiva); distrofia de cono o de conos y bastones (forma autosómica dominante y ligada al cromosoma X); ceguera nocturna congénita estacionaria (forma autosómica dominante, autosómica recesiva y ligada al cromosoma X); degeneración macular (forma autosómica dominante y autosómica recesiva); atrofia óptica, (forma autosómica dominante y ligada al cromosoma X); retinitis pigmentosa (forma autosómica dominante, autosómica recesiva y ligada al cromosoma X); retinopatía sindrómica o sistémica (forma autosómica dominante, autosómica recesiva y ligada al cromosoma X); y el síndrome de Usher (autosómico recesivo).

En otro aspecto, las composiciones y los usos de esta invención se utilizan para tratar la lesión periférica, nocicepción, o dolor crónico. La nocicepción (dolor) durante períodos prolongados de tiempo puede dar lugar a dolor crónico y puede surgir de una lesión o enfermedad a estructuras viscerales, somáticos y neuronales en el cuerpo. Aunque la gama de tratamientos farmacológicos para el dolor neuropático ha mejorado en la última década, muchos pacientes no reciben analgesia eficaz, e incluso medicamentos eficaces a menudo producen efectos secundarios indeseables. La sustancia P (SP) está implicada en la nocicepción, la transmisión de información sobre el daño tisular de los receptores periféricos al sistema nervioso central que se convierte en la sensación de dolor. Se ha teorizado que juega un papel en la fibromialgia. Se sugiere un papel de la sustancia P en la nocicepción por la reducción de los umbrales de respuesta a los estímulos nocivos mediante la administración central de agonistas de NK1 y NK2. Los comportamientos de dolor inducidos por la estimulación mecánica, térmica y química de los tejidos somáticos y viscerales fueron reducidos en los ratones mutantes que carecen de SP / NKA. Las proteínas sensibles a la luz pueden silenciar la actividad de neuronas sobre-activadas (es decir, neuronas periféricas que expresan sustancia P) debido a una lesión periférica o dolor crónico usando NpHR o eNpHR. NpHR / eNpHR puede dirigirse genéticamente a las células que expresan la sustancia P utilizando la secuencia promotor de la sustancia P. En otro aspecto, las proteínas sensibles a la luz mejoran la actividad de las neuronas que están inactivas debido a una lesión periférica o dolor crónico.

En otro aspecto las composiciones y usos de esta invención se utilizan para tratar la lesión de la médula espinal y / o enfermedades de las neuronas motoras. La lesión de la médula espinal puede causar mielopatía o daño a la sustancia blanca y tractos de fibras mielínicas que llevan señales sensoriales y motoras hacia y desde el cerebro. También puede dañar la materia gris en la parte central de la columna vertebral, causando pérdidas segmentarias de interneuronas y neuronas motoras. La lesión de la médula espinal puede ocurrir por muchas causas, incluyendo, pero sin limitarse a trauma, tumores, isquemia, desarrollo anormal, desarrollo neurológico, trastornos neurodegenerativos o malformaciones vasculares. Las proteínas sensibles a la luz activan los circuitos neuronales dañados para restaurar la función motora o sensorial. También los elementos actúan para permitir el control de las funciones autonómicas y viscerales. En otro caso, los elementos actúan para permitir el control de la función esqueleto somática. El control neural de almacenamiento y evacuación de la orina es complejo y la disfunción puede ser difícil de tratar. Un tratamiento para las personas con síntomas refractarios es la estimulación nerviosa eléctrica continua de las raíces nerviosas sacras utilizando electrodos implantados y un generador de impulsos implantado. Sin embargo, la estimulación de esta raíz nerviosa puede resultar en diferentes complicaciones o efectos secundarios. Ser capaz de controlar directamente el nervio sacro a través de herramientas genéticamente dirigidas sería muy beneficioso. Tanto ChR2 y NpHR podrían expresarse en este nervio para controlar el almacenamiento y la evacuación de la vejiga.

En otro aspecto, las composiciones y usos de esta invención se utilizan para tratar la enfermedad de Parkinson. La enfermedad de Parkinson pertenece a un grupo de condiciones llamadas trastornos del movimiento. Se caracterizan por rigidez muscular, temblor, una ralentización del movimiento físico (bradiquinesia) y, en casos extremos, una pérdida de movimiento físico (aquinesia). Los síntomas primarios son los resultados de la disminución de la estimulación de la corteza motora de los ganglios basales, normalmente causada por la formación insuficiente y acción de la dopamina, que se produce en las neuronas dopaminérgicas del cerebro. La enfermedad de Parkinson es crónica y progresiva. La estimulación cerebral profunda (DBS) es un tratamiento quirúrgico eficaz para la enfermedad avanzada de Parkinson (EP), con ventajas significativas en la morbimortalidad y la calidad de vida en comparación con las técnicas de lesión como la talamotomía y / o palidotomía. El procedimiento está indicado en pacientes con temblor severo en reposo, que no responden al tratamiento médico convencional o con

complicaciones motoras. Las complicaciones descritas con más frecuencia en el periodo intra y postoperatorio son finalización prematuro del procedimiento, cables mal colocados, hemorragia intracraneal, convulsiones y complicaciones del hardware, mientras que a largo plazo, los síntomas pueden incluir alta disfunción a nivel cognitivo, problemas psiquiátricos y de lenguaje sutil. De hecho, este método de terapia sería mejorado si se pudiera dirigir a tipos celulares específicos dentro de una región dada para evitar estos efectos secundarios. En una realización proteínas sensibles a la luz activan específicamente los circuitos dopaminérgicos.

En otro aspecto específico, las composiciones y usos de esta invención se utilizan para tratar la epilepsia y convulsiones. La epilepsia es un trastorno neurológico que a menudo se caracteriza por convulsiones. Estos ataques son signos y / o síntomas transitorios debidos a la actividad neuronal anormal, excesiva o asincrónica en el cerebro. Más del 30% de las personas con epilepsia no tienen control de las crisis, incluso con los mejores medicamentos disponibles. La epilepsia no es una sola enfermedad, sino más bien como un grupo de síndromes con síntomas muy divergentes pero todos involucran la actividad eléctrica anormal episódica en el cerebro. La estimulación cerebral profunda aguda (DBS) en varios núcleos talámicos y estructuras del lóbulo temporal medio han demostrado recientemente ser eficaces en pequeños estudios piloto. Hay poca información basada en la evidencia sobre los objetivos racionales y parámetros de estimulación. La DBS en la zona amígdalo-hipocámpica ha producido una importante disminución de los recuentos de convulsiones y anomalías en el EEG interictal durante el seguimiento a largo plazo. Los datos de los estudios piloto sugieren que DBS crónicos para la epilepsia puede ser un procedimiento factible, eficaz y seguro. Una vez más, ser capaz de activar genéticamente un subconjunto específico de células mejoraría la calidad de la terapia, así como minimizaría los efectos secundarios generales. Las proteínas sensibles a la luz pueden utilizarse para alterar la actividad eléctrica sincrónica que conduce a convulsiones en estas áreas cerebrales profundas.

En otro aspecto, se utilizan las composiciones y usos de esta invención para liberar mediante estimulación con luz fármacos o vacunas implantadas para la prevención, el tratamiento y mejora de enfermedades.

En otro aspecto, las composiciones y usos de esta invención se utilizan para tratar la enfermedad neurodegenerativa seleccionada de, pero que no se limita a alcoholismo, enfermedad de Alexander, enfermedad de Alper, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, ataxia telangiectasia, enfermedad de Batten (también conocida como enfermedad de Spielmeyer-Sjogren-Vogt-Batten), encefalopatía espongiiforme bovina (EEB), dolor crónico, enfermedad de Canavan, síndrome de Cockayne, degeneración corticobasal, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Huntington, demencia asociada al VIH, enfermedad de Kennedy, enfermedad de Krabbe, demencia de cuerpos de Lewy, enfermedad de Machado-Joseph (ataxia espinocerebelosa de tipo 3), esclerosis múltiple, atrofia multisistémica, narcolepsia, enfermedad de Lyme, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedad de Pick, esclerosis lateral primaria, enfermedades priónicas, enfermedad de Refsum, enfermedad de Sandhoffs, enfermedad de Schilder, degeneración combinada subaguda de la médula espinal secundaria a la anemia perniciosa, esquizofrenia, enfermedad Spielmeyer-Vogt-Sjogren-Batten (también conocida como enfermedad de Batten), ataxia espinocerebelosa (varios tipos con características diferentes), atrofia muscular espinal, enfermedad de Steele-Richardson-Olszewski y tabes dorsal.

En otro aspecto, las composiciones y usos de esta invención se utilizan para tratar una enfermedad del desarrollo neurológico seleccionado, pero sin limitarse a trastorno de déficit de atención con hiperactividad (TDAH), trastorno de déficit de atención (TDA), esquizofrenia, trastorno obsesivo compulsivo (TOC), retraso mental, trastornos del espectro autista (TEA), parálisis cerebral, síndrome de frágil X, síndrome de Down, síndrome de Rett, síndrome de Asperger, síndrome de Williams-Beuren, trastorno desintegrativo infantil, trastorno de articulaciones, problemas de aprendizaje (es decir, la lectura o la aritmética), dislexia, trastorno del lenguaje expresivo y trastorno del lenguaje receptivo y expresivo mixto, aptitud verbal o rendimiento. Las enfermedades que pueden resultar de los procesos de desarrollo neurológico aberrantes también pueden incluir, pero no están limitadas a los trastornos bipolares, anorexia, depresión general, convulsiones, trastorno obsesivo compulsivo (TOC), ansiedad, bruxismo, síndrome de Angelman, agresión, arrebatos explosivos, autolesiones, estrés postraumático, trastornos de conducta, trastorno de Tourette, trastorno del movimiento estereotípico, trastorno de estado de ánimo, apnea del sueño, síndrome de las piernas inquietas, disomnias, trastorno paranoide de la personalidad, trastorno de personalidad esquizoide, trastorno esquizotípico de la personalidad, trastorno de personalidad antisocial, trastorno límite de la personalidad, trastorno de personalidad histriónica, trastorno de personalidad narcisista, trastorno de personalidad por evitación, trastorno de personalidad dependiente, trastorno de apego reactivo; trastorno de ansiedad por separación; trastorno de oposición desafiante; dispareunia, piromanía, la cleptomanía, tricotilomanía, adicción al juego, pica, trastornos neuróticos, trastornos relacionados con el alcohol, trastornos relacionados con anfetaminas, trastornos relacionados con la cocaína, abuso de la marihuana, los trastornos relacionados con los opioides, abuso de fenciclidina, trastorno por consumo de tabaco, bulimia nerviosa, trastorno delirante, trastornos sexuales, fobias, trastorno de somatización, enuresis, encopresis, trastorno de la expresión escrita, trastorno del lenguaje expresivo, retraso mental, trastorno de las matemáticas, trastorno de tic transitorio, tartamudez, mutismo selectivo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome de sobrecrecimiento bacteriano, intolerancia a los carbohidratos, esprúe celíaca, infección e infestación, linfangiectasia intestinal, síndrome del intestino corto, esprúe tropical, enfermedad de Whipple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ELA, atrofia muscular espinal, y enfermedad de Huntington. Otros ejemplos, análisis e información sobre los trastornos del neurodesarrollo se pueden encontrar, por ejemplo, a través de la rama de trastornos del desarrollo neurológico del Instituto Nacional de Salud Mental (dirección del sitio web en todo el

mundo en nihm.nih.gov/dptr/b2-nd.cfm). Información adicional sobre los trastornos del desarrollo neurológico también se puede encontrar, por ejemplo, en *Developmental Disabilities in Infancy and Childhood: Neurodevelopmental Diagnosis and Treatment*, Capute y Accardo, eds. 1996, Paul H Brookes Pub Co.; Hagerman, *Neurodevelopmental Disorders: Diagnosis and Treatment*, 1999, Oxford Univ Press; *Handbook of Neurodevelopmental and Genetic Disorders in Children*, Goldstein y Reynolds, eds., 1999, Guilford Press; *Handbook of Neurodevelopmental and Genetic Disorders in Adults*, Reynolds y Goldstein, eds., 2005, Guilford Press; y *Neurodevelopmental Disorders*, Tager-Flusberg, ed., 1999, MIT Press.

Evaluación de la terapia

Los efectos de la terapia como se describe en el presente documento se pueden evaluar de varias maneras, utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la visión del sujeto puede analizarse de acuerdo con métodos convencionales. Tales métodos convencionales incluyen, pero no se limitan necesariamente a, electroretinograma (ERG), ERG focal, pruebas de campo visual, pruebas de agudeza visual, tomografía ocular de coherencia (OCT), fotografía del fondo, potenciales evocados visuales (PEV) y pupilometría. En otros casos, se puede evaluar el comportamiento del sujeto. En general, la terapia proporciona el mantenimiento de la visión de un sujeto (por ejemplo, la prevención o inhibición de la pérdida de la visión de una mayor pérdida de la visión debido a la degeneración de los fotorreceptores), disminuye la aparición o progresión de la pérdida de la visión, o, proporciona visión mejorada con respecto a la visión del sujeto antes de la terapia.

Métodos de administración

Los vectores de administración de genes de la presente invención pueden liberarse al ojo a través de diferentes rutas. Se pueden administrar por vía intraocular, mediante la aplicación tópica en el ojo o por inyección intraocular en, por ejemplo el vítreo (inyección intravítrea) o espacio inter-fotorreceptor subretinal (inyección subretiniana). Alternativamente, pueden liberarse localmente por inserción o inyección en el tejido que rodea el ojo. Se pueden administrar sistémicamente a través de una vía oral o por inyección subcutánea, intravenosa o intramuscular. Alternativamente, pueden liberarse por medio de un catéter o por medio de un implante, en el que dicho implante está hecho de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas tales como membranas de silastic o fibras, polímeros biodegradables, o material proteico. El vector de administración de genes se puede administrar antes de la aparición de la condición, para prevenir su aparición, por ejemplo, durante la cirugía en el ojo, o inmediatamente después de la aparición de la condición patológica o durante la ocurrencia de una condición aguda o prolongada.

En otro aspecto, la membrana limitante interna (ILM) se descompone para efectuar la administración. La ILM es el límite entre la retina y el cuerpo vítreo, formada por astrocitos y los pies de las células de Muller. En ambos primates no humanos y seres humanos, la ILM es gruesa y proporciona una barrera sustancial para la retina. De hecho, usando inyecciones intravítreas, la mayoría de las partículas virales son incapaces de transducir células de la retina. En una realización, para mejorar la eficiencia de transducción, se lleva a cabo una separación de la ILM mediante un procedimiento quirúrgico que comprende pelar una pequeña parte de la ILM. En otro aspecto, para mejorar la eficiencia de transducción, la barrera ILM puede ser parcial o totalmente separada comprendiendo el uso de técnicas enzimáticas y una o más enzimas.

En un aspecto, la ILM se mantiene para limitar el efecto terapéutico de la proteína sensible a la luz a la mácula. En otra realización, el procedimiento de exfoliación de ILM descrito en este documento se utiliza para lograr una distribución más amplia de la proteína sensible a la luz.

El vector de administración de genes puede ser modificado para mejorar la penetración de la barrera remato-retiniana. Tales modificaciones pueden incluir el aumento de la lipofilia de la formulación farmacéutica en la que se proporciona el vector de administración de genes.

El vector de administración de genes se puede entregar solo o en combinación, y puede ser liberado junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Idealmente, tal vehículo aumentaría la estabilidad y / o propiedades de administración. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen el factor activo o fragmento o derivado del mismo, que se pueden administrar utilizando un vehículo adecuado tal como liposomas, micropartículas o microcápsulas. En diversos aspectos de la invención, puede ser útil usar tales composiciones para lograr la administración sostenida del componente activo.

La cantidad de vector de administración de genes (por ejemplo, el número de partículas virales), y la cantidad de proteína sensible a la luz expresada, eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección particular puede depender de la naturaleza del trastorno o afección y una variedad de factores específicos del paciente, y puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar.

Los vectores de administración de genes se pueden administrar al ojo, intraocularmente en una serie de lugares dentro del ojo, dependiendo del tipo de enfermedad a tratar, prevenir, o inhibir, y la extensión de la enfermedad. Ejemplos de ubicaciones apropiadas incluyen la retina (por ejemplo, para enfermedades de la retina), el vítreo, o en

otros localizaciones de la retina o adyacentes a la retina o en el ojo o adyacentes al ojo.

La retina humana se organiza en un mosaico bastante exacto. En la fovea, el mosaico es un empaquetamiento hexagonal de conos. Fuera de la fovea, los bastones rompen el empaquetamiento compacto hexagonal de los conos, pero todavía permiten una arquitectura organizada con conos más espaciados uniformemente rodeados por anillos de bastones. Así, en términos de densidades de las diferentes poblaciones fotorreceptoras en la retina humana, es evidente que la densidad de conos es más alta en el foso foveal y cae rápidamente fuera de la fovea a una densidad bastante uniforme en la retina periférica (ver Osterberg, G. (1935) Topography of the layer of rods and cones in the human retina. Acta Ophthal. (supl.) 6,1-103; véase también Curcio, C.A., Sloan, K.R., Packer, O., Hendrickson, A.E. y Kalina, R.E. (1987) Distribution of cones in human and monkey retina: individual variability and radial asymmetry. Science 236,579-582).

El acceso a partes deseadas de la retina, o a otras partes del ojo se puede llevar a cabo fácilmente por un experto en la técnica (véase, en general Medical and Surgical Retina: Advances, Controversies, and Management, Hillel Lewis, Stephen J. Ryan, Eds., medical-illustrator, Timothy C. Hengst St. Louis: Mosby, c1994, xix, 534; véase también Retina, Stephen J. Ryan, editor en jefe, 2ª ed, St. Louis, Mo.: Mosby, c1994. 3 v. (xxix, 2559).

La cantidad de vector viral específico aplicado a la retina es uniformemente bastante pequeña ya que el ojo es una estructura relativamente contenida y el agente se inyecta directamente en ella. La cantidad de vector que necesita ser inyectada se determina por la localización intraocular de las células elegidas dirigidas para el tratamiento. El tipo de célula para ser transducida se puede determinar por la entidad de la enfermedad particular que se va a tratar.

Por ejemplo, un único volumen 20 microlitros (por ejemplo, que contiene aproximadamente 10^{11} título de partícula física / ml de rAAV) puede usarse en una inyección subretiniana para tratar la mácula y la fovea de un ojo humano. Una inyección mayor de 50 a 100 microlitros se pueden usar para liberar el rAAV a una fracción sustancial de la zona de la retina, tal vez para toda la retina, dependiendo de la extensión de la propagación lateral de las partículas.

Una inyección de 100 microlitros puede proporcionar varios millones de partículas activas de rAAV en el espacio subretiniano. Este cálculo se basa en un título de 10^{13} partículas físicas por mililitro. De este título, se estima que 1/1000 a 1/10.000 de las partículas de AAV son infecciosas. La anatomía de la retina limita el volumen posible de inyección en el espacio subretiniano (ESR). Asumiendo una máxima inyección de 100 microlitros, esto podría proporcionar un título infeccioso de 10^5 a 10^9 rAAV en el ESR. Esto tendría el potencial de infectar a todos los aproximadamente 150×10^6 fotorreceptores en toda la retina humana con una única inyección.

Volúmenes de inyección más pequeños aplicadas focalmente a la fovea o mácula pueden transfectar adecuadamente toda la región afectada por la enfermedad en el caso de la degeneración macular u otras retinopatías regionales.

Según la aplicación, al menos, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , o más partículas se pueden liberar en el tejido de interés.

Los vectores de administración de genes alternativamente se pueden liberar en el ojo por inyección intraocular en el humor vítreo, por ejemplo, para tratar la pérdida glaucomatosa de células ganglionares de la retina a través de la apoptosis. En el tratamiento de glaucoma, las células diana primarias para ser transducidas son las células ganglionares de la retina, las células de la retina afectadas principalmente. En tal caso, el volumen de inyección del vector de administración de genes podría ser sustancialmente mayor, ya que el volumen no está limitado por la anatomía del espacio subretiniano. Una dosis aceptable en este ejemplo puede variar entre aproximadamente 25 microlitros a 1000 microlitros.

50 Composiciones farmacéuticas

Los vectores de administración de genes se pueden preparar como una composición farmacéuticamente aceptable adecuada para la administración. En general, dichas composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad de un vector de administración de genes adecuados para la administración de un polinucleótido que codifica la proteína sensible a la luz a una célula del ojo para la expresión de una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína sensible a la luz, combinada con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el vehículo farmacéuticamente aceptable es adecuado para la administración intraocular. Vehículos farmacéuticamente aceptables ilustrativos incluyen, pero no se limitan necesariamente a, solución salina o una solución salina tamponada (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato).

Varios excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica. Tal como se utiliza en este documento, "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier material que, cuando se combina con un ingrediente activo de una composición, permite que el ingrediente conserve la actividad biológica, preferiblemente sin causar reacciones perjudiciales con el sistema inmune del sujeto o que afecten negativamente a los tejidos que rodean el sitio de administración (por ejemplo, dentro del ojo).

Los vehículos farmacéuticamente ejemplares incluyen soluciones acuosas o no acuosas estériles, suspensiones, y emulsiones. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los excipientes farmacéuticos estándar tales como solución salina, solución salina tamponada (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), agua, emulsiones tales como emulsión de aceite / agua, y diversos tipos de agentes humectantes.

5 Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, ácido hialurónico, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo.

10 Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas / acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer lactato o aceites fijados. Los vehículos intravenosos pueden incluir reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer), y similares.

15 Una composición de vector de administración de genes descrito en este documento también se puede liofilizar usando medios bien conocidos en la técnica, para la posterior reconstitución y uso de acuerdo con la invención. Cuando el vector es para liberarse sin ser encapsulado en una partícula viral (por ejemplo, como polinucleótido "desnudo"), las formulaciones para la administración liposómica, y formulaciones que comprenden polinucleótidos microencapsulados, también pueden ser de interés.

20 Las composiciones que comprenden excipientes se formulan mediante métodos convencionales bien conocidos (véase, por ejemplo, Remington Pharmaceutical Sciences, Capítulo 43, 14a ed., Mack Publishing Col, Easton PA 18042, EE.UU.).

25 En general, las composiciones farmacéuticas se pueden preparar en diversas formas, preferiblemente una forma compatible con la administración intraocular. Agentes estabilizantes, agentes humectantes y emulsionantes, sales para variar la presión osmótica o tampones para asegurar un valor de pH adecuado también pueden estar presentes opcionalmente en la composición farmacéutica.

30 La cantidad de vector de administración de genes en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, es decir, de menos de aproximadamente un 0,1%, por lo general en o al menos aproximadamente un 2% hasta un 20% a 50% o más en peso, y puede seleccionarse principalmente por volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado.

35 La composición farmacéutica puede comprender otros agentes adecuados para la administración, dichos agentes puedan tener actividades farmacológicas similares o adicionales que la proteína sensible a la luz a liberar (por ejemplo, ChR1, ChR2, VChR1, ChR2 C128A, ChR2 C128S, ChR2 C128T, híbridos / quimeras ChR1-ChR2, ChD, ChEF, ChF, ChIEF, NpHR, eNpHR, melanopsina, y variantes de los mismos).

40 Equipos

También se proporcionan equipos que comprenden diversos materiales para la realización de los usos de la invención. En un aspecto, el equipo comprende un vector que codifica un polipéptido de una proteína sensible a la luz (por ejemplo ChR1, ChR2, VChR1, ChR2 C128A, ChR2 C128S, ChR2 C128T, híbridos/ quimeras ChR1-ChR2, ChD, ChEF, ChF, ChIEF, NpHR, eNpHR, melanopsina y variantes de los mismos), cuyo vector está adaptado para la administración a un sujeto, particularmente en un ojo del sujeto, y adaptado para proporcionar la expresión del polipéptido sensible a la luz en una célula del ojo, particularmente una célula de mamífero. El equipo puede comprender el vector en un vial estéril, que puede estar etiquetado para su uso. El vector puede proporcionarse en una composición farmacéutica. En un aspecto, el vector está empaquetado en un virus. El equipo puede comprender además una aguja y/o jeringa adecuada para su uso con el vial o, alternativamente, contener el vector, y cuya aguja y/o jeringa son preferiblemente estériles. En otro aspecto, el equipo comprende un catéter adecuado para el suministro de un vector en el ojo, cuyo catéter puede estar opcionalmente unido a una jeringa para la administración del vector. Los equipos pueden comprender más instrucciones de uso, por ejemplo las instrucciones con respecto a la vía de administración, la dosis, régimen de dosificación, punto de administración y similares.

55 Dispositivos

Los datos de la Figura 12C demuestran que la administración de proteínas sensibles a la luz puede funcionar en el rango de visión normal. En algunos aspectos, para una mayor eficacia, puede utilizarse un dispositivo interno o externo. En un aspecto, puede utilizarse un dispositivo externo, tal como unas gafas, para la generación y/o amplificación de la luz. En los casos en los que se está tratando un sujeto que tiene una visión parcial, es decir, el tratamiento de un sujeto cuyos fotorreceptores están sólo parcialmente dañados y se está administrando una proteína sensible a la luz, como ChR1, ChR2, VChR1, ChR2 C128A, ChR2 C128S, ChR2 C128T, híbridos/ quimeras ChR1-ChR2, ChD, ChEF, ChF, ChIEF, NpHR, eNpHR, melanopsina y sus variantes, la estimulación se puede ajustar para que los fotorreceptores supervivientes y/o sanos no se saturen con el dispositivo de generación/ amplificación de la luz. En diversas realizaciones, la limitación de la saturación por el dispositivo de generación /

amplificación de la luz se puede lograr mediante i) estimulación de manera uniforme, pero protegiendo las células fotorreceptoras supervivientes o saludables de la luz brillante a través de una protección solar parcial de tipo lente de contacto implantada o externa (tintado sobre los fotorreceptores, claro en el área de transducción de proteínas sensibles a la luz); ii) el ajuste de la intensidad de la estimulación para que coincida con los tipos de células estimulados; o iii) el ajuste de la estimulación para que esté cercana a la parte superior del rango dinámico visual.

En un aspecto, se implanta un dispositivo que genera luz interna.

En otro aspecto, se implanta una óptica de protección o una barrera de tipo lente de contacto, ya sea en conjunto o independiente del dispositivo. Tal óptica o lente de contacto protege los fotorreceptores de la estimulación de la luz. La lente puede estar tintada sobre los fotorreceptores, y ser clara sobre el área de transducción de proteínas sensibles a la luz.

En algunos aspectos se utiliza un dispositivo externo o gafas montadas en la cabeza. En ciertos casos en los que el elemento sensible a la luz no se activa en la medida deseada mediante la luz natural o ambiente, se proporciona un sistema de un producción de luz o fuente de generación adicional, tal como un sistema de disposición de LED/ láser. En ciertas realizaciones las gafas externas pueden incluir adicionalmente una cámara y una unidad de procesamiento de imágenes para el filtrado, mejora, procesamiento y resolución de las imágenes presentadas. La Figura 13 representa un dispositivo de tipo gafas con un elemento de producción de luz asociado (sistema de disposición de LED/ láser) que pueden activar la expresión de las proteínas sensibles a la luz.

Un ejemplo de sistema de cámaras comprendería al menos tres componentes principales: 1) una pequeña cámara incorporada en las gafas, 2) una unidad de procesamiento de imágenes, y 3) un sistema de suministro de luz que incluye uno o ambos, LED o un sistema láser. La cámara o bien podría ser una cámara de lente única o un sistema de cámara dual que potencialmente podría proporcionar información de la profundidad e imagen binocular. La cámara puede capturar tanto luz visible como infrarroja. La cámara puede ser adaptable a diversas condiciones de iluminación o puede ser fija. La unidad de procesamiento de imagen (IPU) puede proporcionar cualquier número de transformaciones de señal incluyendo la amplificación, aumento o disminución de contraste, estructura del movimiento, realce de bordes o filtrado temporal (es decir, la integración). Además, podrían emplearse algoritmos de prominencia de forma que se mejoren sólo ciertos objetos dentro del campo de visión (por ejemplo, los coches en movimiento, entradas por puertas) y los objetos menos importantes (por ejemplo, las nubes), se filtren. El sistema de disposición de iluminación LED y/ o láser podría contener una matriz de LED de alta densidad o un sistema de láser de escaneo que consista en uno (1) o más láseres. La posición de las luces podría fijarse o ser móvil. Por ejemplo, la orientación de las luces con respecto al ojo podría moverse en función de los movimientos del ojo, utilizando un dispositivo de seguimiento del movimiento del ojo como dato de entrada. Esto se representa en la Figura 13.

En otro ejemplo, un dispositivo de intensificación de imagen, como los proporcionados por Telesensory (<http://www.telesensory.com>), puede combinarse con un dispositivo de exploración de la retina (RSD) como el desarrollado por Microvision (<http://www.microvision.com/milprod.html>), para proporcionar un aparato que se lleva en la cabeza capaz de generar una imagen brillante, intensificada directamente a la retina de un paciente con problemas de visión. Brevemente, un RSD proyecta imágenes en la retina de tal manera que un individuo puede ver una imagen más grande, con movimiento completo sin necesidad de pantallas o monitores adicionales. Por lo tanto, mediante la proyección de una imagen intensificada directamente sobre la retina de un individuo con problemas de visión, es posible mejorar la visión en los que se consideran ciegos o casi ciegos.

Aunque aquí se han mostrado y descrito algunas realizaciones de la presente invención, será obvio para los expertos en la técnica que tales realizaciones se proporcionan solo a modo de ejemplo.

Ejemplos

Ejemplo 1: métodos de inyección

Todos los procedimientos en animales se realizaron de acuerdo con la declaración para el uso de animales en investigación oftálmica y de visión de la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología y las directrices del Comité Institucional de Cuidado y Utilización de Animales de la Universidad de Florida.

Para las inyecciones intravitreales, los ratones se anestesiaron con quetamina (72 mg/ kg)/ xilazina (4 mg/ kg) mediante inyección intraperitoneal. Después de la anestesia, se utilizó una jeringa Hamilton equipada con una aguja biselada de calibre 33. La aguja se pasó a través de la esclerótida, en el ecuador junto al limbo, hacia la cavidad vítrea. La inyección se realizó con observación directa de la aguja en el centro de la cavidad vítrea. El volumen total administrado fue de 1,5 µl, que contenía diferentes concentraciones de los vectores AAV probados.

Para las inyecciones subretinianas, una hora antes de la anestesia, los ojos de los ratones se dilataron con gotas oculares de atropina al 1%, seguido por la administración tópica de fenilefrina al 2,5%. Los ratones se anestesiaron con quetamina (72 mg/ kg) / xilazina (4 mg/ kg) por inyección intraperitoneal y se hizo una abertura dentro de la pupila a través de la córnea con una aguja desechable de calibre 30 1/2 y se introdujo una aguja roma sin bisel de

calibre 33 en una jeringa Hamilton a través de la apertura de la córnea hacia el espacio subretiniano y se administraron 1,5 μ l de AAV.

Los títulos típicos de los vectores AAV eran de entre $1,3 \times 10^{12}$ y $3,0 \times 10^{13}$.

Para fines ilustrativos:

Ejemplo 2: Cribado de serotipos de AAV 1, 2, 5, 7, 8 y 9 para la transducción de células de la retina bipolares

Se llevó a cabo un cribado de los vectores virales conocidos y caracterizados para la transducción óptima de células bipolares de la retina. Los AAV serotipos 1, 2, 5, 7, 8 y 9 con proteína verde fluorescente (GFP) se inyectaron por vía subretinal individualmente en ratones RD1 de 4 semanas de edad. Los ratones RD1 homocigotos son portadores de una mutación RD1 y la degeneración de los fotorreceptores de bastón en estos ratones comienza alrededor del día postnatal (P)10 y es casi completa en P21. La GFP se situó bajo el control del promotor fuerte no específico de tipo celular CBA (fusión del potenciador temprano inmediato de CMV y el promotor de β -actina bovina más la unión del exón 1 y el intrón 1). Un mes más tarde, se analizó en los ratones la expresión de GFP. El doble marcaje con el anticuerpo PKC α de los ratones inyectados con AAV7 demostró que las células transducidas eran probablemente fotorreceptores residuales (sin segmento externo) en lugar de células bipolares. Las inyecciones subretinales con AAV7 se realizaron entonces en ratones de 8 semanas de edad, en los que hay menos posibilidad de fotorreceptores residuales. Se encontró que AAV7 era muy efectivo en la transducción de las células bipolares de la retina, dando lugar a la expresión de GFP en al menos un 75% de todas las células bipolares tras una sola inyección (Figura 9). Estas imágenes se obtuvieron 16 semanas después de la inyección, lo que además demuestra que la expresión de GFP utilizando un mecanismo de entrega con AAV7 es estable durante al menos 4 meses. El AAV7 es un serotipo que puede utilizarse para transducir células bipolares de una manera eficaz y estable.

Ejemplo 3: Transducción de células de la retina bipolares con los serotipos AAV5, AAV2 Mutante Y444F y AAV8 Mutante Y733F

Como se muestra en la Figura 10, a los ratones se les inyectó por vía subretinal (ojo derecho) y por vía intravítrea (ojo izquierdo) 1,5 μ l de virus adenoasociados (AAV) de diferentes serotipos. Los serotipos probados incluyeron AAV2, AAV5 y AAV8, todos los cuales son serotipos tradicionales de tipo salvaje. Además, también los serotipos mutados con una única tirosina a fenilalanina AAV2 mutante Y444F y AAV8 mutante Y733F, en los que 444 y 733 indican la localización de la mutación puntual de la tirosina de la cápside viral, respectivamente. El virus contenía la construcción de DNA auto-complementaria GRM6-ChR2-GFP, en la que GRM6 es la secuencia reguladora 6 del receptor de glutamato metabotrópico que conduce la expresión celular específica en células bipolares ON (incluyendo las bipolares de bastón), ChR2 es el gen de la proteína sensible a la luz terapéutica y GFP es el gen marcador.

Las imágenes de la Figura 10 muestran la expresión general de GFP (gen marcador). Esta expresión se muestra como blanco en las imágenes en blanco y negro. Esto es indicativo de que la expresión general de ChR2 como el complejo ChR2-GFP es una proteína fusionada. Tenga en cuenta los rizos de la expresión de GFP en el INL, que muestran que la expresión del complejo de proteínas ChR2-GFP está unida a la membrana. Estos datos muestran que la administración de la construcción con un virus adenoasociado da lugar a una expresión robusta de ChR2-GFP en los 3 modelos de ceguera del ratón (RD1, rd16, y rho -/-). Esto se llevó a cabo con 3 serotipos diferentes utilizando una inyección subretinal (columna 1). Cuando se utilizó un serotipo mutante de tirosina a fenilalanina, fue posible obtener una buena expresión en las células bipolares (INL) utilizando tanto una inyección subretinal como intravítrea. Sin embargo, los serotipos de tipo salvaje requieren una inyección subretinal para obtener transducción razonable de las células bipolares; las inyecciones intravítreas utilizando serotipos de tipo salvaje no transducen eficazmente las células bipolares (columna 2).

Con fines ilustrativos:

Ejemplo 4: Creación de AAV7-GRM6-ChR2 para establecer sensibilidad a la luz en las células bipolares ON de la retina

mGluR6 es un receptor del glutamato metabotrópico acoplada a proteína G, que en la retina se expresa específicamente en células bipolares ON (Tian 2006). Se realizó una construcción del virus adenoasociado de serotipo 7 (AAV7), un fragmento de la secuencia génica reguladora mGluR6 (presentada en la Figura 6), GRM6 y la canalrodopsina-2, ChR2 para formar la construcción AAV7-GRM6-ChR2. Se clonó el cDNA que codifica ChR2 con eGFP aguas abajo (es decir, a 3') del fragmento de secuencia reguladora mGluR6 con el promotor mínimo SV40. No se utilizó IRES; ChR2 y GFP se fusionaron. Esta construcción de vector viral, una vez administrado mediante un mecanismo de entrega viral, y expresado, puede establecer la fotosensibilidad en la retina en las células bipolares con alta resolución espacial y temporal. Este método puede restaurar la capacidad de respuesta de la retina a la información óptica, utilizando la clase ChR2 de moléculas activadas por la luz para sensibilizar directamente las neuronas retinales a la luz.

Ejemplo 5: Creación de AAV8 mutante Y733F-GRM6-ChR2 y AAV8 mutante Y446F-CBA-ChR2 para establecer sensibilidad en las células bipolares ON de la retina.

El uso de una versión mutada de la tirosina-AAV8 (en la ubicación 733), bajo el control del promotor específico de célula bipolar GRM6, en la configuración auto-complementaria, fue posible restaurar la eficacia del comportamiento visual en ratones RD1, como se representa en Figuras 11 y 12. La figura 11 representa el análisis de la expresión de EGFP en las secciones congeladas de la retina mediante inmunohistoquímica 1 mes después de las inyecciones subretinianas con los vectores de tirosina mutante de AAV. Ejemplos de secciones que representan la propagación y la intensidad de fluorescencia de EGFP en toda la retina después de la transducción con el serotipo 2 Y444 (a) o serotipo 8 Y733 (b). Las imágenes están orientadas con el vítreo hacia la parte inferior y la capa de fotorreceptores hacia la parte superior. Fluorescencia EGFP en los fotorreceptores, células del RPE y ganglionares de ojos de ratón inyectado subretinalmente con el serotipo 2 Y444 (c) fluorescencia EGFP en fotorreceptores, células RPE y de Müller después de la administración de serotipo 8 Y733 (d) Detección de procesos en células de Müller (rojo) por inmunotinción con un anticuerpo de glutamina-sintetasa (GS) (e) imagen fusionada que muestra la colocalización de fluorescencia EGFP (verde) y la tinción GS (rojo) en las secciones de la retina de los ojos tratados con serotipo 8 Y733 (f) Barra de Calibración 100 μ M. gcl, capa de células ganglionares; ipl, capa plexiforme interna; inl, capa nuclear interna; onl, nuclear externa; os, segmento externo; rpe, epitelio pigmentario de la retina.

El uso de una versión mutada de la tirosina-AAV8 (en la ubicación 446), bajo el control del promotor no específico de células CBA (fusión del potenciador inmediato temprano de CMV y el promotor de β -actina bovino más la unión de intron1-exon1, y ChR2), en la configuración autocomplementaria, la mayoría o todas las células bipolares pueden ser localizadas y la función visual se restaura como se muestra en la Figura 12.

Ejemplo 6: Creación de AAV5-CBA-ChR2 para establecer sensibilidad en las células bipolares ON de la retina.

Usando el AAV5, con el promotor no específico de células CBA (fusión del potenciador inmediato temprano de CMV y el promotor de β -actina bovino más la unión de intron1-exon1, y ChR2), en la configuración autocomplementaria, todas las células bipolares puede ser localizadas y el comportamiento de la función visual se restaura (Figura 12). Los ratones tratados fueron inyectados subretinalmente (ojo derecho) y por vía intravítrea (ojo izquierdo) con 1,5 μ l de virus adenoasociados (AAV) de diferentes serotipos. Los serotipos probados incluyen AAV2, AAV5 y AAV7, todos los cuales son serotipos tradicionales de tipo salvaje. Además, los únicos serotipos con la tirosina mutada a fenilalanina fueron AAV2 Y444F mutante y AAV8 Y733F mutante, donde 444 y 733 indican la localización de la mutación puntual de la tirosina de la cápside viral, respectivamente. El virus contenía el DNA autocomplementario de la construcción GRM6-ChR2-GFP, donde GRM6 es la secuencia reguladora que dirige la expresión específica de la célula en las células bipolares ON (incluyendo bastones bipolares), ChR2 es el gen de la proteína sensible a la luz terapéutica, y GFP es el gen marcador.

Estos ratones fueron entrenados en el laberinto de agua Figura 12A durante 14 días (7 días para los ratones de tipo salvaje) y se registró el tiempo para encontrar el objetivo (una plataforma negra con un fuente de luz LED de 4x6). La figura 12B muestra el promedio de tiempo que tardaron los ratones tratados, los ratones de tipo salvaje y los ratones sin tratar en encontrar el objetivo, como una función de la sesión de entrenamiento. Tanto los grupos tratados y los no tratados contenían muestras de los grupos rd1, rd16 y rho - / - (diferentes modelos de ceguera en ratón que tienen diferentes tipos de mutaciones genéticas que conducen a la enfermedad de los fotorreceptores). Estos datos demuestran que los ratones tratados con ChR2 son capaces de aprender una tarea de comportamiento mediante el uso de la información visual, lo que sugiere que una proteína sensible a la luz tal como ChR2 tiene la capacidad de restaurar por lo menos alguna función visual.

El rendimiento de los animales en la tarea se evaluó entonces con diferentes niveles de luz. La Figura 12C muestra el promedio de tiempo que tardaron los ratones rd1, rd16 y rho - / - tratados, inyectados con placebo (los ratones inyectados con placebo representan un promedio de rd1, rd16 y rho - / - sin tratar), y ratones de tipo salvaje para encontrar el objetivo, como una función de la intensidad de la luz. Estos datos muestran que los ratones tratados pueden realizar la tarea en múltiples niveles de luz y su rendimiento depende de la cantidad de luz presentada.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un ácido nucleico recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína sensible a la luz unido operativamente a un fragmento de una secuencia reguladora del receptor de glutamato metabotrópico 6 (mGluR6), en el que el fragmento comprende la secuencia de la Figura 6 o una secuencia que es al menos un 80% idéntica a la secuencia de la Figura 6, en el que el fragmento es de menos de 2.000 pares de bases, y en el que el ácido nucleico se encapsida dentro de un virus adenoasociado recombinante (AAV) de serotipo AAV2 que comprende una proteína de la cápside Y444F mutado o encapsidado dentro de una AAV recombinante de serotipo AAV8 que comprende una proteína de la cápside Y733F mutado y en el que el ácido nucleico es capaz de ser expresado específicamente en una célula bipolar de la retina.
- 10
- 15 2. El ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde la proteína sensible a la luz se selecciona de entre el grupo que consiste en ChRI, ChR2, VChRI, ChR2 C128A, ChR2 C128S, ChR2 C128T, híbridos / quimeras ChR1-ChR2, ChD, ChEF, ChF, ChIEF, NpHR, eNpHR y melanopsina.
- 20 3. El ácido nucleico de la reivindicación 1 en donde la proteína sensible a la luz es ChR2 o una proteína sensible a la luz que es al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90% o al menos un 95% idéntica a ChR2.
- 25 4. El ácido nucleico de la reivindicación 1 en el que el fragmento comprende menos de 1.000 pares de bases, menos de 750 pares de bases, menos de 500 pares de bases o menos de 250 pares de bases.
- 30 5. Un AAV que comprende el ácido nucleico recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 encapsidado como se define en las reivindicaciones 1-4 para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que sufre de una enfermedad o trastorno del ojo, comprendiendo dicho método introducir dicho AAV en un ojo afectado.
- 35 6. El AAV para su uso de acuerdo con la reivindicación 5 en el que la enfermedad o trastorno está provocada por la degeneración de las células fotorreceptoras.
- 40 7. El AAV para su uso según la reivindicación 5 en el que el fragmento de secuencia reguladora mGluR6 está representado por la secuencia en la Figura 6.
8. El AAV para su uso según la reivindicación 5 en el que el AAV se introduce mediante inyección intravítrea, inyección subretiniana y / o desprendimiento de ILM.
9. El AAV para uso de acuerdo con la reivindicación 5 en el que el AAV se introduce en una célula bipolar de la retina.
10. El AAV para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el método comprende además utilizar un dispositivo de generación de luz externa al ojo.
11. El AAV que comprende el ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 encapsidados como se define en las reivindicaciones 1-4 para su utilización en terapia.

ES 2 538 468 T3

ChR1

```

1 gcggttgcttg actacgcttc gctgtaataa tagcagcgcc acaagtagtg tcgccaalaca
61 actctcactt tgagcttgag cacaccgctg agccccgatg tcgcgagggc catggcttct
121 tgccttagcg ctggcagtg cgctggcggc cggcagcgca ggagcctcga ctggcagtg
181 cgcgacggtg cgggtcgcga ctcaggatgg ccccgactac gttttccacc gtgcccacga
241 cgcgatgctc ttccaaacct catacactct tgagaacaat ggttctgta tttgcatccc
301 gaacaacggc cagtgtctct gcttggttg gcttaaatcc aacggaacaa atgcccagaa
361 gttggctgcc aacattctgc agtggattac ttttgcgctt tcagcgctct gcctgatgtt
421 ctacggctac cagacctgga agtctacttg cgctgggag gagatttac tggccacgat
481 cgagatgatc aagtccatca tcgagtattt ccatgagttt gacgaacctg cggatgatca
541 ctcatccaac ggcaacaaga cgtgtggct tcgttacgcg gattggctgc tgacctgcc
601 tgtcattctt atccatctga gcaaccttac gggcttggcg aacgactata acaagcgtac
661 catgggtctg ctgggtgcag atatcggcac gatcgtgtgg ggaccacagg ccgctgtctc
721 caagggatac gtccgtgtca ttttcttctt gatgggcttg tgctacggca tctacacatt
781 ctccaacgca gccaaagttt acattgaggc gtaccacacc gtgcccacgg gcatttgccg
841 cgacctggtc cgtaccttg cctggctcta cttctgttca tgggtatgt tcccgggtgt
901 gttcctgctg ggccccgagg gctttggcca catcaacca tcaactctg ccatcgcca
961 gcgcatctg gaccttgctt ccaagaacgc ttggagtatg atgggtcact ttctgcgtgt
1021 caagatccac gagcacatcc tctgtacg cgacatccgc aagaagcaga aggtcaactg
1081 ggtggccag gagatggagg tggagaccat ggtgcacgag gaggacgac agacgcagaa
1141 ggtgcccacg gcaaagtacg ccaaccgca ctcgttcac atcatgccc accgctcaa
1201 ggagaagggc ttcgagacc gcgctcgtt ggacggcgac ccgaacggcg acgcccaggc
1261 caacgctgca gccggcgca agccccgaat ggagatgggc aagatgacc gcatgggcat
1321 gggcatgggt gccggcatgg gcatggcgac catcgattcg ggccgctca tctcgcctt
1381 gccggacatc tccatggtgg actttttccg cagcagttc gcgcggtgc ccgtgccct
1441 cgaactggtg ccccgctgg gcgcgagaa caccctccag ctggtgcagc aggcgcagtc
1501 actgggaggc tgcgacttgc tctcatgca ccccgagttc ctgcgcgacc gcagtccac
1561 ggttctgctg cccgcctca agatggcg gcagcgccc gcggccttc gctggcggc
1621 aatcgcccc atgcccggact tgatcgaggg ttccggcgctt gacggctggc tggaggccc
1681 cagctttggc gccggcatca accagcaggc gctggtggcg ctgatcaacc gcatgcagca
1741 ggccaagaag atgggcatga tggcggtat ggtatgggc atggcgggc gcatgggtat
1801 gggcatgggt atgggcatgg gcatggcccc cagcatgaac gccggcatga ctggcgcat
1861 gggcgggccc tccatggcg gtgcccgtgat gggcatgggc atgggcatgc agccatgca
1921 gcaggctatg ccggccatgt cggccatgat gactcagcag cccagcatga tgatcagcc
1981 ctccgccatg agcgcggcg gcgccatgca ggcgatgggt ggcgtcatgc ccagccccgc
2041 ccccgggcg cgctgggca ccaaccgct gtttggctct gcgcccctc cgctgagctc
2101 cgagcccggc atcagccctg gcatggcgac gcccccggc gccaccggc caccggcg
2161 tggcggcagc gaggccgaga tgctgcagca gctgatgagc gagatcaacc gcctgaagaa
2221 cgagctgggc gagtaa

```

Figura 1

Chr2

```

1 gcatctgtcg ccaagcaagc attaaacatg gattatggag gcgcccctgag tggcgttggg
61 cgcgagctgc tatttgaac gaaccacagta gtcgtcaatg gctctgtact tgtgctgag
121 gaccagtgtt actgcgcggg ctggattgag tcgctggca caaacggtgc ccaaacggcg
181 tcgaacgtgc tgcaatggct tgctgctggc ttctccatcc tactgcttat gttttacgcc
241 taccaaacat ggaagtcaac ctgctggctgg gaggagatct atgtgtgctg tatcgagatg
301 gtcaaggtga ttctcgagt ctcttcgag ttttaagaacc cgtccatgct gtatctagcc
361 acaggccacc gcgtccagtg gttgcgttac gccgagtggc ttctcacctg cccggctatt
421 ctcatccacc tgtcaaacct gacgggcttg tccaacgact acagcaggcg caccatgggt
481 ctgcttgtgt ctgatattgg cacaattgtg tggggcgcca ctccgccat ggccaccgga
541 tacgtcaagg tcatcttctt ctgctgggt ctgtgttatg gtgctaacac gttctttcac
601 gctgccaagg cctacatcga gggttaccac accgtgccga agggccggtg tcgccagggtg
661 gtgactggca tggcttggct ctcttcgta tcatgggta tgttccccat cctgttcac
721 ctcgcccccg agggcttcgg cgtcctgagc gtgtacggct ccaccgtcgg ccacaccatc
781 attgacctga tgtcgaagaa ctgctgggt ctgctcggcc actacctggc cgtgtgatc
841 cacgacata tcctcatcca cggcgacatt cgcaagacca ccaaattgaa cattggtggc
901 actgagattg aggtcgagac gctggtggag gacgaggccg aggctggcgc ggtcaacaag
961 ggcaccggca agtacgcctc ccgagagtc ttctggta tgccgacaa gatgaaggag
1021 aagggcattg acgtgcgcgc ctctctggac aacagcaagg aggtggagca ggagcaggcc
1081 gccagggctg ccatgatgat gatgaacggc aatggcatgg gtatgggaat gggaatgaac
1141 ggcataaacg gaatgggctg tatgaacggg atggctggcg gcgccaagcc cggcctggag
1201 ctactccgc agctacagcc cggccgcgtc atcctggcgg tgccggacat cagcatgggt
1261 gacttcttcc gcgagcagtt tgctcageta tcggtgacgt acgagctggt gccggccctg
1321 ggcgctgaca acacactggc gctggttacg caggcgcaaga acctggcggc cgtggaactt
1381 gtgttgattc accccgagtt cctgcgcgac cgtctagca ccagcatcct gagccgcctg
1441 cgcggcgcgg gccagcgtgt ggtgcgttc ggtgggccc agctggggcc catgctgac
1501 ctgactcagat ccgcaaacct ggacggctgg ctggagggcc cctcgttcgg acagggcacc
1561 ctgcggccc acatcgttgc cctggtggcc aagatgcagc agatgcgcaa gatgcagcag
1621 atgcagcaga ttggcatgat gaccggcggc atgaacggca tgggcggcgg tatgggcggc
1681 ggcataaacg gcatgggctg cggcaacggc atgaacaaca tgggcaacgg catggcggc
1741 ggcataaacg acggcatggg cggcaatggc atgaacggaa tgggtggcgg caacggcatg
1801 aacaacatgg gcggcaacgg aatggcggc aacggaatgg gcggcggcat gggcggcaac
1861 ggtatgggtg gctccatgaa cggcatgagc tccggcgtgg tggccaacgt gacgccctcc
1921 gccgccggcg gcatgggctg catgatgaac ggccggcatg ctgcgcccca gtcgccggc
1981 atgaacggcg gccgcctggg taccaacccg ctcttcaacg ccgcgccctc accgctcagc
2041 tcgcagctcg gtgcccaggc aggcattggc agcatgggag gcatggcgg aatgagcggg
2101 atgggaggca tgggtggaat gggggcagc ggcggcggc gcgccgccac gacgcaggct
2161 gcgggcggca acgcggaggc ggagatgctg cagaatctca tgaacgagat caatcgctg
2221 aagcgcgagc ttggcgagta a

```

Figura 2

Halorodopsina (NpHR)

ATGACTGAGACCTCCACCCGTGACTGAAAGCGCCGTCGCTCTGCAAGCAGAGGTTACCCAGCGGGAG
CTGTTTCGAGTTCGTCCCTCAACGACCCCTCCTGGCTTCTAGCCTCTACATCAACATGCTCTGGCAGGCCTG
TCTATACTGCTGTTTCGTCTTCATGACCAGGGGACTCGATGACCCTAGGGCTAAACTGATTGCAGTGAGCA
CAATTCTGGTTCCCGTGGTCTCTATCGCTTCTACACTGGCTGGCATCTGGTCTACAATCAGTGCCTGG
AAATGCCAGCTGGCCACTTTGCCGAAGGGAGTTCTGTTCATGCTGGGAGGCGAAGAGGTCGATGGGGTTG
TCACAATGTGGGGTTCGCTACCCACCTGGGCTCTCAGTACCCCATGATCCTGCTGGCACTCGGACTCCTG
GCCGGAAGTAACGCCACCAAACCTTCACTGCTATTACATTCGATATCGCCATGTGCGTGACCGGGCTCG
CAGTCCCTCACCACCAGCAGCCATCTGATGAGATGGTTTTGGTATGCCATCTCTTGTGCCTGCTTTCTGG
TGGTGTGTATATCCTGCTGGTGGAGTGGGCTCAGGATGCCAAGGCTGCAGGGACAGCGACATGTTTAA
TACACTGAAGCTGCTCACTGTGGTGTGTTGGCTGGGTTACCCTATCGTTTGGGCACTCGGCGTGGAGGGA
ATCGCAGTTCTGCCTGTTGGTGTGACAAGCTGGGGCTACTCCTCCTGGACATTGTGGCCAAGTATATTTT
TGCTTTCTGCTGCTGAATTATCTGACTTCCAATGAGTCCGTGGTGTCCGGCTCCATACTGGACGTGCCAT
CCGCCAGCGGCACACCTGCCGATGCTGA

Figura 3

Melanopsina

GAGGATCCGCCACCATGAACCCCTCCTTCGGGCCCTAGAGTCCTGCCCAGC
CCAACCCAAGAGCCCAGCTGCATGGCCACCCCAGCACCACCCAGCTGGTGGGACAGCTCC
CAGAGCAGCATCTCCAGCCTGGGCCGGCTTCCATCCATCAGTCCCACAGCACCTGGGACT
TGGGCTGCTGCCTGGGTCCCCCTCCCCACGGTTGATGTTCCAGACCATGCCACTATAACC
CTGGGCACAGTGATCTTGCTGGTGGGACTCACGGGCATGCTTGGCAACCTGACGGTCATC
TATACCTTCTGCAGGAGCAGAAGCCTCCGGACACCTGCCAACATGTTCAATTATCAACCTC
GCGGTCAGCGACTTCCTCATGAGTTTACCCAGGCCCTGTCTTCTTACCAGTAGCCTC
TATAAGCAGTGGCTCTTGGGGAGACAGGCTGCGAGTTCTATGCCTTCTGTGGAGCTCTC
TTTGGCATTTCCTCCATGATCACCTGACGGCCATCGCCCTGGACCGCTACCTGGTAATC
ACACGCCCGCTGGCCACCTTTGGTGTGGCGTCCAAGAGGCGTGCGGCATTGTCTGCTG
GGCGTTTGGCTCTATGCGCTAGCTTGGAGTCTGCCACCCTTCTTCGGCTGGAGCGCCTAC
GTGCCCCAGGGGTTGCTGACATCCTGCTCCTGGGACTACATGAGCTTCACGCCGGCCGTG
CGTGCCTACACCATGCTTCTGCTGCTTCGTGTTCTTCCTCCCTTTATTAATTATCATC
TACTGCTACATCTTCACTTCAGGGCCATCCGGGAGACAGGACGGGGCTCTCCAGACCTTC
GGGGCCTGCAAGGGCAATGGCGAGTCCCTGTGGCAGCGGCAGCGGCTGCAGAGCGAGTGC
AAGATGGCCAAGATCATGCTGCTGGTCATCCTCCTTTCGTGCTCTCCTGGGCTCCCTAT
TCCGCTGTGGCCCTGGTGGCCTTTGCTGGGTACGCACACGTCCTGACACCCTACATGAGC
TCGGTGCCAGCCGTCATCGCCAAGGCTCTGCAATCCACAACCCCATCATTTACGCCATC
ACCCACCCCAAGTACAGGGTGGCCATTGCCCAGCACCTGCCCTGCCTAGGTGTGCTGCTG
GGTGTATCACGCCGGCACAGTCGCCCCTACCCAGCTACCGCTCCACCCACCGCTCCACG
CTGACCAGCCACACCTCCAACCTCAGCTGGATCTCCATACGGAGGCGCCAGGAGTCCCTG
GGCTCGGAGAGTGAGGTGGGCTGGACACACATGGAGGCAGCAGCTGTGTGGGGAGCTGCC
CAGCAAGCAAATGGGCGGTCCCTCTACGGTCAGGGTCTGGAGGACTTGAAGCCAAGGCA
CCCCCAGACCCAGGGACACGAAGCAGAGACTCCAGGGAAGACCAAGGGGCTGATCCCC
AGCCAGGACCCGCGATGGGCGGCGGCGACTACAAGGACGATGATGACAAGTAATAAGAA
TTCAG

Figura 4

Chr2 (secuencia optimizada al codón de mamífero fusionada con GFP)

5' -
 ATGGACTATGGCGGCGCTTTGTCTGCCGTCGGACGCGAACTTTTGTTCGTTACTAATCCTGTGGTGGTGA
 ACGGGTCCGTCCTGGTCCCTGAGGATCAATGTTACTGTGCCGGATGGATTGAATCTCGCGGCACGAACG
 GCGCTCAGACCGCGTCAAATGTCTGCAGTGGCTTGCAGCAGGATTCAGCATTTTGTCTGCTGATGTTCTA
 TGCCTACCAAACCTGGAAATCTACATGCGGCTGGGAGGAGATCTATGTGTGCCCATTTGAAATGGTTAA
 GGTGATTCTCGAGTTCTTTTTTGAGTTTAAGAATCCCTCTATGCTCTACCTTGCCACAGGACACCGGGTGC
 AGTGGCTGCGCTATGCAGAGTGGCTGCTCACTTGTCTGTCATCCTTATCCACCTGAGCAACCTCACCGG
 CCTGAGCAACGACTACAGCAGGAGAACCATGGGACTCCTTGTCTCAGACATCGGGACTATCGTGTGGGG
 GGCTACCAGCGCCATGGCAACCGGCTATGTTAAAGTCATCTTCTTTTGTCTTGGATTGTGCTATGGCGCG
 AACACATTTTTTACGCCGCGAAAGCATATATCGAGGGTTATCATACTGTGCCAAAGGGTCGGTGCCGCC
 AGGTCGTGACCGGCATGGCATGGCTGTTTTTCGTGAGCTGGGGTATGTTCCCAATTCTCTTCATTTTGGG
 GCCCGAAGGTTTTGGCGTCTGAGCGTCTATGGCTCCACCGTAGGTACACGATTATTGATCTGATGAGT
 AAAAATTGTTGGGGGTTGTTGGGACACTACCTGCGCGTCTGATCCACGAGCACATATTGATTCACGGA
 GATATCCGCAAAACCAAACTGAACATCGGCGGAACGGAGATCGAGGTCGAGACTCTCGTCGAAGA
 CGAAGCCGAGGCCGGAGCCGTGCCAGCGGCACCGGTAGTAGCAGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCA
 CCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCG
 AGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATTTGCACCACCGGCAAGCTGCCCG
 TGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACAT
 GAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCC GAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAA
 GGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCG
 AGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAAC
 AGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCAC
 AACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCC
 GTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGC
 GATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG
 TAA - 3'

Figura 5

GRM6

5'ATCTCCAGATGGCTAAACTTTTAAATCATGAATGAAGTAGATATTACCAAATTGCTTTTTCAGCATCCAT
TTAGATAATCATGTTTTTGCCTTTAATCTGTTAATGTAGTGAATTACAGAAATACATTTCTAAATCATT
CATCCCCAAATCGTTAATCTGCTAAAGTACATCTCTGGCTCAAACAAGACTGGTTG-3'

Figura 6

smCBA

AATTCGGTACCCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTC
CGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCAATTGACGTCA
ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTAC
GGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGA
CGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATC
TACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCC
CCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGG
GGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCG
GCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCC
TATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGACGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGC
CGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCGGCTCTGACTGACCGGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGG
CCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTTGTTTCTTTCTGTGGCTGCGTGAAA
GCCTTGAGGGGCTCCGGGAGCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCTCC
TGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCAT CTTTTGGCAAAG

Figura 7

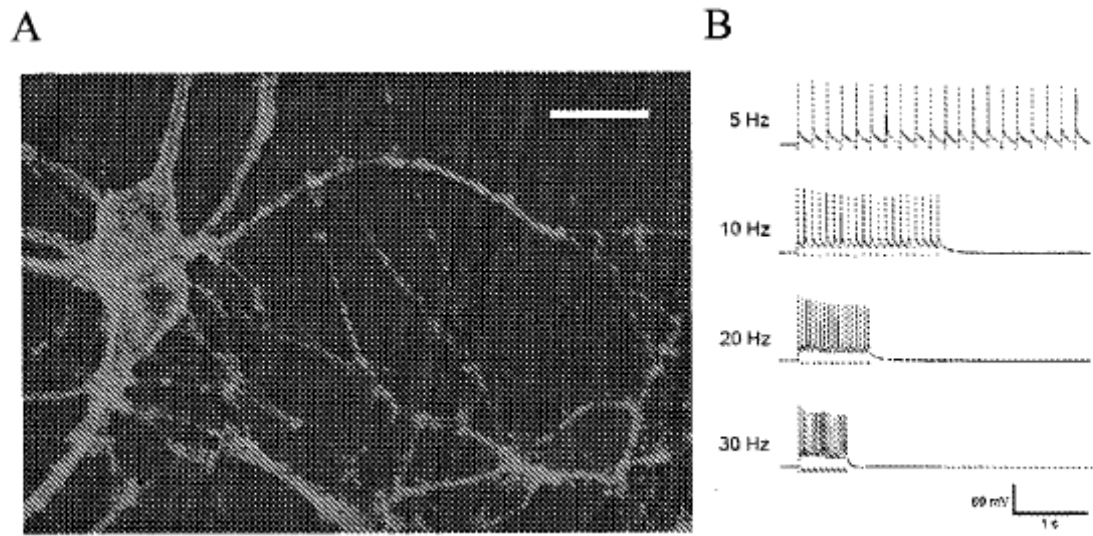


Figura 8

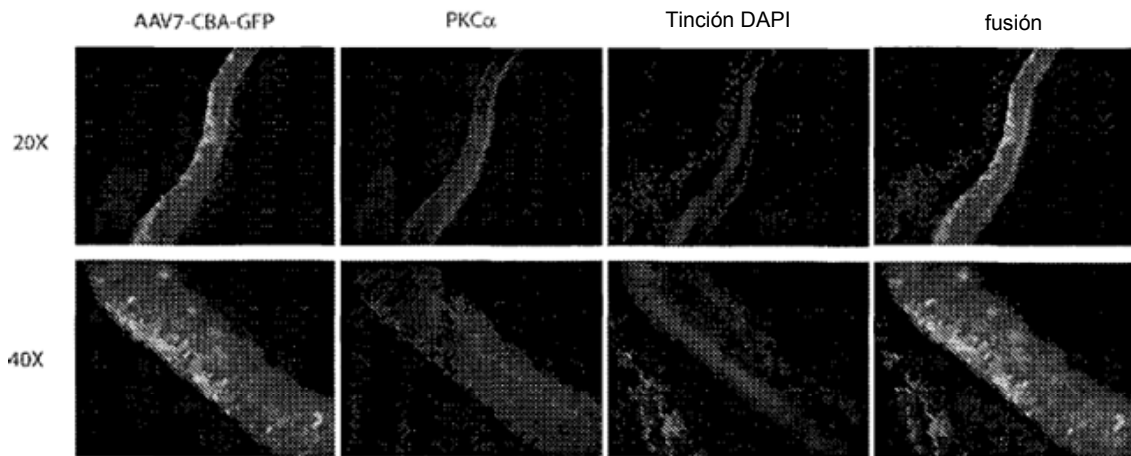


Figura 9

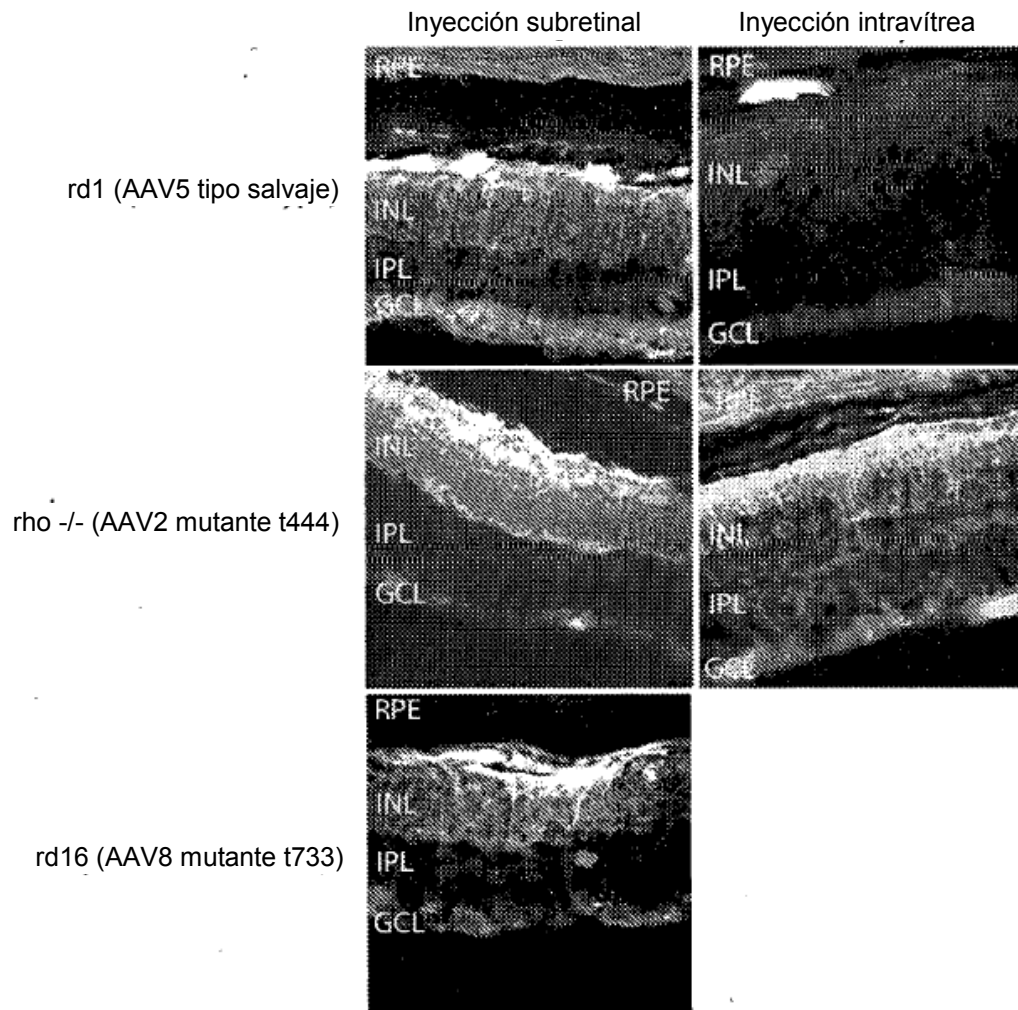


Figura 10

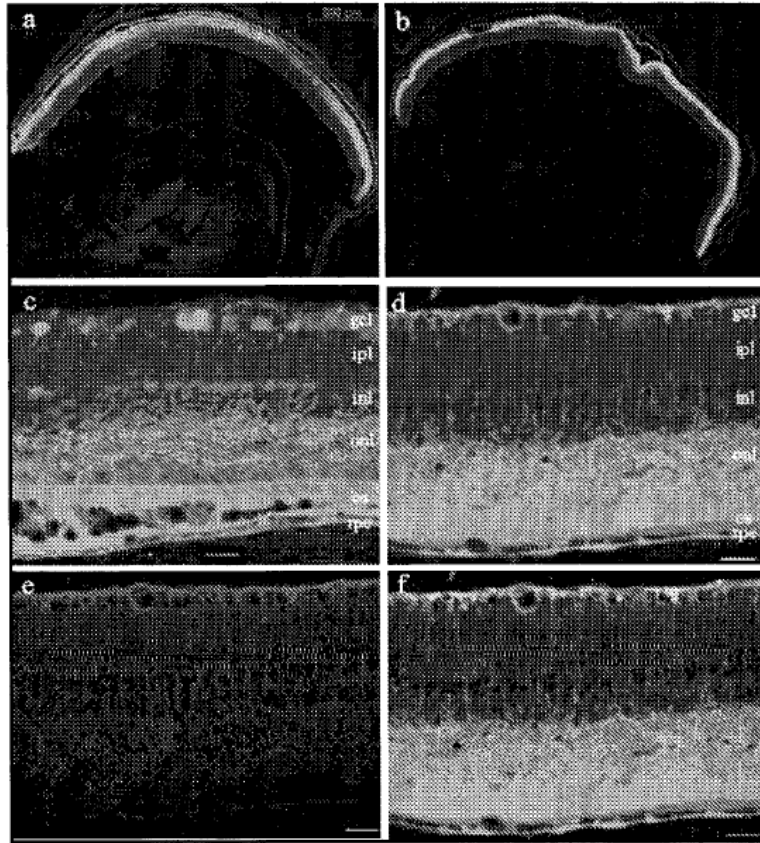


Figura 11

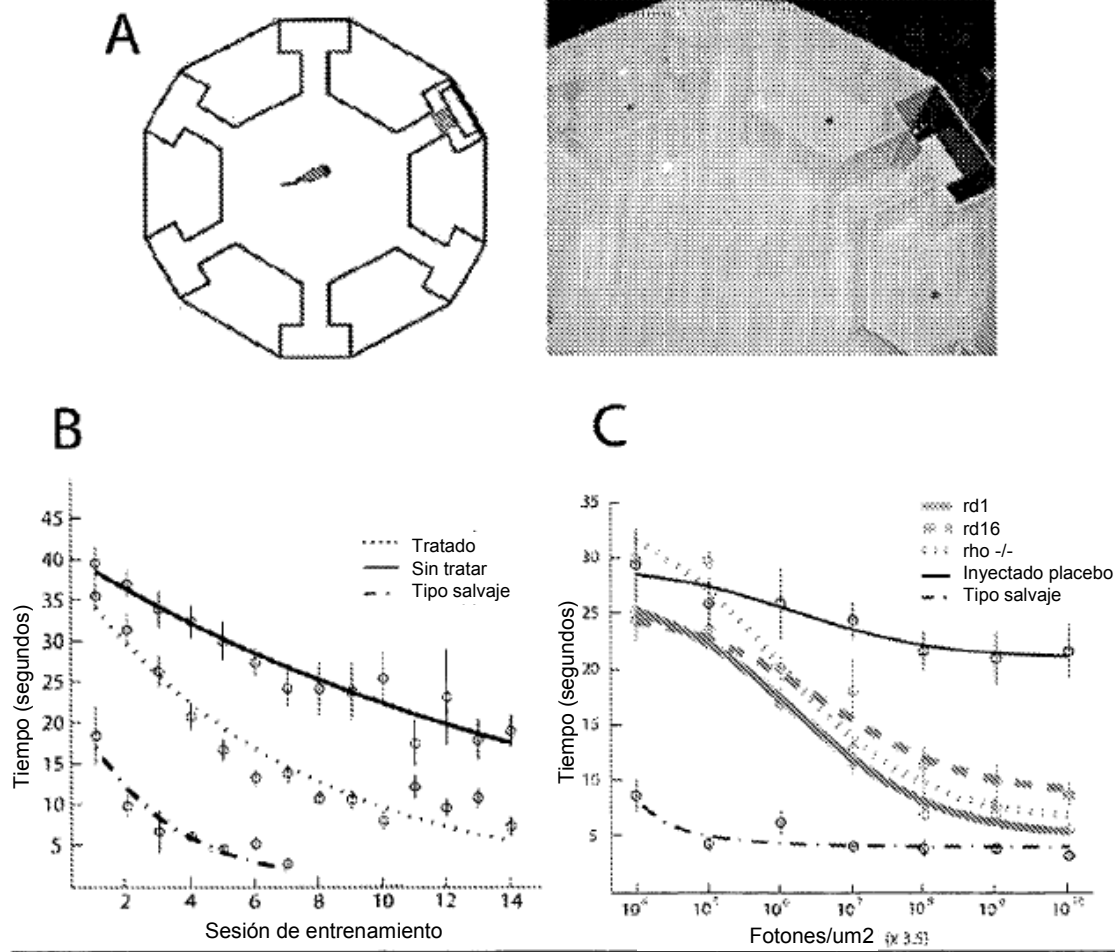


Figura 12

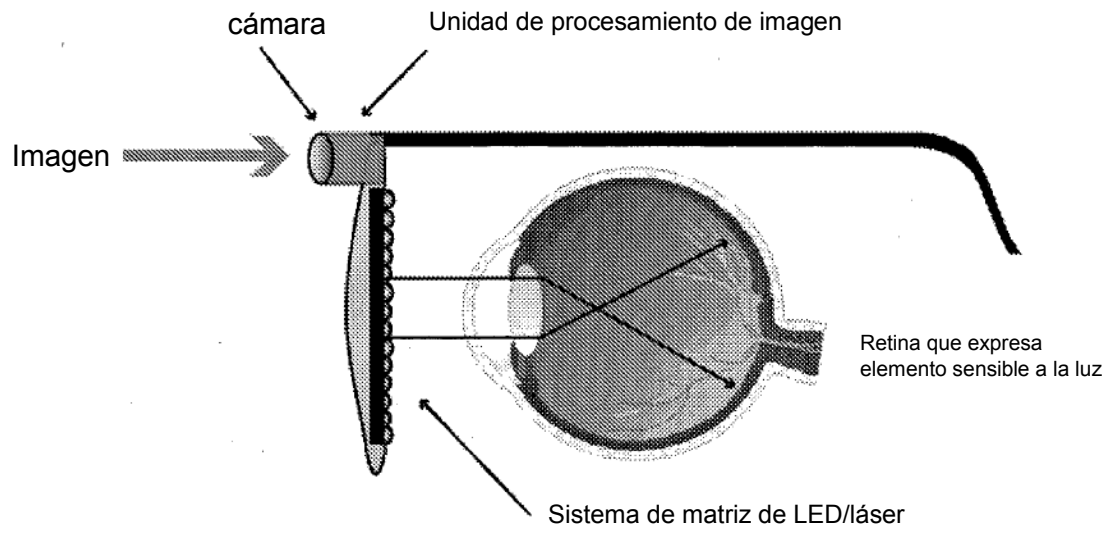


Figura 13