

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 006**

51 Int. Cl.:

A61P 21/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/864 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2013 PCT/US2013/027058**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2013 WO13126521**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2013 E 13751108 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2817068**

54 Título: **Composiciones para el tratamiento de trastornos neurogénicos del suelo pélvico**

30 Prioridad:

21.02.2012 US 201261601298 P

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

01.08.2017

73 Titular/es:

CIRCUIT THERAPEUTICS, INC. (50.0%)

1430 O'Brien Drive

Menlo Park, California 94025, US y

THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND

STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (50.0%)

72 Inventor/es:

DEISSEROTH, KARL A.;

ADEN, ELIZABETH R.;

GRADINARU, VIVIANA y

DELP, SCOTT L.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 628 006 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

Composiciones para el tratamiento de trastornos neurogénicos del suelo pélvico

5 **Campo de la invención**

Esta divulgación se refiere a métodos para el tratamiento de trastornos neurogénicos del suelo pélvico incluyendo disfunción vesical, incontinencia fecal y disfunción sexual en un individuo, mediante el uso de proteínas opsina sensibles a la luz expresadas de forma estable capaces de alterar selectivamente el potencial de membrana de las células neurales que inervan los músculos y órganos responsables de la función urinaria, rectal y sexual.

Introducción

La "optogenética" se refiere a la combinación de métodos genéticos y ópticos utilizados para controlar eventos específicos en células diana de tejido vivo, incluso en mamíferos que se mueven libremente y otros animales, con la precisión temporal (escala de tiempo de milisegundos) necesaria para mantener los sistemas biológicos intactos. La característica distintiva de la optogenética es la introducción de canales de iones y/o proteínas bombas sensibles a la luz de respuesta rápida en las membranas plasmáticas de las células neuronales diana que permita una manipulación temporal precisa del potencial de la membrana neuronal a la vez que se mantiene la resolución del tipo celular mediante el uso de mecanismos de direccionamiento específicos (Véase, p. ej., las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos números 2007/0054319, 2009/0093403 y 2010/0145418, así como las Publicaciones de Solicitud de Patente Internacional números WO 2009/131837 y WO 2007/024391). En tan solo unos pocos años, el campo de la optogenética ha fomentado la comprensión científica fundamental de cómo los tipos específicos de células contribuyen a la función de los tejidos biológicos *in vivo*, incluyendo las interacciones entre los músculos esquelético y liso con las neuronas responsables de su inervación.

La incontinencia urinaria, la incapacidad para mantener el control voluntario de la micción, es una afección que afecta a millones de hombres y mujeres en todo el mundo. El control de la micción es un proceso fisiológico complejo que incluye vías de reflejos neurales, algunas con y sin control del sistema nervioso central, músculos lisos y voluntarios, así como efectos hormonales. (Véase la revisión de DeGroat, 1997, *Urology* 50 [Supp6A]:36-52). Un gran subconjunto de los casos de incontinencia urinaria es al menos parcialmente neurogénico. El término clínico "vejiga hiperactiva" se utiliza generalmente para designar cualquier forma de incontinencia caracterizada por una mayor frecuencia de micción o deseo de evacuar, ya sea de forma completa o episódica, y donde la pérdida de control voluntario varía de parcial a total. "Incontinencia de urgencia" es la pérdida involuntaria de orina asociada con un abrupto y poderoso deseo de evacuar. La incontinencia de urgencia se asocia a menudo con el hallazgo urodinámico de contracciones involuntarias (desinhibidas) del músculo detrusor, el cual proporciona la principal fuerza para expulsar la orina de la vejiga. Un gran subconjunto de pacientes con detrusor desinhibido tiene algún tipo de deterioro neurológico, en cuyo caso el término clínico es "hiperreflexia del detrusor" (HD). Los trastornos neurológicos comunes asociados con la hiperreflexia del detrusor (HD) son enfermedad de Parkinson, ictus, diabetes, esclerosis múltiple (EM) y neuropatía periférica. Además, las personas que sufren una lesión traumática de la médula espinal comúnmente experimentan síntomas asociados con HS.

El músculo esfínter urinario externo también puede verse afectado por lesiones de la médula espinal, lo que tiene como resultado una afección conocida como "disinergia". "La disinergia implica una incapacidad de los músculos esfínter urinarios para relajarse cuando la vejiga se contrae, incluida la contracción activa en respuesta a la evacuación de la vejiga, evitando que la orina fluya a través de la uretra y dando como resultado la evacuación incompleta de la vejiga y el "reflujo" de la orina en los riñones .

Algunos tratamientos para la hiperreflexia del detrusor y la disinergia del esfínter urinario externo dependen de la neuroestimulación eléctrica. Esta modalidad de tratamiento depende del uso de electrodos colocados adyacentes al nervio/músculo a estimular. La activación del electrodo con un impulso eléctrico excita el nervio adyacente, lo que conduce a la contracción de los músculos inervados por ese nervio. Sin embargo, el electrodo es no selectivo y estimulará cada tipo de tejido y célula que entra dentro de su campo eléctrico. Por lo tanto, los métodos y dispositivos neuroestimuladores actuales no pueden actuar localmente con especificidad de tipo celular para regular los músculos y los nervios responsables de los síntomas asociados con la hiperreflexia del detrusor y la disinergia del esfínter urinario externo.

La estimulación de la raíz anterior sacra (SARS, Finetech Medical Limited) es un dispositivo neuroestimulador utilizado para restaurar la función de la vejiga en pacientes que han sufrido lesiones de la médula espinal. El SARS requiere una rizotomía de la raíz sacra para prevenir la HD/DDE (disinergia detrusor-esfínter externo), dando como resultado la pérdida de la función sexual. Además, la rizotomía de la raíz sacra daña aún más las vías aferentes del tracto urinario inferior, lo que lleva a la arreflexia de la vejiga o la pérdida de la contracción de la vejiga. Como resultado, la estimulación eléctrica posquirúrgica es necesaria para activar el músculo detrusor. Sin embargo, al mismo tiempo, el electrodo también activa el músculo esfínter urinario externo porque los nervios que inervan el esfínter son más grandes que los del detrusor y, por lo tanto, son reclutados primero. Debido a que el músculo estriado esfínter se relaja más rápidamente que el músculo liso del detrusor, un individuo que ha sufrido el SARS

experimenta evacuación post-estímulo durante un breve período de tiempo. Sin embargo, además de la ya mencionada pérdida de la función sexual, el SARS a menudo produce una presión vesical muy alta que puede causar reflujo vesicoureteral a corto plazo y se ha asociado, a largo plazo, con insuficiencia renal.

5 Otros tratamientos actuales para la hiperreflexia del detrusor y la disinergia del esfínter urinario externo son el autocateterismo permanente o intermitente combinado con agentes anti-muscarínicos (como oxibutinina o tolterodina), el uso de alfa-bloqueantes, la inyección del esfínter urinario externo con toxina botulínica, Botox® (Allergan) o Dysport® (Ipsen)), dilatación con balón del esfínter urinario externo y uso de stents uretrales. Sin embargo, todos estos tratamientos sufren inconvenientes considerables, incluyendo la necesidad de tratamientos repetidos frecuentes (en el caso de la cateterización intermitente y la administración de toxina botulínica), el aumento de las infecciones del tracto urinario (cateterismo, stents, dilatación con balón), aumento de la incidencia de septicemia (dilatación con balón) y aumento de la susceptibilidad al carcinoma de células escamosas (cateterismo).

15 Otro trastorno del piso pélvico, la incontinencia fecal, es una condición por la cual el material fecal es involuntariamente excretado o filtrado debido a la disminución del control intestinal. La incontinencia fecal de diversos grados se cree que es el resultado de cualquier número de factores, incluyendo disfunción o daño a los esfínteres anales, disfunción del piso pélvico o disminución de la adherencia en el recto. La inervación neural a la región anorrectal es tanto somática como autónoma. El nervio perineal superficial (rama del nervio pudendo) proporciona fibras sensoriales al perineo así como a la mucosa del canal anal. El esfínter anal externo recibe su inervación motora del nervio rectal inferior (también conocido como nervio hemorroidal inferior, una rama del nervio pudendo). Al igual que los tratamientos para la disfunción urinaria, algunos tratamientos para la incontinencia fecal dependen de la estimulación eléctrica de los nervios que controlan los músculos esfínter anal e intentan restaurar la continencia de un individuo. Otros tratamientos quirúrgicos, como la colostomía, también son comunes. Sin embargo, todos estos métodos sufren considerables inconvenientes prácticos y complicaciones.

25 La disfunción sexual comprende una amplia gama de enfermedades, incluyendo disfunción eréctil, disfunción orgásmica, eyaculación precoz y falta de lubricación. Las disfunciones sexuales afectan tanto a las mujeres como a los hombres, y pueden ser de por vida o adquiridas. La disfunción sexual tiene una serie de causas, tanto fisiológicas como psicológicas, y en muchos pacientes el trastorno puede ser multifactorial. Las causas incluyen varias que son esencialmente de origen neurológico. Por ejemplo, el daño a las vías utilizadas por el sistema nervioso autónomo para inervar el pene y el clítoris puede interrumpir la excitación sexual iniciada por el sistema nervioso central. Lesiones (p.ej., daño, infección o enfermedad) de las vías nerviosas somáticas (es decir, cualquiera de los nervios asociados con la sensación o el movimiento) puede afectar a la función sexual reflexogénica (es decir, respuesta fisiológica instintiva involuntaria a un estímulo) y puede interrumpir la sensación táctil necesaria para mantener la excitación sexual. Además, las lesiones de la médula espinal pueden producir diversos grados de disfunción sexual dependiendo de la localización y la gravedad de las lesiones.

40 Actualmente, no existe una buena terapia de larga duración, rentable o clínicamente significativa que se dirija precisamente a las células neurales y a los músculos y órganos asociados responsables de estos defectos con el potencial de producir una micción más fisiológicamente normal, el control del intestino y la función sexual en individuos con síntomas asociados a trastornos neurogénicos del suelo pélvico.

45 Se conocen del documento US2009/0326603 medios para tratar la disfunción de la vejiga mediante la estimulación eléctrica del nervio pudendo, lo que conduce a contracciones de la vejiga.

Sumario

50 La invención a la que pertenece esta memoria descriptiva se expone en las reivindicaciones adjuntas a esta memoria descriptiva.

En la presente memoria se proporcionan métodos para el tratamiento de la disfunción vesical, la incontinencia fecal y la disfunción sexual en un individuo mediante el uso de proteínas opsina sensibles a la luz expresadas de forma estable capaces de hiperpolarizar o despolarizar las neuronas que inervan los músculos de la vejiga, las neuronas que inervan el esfínter anal externo, las neuronas que inervan los músculos responsables de la contracción del recto y/o las neuronas que inervan los órganos genitales, en los que la hiperpolarización o depleción sináptica inducida por la despolarización de las neuronas induce la relajación del músculo inervado por las neuronas y la despolarización de las neuronas induce la contracción del músculo inervado por las neuronas. En algunas realizaciones, la contracción del músculo detrusor y la relajación del esfínter urinario externo para permitir la micción pueden ser inducidas por la activación de una o más de las proteínas opsina sensibles a la luz expresadas en las neuronas. En algunas realizaciones, la relajación del músculo detrusor y la contracción del esfínter urinario externo para permitir el almacenamiento de orina puede ser inducida por la activación de una o más de las proteínas opsina sensibles a la luz expresadas en las neuronas. En algunas realizaciones, la contracción del esfínter anal externo para permitir el almacenamiento de las heces puede ser inducida por la activación de una o más proteínas opsina sensibles a la luz expresadas en las neuronas. En algunas realizaciones, la relajación del esfínter anal externo para permitir la defecación puede ser inducida por la activación de una o más de las proteínas opsina sensibles a la luz expresadas en las neuronas. Además, la defecación puede facilitarse adicionalmente mediante la contracción

simultánea de los músculos responsables de la contracción del recto inducida por la activación de una o más de las proteínas opsina sensibles a la luz expresadas en las neuronas. En algunas realizaciones, la disfunción sexual puede tratarse aumentando la despolarización de las neuronas responsables de la inervación de los músculos y órganos de los genitales.

5 Por consiguiente, en algunos aspectos, en la presente memoria se proporciona un método para tratar una disfunción de la vejiga en un individuo que lo necesite, comprendiendo el método: administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz al individuo, en el que la proteína opsina se expresa en la membrana plasmática de una población de neuronas responsables de la inervación del músculo detrusor y/o una población de neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter urinario externo en el individuo, en el que la proteína opsina induce la hiperpolarización de las neuronas que expresan la proteína opsina en respuesta a la luz, de modo que la hiperpolarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo detrusor permite el almacenamiento de orina en la vejiga y la hiperpolarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter urinario externo permite la evacuación de la orina de la vejiga, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz que comprende una secuencia al menos un 95 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:1, una señal de exportación del RE y una señal de tráfico de membrana.

20 En algunos aspectos, en la presente memoria se proporciona un método para tratar una disfunción de la vejiga en un individuo que lo necesite, comprendiendo el método: administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz al individuo, en el que la proteína opsina se expresa en la membrana plasmática de una población de neuronas responsables de la inervación del músculo detrusor y/o una población de neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter urinario externo en el individuo, en el que la proteína opsina induce la hiperpolarización de las neuronas que expresan la proteína opsina en respuesta a la luz, de modo que la hiperpolarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo detrusor permite el almacenamiento de orina en la vejiga y la hiperpolarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter urinario externo permite la evacuación de la orina de la vejiga, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz que comprende una secuencia al menos un 95 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:23, una señal de exportación del RE y una señal de tráfico de membrana.

35 En algunos aspectos, en la presente memoria se proporciona un método para tratar una disfunción de la vejiga en un individuo que lo necesite, comprendiendo el método: administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz al individuo, en el que la proteína opsina se expresa en la membrana plasmática de una población de neuronas responsables de la inervación del músculo detrusor y/o una población de neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter urinario externo en el individuo, en el que la proteína opsina induce la hiperpolarización de las neuronas que expresan la proteína opsina en respuesta a la luz, de modo que la hiperpolarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo detrusor permite el almacenamiento de orina en la vejiga y la hiperpolarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter urinario externo permite la evacuación de la orina de la vejiga, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz que comprende una secuencia al menos un 95 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:4, una señal de exportación del RE y una señal de tráfico de membrana.

45 En algunos aspectos, en la presente memoria se proporciona un método para tratar una disfunción de la vejiga en un individuo que lo necesite, comprendiendo el método: administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz al individuo, en el que la proteína opsina se expresa en la membrana plasmática de una población de neuronas responsables de la inervación del músculo detrusor y/o una población de neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter urinario externo en el individuo, en el que la proteína opsina es capaz de inducir la depleción sináptica inducida por la despolarización de las neuronas que expresan la proteína opsina en respuesta a la luz, de modo que la depleción sináptica inducida por la despolarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo detrusor permite el almacenamiento de orina en la vejiga y la depleción sináptica inducida por la despolarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter urinario externo permite la evacuación de la orina de la vejiga, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz que comprende una secuencia al menos un 95 % idéntica a la secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11.

60 En algunos aspectos, en la presente memoria se proporciona un método para tratar una disfunción de la vejiga en un individuo que lo necesite, comprendiendo el método: administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz al individuo, en el que la proteína opsina se expresa en la membrana plasmática de una población de neuronas responsables de la inervación del músculo detrusor y/o una población de neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter urinario externo en el individuo, en el que la proteína opsina es capaz de inducir la despolarización de las neuronas, de modo que la despolarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo detrusor permite la evacuación de

la orina de la vejiga y la despolarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter urinario externo permite el almacenamiento de la orina de la vejiga, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz que comprende una secuencia al menos un 95 % idéntica a la secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11.

En otros aspectos, en la presente memoria se proporciona un método para tratar la incontinencia fecal en un individuo que lo necesite, comprendiendo el método: administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz al individuo, en el que la proteína opsina se expresa en la membrana plasmática de una población de neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter anal externo en el individuo, en el que la proteína opsina induce la hiperpolarización de las neuronas que expresan la proteína opsina en respuesta a la luz, de modo que la hiperpolarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter anal externo permite la defecación, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz que comprende una secuencia al menos un 95 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:1, una señal de exportación del RE y una señal de tráfico de membrana.

En otros aspectos, en la presente memoria se proporciona un método para tratar la incontinencia fecal en un individuo que lo necesite, comprendiendo el método: administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz al individuo, en el que la proteína opsina se expresa en la membrana plasmática de una población de neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter anal externo en el individuo, en el que la proteína opsina induce la hiperpolarización de las neuronas que expresan la proteína opsina en respuesta a la luz, de modo que la hiperpolarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter anal externo permite la defecación, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz que comprende una secuencia al menos un 95 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:4, una señal de exportación del RE y una señal de tráfico de membrana.

En otros aspectos, en la presente memoria se proporciona un método para tratar la incontinencia fecal en un individuo que lo necesite, comprendiendo el método: administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz al individuo, en el que la proteína opsina se expresa en la membrana plasmática de una población de neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter anal externo en el individuo, en el que la proteína opsina induce la hiperpolarización de las neuronas que expresan la proteína opsina en respuesta a la luz, de modo que la hiperpolarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter anal externo permite la defecación, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz que comprende una secuencia al menos un 95 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:23, una señal de exportación del RE y una señal de tráfico de membrana.

En otros aspectos más, en la presente memoria se proporciona un método para tratar la incontinencia fecal en un individuo que lo necesite, comprendiendo el método: administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz al individuo, en el que la proteína opsina se expresa en la membrana plasmática de una población de neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter anal externo en el individuo, en el que la proteína opsina es capaz de inducir la depleción sináptica inducida por la despolarización de las neuronas que expresan la proteína opsina en respuesta a la luz, de modo que la depleción sináptica inducida por la despolarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter anal externo permite la defecación, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz que comprende una secuencia al menos un 95 % idéntica a la secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11.

En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para tratar la incontinencia fecal en un individuo que lo necesite, comprendiendo el método: administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz al individuo, en el que la proteína opsina se expresa en la membrana plasmática de una población de neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter anal externo en el individuo, en el que la proteína opsina es capaz de inducir la despolarización de las neuronas, de modo que la despolarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter anal externo permite el almacenamiento de las heces en el recto, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz que comprende una secuencia al menos un 95 % idéntica a la secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11.

En otros aspectos, en la presente memoria se proporciona un método para tratar la disfunción sexual en un individuo que lo necesite, comprendiendo el método: administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz al individuo, en donde la proteína opsina se expresa en la membrana plasmática de una población de neuronas responsables de la inervación de los

genitales del individuo, en donde la proteína opsina induce la despolarización de las neuronas que expresan la proteína opsina en respuesta a la luz, por lo que la despolarización de las neuronas responsables de la inervación De los genitales restaura la función sexual.

5 En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un kit para tratar una disfunción de la vejiga en un individuo que lo necesite, que comprende: a) un polinucleótido que codifica una proteína opsina sensible a la luz, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína opsina que comprende una secuencia al menos un 95 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:1, una señal de exportación del RE y una señal de tráfico de membrana y b) una fuente de luz capaz de generar luz en respuesta a una señal externa,
10 en el que la luz es capaz de activar la proteína opsina.

En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un kit para tratar una disfunción de la vejiga en un individuo que lo necesite, que comprende: a) un polinucleótido que codifica una proteína opsina sensible a la luz, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína opsina que comprende una
15 secuencia al menos un 95 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:4, una señal de exportación del RE y una señal de tráfico de membrana y b) una fuente de luz capaz de generar luz en respuesta a una señal externa, en el que la luz es capaz de activar la proteína opsina.

En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un kit para tratar una disfunción de la vejiga en un individuo que lo necesite, que comprende: a) un polinucleótido que codifica una proteína opsina sensible a la luz, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína opsina que comprende una
20 secuencia al menos un 95 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:23, una señal de exportación del RE y una señal de tráfico de membrana y b) una fuente de luz capaz de generar luz en respuesta a una señal externa, en el que la luz es capaz de activar la proteína opsina.

En otros aspectos más, en la presente memoria se proporciona un kit para tratar una disfunción de la vejiga en un individuo que lo necesite, que comprende: a) un polinucleótido que codifica una proteína opsina sensible a la luz, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que
25 comprende una secuencia al menos un 95 % idéntica a una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11 y b) una fuente de luz capaz de generar luz en respuesta a una señal externa, en el que la luz es capaz de activar la proteína opsina.

En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un kit para tratar la incontinencia fecal en un individuo que lo necesite, que comprende: a) un polinucleótido que codifica una proteína opsina sensible a la luz, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína opsina que comprende una
35 secuencia al menos un 95 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:1, una señal de exportación del RE y una señal de tráfico de membrana y b) una fuente de luz capaz de generar luz en respuesta a una señal externa, en el que la luz es capaz de activar la proteína opsina.

En otro aspecto más, en la presente memoria se proporciona un kit para tratar la incontinencia fecal en un individuo que lo necesite, que comprende: a) un polinucleótido que codifica una proteína opsina sensible a la luz, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende
40 una secuencia al menos un 95 % idéntica a una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11; y b) una fuente de luz capaz de generar luz en respuesta a una señal externa, en el que la luz es capaz de activar la proteína opsina.

En otros aspectos, en la presente memoria se proporciona un kit para tratar la disfunción sexual en un individuo que lo necesite, que comprende: a) un polinucleótido que codifica una proteína opsina sensible a la luz, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende
50 una secuencia al menos un 95 % idéntica a una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11 y b) una fuente de luz capaz de generar luz en respuesta a una señal externa, en el que la luz es capaz de activar la proteína opsina.

Breve descripción de los dibujos

60 La Figura 1 representa esquemáticamente las diversas secciones de la médula espinal, incluyendo el núcleo dorsolateral (DLN).

La Figura 2 representa números de neuronas motoras pudendas del esfínter urinario externo (EUE) que expresan opsinas codificadas por la construcción AAV.

La Figura 3 representa la estimulación óptica del nervio pudendo que expresa ChR2.

La Figura 4 representa un ejemplo de realización del control optogenético del EUE.

65

Descripción detallada

Esta divulgación proporciona, entre otros, métodos para tratar la disfunción de la vejiga, la incontinencia fecal y/o la disfunción sexual en un individuo alterando selectivamente el potencial de membrana eléctrico de las células neuronales periféricas que gobiernan el llenado y la evacuación de la vejiga urinaria, la contracción del esfínter anal externo y/o la inervación de los músculos y órganos de los genitales. Los inventores han desarrollado métodos para tratar enfermedades y afecciones que alteran la función urinaria, rectal y sexual normales utilizando una o más proteínas opsinas sensibles a la luz que se expresan de forma estable en las células neurales periféricas que inervan los músculos y órganos responsables de estos procesos fisiológicos.

El control selectivo del estado de polarización de la membrana de los nervios que inervan el detrusor y el esfínter urinario externo (también denominado "esfínter uretral externo") permite que la vejiga se llene mientras que simultáneamente se permite que el esfínter urinario externo permanezca en un estado "cerrado". Esto puede lograrse mediante la hiperpolarización selectiva o la depleción sináptica inducida por la despolarización de las innervaciones del detrusor mediante el uso de bombas de iones sensibles a la luz o canales catiónicos, respectivamente, y permitiendo que las innervaciones externas del esfínter urinario se despolaricen naturalmente en un estado cerrado. Como alternativa, si el control neuronal del esfínter urinario externo se altera, daña o si no es capaz de generar suficiente fuerza muscular para cerrar el esfínter, se pueden usar métodos optogenéticos o electroestimuladores tradicionales en combinación con el control optogenético del detrusor para cerrar el esfínter urinario externo.

Cuando el individuo siente el deseo de miccionar o si desea miccionar acuerdo con una pauta predeterminada, los nervios que inervan el esfínter urinario externo pueden ser hiperpolarizados selectivamente o sometidos a una depleción sináptica inducida por la despolarización, haciendo que el esfínter se relaje, provocando simultáneamente el cese de la hiperpolarización o depleción sináptica inducida por la despolarización del detrusor, lo que le permite despolarizarse y contraerse naturalmente, forzando así a la orina fuera de la vejiga. Sin embargo, si las innervaciones del músculo detrusor se alteran, dañan o si no pueden generar fuerza muscular suficiente para evacuar la vejiga urinaria, pueden usarse métodos optogenéticos o electroestimuladores para impulsar la despolarización de estas neuronas, forzando así al detrusor a contraerse y evacuar el contenido de la vejiga.

Por lo tanto, los métodos divulgados en la presente memoria pueden aliviar o prevenir muchos de los síntomas asociados con disfunciones de la vejiga (por ejemplo, hiperreflexia del detrusor y disinerxia del esfínter externo del detrusor) incluyendo, pero no limitándose a, pérdidas diurnas y nocturnas, retención urinaria, infecciones del tracto urinario y la vejiga, reflujo vesicoureteral, hidroureteronefrosis, cálculos renales, insuficiencia renal y/o fallo renal.

El control selectivo del estado de polarización de la membrana de los nervios que inervan el esfínter anal externo permite controlar la defecación y el almacenamiento de las heces en el recto. Esto puede lograrse mediante la hiperpolarización selectiva o la depleción sináptica inducida por la despolarización de las innervaciones del esfínter anal externo mediante el uso de bombas de iones sensibles a la luz o canales catiónicos, respectivamente. Cuando el individuo siente el deseo de defecar o desea defecar de acuerdo con una pauta predeterminada, los nervios que inervan el esfínter anal externo pueden ser hiperpolarizados selectivamente o sometidos a depleción sináptica inducida por la despolarización, provocando la relajación del músculo esfínter contraído naturalmente. Cuando se completa la defecación, la hiperpolarización optogenética o la depleción sináptica inducida por la despolarización de las innervaciones del esfínter anal externo pueden cesar, dando lugar a que el esfínter anal externo vuelva a su estado natural cerrado. De forma alternativa, si el control neural del esfínter anal externo se altera, se daña o si no es capaz de generar suficiente fuerza muscular para cerrar naturalmente el esfínter, se pueden usar métodos optogenéticos o electroestimuladores tradicionales para cerrar el esfínter anal externo. Además, el control de la continencia fecal se puede mejorar aún más mediante la despolarización selectiva simultánea de las innervaciones del recto, obligando al recto a contraerse y forzar su contenido hacia y a través del esfínter anal externo relajado optogenéticamente. Por lo tanto, los métodos divulgados en la presente memoria pueden aliviar o prevenir la incontinencia fecal.

El control selectivo del estado de polarización de la membrana de los nervios que inervan los genitales externos de hombres y mujeres permite la restauración de la función sexual. Esto puede lograrse mediante la despolarización selectiva de uno o más nervios raquídeos sacros y/o componentes del tronco del nervio pudiendo para controlar la función sexual, como en la erección, eyaculación u orgasmo masculinos y en la lubricación vaginal u orgasmo femeninos, así como para restaurar las sensaciones táctiles necesarias para mantener la excitación sexual mediante el uso de canales catiónicos sensibles a la luz. Por lo tanto, los métodos divulgados en la presente memoria pueden restaurar la función sexual.

Técnicas generales

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, biología celular, bioquímica, química de ácidos nucleicos, inmunología, fisiología, urología y fisiopatología de la micción que son bien conocidas por los expertos en la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura, tales como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición

(Sambrook et al., 1989) and Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición (Sambrook and Russel, 2001), (conjuntamente referidas como "Sambrook"); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987, incluidos los suplementos hasta 2001); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York; Harlow and Lane (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (conjuntamente referidas en la presente memoria como "Harlow and Lane"), Beaucage et al. eds., Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000), Handbook of Experimental Immunology, 4ª edición (D. M. Weir & C. C. Blackwell, eds., Blackwell Science Inc., 1987) y Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller & M. P. Calos, eds., 1987). Otras referencias útiles incluyen Harrison's Principles of Internal Medicine (McGraw Hill; J. Isseleacher et al., eds.), Corcos & Schickik, Textbook of the Neurogenic Bladder: Adults and Children. (Informa Health Care, 2004), Walsh et al., Campbell's Urology, 8ª ed., (Saunders, 2002), Fecal Incontinence: Diagnosis and Treatment, (Ratto & Doglietto, eds., Springer, 2007) y Lechtenberg et al., Sexual Dysfunction: Neurologic, Urologic, and Gynecologic Aspects (Lippincott Williams & Wilkins, 1994).

15 **Definiciones**

Tal como se usa en la presente memoria, la "depleción sináptica inducida por despolarización" ocurre cuando la despolarización continua de una membrana plasmática de células neuronales evita que la célula neural mantenga una acción de alta frecuencia sobre dianas eferentes debido a la depleción de las reservas vesiculares terminales de neurotransmisores.

Un "individuo" puede ser un mamífero, incluyendo un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales de granja, animales de deporte, mascotas, primates, ratones y ratas. Los individuos también incluyen animales de compañía incluyendo, pero sin limitarse a, perros y gatos. En un aspecto, un individuo es un ser humano. En otro aspecto, un individuo es un animal no humano.

Las sustituciones de aminoácidos en una secuencia de proteína nativa pueden ser "conservadoras" o "no conservadoras" y dichos restos de aminoácidos sustituidos pueden o no ser codificados por el código genético. Una "sustitución de aminoácidos conservadora" es aquella en la que el resto de aminoácido se sustituye por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral químicamente similar (es decir, reemplazando un aminoácido que posee una cadena lateral básica con otro aminoácido con una cadena lateral básica). Una "sustitución de aminoácidos no conservadora" es aquella en la que el resto de aminoácido se sustituye por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral químicamente diferente (es decir, reemplazando un aminoácido que tiene una cadena lateral básica con un aminoácido que tiene una cadena lateral aromática). El "alfabeto" estándar de veinte aminoácidos se divide en familias químicas basadas en las propiedades químicas de sus cadenas laterales. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p.ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p.ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (p.ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p.ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (p.ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales que tienen grupos aromáticos (p.ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Como se usa en la presente memoria, una "dosificación eficaz" o "cantidad eficaz" de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para producir resultados beneficiosos o deseados. Para el uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados tales como eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar la aparición de la enfermedad, incluyendo síntomas bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que presentes durante el desarrollo de la enfermedad. Para el uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados clínicos tales como la disminución de uno o más síntomas resultantes de la enfermedad, el aumento de la calidad de vida de los pacientes de la enfermedad, la disminución de la dosis de otros medicamentos requeridos para tratar la enfermedad, la intensificación del efecto de otra medicación tal como mediante el direccionamiento, retrasando la progresión de la enfermedad y/o prolongando la supervivencia. Una dosificación eficaz puede administrarse en una o más administraciones. Para los fines de esta invención, una dosificación eficaz del fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para realizar un tratamiento profiláctico o terapéutico, ya sea directa o indirectamente. Como se entiende en el contexto clínico, una dosificación eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica puede o no conseguirse junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por lo tanto, puede considerarse una "dosificación eficaz" en el contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos y se puede considerar que un solo agente se administre en una cantidad eficaz si, junto con uno o más de otros agentes, se consigue un resultado deseable.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "tratamiento" o "tratar" es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados que incluyen resultados clínicos. Para los propósitos de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: disminución de los síntomas resultantes de la enfermedad, aumento de la calidad de vida de los pacientes que sufren la enfermedad, disminución de la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, retraso de la progresión de la enfermedad y/o prolongación de la supervivencia de los individuos.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “nervio raquídeo sacro” se refiere a cualquiera de los nervios raquídeos mixtos que llevan señales motoras, sensoriales y autónomas entre la médula espinal y el cuerpo que se origina cerca de uno de los cinco huesos sacros fusionados de la columna vertebral S1, S2, S3, S4 o S5).

- 5 Como se usa en la presente memoria, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referencias plurales a menos que se indique lo contrario.

Se pretende que cada máxima limitación numérica dada a lo largo de esta memoria descriptiva incluya cualquier limitación numérica inferior, como si dichas limitaciones numéricas inferiores estuvieran expresamente escritas en la presente memoria. Cada limitación numérica mínima dada a lo largo de esta memoria descriptiva incluirá todas las limitaciones numéricas más altas, como si dichas limitaciones numéricas más altas estuvieran expresamente escritas en la presente memoria. Cada intervalo numérico dado a lo largo de esta memoria descriptiva incluirá cada rango numérico más estrecho que entra dentro de dicho intervalo numérico más amplio, como si tales intervalos numéricos más estrechos estuvieran todos expresamente escritos en la presente memoria.

15 ***Fisiología de la vejiga urinaria***

El tracto urinario inferior de individuos sanos tiene dos fases discretas de actividad: la fase de almacenamiento, en la que la orina se almacena en la vejiga y la fase de evacuación, que ocurre cuando la orina es liberada a través de la uretra. Este sistema reflejo es controlado tanto por una señal consciente del cerebro como por la velocidad de activación de las fibras sensoriales contenidas en la vejiga y la uretra (Yoshimura & Chancellor, 2003, Rev. Urol. 5 (Supl. 8): S3-S10). La vejiga de una persona promedio puede contener de 350 ml a 550 ml de orina. Cuando el volumen de líquido en la vejiga es bajo, la activación nerviosa del receptor sensorial es baja, dando como resultado la excitación y despolarización de las células neurales que inervan el esfínter urinario externo y la relajación del músculo detrusor que rodea la vejiga urinaria (Blok & Holstege, Neurosci. Lett., 1994, 166(1):93-6). Cuando la vejiga está casi llena, los receptores de estiramiento que recubren la pared de la vejiga desencadenan un aumento de la actividad aferente, dando como resultado la sensación consciente de urgencia urinaria. Generalmente, una persona siente la necesidad de orinar cuando hay aproximadamente 200 ml de orina en la vejiga. Cuando el individuo está listo para orinar, inconscientemente inicia la evacuación, lo que da como resultado la contracción de la vejiga y la relajación del esfínter urinario externo. La evacuación continúa hasta que la vejiga se vacía por completo, momento en el que la vejiga se relaja y el esfínter urinario externo se contrae para reiniciar el almacenamiento. Los músculos que controlan el reflejo de la micción son controlados tanto por los sistemas nerviosos autónomos como somáticos. Durante la fase de almacenamiento, el esfínter uretral interno permanece tenso y el músculo detrusor relajado por estimulación simpática. Durante la micción, la estimulación parasimpática hace que el músculo detrusor se contraiga y el esfínter uretral interno se relaje. El esfínter urinario externo (también conocido como esfínter de la uretra) está bajo control somático y está conscientemente relajado durante la micción.

La disfunción neurogénica de la vejiga urinaria está causada más a menudo por enfermedades o lesiones de las células del sistema nervioso central o de los nervios periféricos implicados en el control de la micción. La hiperreflexia del detrusor (HD) y la disinergia del detrusor-esfínter externo (DDE) son dos afecciones debidas a la alteración de la regulación del sistema nervioso central del reflejo de la micción. Los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para aliviar los síntomas de disfunción de la vejiga en individuos.

45 ***Hiperreflexia del detrusor***

El músculo urinario detrusor, (también conocido como músculo detrusor, muscularis propria de la vejiga urinaria y and muscularis propria) rodea la vejiga urinaria y se contrae al orinar para exprimir la orina. De lo contrario, permanece relajado para permitir que la vejiga se llene. La hiperreflexia del detrusor se refiere a una afección neurogénica por la cual el músculo detrusor se contrae anormalmente y evita que la vejiga se vacíe completamente. Los síntomas de la HD van desde la subactividad del detrusor hasta la hiperactividad, dependiendo del sitio y la naturaleza de la lesión neurológica. Por ejemplo, la “hiperreflexia del detrusor con contractilidad deteriorada” (DHIC) se refiere a los síntomas de la vejiga hiperactiva, pero el músculo detrusor es incapaz de producir suficiente presión para permitir la evacuación total. Por lo tanto, el detrusor es demasiado débil para afrontar una contracción adecuada para que se produzca la evacuación adecuada. La afección es similar a la retención urinaria, pero son frecuentes los síntomas irritantes de la evacuación. Adicionalmente, “arreflexia del detrusor” se refiere a la incapacidad completa del detrusor para vaciarse debido a una lesión de la neurona motora inferior (p.ej., al cordón sacro o nervios periféricos).

Las causas de la hiperreflexia del detrusor son variadas. Las lesiones en el cerebro en la región por encima de la protuberancia destruyen el centro de control maestro de la micción, lo que tiene como resultado una pérdida completa de control de la micción. Sin embargo, los reflejos primitivos de evacuación del tracto urinario inferior están todavía intactos. Los individuos que sufren una lesión de este tipo presentan incontinencia de urgencia (también conocida como vejiga espástica). En este caso, la vejiga se vacía rápidamente y a menudo, con volúmenes relativamente bajos de orina. Además, el almacenamiento de orina en la vejiga es difícil y las personas con este problema por lo general se apresuran a ir al baño e incluso presentan pérdidas de orina antes de llegar a su destino. A menudo, la afección tiene como resultado la interrupción del sueño varias veces durante la noche, lo que requiere

que el individuo tenga que ir en varias ocasiones al baño para aliviar el impulso de evacuar. Ejemplos típicos de lesiones cerebrales que pueden dar como resultado los síntomas de hiperreflexia del detrusor incluyen, sin limitación, ictus, tumor cerebral, enfermedad de Parkinson, hidrocefalia, parálisis cerebral y lesión cerebral traumática.

5 Las enfermedades o lesiones de la médula espinal entre la protuberancia y la médula espinal sacra también pueden provocar hiperreflexia del detrusor. Los individuos que sufren lesiones medulares que resultan en paraplejía o tetraplejía suelen experimentar espasticidad en las extremidades inferiores. En el período inicialmente posterior al traumatismo de la médula espinal, el individuo experimenta una pérdida de sensación acompañada de parálisis motora con pérdida inicial pero recuperación gradual de los reflejos después de aproximadamente 6-12 semanas. Esta recuperación gradual del sistema nervioso a menudo conduce a la hiperestimulación de los órganos afectados, incluyendo el músculo detrusor de la vejiga. De forma similar a lo que sucede en los individuos con lesiones cerebrales, los individuos que sufren trauma de la médula espinal a menudo experimentan incontinencia de urgencia. Además de los accidentes asociados con lesiones deportivas o vehículos de motor, la esclerosis múltiple (EM) también puede causar enfermedad de la médula espinal. Además, los niños nacidos con mielomeningocele también pueden exhibir vejigas neurogénicas que conducen a síntomas asociados con hiperreflexia del detrusor. En algunos aspectos de los métodos para tratar la hiperreflexia del detrusor proporcionados en la presente memoria, una lesión en el sistema nervioso que cause hiperreflexia del detrusor en un individuo no se produce en las células nerviosas situadas por debajo del segundo, tercer y/o cuarto nervios raquídeos sacros (S2, S3, S4).

20 Las enfermedades que tienen como resultado neuropatía periférica también pueden causar síntomas asociados con la hiperreflexia del detrusor. La diabetes mellitus y el SIDA pueden dañar o destruir los nervios que inervan el músculo detrusor de la vejiga y pueden conducir a distensión silenciosa e indolora de la vejiga. Los pacientes con diabetes crónica pueden perder primero la sensación de llenado de la vejiga, antes de que la vejiga se descompense. Las personas afectadas tienen dificultad para orinar y también pueden experimentar DHIC. Otros ejemplos no limitativos de enfermedades del sistema nervioso periférico que pueden causar hiperreflexia del detrusor son la poliomielitis, el síndrome de Guillain-Barré, el herpes grave en el área genitoanal, la anemia perniciosa y la neurosífilis.

30 La hiperreflexia del detrusor se diagnostica mediante cistometría, que se utiliza para evaluar la función de la vejiga. Los estudios de flujo de presión implican la medición de las presiones del detrusor mientras que el paciente está evacuando para distinguir la HD de la contractilidad del detrusor. Se puede obtener información diagnóstica adicional de: un diario de evacuación, análisis de orina y cultivo, niveles de electrolitos plasmáticos y creatinina o una ecografía de las vías renales que incluye la medición del volumen de orina residual post-evacuación (PVR).

35 Disinergia del esfínter externo del detrusor (DDE)

Este trastorno de la evacuación es similar a la hiperreflexia del detrusor, excepto que el esfínter urinario externo puede tener contracciones paradójicas simultáneamente con las del músculo detrusor cuando intenta la evacuación. Normalmente, el músculo detrusor y el esfínter urinario externo funcionan en sinergia, de modo que cuando uno se contrae (p.ej., el esfínter durante la fase de almacenamiento o el detrusor durante la fase de evacuación) el otro está relajado (p.ej., el esfínter durante la fase de evacuación o el detrusor durante la fase de almacenamiento). Si tanto la vejiga como el esfínter externo se contraen al mismo tiempo, el individuo afectado percibirá un intenso deseo de orinar, pero en realidad solo podrá evacuar una pequeña cantidad. El término médico para esto es disinergia del detrusor-esfínter externo porque la vejiga y el esfínter externo no están operando en sinergia. A pesar de que la vejiga está tratando de expulsar la orina, el esfínter externo se está contrayendo para evitar que la orina salga.

50 Tanto el músculo detrusor como el esfínter urinario externo se inervan a través de los nervios que se originan en la médula espinal sacra. El músculo detrusor es inervado por las inervaciones del detrusor parasimpático que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros. El esfínter urinario externo, por otra parte, es inervado por las inervaciones externas del esfínter urinario del nervio pudendo. El nervio pudendo se origina en el plexo sacro y deriva sus fibras de las ramas ventrales del segundo, tercer y cuarto nervios raquídeos sacros (S2, S3, S4). Pasa entre los músculos piriforme y coccígeo y sale de la pelvis a través de la parte inferior del foramen ciático mayor. A continuación cruza la espina dorsal isquiática y entra de nuevo en la pelvis a través del foramen ciático menor. Acompaña a los vasos pudendos internos hacia arriba y hacia adelante a lo largo de la pared lateral de la fosa isquiorrectal y está contenido en una vaina de la fascia obturadora conocida como el canal pudendo. El nervio pudendo abandona los nervios rectales inferiores y luego se divide en dos ramas terminales: el nervio perineal y el nervio dorsal del pene (hombres) o el nervio dorsal del clitoris (en las mujeres). Los nervios anales inferiores se ramifican poco después de pasar a través del foramen ciático más grande. En algunos aspectos de los métodos para tratar la disinergia del detrusor-esfínter externo proporcionados en la presente memoria, en un individuo no se produce una lesión en el sistema nervioso que provoque disinergia del esfínter externo del detrusor en las células nerviosas situadas por debajo del segundo, tercer y/o cuarto nervios raquídeos sacros (S2, S3, S4).

65 La DDE se diagnostica inicialmente a partir de un trazado electromiográfico (EMG) del esfínter uretral que mide los potenciales eléctricos generados por la despolarización de las células musculares. Los estudios videourodinámicos se utilizan para confirmar la DDE e identificar otras irregularidades fisiológicas o anatómicas.

Incontinencia fecal

La incontinencia fecal (IF) es la pérdida de control regular del intestino. La excreción involuntaria y el escape son episodios comunes para los afectados. La incontinencia fecal puede ser causada por daño en los nervios que controlan los esfínteres anales o en los nervios que detectan heces en el recto. El daño en los nervios que controlan los músculos del esfínter puede hacer que los músculos no puedan trabajar eficazmente. Si los nervios sensoriales están dañados, la detección de heces en el recto está deshabilitada y uno no sentirá la necesidad de defecar hasta que sea demasiado tarde. El daño nervioso puede ser causado por, sin limitación, por el parto, estreñimiento crónico, ictus, enfermedades que causan degeneración nerviosa, como diabetes y esclerosis múltiple. El daño en la médula espinal también puede tener como resultado incontinencia fecal. Además, mientras que el recto normalmente se estira para sostener las heces hasta que se libera voluntariamente, la cirugía rectal, la radioterapia y la enfermedad inflamatoria del intestino pueden causar cicatrices, lo que puede hacer que las paredes del recto se vuelvan rígidas y menos elásticas. Las paredes rectales son incapaces de estirar tanto y son incapaces de acomodar tantas heces, lo que conduce a la IF. La enfermedad inflamatoria intestinal también puede hacer que las paredes rectales estén muy irritadas y, por lo tanto, sean incapaces de contener las heces.

Los esfínteres anales mantienen el ano cerrado mientras que las heces se acumulan en el recto. Eventualmente, la presión en la pared rectal hace que el esfínter anal interno se relaje mientras que el control motor consciente sobre el esfínter anal externo (EAE) permite que las heces salgan del cuerpo a través del ano. El EAE es un plano aplanado de fibras musculares, de forma elíptica e íntimamente adherente al integumento que rodea el margen del ano. El EEA está, al igual que otros músculos, siempre en estado de contracción tónica y no tiene músculo antagonista que mantenga el canal y el orificio anal cerrados. Además, se puede contraer aún más la influencia de la voluntad para ocluir más firmemente la apertura anal. Es inervado por una rama del cuarto nervio raquídeo sacro (S4) y por la rama rectal (también conocida como hemorroidal inferior) del nervio pudendo.

Disfunción sexual

La disfunción sexual se refiere a una dificultad experimentada por un individuo o una pareja durante cualquier etapa de una actividad sexual normal, incluyendo el deseo, la excitación o el orgasmo. Hay muchos factores que pueden provocar en una persona una disfunción sexual, cual puede ser debida a causas emocionales o físicas. Por ejemplo, la actividad sexual puede verse afectada por factores físicos como el uso de drogas, alcohol, nicotina, narcóticos, estimulantes, antihipertensivos, antihistamínicos y algunos fármacos psicoterapéuticos. Las lesiones en la espalda también pueden afectar a la actividad sexual, al igual que los problemas con una próstata agrandada, problemas con la irrigación sanguínea y daño a los nervios (como en las lesiones de la médula espinal). La enfermedad, como la neuropatía diabética, la esclerosis múltiple, los tumores y, en raras ocasiones, la sífilis terciaria, también pueden afectar a la actividad sexual, al igual que la insuficiencia de diversos sistemas orgánicos (como el corazón y los pulmones), trastornos endocrinos (por ejemplo, hipotálamo, la glándula tiroidea, hipofisaria o suprarrenal), deficiencias hormonales (por ejemplo, niveles bajos de testosterona, estrógenos o andrógenos) y algunos defectos congénitos.

En el caso de los hombres, la piel del pene está inervada por el nervio dorsal del pene, que es la división más profunda del nervio pudendo; acompaña a la arteria pudenda interna a lo largo de la rama isquiática, que transcurre hacia adelante a lo largo del margen de la rama inferior del pubis, entre las capas superior e inferior de la fascia del diafragma urogenital. En las mujeres, el clítoris es inervado por una rama similar del nervio pudendo conocido como el nervio dorsal del clítoris. Además, el nervio pudendo desempeña un papel en la inervación de los músculos bulboesponjoso e isquiocavernoso y áreas alrededor del escroto (en hombres), perineo y ano. Durante el acto sexual, en el clímax sexual, los espasmos del bulboesponjoso e isquiocavernoso tienen como resultado la eyaculación en el varón y la mayoría de las sensaciones externas asociadas con la experiencia del orgasmo en ambos sexos.

Proteínas opsina sensibles a la luz

En la presente memoria se proporcionan métodos optogenéticos para hiperpolarizar o despolarizar selectivamente las neuronas responsables de la inervación del músculo detrusor y el esfínter urinario externo con proteínas opsina sensibles a la luz para restablecer eficazmente la sinergia detrusor-esfínter en individuos afectados con disfunción de la vejiga (tal como HD y DDE). También se proporcionan en la presente memoria métodos optogenéticos para hiperpolarizar o despolarizar selectivamente las neuronas responsables de la inervación del esfínter anal externo para restablecer eficazmente el control intestinal en individuos afectados por incontinencia fecal. Adicionalmente, se proporcionan métodos optogenéticos para la despolarización selectiva de las neuronas responsables de la inervación de los músculos y órganos de los genitales con proteínas opsina sensibles a la luz para restablecer eficazmente la función sexual en individuos con disfunción sexual. La optogenética se refiere a la combinación de métodos genéticos y ópticos utilizados para controlar eventos específicos en células diana de tejido vivo, incluso en mamíferos que se mueven libremente y otros animales, con la precisión temporal (escala de tiempo de milisegundos) necesaria para mantener el ritmo de funcionamiento de sistemas biológicos intactos. La optogenética requiere la introducción de canales o proteínas bomba sensibles a la luz de respuesta rápida en las membranas plasmáticas de las células neuronales diana que permiten una manipulación temporal precisa del potencial de la

membrana neuronal mientras se mantiene la resolución del tipo celular mediante el uso de mecanismos específicos de direccionamiento. Puede usarse cualquier opsina microbiana para promover la hiperpolarización o despolarización de la membrana de las células neurales en respuesta a la luz. Por ejemplo, puede usarse la familia halorodopsina de bombas de cloruro sensibles a la luz (p. ej., NpHR, NpHR2.0, NpHR3.0, NpHR3.1) y la bomba de protones GtR3 para promover la hiperpolarización de la membrana de las células neurales en respuesta a la luz. Como otro ejemplo, se puede usar eARCH (una bomba de protones) para promover la hiperpolarización de la membrana celular neural en respuesta a la luz. Además, los miembros de la familia canalrodopsina de proteínas de canal catiónico sensibles a la luz (p.ej., ChR2, SFOs, SSFOs, C1V1s) se pueden utilizar para promover la despolarización de la membrana celular neuronal o la depleción sináptica inducida por la despolarización en respuesta a un estímulo de luz.

Intensificación del transporte celular por motivos de aminoácidos

La presente divulgación proporciona la modificación de proteínas opsina sensibles a la luz expresadas en una célula mediante la adición de uno o más motivos de secuencia de aminoácidos que intensifican el transporte a las membranas plasmáticas de las células de mamífero. Las proteínas opsina sensibles a la luz que tienen componentes derivados de organismos evolutivamente más simples pueden no ser expresadas o toleradas por células de mamífero o pueden presentar una localización subcelular alterada cuando se expresan a niveles altos en células de mamífero. Por consiguiente, en algunas realizaciones, las proteínas opsina sensibles a la luz expresadas en una célula pueden fusionarse con uno o más motivos de secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en un péptido señal, una señal de exportación del retículo endoplásmico (RE), una señal de tráfico de membrana y/o una señal de exportación del aparato de Golgi N-terminal. Los uno o más motivos de secuencia de aminoácidos que intensifican el transporte de proteína opsina sensible a la luz a las membranas plasmáticas de las células de mamífero pueden fusionarse con el extremo N terminal, el extremo C terminal o con los extremos N y C terminales de la proteína opsina sensible a la luz. Opcionalmente, la proteína opsina sensible a la luz y el uno o más motivos de secuencia de aminoácidos pueden estar separados por un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína opsina sensible a la luz puede modificarse mediante la adición de una señal de tráfico (ts) que intensifica el transporte de la proteína a la membrana plasmática de la célula. En algunas realizaciones, la señal de tráfico puede derivarse de la secuencia de aminoácidos del canal de potasio rectificador interno humano Kir2.1. En otras realizaciones, la señal de tráfico puede comprender la secuencia de aminoácidos, KSRITSEGEYIPLDQIDINV (SEQ ID NO:12)).

Las secuencias de tráfico que son adecuadas para su uso pueden comprender una secuencia de aminoácidos que tiene 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos, tal como una secuencia de tráfico de canal de potasio rectificador interno humano Kr2.1 (por ej., KSRITSEGEYIPLDQIDINV (SEQ ID NO:12)).

Una secuencia de tráfico puede tener una longitud de aproximadamente 10 aminoácidos a aproximadamente 50 aminoácidos, por ejemplo, de aproximadamente 10 aminoácidos a aproximadamente 20 aminoácidos, de aproximadamente 20 aminoácidos a aproximadamente 30 aminoácidos, de aproximadamente 30 aminoácidos a aproximadamente 40 aminoácidos, o de aproximadamente 40 aminoácidos a aproximadamente 50 aminoácidos.

Las secuencias de señal que son adecuadas para el uso pueden comprender una secuencia de aminoácidos que tiene una secuencia de aminoácidos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos tal como una de las siguientes:

- 1) El péptido señal de hChR2 (por ejemplo, MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGS (SEQ ID NO:13))
- 2) El péptido señal de la subunidad $\beta 2$ del receptor nicotínico neuronal de acetilcolina (por ejemplo, MAGHSNSMALFSFLLWLCSGVLGTEF (SEQ ID NO:14));
- 3) Una secuencia de señal del receptor nicotínico de acetilcolina (por ejemplo, MGLRALMLWLLAAGLVRESLQG (SEQ ID NO:15)); y
- 4) Una secuencia de señal del receptor nicotínico de acetilcolina (por ejemplo, MRGTPLLLVVSFLSLQD (SEQ ID NO:16)).

Una secuencia señal puede tener una longitud de aproximadamente 10 aminoácidos a aproximadamente 50 aminoácidos, por ejemplo, de aproximadamente 10 aminoácidos a aproximadamente 20 aminoácidos, de aproximadamente 20 aminoácidos a aproximadamente 30 aminoácidos, de aproximadamente 30 aminoácidos a aproximadamente 40 aminoácidos, o de aproximadamente 40 aminoácidos a aproximadamente 50 aminoácidos.

Las secuencias de exportación del retículo endoplásmico (ER) que son adecuadas para su uso en una opsina modificada de la presente divulgación incluyen, por ej., VXXSL (donde X es cualquier aminoácido) (por ej., VKESL (SEQ ID NO:17), VLGS:18), etc.); NANSFCYENEVALTSK (SEQ ID NO:19); FXYENE (SEQ ID NO:20) (donde X es cualquier aminoácido), por ejemplo, FCYENEV (SEQ ID NO:21) y similares. Una secuencia de exportación del RE puede tener una longitud de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 25 aminoácidos, por ejemplo, de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 10 aminoácidos, de aproximadamente 10 aminoácidos a aproximadamente 15 aminoácidos, de aproximadamente 15 aminoácidos a aproximadamente 20 aminoácidos, o de

aproximadamente 20 aminoácidos a aproximadamente 25 aminoácidos.

Otros motivos de proteína adicionales que pueden intensificar el transporte de proteína opsina sensible a la luz a la membrana plasmática de una célula se describen en la Solicitud de patente de los Estados Unidos N.º 12/041.628, la cual se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad. En algunas realizaciones, la secuencia del péptido señal en la proteína puede suprimirse o sustituirse con una secuencia de péptido señal de una proteína diferente.

Bombas de cloruro sensibles a la luz

En algunos aspectos de los métodos proporcionados en la presente memoria, uno o más miembros de la familia halorodopsina de bombas de cloruro sensibles a la luz se expresan en las membranas plasmáticas de las células neurales que comprenden las inervaciones del músculo detrusor y el esfínter urinario externo. En algunas realizaciones, dichas una o más bombas de cloruro sensibles a la luz se expresan en la membrana plasmática de los nervios que comprenden uno o más nervios raquídeos sacros. En otras realizaciones, dichas una o más bombas de cloruro sensibles a la luz se expresan en la membrana plasmática de nervios que comprenden las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros. En otra realización, dichas una o más bombas de cloruro sensibles a la luz se expresan en la membrana plasmática del nervio pudendo. En otras realizaciones, dichas una o más bombas de cloruro sensibles a la luz se expresan en la membrana plasmática de los nervios que comprenden las inervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo.

En algunos aspectos, dichas una o más proteínas bomba de cloruro sensibles a la luz, expresadas en las membranas plasmáticas de las células nerviosas descritas anteriormente, pueden derivarse de *Natronomonas pharaonis*. En algunas realizaciones, las proteínas bomba de cloruro sensibles a la luz pueden ser sensibles a la luz ámbar así como a la luz roja y pueden mediar una corriente hiperpolarizante en la célula nerviosa cuando las proteínas bomba de cloruro sensibles a la luz se iluminan con luz ámbar o roja. La longitud de onda de la luz que puede activar las bombas de cloruro sensibles a la luz puede estar entre aproximadamente 580 y 630 nm. En algunas realizaciones, la luz puede tener una longitud de onda de aproximadamente 589 nm o la luz puede tener una longitud de onda superior a aproximadamente 630 nm (p.ej. menos de aproximadamente 740 nm). En otra realización, la luz tiene una longitud de onda de aproximadamente 630 nm. En algunas realizaciones, la proteína bomba de cloruro sensible a la luz puede hiperpolarizar una membrana neural durante al menos aproximadamente 90 minutos cuando se expone a un pulso continuo de luz. En algunas realizaciones, la proteína bomba de cloruro sensible a la luz puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:1. Además, la proteína bomba de cloruro sensible a la luz puede comprender sustituciones, deleciones y/o inserciones introducidas en una secuencia de aminoácidos nativa para aumentar o disminuir la sensibilidad a la luz, aumentar o disminuir la sensibilidad a determinadas longitudes de onda de la luz y/o aumentar o disminuir la capacidad de la proteína sensible a la luz para regular el estado de polarización de la membrana plasmática de la célula. En algunas realizaciones, la proteína bomba de cloruro sensible a la luz contiene una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras. En algunas realizaciones, la proteína sensible a la luz contiene una o más sustituciones de aminoácidos que no conservadoras. La proteína sensible a la luz que comprende sustituciones, deleciones y/o inserciones introducidas en la secuencia de aminoácidos nativa retiene adecuadamente la capacidad de hiperpolarizar la membrana plasmática de una célula neuronal en respuesta a la luz .

Además, en otros aspectos, la proteína bomba de cloruro sensible a la luz puede comprender una secuencia de aminoácidos básica al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:1 y una señal de exportación del retículo endoplásmico (RE). Esta señal de exportación del RE puede fusionarse con el extremo C terminal de la secuencia de aminoácidos básica o puede fusionarse con el extremo N terminal de la secuencia de aminoácidos básica. En algunas realizaciones, la señal de exportación del RE está unida a la secuencia de aminoácidos básica por un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400 o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador puede comprender además una proteína fluorescente, por ejemplo, pero sin limitarse a, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde o una proteína fluorescente cian. En algunas realizaciones, la señal de exportación del RE puede comprender la secuencia de aminoácidos FXYENE (SEQ ID NO:20), donde X puede ser cualquier aminoácido. En otra realización, la señal de exportación del RE puede comprender la secuencia de aminoácidos VXXSL, donde X puede ser cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, la señal de exportación del RE puede comprender la secuencia de aminoácidos FCYENEV (SEQ ID NO:21).

Las secuencias de exportación del retículo endoplásmico (ER) que son adecuadas para su uso en una opsina modificada de la presente divulgación incluyen, por ej., VXXSL (donde X es cualquier aminoácido) (por ej., VKESL (SEQ ID NO:17), VLGSL (SEQ ID NO:18), etc.); NANSFCYENEVALTSK (SEQ ID NO:19); FXYENE (donde X es cualquier aminoácido) (SEQ ID NO:20), por ejemplo, FCYENEV (SEQ ID NO:21) y similares. Una secuencia de exportación del RE puede tener una longitud de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 25 aminoácidos, por ejemplo, de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 10 aminoácidos, de aproximadamente 10 aminoácidos a aproximadamente 15 aminoácidos, de aproximadamente 15 aminoácidos a

aproximadamente 20 aminoácidos o de aproximadamente 20 aminoácidos a aproximadamente 25 aminoácidos.

En otros aspectos, las proteínas bomba de cloruro sensible a la luz proporcionadas en la presente memoria pueden comprender una proteína sensible a la luz expresada en la membrana celular, en la que la proteína comprende una
 5 secuencia de aminoácidos básica al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:1 y una señal de tráfico (p.ej., que puede intensificar el transporte de la proteína bomba de cloruro sensible a la luz a la membrana plasmática). La señal de tráfico puede fusionarse con el extremo C terminal de la secuencia de aminoácidos básica o puede fusionarse con el extremo N terminal de la secuencia de aminoácidos básica. En algunas realizaciones, la señal de tráfico puede estar
 10 unida a la secuencia de aminoácidos básica mediante un enlazador que puede comprender cualquiera de aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400, o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador puede comprender además una proteína fluorescente, por ejemplo, pero sin limitarse a, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde o una proteína fluorescente cian. En algunas realizaciones, la señal de tráfico puede derivarse de la secuencia de aminoácidos del canal de potasio rectificador interno humano $K_{ir}2.1$. En otras realizaciones, la señal de tráfico puede comprender la secuencia de aminoácidos KSRITSEGEYIPLDQIDINV (SEQ ID NO:12).

En algunos aspectos, la proteína bomba de cloruro sensible a la luz puede comprender una secuencia de aminoácidos básica al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o
 20 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:1 y al menos uno (dos, tres, o más) motivos de la secuencia de aminoácidos que intensifican el transporte a las membranas plasmáticas de las células de mamífero seleccionadas del grupo que consiste en una señal de exportación del RE, un péptido señal y una señal de tráfico de membrana. En algunas realizaciones, la proteína bomba de cloruro sensible a la luz comprende un péptido señal N-terminal, una señal de exportación del RE C-terminal y una señal de tráfico C-terminal. En algunas realizaciones, la señal de exportación del RE C-terminal y la señal de tráfico C-terminal pueden unirse mediante un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400 o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador puede comprender además una proteína fluorescente, por ejemplo, pero sin limitarse a, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde o una proteína fluorescente cian. En algunas realizaciones, la señal de exportación del RE puede estar localizada más próxima al C-terminal que la señal de tráfico. En otras realizaciones, la señal de tráfico está localizada más próxima al C-terminal que la señal de exportación del RE. En algunas realizaciones, el péptido señal comprende la secuencia de aminoácidos MTETLPPVTESAVALQAE (SEQ ID NO:22). En otra realización, la proteína bomba de cloruro sensible a la luz comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO:2.

Además, en otros aspectos, las proteínas bomba de cloruro sensibles a la luz pueden comprender una secuencia de aminoácidos básica al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o
 40 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:1, en la que el péptido señal N-terminal de la SEQ ID NO:1 se elimina o se sustituye. En algunas realizaciones, pueden usarse otros péptidos señal (tales como péptidos señal de otras opsinas). La proteína sensible a la luz puede comprender además una señal de transporte del RE y/o una señal de tráfico de membrana descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, la proteína bomba de cloruro sensible a la luz comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO:3.

En algunas realizaciones, la proteína opsina sensible a la luz es una proteína opsina NpHR que comprende una
 45 secuencia de aminoácidos al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, la proteína opsina NpHR comprende además una señal de exportación del retículo endoplásmico (RE) y/o una señal de tráfico de membrana. Por ejemplo, la proteína opsina NpHR comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:1 y una señal de exportación del retículo endoplásmico (RE). En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:1 está unida a la señal de exportación del RE a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la señal de exportación del RE comprende la secuencia de aminoácidos FXYENE (SEQ ID NO:20), donde X puede ser cualquier aminoácido. En otra realización, la señal de exportación del RE comprende la secuencia de aminoácidos VXXSL, donde X puede ser cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, la señal de exportación del RE
 55 comprende la secuencia de aminoácidos FCYENEV (SEQ ID NO:21). En algunas realizaciones, la proteína opsina NpHR comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:1, una señal de exportación del RE y una señal de tráfico de membrana. En otras realizaciones, la proteína opsina NpHR comprende, desde el extremo N terminal hasta el extremo C terminal, la secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:1, la señal de exportación del RE y la señal de tráfico de membrana. En otras realizaciones, la proteína opsina NpHR comprende, desde el extremo N terminal hasta el extremo C terminal, la secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:1, la señal de tráfico de membrana y la señal de exportación del RE. En algunas realizaciones, la señal de tráfico de membrana se deriva de la secuencia de aminoácidos del canal de potasio rectificador interno humano $K_{ir}2.1$. En algunas realizaciones, la señal de tráfico de membrana comprende la secuencia de aminoácidos KSRITSEGEYIPEDQIDINV (SEQ ID NO:12). En algunas realizaciones, la señal de tráfico de membrana está unida a la señal de exportación del RE a través de un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de 5, 10, 20,

30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400 o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador puede comprender además una proteína fluorescente, por ejemplo, pero sin limitarse a, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde o una proteína fluorescente cian. En algunas realizaciones, la proteína opsina sensible a la luz comprende además un péptido señal N-terminal. En algunas realizaciones, la proteína opsina sensible a la luz comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2. En algunas realizaciones, la proteína opsina sensible a la luz comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3

En la presente memoria también se proporcionan polinucleótidos que codifican cualquiera de las proteínas bomba de ion cloruro sensible a la luz descritas en la presente memoria, tales como una proteína sensible a la luz que comprende una secuencia de aminoácidos básica al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:1, una señal de exportación del RE y una señal de tráfico de membrana. En otra realización, los polinucleótidos comprenden una secuencia que codifica una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO:2 y la SEQ ID NO:3. Los polinucleótidos pueden estar en un vector de expresión (tal como, pero sin limitarse a, un vector viral descrito en la presente memoria). Los polinucleótidos pueden usarse para la expresión de las proteínas bomba de ion cloruro sensibles a la luz.

Se puede encontrar información adicional relacionada con proteínas bomba de cloruro sensible a la luz en las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos números 2009/0093403 y 2010/0145418, así como en la Solicitud de Patente Internacional N.º: PCT/US2011/028893, cuyas divulgaciones se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad.

Bombas de protones sensibles a la luz

En algunos aspectos de los métodos proporcionados en la presente memoria, una o más bombas de protones sensibles a la luz se expresan en las membranas plasmáticas de las células neurales que comprenden las innervaciones del músculo detrusor y el esfínter urinario externo. En algunas realizaciones, una o más bombas de protones sensibles a la luz se expresan en la membrana plasmática de los nervios que comprenden uno o más nervios raquídeos sacros. En otras realizaciones, la o las bombas de protones sensibles a la luz se expresan en la membrana plasmática de nervios que comprenden las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros. En otra realización, una o más bombas de protones sensibles a la luz se expresan en la membrana plasmática del nervio pudiendo. En otras realizaciones, la una o más bombas de protones sensibles a la luz se expresan en la membrana plasmática de nervios que comprende las innervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudiendo.

En algunas realizaciones, la proteína bomba de protones sensible a la luz puede ser sensible a la luz azul y puede derivarse de *Guillardia theta*, en la que la proteína bomba de protones puede ser capaz de mediar una corriente hiperpolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz azul. La luz puede tener una longitud de onda entre aproximadamente 450 y aproximadamente 495 nm o puede tener una longitud de onda de aproximadamente 490 nm. En otra realización, la proteína bomba de protones sensible a la luz puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:4. La proteína bomba de protones sensible a la luz puede comprender adicionalmente sustituciones, deleciones y/o inserciones introducidas en una secuencia de aminoácidos nativa para aumentar o disminuir la sensibilidad a la luz, aumentar o disminuir la sensibilidad a determinadas longitudes de onda de la luz y/o aumentar o disminuir la capacidad de la proteína de la bomba de protones sensible a la luz para regular el estado de polarización de la membrana plasmática de la célula. Además, la proteína bomba de protones sensible a la luz puede contener una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras y/o una o más sustituciones de aminoácidos no conservadoras. La proteína bomba de protones sensible a la luz que comprende sustituciones, deleciones y/o inserciones introducidas en la secuencia de aminoácidos nativa retiene adecuadamente la capacidad de hiperpolarizar la membrana plasmática de una célula neuronal en respuesta a la luz.

En otros aspectos de los métodos divulgados en la presente memoria, la proteína bomba de protones sensible a la luz puede comprender una secuencia de aminoácidos básica al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:4 y al menos uno (como uno, dos, tres o más) motivos de secuencia de aminoácidos que intensifican el transporte a las membranas plasmáticas de las células de mamífero seleccionados del grupo que consiste en un péptido señal, una señal de exportación del RE y una señal de tráfico de membrana. En algunas realizaciones, la proteína bomba de protones sensible a la luz comprende un péptido señal N-terminal y una señal de exportación del RE C-terminal. En algunas realizaciones, la proteína bomba de protones sensible a la luz comprende un péptido señal N-terminal y una señal de tráfico C-terminal. En algunas realizaciones, la proteína bomba de protones sensible a la luz comprende un péptido señal N-terminal, una señal de exportación del RE C-terminal y una señal de tráfico C-terminal. En algunas realizaciones, la proteína bomba de protones sensible a la luz comprende una señal de exportación del RE C-terminal y una señal de tráfico C-terminal. En algunas realizaciones, la proteína bomba de protones sensible a la luz comprende una señal de exportación del RE C-terminal y la señal de tráfico C-terminal están unidas por un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de

aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400 o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador puede comprender además una proteína fluorescente, por ejemplo, pero sin limitarse a, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde o una proteína fluorescente cian. En algunas realizaciones, la señal de exportación del RE está situada más próxima al C-terminal que la señal de tráfico. En algunas realizaciones, la señal de tráfico está situada más próxima al C-terminal que la señal de exportación del RE.

En la presente memoria también se proporcionan polinucleótidos aislados que codifican cualquiera de las proteínas bomba de protones sensibles a la luz descritas en la presente memoria, tales como una proteína bomba de protones sensible a la luz que comprende una secuencia de aminoácidos de núcleo al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:4. También se proporcionan en la presente memoria vectores de expresión (tales como un vector viral descrito en la presente memoria) que comprenden un polinucleótido que codifica las proteínas descritas en la presente memoria, tal como una proteína bomba de protones sensible a la luz que comprende una secuencia de aminoácidos básica al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:4. Los polinucleótidos pueden usarse para la expresión de la proteína opsina sensible a la luz en células neurales (p.ej. las células neurales que comprenden las inervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros y las inervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo).

Se puede encontrar información adicional relacionada con proteínas bomba de protones sensibles a la luz en la Solicitud de Patente Internacional N.º PCT/US2011/028893, cuya divulgación se incorpora por referencia en su totalidad.

En algunas realizaciones, la proteína de bomba de protones sensible a la luz puede responder a la luz verde o amarilla y puede derivarse de *Hadorubrum sodomense*, en la que la proteína de bomba de protones puede ser capaz de mediar una corriente hiperpolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz verde o amarilla. La luz puede tener una longitud de onda entre aproximadamente 560 y aproximadamente 570 nm o puede tener una longitud de onda de aproximadamente 566 nm. En otra realización, la proteína de bomba de protones sensible a la luz puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:23. La proteína de bomba de protones sensible a la luz puede comprender adicionalmente sustituciones, deleciones y/o inserciones introducidas en una secuencia de aminoácidos nativa para aumentar o disminuir la sensibilidad a la luz, aumentar o disminuir la sensibilidad a determinadas longitudes de onda de luz y/o aumentar o disminuir la capacidad la proteína de la bomba de protones sensible a la luz para regular el estado de polarización de la membrana plasmática de la célula. Además, la proteína de bomba de protones sensible a la luz puede contener una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras y/o una o más sustituciones de aminoácidos no conservadoras. La proteína de bomba de protones sensible a la luz que comprende sustituciones, deleciones y/o inserciones introducidas en la secuencia de aminoácidos nativa retiene adecuadamente la capacidad de hiperpolarizar la membrana plasmática de una célula neuronal en respuesta a la luz.

En otros aspectos de los métodos divulgados en la presente memoria, la proteína de bomba de protones sensible a la luz puede comprender una secuencia de aminoácidos básica al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:23 y al menos uno (tal como uno, dos, tres o más) motivos de secuencia de aminoácidos que intensifican el transporte a las membranas plasmáticas de células de mamífero seleccionados del grupo que consiste en un péptido señal, una señal de exportación del RE y una señal de tráfico de membrana. En algunas realizaciones, la proteína de bomba de protones sensible a la luz comprende un péptido señal N-terminal y una señal de exportación del RE C-terminal. En algunas realizaciones, la proteína bomba de protones sensible a la luz comprende un péptido señal N-terminal y una señal de tráfico C-terminal. En algunas realizaciones, la proteína bomba de protones sensible a la luz comprende un péptido señal N-terminal, una señal de exportación del RE C-terminal y una señal de tráfico C-terminal. En algunas realizaciones, la proteína bomba de protones sensible a la luz comprende una señal de exportación del RE C-terminal y una señal de tráfico C-terminal. En algunas realizaciones, la señal de exportación del RE C-terminal y la señal de tráfico C-terminal están unidas por un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400 o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador puede comprender además una proteína fluorescente, por ejemplo, pero sin limitarse a, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde o una proteína fluorescente cian. En algunas realizaciones, la señal de exportación del RE está situada más en C-terminal que la señal de tráfico. En algunas realizaciones, la señal de tráfico se encuentra más próxima al C-terminal que la señal de exportación del RE.

También se proporcionan en la presente memoria polinucleótidos aislados que codifican cualquiera de las proteínas bomba de protones sensibles a la luz descritas en la presente memoria, tales como una proteína bomba de protones sensible a la luz que comprende una secuencia de aminoácidos básica al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:23. También se proporcionan en la presente memoria vectores de expresión (tales como un vector viral descrito en la presente memoria) que comprenden un polinucleótido que codifica las proteínas descritas en la presente memoria,

tal como una proteína bomba de protones sensible a la luz que comprende una secuencia de aminoácidos básica de al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:23. Los polinucleótidos pueden usarse para la expresión de la proteína sensible a la luz en células neurales (p.ej. las células neurales que comprenden las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros y las innervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo).

Proteínas canal catiónico sensibles a la luz

En algunos aspectos de los métodos proporcionados en la presente memoria, uno o más canales catiónicos sensibles a la luz pueden expresarse en las membranas plasmáticas de las células neurales que comprenden las innervaciones del músculo detrusor y el esfínter urinario externo. En algunas realizaciones, uno o más canales catiónicos sensibles a la luz se pueden expresar en la membrana plasmática de uno o más nervios raquídeos sacros (tales como cualquiera de S1, S2, S3, S4 y/o S5). En otras realizaciones, el uno o más canales catiónicos sensibles a la luz pueden expresarse en la membrana plasmática de nervios que comprenden las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros. En otra realización, uno o más canales catiónicos sensibles a la luz pueden expresarse en la membrana plasmática del nervio pudendo. En otras realizaciones, el uno o más canales catiónicos sensibles a la luz pueden expresarse en la membrana plasmática de nervios que comprenden las innervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo.

En algunos aspectos, la proteína canal catiónico sensible a la luz puede derivarse de *Chlamydomonas reinhardtii*, en la que la proteína canal catiónico puede ser capaz de mediar una corriente despolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En otra realización, la proteína canal catiónico sensible a la luz puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:5. La luz utilizada para activar la proteína canal catiónico sensible a la luz derivada de *Chlamydomonas reinhardtii* puede tener una longitud de onda entre aproximadamente 460 y aproximadamente 495 nm o puede tener una longitud de onda de aproximadamente 480 nm. Adicionalmente, la luz puede tener una intensidad de al menos aproximadamente 100 Hz. En algunas realizaciones, la activación del canal catiónico sensible a la luz derivado de *Chlamydomonas reinhardtii* con luz que tiene una intensidad de 100 Hz puede causar la depleción sináptica inducida por la despolarización de las neuronas que expresan el canal catiónico sensible a la luz. La proteína canal catiónico sensible a la luz puede comprender adicionalmente sustituciones, deleciones y/o inserciones introducidas en una secuencia de aminoácidos nativa para aumentar o disminuir la sensibilidad a la luz, aumentar o disminuir la sensibilidad a determinadas longitudes de onda de la luz y/o aumentar o disminuir la capacidad de la proteína canal catiónico sensible a la luz para regular el estado de polarización de la membrana plasmática de la célula. Adicionalmente, la proteína canal catiónico sensible a la luz puede contener una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras y/o una o más sustituciones de aminoácidos no conservadoras. La proteína canal catiónico sensible a la luz que comprende sustituciones, deleciones y/o inserciones introducidas en la secuencia de aminoácidos nativa retiene adecuadamente la capacidad de despolarizar la membrana plasmática de una célula neuronal en respuesta a la luz.

En algunas realizaciones, el canal catiónico sensible a la luz comprende una sustitución de T159C de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:5. En algunas realizaciones, el canal catiónico sensible a la luz comprende una sustitución L132C de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:5. En algunas realizaciones, el canal catiónico sensible a la luz comprende una sustitución E123T de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:5. En algunas realizaciones, el canal catiónico sensible a la luz comprende una sustitución E123A de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:5. En algunas realizaciones, el canal catiónico sensible a la luz comprende una sustitución T159C y una sustitución E123T de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:5. En algunas realizaciones, el canal catiónico sensible a la luz comprende una sustitución T159C y una sustitución E123A de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:5. En algunas realizaciones, el canal catiónico sensible a la luz comprende una sustitución T159C, una sustitución L132C y una sustitución E123T de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:5. En algunas realizaciones, el canal catiónico sensible a la luz comprende una sustitución T159C, una sustitución L132C y una sustitución E123A de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:5. En algunas realizaciones, el canal catiónico sensible a la luz comprende una sustitución L132C y una sustitución E123T de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:5. En algunas realizaciones, el canal catiónico sensible a la luz comprende una sustitución L132C y una sustitución E123A de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:5.

Se puede encontrar información adicional relacionada con proteínas e canal catiónico sensibles a la luz en la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 2007/0054319 y las Publicaciones de Solicitud de Patente Internacional números WO 2009/131837 y WO 2007/024391, cuyas divulgaciones se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

Opsinas de función de paso y opsinas de función de paso estabilizadas

En otras realizaciones, la proteína canal catiónico sensible a la luz puede ser una proteína opsina de función de paso (SFO) o una proteína opsina de función de paso estabilizada (SSFO) que puede tener sustituciones de aminoácidos específicas en posiciones clave a lo largo del sitio de unión a la retina de la proteína. En algunas

realizaciones, la proteína SFO puede tener una mutación en el resto de aminoácido C128 de la SEQ ID NO:5. En otras realizaciones, la proteína SFO tiene una mutación C128A en la SEQ ID NO:5. En otras realizaciones, la proteína SFO tiene una mutación C128S en la SEQ ID NO:5. En otra realización, la proteína SFO tiene una mutación C128T en la SEQ ID NO:5. En algunas realizaciones, la proteína SFO puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:6.

En algunas realizaciones, la proteína SSFO puede tener una mutación en el resto de aminoácido D156 de la SEQ ID NO:5. En otras realizaciones, la proteína SSFO puede tener una mutación en ambos restos de aminoácidos C128 y D156 de la SEQ ID NO:5. En una realización, la proteína SSFO tiene una mutación C128S y una mutación D156A en la SEQ ID NO:5. En otra realización, la proteína SSFO puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica la secuencia mostrada en las SEQ ID NO:7. En otra realización, la proteína SSFO puede comprender una mutación C128T en la SEQ ID NO:5. En algunas realizaciones, la proteína SSFO comprende mutaciones C128T y D156A en la SEQ ID NO:5.

En algunas realizaciones, las proteínas SFO o SSFO proporcionadas en la presente memoria pueden ser capaces de mediar una corriente despolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz azul. En otras realizaciones, la luz puede tener una longitud de onda de aproximadamente 445 nm. Adicionalmente, la luz puede tener una intensidad de aproximadamente 100 Hz. En algunas realizaciones, la activación de la proteína SFO o SSFO con luz que tiene una intensidad de 100 Hz puede causar una depleción sináptica inducida por la despolarización de las neuronas que expresan la proteína SFO o SSFO. En algunas realizaciones, cada una de las proteínas opsina de función de paso y opsina de función de paso estabilizada divulgadas puede tener propiedades y características específicas para su uso en la despolarización de la membrana de una célula neuronal en respuesta a la luz.

Se puede encontrar información adicional relacionada con proteínas SFO o SSFO en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º WO 2010/056970 y Solicitudes de Patente Provisional de los Estados Unidos números 61/410.704 y 61/511,905, cuyas divulgaciones se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

Canales catiónicos quiméricos C1V1

En otras realizaciones, la proteína canal catiónico sensible a la luz puede ser una proteína quimérica C1V1 derivada de la proteína VChR1 de *Volvox carteri* y la proteína ChR1 de *Chlamydomonas reinhardtii*, en la que la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de VChR1 que tiene al menos la primera y segunda hélices transmembrana sustituidas por la primera y segunda hélices transmembrana de ChR1, es sensible a la luz y es capaz de mediar una corriente despolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En algunas realizaciones, la proteína C1V1 puede comprender además una sustitución dentro del dominio de bucle intracelular situado entre la segunda y tercera hélices transmembrana de la proteína quimérica sensible a la luz, en la que al menos una porción del dominio de bucle intracelular se reemplaza por la porción correspondiente de ChR1. En otra realización, la porción del dominio de bucle intracelular de la proteína quimérica C1V1 puede reemplazarse con la porción correspondiente de ChR1 que se extiende hasta el resto de aminoácido A145 de ChR1. En otras realizaciones, la proteína quimérica C1V1 puede comprender además una sustitución dentro de la tercera hélice transmembrana de la proteína quimérica sensible a la luz, en la que al menos una porción de la tercera hélice transmembrana se reemplaza por la secuencia correspondiente de ChR1. En otra realización más, la porción del dominio de bucle intracelular de la proteína quimérica C1V1 puede reemplazarse con la porción correspondiente de ChR1 que se extiende hasta el resto de aminoácido W163 del ChR1. En otras realizaciones, la proteína quimérica C1V1 puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:8.

En algunas realizaciones, la proteína C1V1 puede mediar una corriente despolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz verde. En otras realizaciones, la luz puede tener una longitud de onda de entre aproximadamente 540 nm a aproximadamente 560 nm. En algunas realizaciones, la luz puede tener una longitud de onda de aproximadamente 542 nm. En algunas realizaciones, la proteína quimérica C1V1 no es capaz de mediar una corriente despolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz violeta. En algunas realizaciones, la proteína quimérica no es capaz de mediar una corriente despolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 405 nm. Adicionalmente, la luz puede tener una intensidad de aproximadamente 100 Hz. En algunas realizaciones, la activación de la proteína quimérica C1V1 con luz que tiene una intensidad de 100 Hz puede causar la depleción sináptica inducida por despolarización de las neuronas que expresan la proteína quimérica C1V1. En algunas realizaciones, la proteína quimérica C1V1 divulgada puede tener propiedades y características específicas para su uso en la despolarización de la membrana de una célula neuronal en respuesta a la luz.

Variantes mutantes quiméricos C1V1

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos sustituidas o mutadas, en las que el polipéptido mutante retiene la naturaleza activable por luz característica del

polipéptido quimérico C1V1 precursor, pero también puede poseer propiedades alteradas en algunos aspectos específicos. Por ejemplo, las proteínas quiméricas C1V1 sensibles a la luz mutantes descritas en la presente memoria pueden presentar un nivel aumentado de expresión tanto dentro de una célula animal como en la membrana plasmática de la célula animal; una respuesta alterada cuando se expone a diferentes longitudes de onda de luz, particularmente luz roja y/o una combinación de rasgos en los que el polipéptido quimérico C1V1 posee las propiedades de baja desensibilización, desactivación rápida, baja activación de la luz violeta para una activación cruzada mínima con otros canales catiónicos sensibles a la luz y/o fuerte expresión en células animales.

Por consiguiente, se proporcionan en la presente invención proteínas opsina sensibles a la luz quimérica C1V1 que pueden tener sustituciones de aminoácidos específicas en posiciones clave a lo largo del sitio de unión a la retina de la porción VChR1 del polipéptido quimérico. En algunas realizaciones, la proteína C1V1 puede tener una mutación en el resto de aminoácido E122 de la SEQ ID NO:7. En algunas realizaciones, la proteína C1V1 puede tener una mutación en el resto de aminoácido E162 de la SEQ ID NO:7. En otras realizaciones, la proteína C1V1 puede tener una mutación en ambos restos de aminoácidos E162 y E122 de la SEQ ID NO:7. En otras realizaciones, la proteína C1V1 puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:11. En algunas realizaciones, cada una de las proteínas quiméricas C1V1 mutantes divulgadas puede tener propiedades y características específicas para su uso en la despolarización de la membrana de una célula animal en respuesta a la luz.

En algunos aspectos, la proteína quimérica mutante C1V1-E122 es capaz de mediar una corriente despolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En algunas realizaciones la luz puede ser luz verde. En otras realizaciones, la luz puede tener una longitud de onda de entre aproximadamente 540 nm a aproximadamente 560 nm. En algunas realizaciones, la luz puede tener una longitud de onda de aproximadamente 546 nm. En otras realizaciones, la proteína quimérica mutante C1V1-E122 puede mediar una corriente despolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz roja. En algunas realizaciones, la luz roja puede tener una longitud de onda de aproximadamente 630 nm. En algunas realizaciones, la proteína quimérica mutante C1V1-E122 no media una corriente despolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz violeta. En algunas realizaciones, la proteína quimérica no media una corriente despolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 405 nm. Adicionalmente, la luz puede tener una intensidad de aproximadamente 100 Hz. En algunas realizaciones, la activación de la proteína quimérica mutante C1V1-E122 con luz que tiene una intensidad de 100 Hz puede provocar una depleción sináptica inducida por la despolarización de las neuronas que expresan la proteína quimérica mutante C1V1-E122. En algunas realizaciones, la proteína quimérica mutante C1V1-E122 divulgada puede tener propiedades y características específicas para su uso en la despolarización de la membrana de una célula neuronal en respuesta a la luz.

En otros aspectos, la proteína quimérica mutante C1V1-E162 es capaz de mediar una corriente despolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En algunas realizaciones la luz puede ser luz verde. En otras realizaciones, la luz puede tener una longitud de onda de entre aproximadamente 535 nm a aproximadamente 540 nm. En algunas realizaciones, la luz puede tener una longitud de onda de aproximadamente 542 nm. En otras realizaciones, la luz puede tener una longitud de onda de aproximadamente 530 nm. En algunas realizaciones, la proteína quimérica mutante C1V1-E162 no media una corriente despolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz violeta. En algunas realizaciones, la proteína quimérica no media una corriente despolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 405 nm. Adicionalmente, la luz puede tener una intensidad de aproximadamente 100 Hz. En algunas realizaciones, la activación de la proteína quimérica mutante C1V1-E162 con luz que tiene una intensidad de 100 Hz puede provocar una depleción sináptica inducida por la despolarización de las neuronas que expresan la proteína quimérica mutante C1V1-E162. En algunas realizaciones, la proteína quimérica mutada C1V1-E162 divulgada puede tener propiedades y características específicas para su uso en la despolarización de la membrana de una célula neuronal en respuesta a la luz.

En otros aspectos más, la proteína quimérica mutante C1V1-E122/E162 es capaz de mediar una corriente despolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En algunas realizaciones la luz puede ser luz verde. En otras realizaciones, la luz puede tener una longitud de onda de entre aproximadamente 540 nm a aproximadamente 560 nm. En algunas realizaciones, la luz puede tener una longitud de onda de aproximadamente 546 nm. En algunas realizaciones, la proteína quimérica mutante C1V1-E122/E162 no media una corriente despolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz violeta. En algunas realizaciones, la proteína quimérica no media una corriente despolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 405 nm. En algunas realizaciones, la proteína quimérica mutante C1V1-E122/E162 puede mostrar menos activación cuando se expone a luz violeta con respecto a proteínas quiméricas C1V1 que carecen de mutaciones en E122/E162 o con respecto a otras proteínas canal catiónico sensibles a la luz. Adicionalmente, la luz puede tener una intensidad de aproximadamente 100 Hz. En algunas realizaciones, la activación de la proteína quimérica mutante C1V1-E122/E162 con luz que tiene una intensidad de 100 Hz puede provocar la depleción sináptica inducida por la despolarización de las neuronas que expresan la proteína quimérica mutante C1V1-E122/E162. En algunas realizaciones, la proteína quimérica mutada C1V1-E122/E162 divulgada puede tener propiedades y características específicas para su uso en la despolarización de la membrana de una

célula neuronal en respuesta a la luz.

Se puede encontrar información adicional relacionada con canales catiónicos quiméricos C1V1, así como variantes mutantes de los mismos en la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos números 61/410.736, 61/410.744 y 61/511.912, cuyas divulgaciones se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

Polinucleótidos

La divulgación también proporciona polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende un casete de expresión. En algunas realizaciones, el polinucleótido es un vector que comprende el ácido nucleico anteriormente descrito. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica una proteína opsina sensible a la luz de la divulgación está unido operativamente a un promotor. Los promotores son bien conocidos en la técnica. Se puede usar cualquier promotor que funcione en la célula hospedadora para la expresión de las proteínas opsina sensibles a la luz y/o cualquier variante de las mismas de la presente divulgación. En una realización, el promotor utilizado para dirigir la expresión de las proteínas opsina sensibles a la luz puede ser un promotor que es específico de las neuronas motoras. En otras realizaciones, el promotor es capaz de dirigir la expresión de las proteínas opsina sensibles a la luz en las neuronas de los sistemas nervioso simpático y/o parasimpático. Las regiones de control de la iniciación o promotores, que son útiles para dirigir la expresión de las proteínas opsina sensibles a la luz o sus variantes en una célula animal específica son numerosos y familiares para los expertos en la materia. Puede usarse prácticamente cualquier promotor capaz de dirigir estos ácidos nucleicos. Ejemplos de genes específicos de neuronas motoras se pueden encontrar, por ejemplo, en Kudo et al., Human Mol. Genética, 2010, 19(16):3233-3253, cuyo contenido se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad. En algunas realizaciones, el promotor usado para impulsar la expresión de la proteína sensible a la luz puede ser el promotor *Thy1*, que es capaz de dirigir la expresión robusta de transgenes en neuronas tanto del sistema nervioso central como periférico (Véase, por ejemplo, Llewellyn, et al., 2010, Nat. Med., 16(10):1161-1166). En otras realizaciones, el promotor utilizado para dirigir la expresión de la proteína sensible a la luz puede ser el promotor EF1 α , un promotor de citomegalovirus (CMV), el promotor CAG, un promotor de la sinapsina-I (por ejemplo, un promotor de la sinapsina-I humana), un promotor de la sinucleína 1 humana, un promotor Thy1 humano, un promotor de la alfa quinasa II dependiente de calcio/calmodulina (CAMKII α), o cualquier otro promotor capaz de dirigir la expresión de las proteínas opsina sensibles a la luz en las neuronas periféricas de los mamíferos.

En la presente memoria también se proporcionan vectores que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz o cualquier variante de la misma descrita en la presente memoria. Los vectores que se pueden administrar de acuerdo con la presente invención también incluyen vectores que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un ARN (p. ej., un ARNm) que cuando se transcribe a partir de los polinucleótidos del vector tendrá como resultado la acumulación de proteínas opsina sensibles a la luz en las membranas plasmáticas de las células animales diana. Los vectores que pueden usarse incluyen, sin limitación, vectores lentivirales, VHS, adenovirales y virales adeno-asociados (AAV). Los lentivirus incluyen, pero no se limitan a VIH-1, VIH-2, VIS, VIF y VAIE. Los lentivirus pueden ser pseudotipados con las proteínas de la envoltura de otros virus, incluyendo pero sin limitarse a los virus VSV, rabia, Mo-MLV, baculovirus y Ébola. Tales vectores pueden prepararse usando métodos convencionales en la técnica.

En algunas realizaciones, el vector es un vector AAV recombinante. Los vectores AAV son virus de ADN de tamaño relativamente pequeño que pueden integrarse, de una manera estable y específica del sitio, en el genoma de las células que infectan. Son capaces de infectar un amplio espectro de células sin inducir ningún efecto sobre el crecimiento, la morfología o la diferenciación celular y no parecen estar implicados en patologías humanas. El genoma del AAV ha sido clonado, secuenciado y caracterizado. Abarca aproximadamente 47.00 bases y contiene una región de repetición terminal invertida (ITR) de aproximadamente 145 bases en cada extremo, que sirve como un origen de replicación para el virus. El resto del genoma se divide en dos regiones esenciales que llevan las funciones de encapsidación: la parte izquierda del genoma, que contiene el gen *rep* implicado en la replicación viral y la expresión de los genes virales y la parte derecha del genoma, que contiene el gen *cap* que codifica las proteínas de la cápside del virus.

Los vectores AAV pueden prepararse usando métodos estándar en la técnica. Los virus adeno-asociados de cualquier serotipo son adecuados (véase, p.ej., Blacklow, págs. 165-174 de "Parvoviruses and Human Disease" J. R. Pattison, ed. (1988); Rose, Comprehensive Virology 3:1, 1974; P. Tattersall "The Evolution of Parvovirus Taxonomy" en Parvoviruses (JR Kerr, SF Cotmore. ME Bloom, RM Linden, CR Parrish, Eds.) p5-14, Hudder Arnold, Londres, Reino Unido (2006) y DE Bowles, JE Rabinowitz, RJ Samulski "The Genus Dependovirus" (JR Kerr, SF Cotmore. ME Bloom, RM Linden, CR Parrish, Eds.) p15-23, Hudder Arnold, Londres, Reino Unido (2006), cuyas divulgaciones se incorporan aquí por referencia en su totalidad). Se pueden encontrar métodos para purificar vectores en, por ejemplo, las patentes US-6.566.118, US-6.989.264 y US-6.995.006 y en el documento WO/1999/011764 Titulado "Methods for Generating High Titer Helper-free Preparation of Recombinant AAV Vectors", cuyas divulgaciones se incorporan aquí por referencia en su totalidad. Los métodos para preparar vectores AAV en un sistema de baculovirus se describen por ejemplo en el documento WO 2008/024998. Los vectores AAV pueden ser autocomplementarios o de hebra sencilla.

La preparación de vectores híbridos se describe, por ejemplo, en la Solicitud PCT N.º PCT/US2005/027091. El uso de vectores derivados de los AAV para la transferencia de genes *in vitro* e *in vivo* ha sido descrito (Véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º: 91/18088 y WO 93/09239; Patentes US-4.797.368, US-6.596.535 y US-5.139.941 y la Patente Europea N.º: 048 8528, cuyas divulgaciones se incorporan aquí por referencia en su totalidad). Estas publicaciones describen diversas construcciones derivadas de AAV en las que los genes *rep* y/o *cap* se eliminan y se sustituyen por un gen de interés y el uso de estas construcciones para transferir el gen de interés *in vitro* (en células cultivadas) o *in vivo* (directamente en un organismo). Los AAV recombinantes defectuosos para la replicación de acuerdo con la presente divulgación pueden prepararse co-transfectando un plásmido que contiene la secuencia de ácido nucleico de interés flanqueada por dos regiones de repetición terminal invertida (ITR) del AAV y un plásmido que lleva los genes de encapsidación del AAV (genes *rep* y *cap*), en una línea celular que está infectada con un virus colaborador humano (por ejemplo un adenovirus). Los recombinantes del AAV que se producen se purifican después mediante técnicas estándar.

En algunas realizaciones, el vector(es) para su uso en los métodos de la presente divulgación se encapsidan en una partícula de virus (por ejemplo, partícula de virus AAV, incluyendo, pero sin limitarse a AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15 y AAV16). De acuerdo con ello, la presente divulgación incluye una partícula de virus recombinante (recombinante porque contiene un polinucleótido recombinante) que comprende cualquiera de los vectores descritos en la presente memoria. Los métodos para producir tales partículas son conocidos en la técnica y se describen en la Patente US-6.596.535, cuya divulgación se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Administración de proteínas opsina sensibles a la luz

En algunos aspectos, los polinucleótidos que codifican las proteínas opsina sensibles a la luz divulgadas en la presente memoria (por ejemplo, un vector AAV) se pueden administrar directamente a las neuronas responsables de la inervación del músculo detrusor y/o las neuronas responsables de la innervación del esfínter urinario externo con una aguja, catéter o dispositivo relacionado, usando técnicas neuroquirúrgicas conocidas en la técnica, tal como por inyección estereotáctica (Ver, p.ej., Stein et al., J. Virol, 73: 3424-3429, 1999; Davidson et al., PNAS, 97:3428-3432, 2000; Davidson et al., Nat. Genet. 3:219-223, 1993; y Alisky y Davidson, Hum. Gene Ther. 11:2315-2329, 2000, cuyos contenidos se incorporan aquí por referencia en su totalidad) o fluoroscopia. En algunas realizaciones, el polinucleótido que codifica las proteínas opsina sensibles a la luz divulgadas en la presente memoria (por ejemplo, un vector AAV1) puede administrarse a las neuronas responsables de la inervación del músculo detrusor mediante la inyección del polinucleótido en el cuerpo celular neuronal motor somático de uno o más nervios raquídeos sacros (tal como cualquiera de S1, S2, S3, S4 y/o S5). En otras realizaciones, el polinucleótido que codifica las proteínas opsina sensibles a la luz divulgadas en la presente memoria (por ejemplo, un vector AAV) se puede administrar a las neuronas responsables de la inervación del esfínter urinario externo por inyección del polinucleótido en el nervio pudiendo. En otra realización, el polinucleótido que codifica las proteínas opsina sensibles a la luz divulgadas en la presente memoria (por ejemplo, un vector AAV) puede administrarse a las neuronas responsables de la inervación del esfínter urinario externo por inyección del polinucleótido en el núcleo de Onuf.

En algunos aspectos, los polinucleótidos que codifican las proteínas opsina sensibles a la luz divulgadas en la presente memoria (por ejemplo, un vector de AAV) se pueden administrar directamente a las neuronas responsables de la inervación del esfínter anal externo con una aguja, catéter o dispositivo relacionado usando técnicas neuroquirúrgicas conocidas en la técnica, tales como por inyección estereotáctica o fluoroscopia. En algunas realizaciones, el polinucleótido que codifica las proteínas opsina sensibles a la luz divulgadas en la presente memoria (por ejemplo, un vector AAV) puede administrarse a las neuronas responsables de la inervación del esfínter anal externo por inyección del polinucleótido en un cuerpo celular neuronal motor somático de un nervio raquídeo sacro (por ejemplo, cualquiera de S1, S2, S3, S4 y/o S5). En otras realizaciones, el polinucleótido que codifica las proteínas opsina sensibles a la luz divulgadas en la presente memoria (por ejemplo, un vector AAV) se puede administrar a las neuronas responsables de la inervación del esfínter anal externo por inyección del polinucleótido en el nervio pudiendo o por inyección del polinucleótido en el núcleo de Onuf. En otras realizaciones, el polinucleótido que codifica las proteínas opsina sensibles a la luz divulgadas en la presente memoria (por ejemplo, un vector AAV) puede administrarse a las neuronas responsables de la inervación del recto por inyección del polinucleótido en un cuerpo celular de una neurona motora somática de un nervio raquídeo sacro (por ejemplo, cualquiera de S1, S2, S3, S4 y/o S5) o por inyección en el plexo hipogástrico inferior.

En algunos aspectos, los polinucleótidos que codifican las proteínas opsina sensibles a la luz divulgadas en la presente memoria (por ejemplo, un vector AAV) se pueden administrar directamente a las neuronas responsables de la inervación de los músculos y órganos de los genitales masculinos y femeninos con una aguja, catéter o dispositivo relacionado, usando técnicas neuroquirúrgicas conocidas en la técnica, tales como por inyección estereotáctica o fluoroscopia. En algunas realizaciones, el polinucleótido que codifica las proteínas opsina sensibles a la luz divulgadas en la presente memoria (por ejemplo, un vector AAV) se puede suministrar a las neuronas responsables de la inervación de los músculos y órganos de los genitales masculino y femenino por inyección del polinucleótido en un cuerpo celular de una neurona motora somática de un nervio raquídeo sacro (por ejemplo, cualquiera de S1, S2, S3, S4 y/o S5). En otras realizaciones, el polinucleótido que codifica las proteínas opsina sensibles a la luz divulgadas en la presente memoria (por ejemplo, un vector AAV) puede administrarse a las neuronas responsables

de la inervación de los músculos y órganos de los genitales masculino y femenino por inyección del polinucleótido en el nervio pudiendo o por inyección del polinucleótido en el núcleo de Onuf.

5 También pueden usarse otros métodos para administrar las proteínas opsina sensibles a la luz a los nervios de interés, tales como, pero sin limitarse a, transfección con lípidos o polímeros iónicos, electroporación, transfección óptica, impelencia o mediante pistola génica.

10 En otro aspecto, el polinucleótido que codifica las proteínas opsina sensibles a la luz divulgadas en la presente memoria (por ejemplo, un vector AAV) se puede suministrar directamente al músculo detrusor de la vejiga y/o los músculos responsables de la contracción del esfínter urinario externo. Debido a las limitaciones inherentes a la inyección de vectores virales directamente en los cuerpos celulares específicos que inervan determinados músculos, los investigadores han intentado administrar transgenes a las neuronas periféricas mediante la inyección de vectores virales directamente en el músculo. Estos experimentos han demostrado que algunos serotipos virales tales como adenovirus, AAV2 y lentivirus pseudotipado con la glicoproteína del virus de la rabia pueden ser absorbidos por células musculares y retrogradablemente transportados a neuronas motoras a través de la sinapsis neuromuscular (Véase, por ejemplo, Azzouz et al., 2009, Antioxid Redox Signal., 11(7):1523-34; Kaspar et al., 2003, Science, 301 (5634):839-842; Manabe et al., 2002, Apoptosis, 7(4):329-334, cuyas divulgaciones se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad).

20 Por consiguiente, en algunas realizaciones, los polinucleótidos que codifican las proteínas opsina sensibles a la luz divulgadas en la presente memoria (por ejemplo, un vector de AAV) se pueden administrar a las neuronas responsables de la inervación del esfínter urinario externo por inyección del vector de expresión de polinucleótido directamente en los músculos responsables de la contracción del esfínter urinario externo. En otra realización, los polinucleótidos que codifican las proteínas opsina sensibles a la luz divulgadas en la presente memoria (por ejemplo, un vector AAV) se pueden administrar a las neuronas responsables de la inervación del músculo detrusor por inyección del vector de expresión polinucleotídico directamente en el músculo detrusor. En otras realizaciones, los polinucleótidos que codifican las proteínas opsina sensibles a la luz divulgadas en la presente memoria (por ejemplo, un vector AAV) se pueden administrar a las neuronas responsables de la inervación del esfínter anal externo mediante la inyección del vector de expresión polinucleotídico directamente en los músculos responsables de la contracción del esfínter anal externo. En otras realizaciones, los polinucleótidos que codifican las proteínas opsina sensibles a la luz divulgadas en la presente memoria (por ejemplo, un vector AAV) se pueden administrar a las neuronas responsables de la inervación del recto mediante la inyección del vector de expresión polinucleotídico directamente en los músculos responsables de la contracción del recto. En otra realización más, los polinucleótidos que codifican las proteínas opsina sensibles a la luz divulgadas en la presente memoria (por ejemplo, un vector AAV) pueden administrarse a las neuronas responsables de la inervación de los genitales masculino y femenino por inyección del vector de expresión polinucleotídico directamente en los músculos y órganos responsables de la función sexual normal incluyendo, pero sin limitarse a, los músculos bulboesponjoso e isquiocavernoso del pene, la piel del pene, los músculos perineales o el clítoris.

40 **Fuentes lumínicas y eléctricas**

En algunos aspectos de la presente divulgación, las proteínas opsina sensibles a la luz divulgadas en la presente memoria pueden activarse mediante una fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) o un electrodo implantable situado alrededor o cerca de fibras nerviosas que expresan las proteínas opsina sensibles a la luz o de los nervios que controlan los músculos de la vejiga, el esfínter urinario externo, el esfínter anal externo, el recto y/o los genitales masculinos o femeninos. Los manguitos del electrodo y los electrodos colocados quirúrgicamente alrededor o cerca de los nervios para su uso en la estimulación eléctrica de esos nervios son bien conocidos en la técnica (Véase, por ejemplo, las patentes US-4.602.624, US-7.142.925 y US-6.600.956, así como las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos números 2008/0172116 y 2010/0094372, cuyas divulgaciones se incorporan por referencia en su totalidad). Las fuentes de luz (tal como un manguito lumínico) o electrodos de la presente invención pueden estar constituidas por cualquier composición útil o mezcla de composiciones, tal como platino o acero inoxidable, como son conocidas en la técnica, y pueden ser de cualquier configuración útil para estimular las proteínas opsina sensibles a la luz divulgadas en la presente memoria o los nervios que controlan los músculos y órganos de la vejiga, el esfínter urinario externo, el esfínter anal externo y/o los genitales masculinos o femeninos.

55 Los electrodos o la fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) pueden colocarse alrededor o cerca de un nervio, tales como, pero sin limitarse a, las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros, las inervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo, las innervaciones del esfínter anal externo que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros y/o el nervio rectal inferior (también conocido como nervio hemorroidal inferior) que tienen su origen en el nervio pudendo, las innervaciones del recto que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros y/o el plexo hipogástrico inferior, el nervio dorsal del pene que tiene su origen en el nervio pudendo y/o el nervio dorsal del clítoris que tiene su origen en el nervio pudendo. Las fibras nerviosas responsables de la inervación de los músculos y/o órganos antes mencionados pueden ser identificadas por los médicos antes de colocar el electrodo o la fuente de luz implantable alrededor o cerca de las fibras nerviosas usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, las fibras nerviosas pueden ser estimuladas con breves impulsos de electricidad y observar la localización de las contracciones musculares causadas por dicha estimulación

eléctrica para asegurar la colocación correcta del electrodo o de la fuente de luz implantable. Los electrodos o la fuente de luz implantable son perfectamente adecuados para ser utilizados junto con el nervio pudiendo en particular, ya sea en el tronco del nervio pudiendo o en sus ramas aferentes o eferentes fuera de la raíz sacra (de donde proviene el nervio pudiendo), que inervan los músculos y órganos del tracto urinario inferior, el intestino, el perineo y los genitales. El tronco del nervio pudiendo y sus ramas se separan de la raíz sacra y de la columna vertebral. En consecuencia, son accesibles quirúrgicamente desde la parte delantera del cuerpo y no requieren procedimientos quirúrgicos complejos sobre, en o cerca de la columna vertebral o que impliquen rizotomía dorsal. En otra realización, se puede colocar una fuente de luz cerca de las raíces ventrales de las dianas nerviosas deseadas. En otra realización, una fuente de luz comprende un cable de fibra óptica colocado cerca de un objetivo nervioso deseado que está expuesto quirúrgicamente.

En algunas realizaciones, la fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) no rodea completamente al nervio, sino, más bien, puede tener una forma de U. En otra realización, la fuente de luz implantable puede tener un brazo de fijación que puede usarse para guiar la fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) a las fibras nerviosas (p.ej., las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros y/o las innervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudiendo). El brazo de unión se puede retirar después de la implantación de la fuente de luz o puede dejarse en su sitio para fijar la posición de la fuente de luz en la proximidad de las fibras nerviosas de interés.

La fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) puede comprender un cuerpo interior, teniendo el cuerpo interior al menos un medio para generar luz que está configurado para una fuente de energía. En algunas realizaciones, la fuente de energía puede ser una batería interna para alimentar los medios generadores de luz. En otra realización, la fuente de luz implantable puede comprender una antena externa para recibir energía electromagnética transmitida inalámbricamente desde una fuente externa para alimentar los medios generadores de luz. La energía electromagnética transmitida inalámbricamente puede ser una onda de radio, una microonda o cualquier otra fuente de energía electromagnética que pueda ser transmitida desde una fuente externa para alimentar los medios generadores de luz de la fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico). En una realización, el medio generador de luz es controlado por un circuito integrado producido usando un semiconductor u otros procesos conocidos en la técnica.

En algunos aspectos, los medios lumínicos pueden ser un diodo emisor de luz (LED). En algunas realizaciones, el LED puede generar luz azul y/o verde. En otras realizaciones, el LED puede generar luz ámbar y/o amarilla. En algunas realizaciones, varios microLED están incrustados en el cuerpo interno de la fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico). En otras realizaciones, el medio generador de luz es un diodo láser de estado sólido o cualquier otro medio capaz de generar luz. Los medios generadores de luz pueden generar luz que tiene una intensidad suficiente para activar las proteínas opsina sensibles a la luz expresadas en la membrana plasmática de los nervios en proximidad a la fuente de luz (tal como un manguito lumínico). En algunas realizaciones, los medios generadores de luz producen luz que tiene una intensidad de cualquiera de aproximadamente $0,05 \text{ mW/mm}^2$, $0,1 \text{ mW/mm}^2$, $0,2 \text{ mW/mm}^2$, $0,3 \text{ mW/mm}^2$, $0,4 \text{ mW/mm}^2$, $0,5 \text{ mW/mm}^2$, aproximadamente $0,6 \text{ mW/mm}^2$, aproximadamente $0,7 \text{ mW/mm}^2$, aproximadamente $0,8 \text{ mW/mm}^2$, aproximadamente $0,9 \text{ mW/mm}^2$, aproximadamente $1,0 \text{ mW/mm}^2$, aproximadamente $1,1 \text{ mW/mm}^2$, aproximadamente $1,2 \text{ mW/mm}^2$, aproximadamente $1,3 \text{ mW/mm}^2$, aproximadamente $1,4 \text{ mW/mm}^2$, aproximadamente $1,5 \text{ mW/mm}^2$, aproximadamente $1,6 \text{ mW/mm}^2$, aproximadamente $1,7 \text{ mW/mm}^2$, aproximadamente $1,8 \text{ mW/mm}^2$, aproximadamente $1,9 \text{ mW/mm}^2$, aproximadamente $2,0 \text{ mW/mm}^2$, aproximadamente $2,1 \text{ mW/mm}^2$, aproximadamente $2,2 \text{ mW/mm}^2$, aproximadamente $2,3 \text{ mW/mm}^2$, aproximadamente $2,4 \text{ mW/mm}^2$, aproximadamente $2,5 \text{ mW/mm}^2$, aproximadamente 3 mW/mm^2 , aproximadamente $3,5 \text{ mW/mm}^2$, aproximadamente 4 mW/mm^2 , aproximadamente $4,5 \text{ mW/mm}^2$, aproximadamente 5 mW/mm^2 , aproximadamente $5,5 \text{ mW/mm}^2$, aproximadamente 6 mW/mm^2 , aproximadamente 7 mW/mm^2 , aproximadamente 8 mW/mm^2 , aproximadamente 9 mW/mm^2 , o aproximadamente 10 mW/mm^2 , inclusive, incluyendo valores entre estos números. En otras realizaciones, los medios generadores de luz producen luz que tiene una intensidad de al menos aproximadamente 100 Hz .

En algunos aspectos, los medios generadores de luz pueden ser activados externamente por un controlador externo. El controlador externo puede comprender un generador de energía que puede montarse en una bobina transmisora. En algunas realizaciones del controlador externo, se puede conectar una batería al generador de energía, para proporcionar energía al mismo. Se puede conectar un interruptor al generador de energía, lo que permite a un individuo activar o desactivar manualmente el generador de energía. En algunas realizaciones, tras la activación del interruptor, el generador de energía puede proporcionar energía a los medios generadores de luz en la fuente de luz mediante el acoplamiento electromagnético entre la bobina de transmisión en el controlador externo y la antena externa de la fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico). La bobina de transmisión puede establecer un acoplamiento electromagnético con la antena externa de la fuente de luz implantable cuando está en proximidad de la misma, para suministrar energía a los medios generadores de luz y para transmitir una o más señales de control a la fuente de luz implantable. En algunas realizaciones, el acoplamiento electromagnético entre la bobina de transmisión del controlador externo y la antena externa de la fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) puede ser un acoplamiento de inductancia magnética de radiofrecuencia. Cuando se utiliza acoplamiento de inductancia magnética de radiofrecuencia, la frecuencia de funcionamiento de la onda de radio puede estar entre aproximadamente 1 y 20 MHz , inclusive, incluyendo cualquier valor entre estos números (por ejemplo,

aproximadamente 1 MHz, aproximadamente 2 MHz, aproximadamente 3 MHz, aproximadamente 4 MHz, aproximadamente 5 MHz, aproximadamente 6 MHz, aproximadamente 7 MHz, aproximadamente 8 MHz, aproximadamente 9 MHz, aproximadamente 10 MHz, aproximadamente 11 MHz, aproximadamente 12 MHz, aproximadamente 13 MHz, aproximadamente 14 MHz, aproximadamente 15 MHz, aproximadamente 16 MHz, aproximadamente 17 MHz, aproximadamente 18 MHz, aproximadamente 19 MHz, o aproximadamente 20 MHz). Sin embargo, se pueden utilizar otras técnicas de acoplamiento, tales como un receptor óptico, infrarrojo o un sistema de telemetría biomédica (Véase, por ejemplo, Kiourti, "Biomedical Telemetry: Communication between Implanted Devices and the External World, Opticon1826, (8):Spring, 2010).

En algunos aspectos de la presente divulgación, más de una de las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros, las innervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo, las innervaciones del esfínter anal externo de los nervios raquídeos pudendos o sacros pueden expresar bombas sensibles a la luz que promueven la hiperpolarización nerviosa cuando se activan con luz. En algunas realizaciones, los medios generadores de luz de la fuente de luz implantable colocados alrededor o cerca de las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros, generan luz continuamente cuando la vejiga almacena la orina mientras que, al mismo tiempo, la fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) colocado alrededor o cerca de las innervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo no genera luz. En otro aspecto, los medios generadores de luz de la fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) colocados alrededor o cerca de las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros no generan luz cuando la vejiga está vaciando mientras que al mismo tiempo, la fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) colocada alrededor o cerca de las innervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo puede generar luz continuamente. En algunas realizaciones, una primera señal de control generada por el controlador externo puede activar los medios generadores de luz de la fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) colocada alrededor o cerca de las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros mientras que simultáneamente desactivan la luz implantable (tal como un manguito lumínico) colocado alrededor o cerca de las innervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo. En otra realización, una segunda señal de control generada por el controlador externo puede desactivar los medios generadores de luz de la fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) colocada alrededor o cerca de las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros mientras que simultáneamente activan la fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) colocada alrededor o cerca de las innervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo. En otra realización, una señal de control generada por el controlador externo puede activar los medios generadores de luz de la fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) colocada alrededor o cerca de las innervaciones del esfínter anal externo que tienen su origen en los nervios raquídeos pudendos o sacros.

En algunos aspectos de la presente divulgación, las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros, las innervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo y/o las innervaciones del esfínter anal externo de los nervios raquídeos pudendos o sacros pueden expresar canales catiónicos sensibles a la luz que promueven la depleción sináptica inducida por la despolarización nerviosa cuando se activan con luz. En algunas realizaciones, los medios generadores de luz de la fuente de luz implantable colocada alrededor o cerca de las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros no generan luz cuando la vejiga almacena la orina mientras que al mismo tiempo, la fuente de luz implantable (como un manguito lumínico) colocada alrededor o cerca de las innervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo puede generar continuamente luz que tiene una intensidad de al menos 100 Hz. En otro aspecto, el medio generador de luz de la fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) colocado alrededor o cerca de las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros genera luz que tiene una intensidad de al menos 100 Hz cuando la vejiga está vaciando mientras que al mismo tiempo, la fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) colocada alrededor o cerca de las innervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo no genera luz. En otro aspecto, los medios generadores de luz de la fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) colocada alrededor o cerca de las innervaciones del esfínter anal externo que tienen su origen en los nervios raquídeos pudendos o sacros, generan luz que tiene una intensidad de al menos 100 Hz cuando el esfínter anal externo se relaja. En algunas realizaciones, una primera señal de control generada por el controlador externo puede activar los medios generadores de luz de la fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) colocados alrededor o cerca de las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros mientras que simultáneamente se desactiva la luz implantable (tal como un manguito lumínico) colocado alrededor o cerca de las innervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo. En otra realización, una segunda señal de control generada por el controlador externo puede desactivar los medios generadores de luz de la fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) colocada alrededor o cerca de las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros mientras que simultáneamente se activa la luz implantable (tal como un manguito lumínico) colocada alrededor o cerca de las innervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo. En otra realización, una señal de control generada por el controlador externo puede desactivar los medios generadores de luz de la fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) colocada alrededor o cerca de las innervaciones del esfínter anal externo que tienen su origen en los nervios raquídeos pudendos o sacros.

En algunos aspectos de la presente divulgación, las innervaciones de los músculos u órganos de los genitales masculinos o femeninos que tienen su origen en el nervio pudendo o uno o más nervios raquídeos sacros pueden expresar proteínas canal catiónico sensibles a la luz que promueven la despolarización nerviosa cuando se activan

con luz. En algunas realizaciones, los medios generadores de luz de la fuente de luz implantable colocada alrededor o cerca de las inervaciones de los genitales masculinos o femeninos que tienen su origen en los nervios raquídeos pudendos o sacros, generan luz continuamente cuando el individuo desea participar en una actividad sexual tal como, pero sin limitarse a, erección, orgasmo, eyaculación y/o lubricación vaginal. En algunas realizaciones, los medios generadores de luz de la fuente de luz implantable colocada alrededor o cerca de las inervaciones de los genitales masculinos o femeninos que tienen su origen en los nervios raquídeos pudendos o sacros, generan luz continuamente cuando el individuo desea restablecer sensaciones táctiles en el área genital requerida para mantener la excitación sexual. En algunas realizaciones, una primera señal de control generada por el controlador externo puede activar los medios generadores de luz de la fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) colocada alrededor o cerca de las inervaciones de los músculos u órganos de los genitales masculinos o femeninos que tienen su origen en los nervios raquídeos pudendos o sacros. En otra realización, una segunda señal de control generada por el controlador externo puede desactivar los medios generadores de luz de la fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) colocada alrededor o cerca de las inervaciones de los músculos u órganos de los genitales masculinos o femeninos que tienen su origen en los nervios raquídeos pudendos o sacros.

En otros aspectos de la presente divulgación, puede usarse una combinación de estimulación nerviosa con proteínas opsina sensibles a la luz y electricidad para restaurar la continencia urinaria y/o fecal. En algunas realizaciones, las inervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros pueden expresar cualquiera de las proteínas opsina sensibles a la luz descritas en la presente memoria y puede colocarse un electrodo alrededor o cerca de las inervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo. En algunas realizaciones, las inervaciones del esfínter anal externo que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros y/o pudendos pueden tener un electrodo colocado alrededor o cerca de las inervaciones del esfínter anal externo que tienen su origen en el nervio pudendo y/o los nervios raquídeos sacros. En otras realizaciones, un electrodo puede colocarse alrededor o cerca de las inervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros, mientras que las inervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo pueden expresar cualquiera de las proteínas opsina sensibles a la luz descritas en la presente memoria. En algunas realizaciones, una primera señal de control generada por el controlador externo puede activar los medios generadores de luz de la fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) colocada alrededor o cerca de las inervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros a la vez que se activa simultáneamente un electrodo colocado alrededor o cerca de las inervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo. En otra realización, una segunda señal de control generada por el controlador externo puede desactivar los medios generadores de luz de la fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) colocada alrededor o cerca de las inervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros a la vez que simultáneamente se desactiva un electrodo colocado alrededor o cerca de las inervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo. En otra realización, una primera señal de control generada por el controlador externo puede desactivar un electrodo colocado alrededor o cerca de las inervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros a la vez que simultáneamente se activa un medio generador de luz de la fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) colocada alrededor o cerca de las inervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo. En otra realización más, una segunda señal de control generada por el controlador externo puede activar un electrodo colocado alrededor o cerca de las inervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros a la vez que simultáneamente se desactiva un medio generador de luz de la fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) colocado alrededor o cerca de las inervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo.

Ejemplos de dispositivos de estimulación de luz, incluyendo la fuente de luz (tal como un manguito lumínico), se pueden encontrar en las Solicitudes de Patente Internacional números PCT/US08/50628 y PCT/US09/49936 y en Llewellyn et al., 2010, Nat. Med., 16(10):161-165, cuyas divulgaciones se incorporan en la presente memoria en su totalidad.

Métodos

La presente divulgación se refiere a métodos para inhibir los síntomas (discapacidades, afectaciones) asociados con la disfunción de la vejiga, la incontinencia fecal (IF) y/o la disfunción sexual. En particular, los métodos proporcionados en la presente memoria se refieren al tratamiento y/o alivio de los síntomas asociados con la hiperreflexia del detrusor (HD) y/o a la disinergia detrusor-esfínter externo (DDE). Como tal, no se requiere que el daño fisiológico o todos los efectos de la afección se inviertan por completo, aunque los efectos de los métodos actualmente divulgados probablemente se extiendan a un beneficio terapéutico significativo para el paciente. Como tal, un beneficio terapéutico no es necesariamente una cura completa para la HD, la DDE, la IF y/o la disfunción sexual, sino que puede abarcar un resultado que incluye reducir o prevenir los síntomas o el daño fisiológico resultante de estas afecciones, reducir o prevenir la aparición de tales síntomas o daños (ya sea cuantitativa o cualitativamente), reducir la gravedad de tales síntomas o efectos fisiológicos y/o mejorar la recuperación del paciente después de experimentar una causa de HD, DDE, IF y/o disfunción sexual (por ejemplo, pero sin limitarse a, lesión de la médula espinal y esclerosis múltiple).

Específicamente, los métodos de la presente divulgación pueden prevenir el daño asociado con HD, DDE, IF y/o disfunción sexual prolongada, y/o reducir o aliviar los síntomas o afecciones asociadas con (que resultan de) estas afecciones. Como tal, proteger a un individuo de los efectos o síntomas fisiológicos resultantes de HD, DDE, IF y/o

disfunción sexual incluye tanto prevenir como reducir la aparición y/o gravedad de los efectos de los síntomas y tratar a un paciente en el cual los síntomas ya están ocurriendo o empiezan a ocurrir. Un efecto beneficioso puede ser fácilmente evaluado por un experto en la materia y/o un médico clínico capacitado que esté tratando al paciente. Por ejemplo, muchos de los métodos descritos anteriormente para el diagnóstico de la HD y/o la DDE pueden usarse para evaluar al paciente antes y después del tratamiento usando un método de la presente invención para evaluar el éxito del tratamiento. En algunas realizaciones, existe una diferencia positiva o beneficiosa en la gravedad o aparición de al menos una puntuación, valor o medida clínica o biológica utilizada para evaluar tales pacientes en aquellos que han sido tratados con los métodos de la presente invención en comparación con aquellos que no lo han hecho.

Hiperpolarización o depleción sináptica inducida por la despolarización con proteínas opsina sensibles a la luz para el tratamiento de la disfunción vesical y/o la incontinencia fecal

Disfunción vesical

En consecuencia, en la presente memoria se proporciona un método para tratar una disfunción de la vejiga en un individuo que lo necesite, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz al individuo, en el que la proteína opsina sensible a la luz se expresa en la membrana plasmática de una población de neuronas responsables de la innervación del músculo detrusor y/o de una población de neuronas responsables de la innervación del músculo esfínter urinario externo en el individuo, en el que la proteína opsina sensible a la luz es capaz de inducir la hiperpolarización de las neuronas que expresan la proteína opsina sensible a la luz en respuesta a la luz, de modo que la hiperpolarización de las neuronas responsables de la innervación del músculo detrusor permite el almacenamiento de orina en la vejiga y la hiperpolarización de las neuronas responsables de la innervación de músculo esfínter urinario externo permite la evacuación de la orina de la vejiga. Se pueden administrar cualesquiera polinucleótidos descritos en la presente memoria que codifiquen una proteína opsina sensible a la luz capaz de inducir hiperpolarización. En algunas realizaciones, la disfunción de la vejiga es HD y/o DDE. En otras realizaciones, la población de neuronas responsables de la innervación del músculo detrusor y/o una población de neuronas responsables de la innervación del músculo esfínter urinario externo se hiperpolarizan por exposición a la luz ámbar. Un ejemplo de realización de un método en cuestión se representa esquemáticamente en la Figura 4.

Cuando se iluminan con una fuente de luz implantable (como un manguito lumínico) colocada alrededor o cerca de las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros, las proteínas opsina sensibles a la luz expresadas en las membranas plasmáticas de las innervaciones del detrusor mantienen un potencial de membrana neural hiperpolarizado evitando la contracción del músculo detrusor y permitiendo que la vejiga se llene. Cuando las proteínas opsina sensibles a la luz expresadas en las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros no son iluminadas por la fuente de luz implantable, el músculo detrusor es capaz de contraerse debido a la recuperación del potencial normal de membrana neural y la presión generada facilita la evacuación. De forma similar, cuando se iluminan mediante una fuente de luz implantable colocada alrededor o cerca de las innervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo, las proteínas opsina sensibles a la luz expresadas en las membranas plasmáticas de las innervaciones del esfínter urinario externo mantienen un potencial de membrana neural hiperpolarizado, evitando la contracción del esfínter urinario externo y permitiendo al individuo miccionar. Cuando las proteínas opsina sensibles a la luz expresadas en las innervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo no son iluminadas por la fuente de luz implantable, el esfínter urinario externo se contrae y permite que la vejiga se llene.

También en la presente memoria se proporciona un método para tratar una disfunción de la vejiga en un individuo que lo necesite, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz al individuo, en el que la proteína opsina sensible a la luz se expresa en la membrana plasmática de una población de neuronas responsables de la innervación del músculo detrusor y/o de una población de neuronas responsables de la innervación del músculo esfínter urinario externo en el individuo, en el que la proteína opsina sensible a la luz es capaz de causar la depleción sináptica inducida por la despolarización de las neuronas que expresan la proteína opsina sensible a la luz en respuesta a la luz, de modo que la depleción sináptica inducida por la despolarización de las neuronas responsables de la innervación del músculo detrusor permite el almacenamiento de orina en la vejiga y la depleción sináptica inducida por la despolarización de las neuronas responsables de la innervación del músculo esfínter urinario externo permite evacuar la orina de la vejiga. Se pueden administrar cualesquiera polinucleótidos descritos en la presente memoria que codifiquen una proteína opsina sensible a la luz capaz de causar la depleción sináptica inducida por la despolarización. En algunas realizaciones, la disfunción de la vejiga es HD y/o DDE. En otras realizaciones, la población de neuronas responsables de la innervación del músculo detrusor y/o una población de neuronas responsables de la innervación del músculo esfínter urinario externo puede despolarizarse hasta el punto de la depleción sináptica por exposición a la luz azul, verde, amarilla, naranja o roja. En algunas realizaciones, la luz tiene una intensidad de al menos aproximadamente 100 Hz.

Cuando son iluminadas por una fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) colocado alrededor o cerca de las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros, las proteínas opsina

sensibles a la luz expresadas en las membranas plasmáticas de las innervaciones del detrusor provocan una depleción sináptica inducida por la despolarización de las células neurales, evitando así la contracción del músculo detrusor y permitiendo que la vejiga se llene. Cuando las proteínas opsina sensibles a la luz expresadas en las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros no son iluminadas por la fuente de luz implantable, el músculo detrusor es capaz de contraerse debido a la recuperación de las vesículas transinápticas y la presión generada facilita la evacuación. De forma similar, cuando se iluminan mediante una fuente de luz implantable colocada alrededor o cerca de las innervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo, las proteínas opsina sensibles a la luz expresadas en las membranas plasmáticas de las innervaciones del esfínter urinario externo provocan una depleción sináptica inducida por la despolarización de esas neuronas, evitando la contracción del esfínter urinario externo y permitiendo que el individuo evacue. Cuando las proteínas opsina sensibles a la luz expresadas en las innervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo no son iluminadas por la fuente de luz implantable, el esfínter urinario externo se contrae y permite que la vejiga se llene.

En algunos aspectos, el individuo controla externamente el estado de polarización de las neuronas responsables de la innervación del músculo detrusor y/o de las neuronas responsables de la innervación del esfínter urinario externo activando los medios luminosos a partir de una o más fuentes de luz (tal como un manguito lumínico) que rodea o está situado cerca de uno de los nervios raquídeos sacros (como cualquiera de S1, S2, S3, S4, o S5) y/o el nervio pudendo. En otra realización, el individuo cambia selectivamente el estado de polarización de la membrana de las neuronas responsables de la innervación del músculo detrusor y/o neuronas responsables de la innervación del esfínter urinario externo activando la fuente de luz que rodea o se encuentra cerca del nervio pudendo a la vez que simultáneamente se desactiva la fuente de luz que rodea o se encuentra cerca de los nervios raquídeos sacros cuando el individuo experimenta la necesidad y/o impulso de evacuar o desea evacuar de acuerdo con una pauta predeterminada. En otra realización, el individuo es un ser humano.

En algunos aspectos, tanto la población de neuronas responsables de la innervación del músculo detrusor como la población de neuronas responsables de la innervación del músculo esfínter urinario externo en el individuo pueden transfectarse con un vector de expresión que comprende cualquiera de los polinucleótidos descritos anteriormente. En algunas realizaciones, el vector de expresión puede ser un vector viral tal como cualquiera de los vectores de expresión víricos descritos anteriormente. En algunos aspectos, la población de neuronas responsables de la innervación del músculo detrusor puede ser transfectada por inyección del vector de expresión en el cuerpo de la célula neuronal motora somática de un nervio raquídeo sacro (tal como cualquiera de S1, S2, S3, S4, y/o S5). En otros aspectos, la población de neuronas responsables de la innervación del músculo esfínter urinario externo se transfecta mediante la inyección del vector de expresión en el núcleo de Onuf. En algunos aspectos, una o más fuentes de luz (tales como un manguito lumínico) capaces de generar luz en respuesta a una señal externa, tales como las descritas anteriormente, son colocadas quirúrgicamente alrededor o cerca de las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros y alrededor de las innervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo.

Incontinencia fecal

También en la presente memoria se proporciona un método para tratar una incontinencia fecal en un individuo que lo necesite, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz al individuo, en el que la proteína opsina sensible a la luz se expresa en la membrana plasmática de una población de neuronas responsables de la innervación del músculo esfínter anal externo en el individuo, en el que la proteína opsina sensible a la luz es capaz de inducir hiperpolarización de las neuronas que expresan la proteína sensible a la luz en respuesta a la luz, de modo que la hiperpolarización de las neuronas responsables de la innervación del músculo esfínter anal externo permite la relajación del esfínter. Se puede administrar cualesquiera polinucleótidos descritos en la presente memoria que codifiquen una proteína opsina sensible a la luz capaz de inducir hiperpolarización. En otras realizaciones, la población de neuronas responsables de la innervación del músculo esfínter anal externo está hiperpolarizada por exposición a la luz ámbar.

Cuando se iluminan con una fuente de luz implantable (como un manguito lumínico) colocada alrededor o cerca de las innervaciones del esfínter anal externo del nervio pudendo y/o uno o más nervios raquídeos sacros (como cualquiera de S1, S2, S3, S4 y/o S5), las proteínas opsina sensibles a la luz expresadas en las membranas plasmáticas de las innervaciones del esfínter anal externo mantienen un potencial de membrana neural hiperpolarizada, evitando la contracción del esfínter anal externo y permitiendo al individuo defecar. Cuando las proteínas opsina sensibles a la luz expresadas en las innervaciones del esfínter anal externo del nervio pudendo y/o los nervios raquídeos sacros no son iluminadas por la fuente de luz implantable, el esfínter anal externo se contrae naturalmente y permite el almacenamiento de heces en el intestino.

También en la presente memoria se proporciona un método para tratar la incontinencia fecal en un individuo que lo necesite, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz al individuo, en el que la proteína opsina sensible a la luz es expresada en la membrana plasmática de una población de neuronas responsable de la innervación del músculo esfínter anal externo en el individuo, en el que la proteína opsina sensible a la luz es capaz

de causar la depleción sináptica inducida por la despolarización de las neuronas que expresan la proteína sensible a la luz en respuesta a la luz, de modo que la depleción sináptica inducida por la despolarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter anal externo permite la relajación del esfínter. Se pueden administrar cualesquiera polinucleótidos descritos en la presente memoria que codifiquen una proteína opsina sensible a la luz capaz de inducir una depleción sináptica inducida por la despolarización de las neuronas. En otras realizaciones, la población de neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter anal externo puede despolarizarse hasta el punto de la depleción sináptica por exposición a luz azul, verde, amarilla, naranja o roja. En algunas realizaciones, la luz puede tener una intensidad de al menos aproximadamente 100 Hz.

5
10
15

Cuando se iluminan con una fuente de luz implantable colocada alrededor o cerca de las innervaciones del esfínter anal externo que tienen su origen en los nervios raquídeos pudendos y/o sacra, las proteínas opsina sensibles a la luz expresadas en las membranas plasmáticas de las innervaciones del esfínter anal externo causan depleción sináptica inducida por despolarización De esas neuronas, evitando la contracción del esfínter anal externo y permitiendo al individuo defecar. Cuando las proteínas opsina sensibles a la luz expresadas en las innervaciones del esfínter anal externo del nervio pudendo y/o los nervios raquídeos sacros no son iluminadas por la fuente de luz implantable, el esfínter anal externo se contrae naturalmente y permite que el recto almacene las heces.

20
25
30
35

En algunos aspectos, el individuo controla externamente el estado de hiperpolarización de las neuronas responsables de la inervación del esfínter anal externo activando los medios lumínicos de una o más fuentes de luz (como un manguito lumínico) que rodean o están situados cerca de los nervios raquídeos sacros y/o el nervio pudendo. En otra realización, el individuo cambia selectivamente el estado de polarización de la membrana de las neuronas responsables de la inervación del esfínter anal externo activando la fuente de luz que rodea o está situada cerca del nervio pudendo y/o los nervios raquídeos sacros cuando el individuo experimenta la necesidad y/o la urgencia de defecar o desea defecar de acuerdo con una pauta predeterminada. En otra realización, el individuo es un ser humano. En algunos aspectos, la población de neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter anal externo en el individuo puede transfectarse con un vector de expresión que comprende cualquiera de los polinucleótidos descritos anteriormente. En algunas realizaciones, el vector de expresión puede ser un vector viral tal como cualquiera de los vectores de expresión víricos descritos anteriormente. En algunos aspectos, la población de neuronas responsable de la inervación del músculo esfínter anal externo es transfectada por inyección del vector de expresión en un nervio raquídeo sacro (tal como cualquiera de S1, S2, S3, S4 y/o S5). En otros aspectos, la población de neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter anal externo se transfecta mediante inyección del vector de expresión en el nervio pudendo o por inyección del vector de expresión en el núcleo de Onuf. En algunos aspectos, una o más fuentes de luz (tales como un manguito lumínico) capaces de generar luz en respuesta a una señal externa, tales como las descritas anteriormente, se colocan quirúrgicamente alrededor o cerca de las innervaciones del esfínter anal externo que tienen su origen en el nervio pudendo y/o en los nervios raquídeos sacros.

Despolarización con proteínas opsina sensibles a la luz o electroestimulación para impulsar la contracción muscular

40 **Disfunción vesical**

Los músculos del esfínter existen en un estado naturalmente contraído (tónico) debido al hecho de que, a diferencia de la mayoría de los músculos esqueléticos, no hay otro músculo que se oponga a la contracción del esfínter (por ejemplo, el músculo bíceps está en oposición al músculo tríceps). Sin embargo, en algunas situaciones, las células o neuronas ubicadas más arriba de los sitios de inervación del músculo esfínter pueden estar dañadas, ser no funcionales o incapaces de generar una contracción muscular lo suficientemente fuerte como para expulsar la orina de la vejiga, cerrar el esfínter urinario externo o cerrar el esfínter anal externo. En estas circunstancias, la despolarización de estos nervios periféricos mediante el uso de proteínas opsina sensibles a la luz o la electroestimulación tradicional puede utilizarse para restaurar la función urinaria y/o continencia fecal y lograr un control "on/off" del músculo detrusor, esfínter urinario y/o esfínter anal, respectivamente.

55
60
65

En consecuencia, en la presente memoria se proporciona un método para tratar una disfunción de la vejiga en un individuo que lo necesite, comprendiendo el método administrar cantidades efectivas de secuencias polinucleotídicas (tales como cualquiera de las secuencias polinucleotídicas divulgadas anteriormente) que codifican una primera proteína opsina sensible a la luz y una segunda proteína opsina sensible a la luz, en el que la segunda proteína opsina sensible a la luz se expresan en la membrana plasmática de una población de neuronas responsables de la inervación del músculo detrusor y/o de una población de neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter urinario externo en el individuo, en el que la primera proteína opsina sensible a la luz es capaz de inducir hiperpolarización de las neuronas que expresan la primera proteína sensible a la luz en respuesta a una primera longitud de onda de luz, de modo que la hiperpolarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo detrusor permite el almacenamiento de orina en la vejiga y la hiperpolarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter urinario externo permite la evacuación de la orina de la vejiga, en el que la segunda proteína opsina sensible a la luz es capaz de inducir la despolarización de las neuronas que expresan la segunda proteína opsina sensible a la luz en respuesta a una segunda longitud de onda de luz, de modo que la despolarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo detrusor permite la evacuación de la orina de la vejiga y la despolarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter urinario

externo permite el cierre del esfínter permitiendo el almacenamiento de orina. En algunas realizaciones, la disfunción de la vejiga es DH y/o DDE.

5 Cuando se ilumina por luz que tiene una primera longitud de onda proporcionada por una fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) colocada alrededor o cerca de las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros, las primeras proteínas opsina sensibles a la luz expresadas en las membranas plasmáticas de las innervaciones del detrusor hiperpolarizan las innervaciones, evitando así la contracción del músculo detrusor y permitiendo que la vejiga se llene. Cuando las segundas proteínas opsina sensibles a la luz expresadas en las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros son iluminadas por luz que tiene una segunda longitud de onda proporcionada por la fuente de luz implantable, el músculo detrusor es capaz de contraerse debido a la despolarización de las innervaciones del detrusor. De manera similar, cuando se ilumina con luz que tiene una primera longitud de onda proporcionada por una fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) colocada alrededor o cerca de las innervaciones del esfínter externo del nervio pudendo, las primeras proteínas opsina sensibles a la luz expresadas en las membranas plasmáticas de las innervaciones del esfínter externo hiperpolarizan esas neuronas, evitando la contracción del esfínter urinario externo y permitiendo que el individuo evacue. Cuando las segundas proteínas opsina sensibles a la luz expresadas en las innervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo se iluminan por luz que tiene una segunda longitud de onda proporcionada por la fuente de luz implantable, el esfínter urinario externo se contrae debido a la despolarización de las innervaciones, permitiendo el almacenamiento de orina en la vejiga.

Incontinencia fecal

Además, en la presente memoria se proporciona un método para tratar la incontinencia fecal en un individuo que lo necesite, comprendiendo el método administrar cantidades efectivas de secuencias polinucleotídicas (tales como cualquiera de las secuencias polinucleotídicas divulgadas anteriormente) que codifican una primera proteína opsina sensible a la luz y una segunda proteína opsina sensible a la luz al individuo, en el que la primera proteína opsina sensible a la luz y la segunda proteína opsina sensible a la luz se expresan en la membrana plasmática de una población de neuronas responsables de la innervación del músculo esfínter anal externo en el individuo, en el que la primera proteína opsina sensible a la luz es capaz de inducir hiperpolarización de las neuronas que expresan la primera proteína opsina sensible a la luz en respuesta a una primera longitud de onda de luz, de modo que la hiperpolarización de las neuronas responsables de la innervación del músculo esfínter anal externo permite la relajación del esfínter permitiendo la defecación, en el que la segunda opsina sensible a la luz es capaz de inducir la despolarización de las neuronas que expresan la segunda proteína opsina sensible a la luz en respuesta a una segunda longitud de onda de luz, de modo que la despolarización de las neuronas responsables de la innervación del músculo esfínter anal externo permite el cierre del esfínter permitiendo el almacenamiento de las heces en el intestino.

40 Cuando se iluminan por una luz que tiene una primera longitud de onda proporcionada por una fuente de luz implantable (tal como un manguito lumínico) colocada alrededor o cerca de las innervaciones del esfínter anal externo que tienen su origen en el nervio pudendo y/o los nervios raquídeos sacros, las proteínas opsina sensibles a la luz expresadas en las membranas plasmáticas de las innervaciones del esfínter anal externo hiperpolarizan las innervaciones, evitando así la contracción del músculo esfínter y permitiendo que el esfínter se relaje. Cuando las segundas proteínas opsinas sensibles a la luz, expresadas en las membranas plasmáticas de las innervaciones del esfínter anal externo que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros y/o del nervio pudendo, son iluminadas por luz que tiene una segunda longitud de onda proporcionada por la fuente luminosa implantable, el músculo esfínter es capaz de contraerse debido a la despolarización de las innervaciones del esfínter, permitiendo así el almacenamiento de heces en el recto.

50 En otro aspecto, el método para tratar la incontinencia fecal comprende además administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido (tal como cualquiera de las secuencias polinucleotídicas divulgadas anteriormente) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz al individuo, en el que la proteína opsina sensible a la luz se expresa en la membrana plasmática de una población de neuronas responsables de la innervación de los músculos responsables de la contracción del recto en el individuo, en el que la proteína opsina sensible a la luz es capaz de inducir la despolarización de las neuronas que expresan la proteína opsina sensible a la luz en respuesta a la luz, de modo que la despolarización de las neuronas responsables de la innervación de los músculos responsables de la contracción del recto facilita la defecación. En algunos aspectos, el individuo controla externamente el estado de despolarización de las neuronas responsables de la innervación de los músculos responsables de la contracción del recto activando los medios lumínicos de una o más fuentes de luz (tal como un manguito lumínico o cualquiera de las fuentes de luz descritas en la presente memoria) que rodea o está situada cerca de los nervios raquídeos sacros y/o las fibras nerviosas que tienen su origen en el plexo hipogástrico inferior. En otra realización, el individuo cambia selectivamente el estado de polarización de la membrana de las neuronas responsables de la innervación de los músculos responsables de la contracción del recto activando la fuente de luz que rodea o está situada cerca de los nervios raquídeos sacros y/o las fibras nerviosas que tienen su origen en el plexo hipogástrico inferior cuando el individuo experimenta la necesidad y/o la urgencia de defecar o desea defecar de acuerdo con una pauta predeterminada.

65 En otros aspectos, el método puede comprender también la estimulación eléctrica que puede usarse para

despolarizar las innervaciones del músculo detrusor y/o las innervaciones pudendas del esfínter urinario externo, así como las innervaciones del esfínter anal externo. En algunas realizaciones, se coloca un electrodo controlable externamente alrededor o cerca de las neuronas responsables de la innervación del músculo detrusor, las neuronas responsables de la innervación del esfínter urinario externo y/o de las neuronas responsables de la innervación del esfínter anal externo. En otras realizaciones, la estimulación eléctrica puede usarse para despolarizar las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros, dando como resultado la contracción del músculo detrusor y la evacuación de la vejiga urinaria, a la vez que las proteínas opsina sensibles a la luz pueden usarse para hiperpolarizar o causar depleción sináptica inducida por la despolarización de las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros, lo que tiene como resultado la relajación del músculo detrusor, permitiendo así que la vejiga urinaria se llene. En otra realización, la estimulación eléctrica puede utilizarse para despolarizar las innervaciones externas del esfínter urinario del nervio pudendo, cerrando así el esfínter urinario externo y permitiendo que la vejiga se llene mientras que las proteínas opsina sensibles a la luz pueden usarse para hiperpolarizar o provocar la depleción sináptica inducida por la despolarización de las innervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo, dando como resultado la relajación del esfínter urinario externo, permitiendo así que la vejiga urinaria se vacíe.

Despolarización con proteínas opsina sensibles a la luz para el tratamiento de la disfunción sexual

También en la presente memoria se proporciona un método para tratar la disfunción sexual en un individuo que lo necesite, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz al individuo, en el que la proteína opsina sensible a la luz es expresada en la membrana plasmática de una población de neuronas responsables de la innervación de los músculos y órganos de los genitales responsables de la función sexual en el individuo, en el que la proteína opsina sensible a la luz es capaz de causar la despolarización de las neuronas que expresan la proteína opsina sensible a la luz en respuesta a la luz, de modo que la despolarización de las neuronas responsables de la innervación de los genitales permite relaciones sexuales y/o la funcionalidad sexual en el individuo. En algunas realizaciones, la funcionalidad sexual es una o más funciones seleccionadas del grupo que consiste en erección, orgasmo, eyaculación y lubricación vaginal. En otras realizaciones, la funcionalidad sexual es la restauración de sensaciones táctiles a los genitales necesarias para mantener la excitación sexual. Se puede administrar cualquiera de los polinucleótidos descritos en la presente memoria que codifiquen una proteína opsina sensible a la luz capaz de inducir despolarización de neuronas. En otras realizaciones, la población de neuronas puede despolarizarse hasta el punto de la depleción sináptica por exposición a luz azul, verde, amarilla, naranja o roja.

Cuando se iluminan por una fuente de luz implantable colocada alrededor o cerca del nervio dorsal del pene/clítoris (una rama del nervio pudendo) o los nervios raquídeos sacros, las proteínas opsina sensibles a la luz expresadas en las membranas plasmáticas del nervio dorsal del pene/clítoris provocan la despolarización de esas neuronas, conduciendo a la contracción de esos músculos y sensaciones y/o funciones asociadas con relaciones sexuales normales. Estas incluyen, pero no se limitan a, erección, orgasmo, eyaculación y lubricación vaginal. Además, cuando se iluminan con una fuente de luz implantable colocada alrededor o cerca del nervio dorsal del pene/clítoris (una rama del nervio pudendo) o los nervios raquídeos sacros, las proteínas opsinas sensibles a la luz expresadas en las membranas plasmáticas del nervio dorsal del pene/clítoris causan la despolarización de esas neuronas, llevando a la restauración de sensaciones táctiles a los genitales requeridas para mantener la excitación sexual.

En algunos aspectos, el individuo controla externamente la despolarización de las neuronas responsables de la innervación de los genitales activando los medios lumínicos de una o más fuentes de luz que rodean o se encuentran cerca del nervio pudendo (tal como el nervio dorsal del pene/clítoris del nervio pudendo) o los nervios raquídeos sacros. En otra realización, el individuo cambia externamente el estado de polarización de las neuronas responsables de la innervación de los músculos de los genitales activando los medios lumínicos de una o más fuentes de luz (como un manguito lumínico) que rodea o se encuentra cerca del nervio pudendo y/o los nervios raquídeos sacros cuando el individuo experimenta el deseo de tener relaciones sexuales o cuando el individuo elige tener relaciones sexuales de acuerdo con una pauta predeterminada. En otra realización, el individuo puede ser un ser humano.

En algunos aspectos, la población de neuronas responsables de la innervación de los músculos y órganos de los genitales puede ser transfectada por inyección de un vector de expresión polinucleotídico (tal como cualquiera de los vector de expresión polinucleotídicos descritos anteriormente) en el cuerpo de las células neuronales motoras somáticas de un nervio raquídeo sacro (tal como cualquiera de S1, S2, S3, S4 y/o S5). En otros aspectos, la población de neuronas responsables de la innervación de los músculos de los genitales puede ser transfectada por inyección del vector de expresión en el nervio pudendo. En algunos aspectos, una o más fuentes de luz (tales como un manguito lumínico) capaces de generar luz en respuesta a una señal externa, tales como las descritas anteriormente, pueden colocarse quirúrgicamente alrededor o cerca del nervio pudendo (tal como el nervio dorsal de la rama del pene/clítoris del nervio pudendo) o los nervios raquídeos sacros.

Kits

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona kits para tratar una disfunción de la vejiga, incontinencia

fecal y/o disfunción sexual en un individuo que lo necesite. En algunas realizaciones, el kit comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína bomba iónica sensible a la luz, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia al menos un 95 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO : 1, una señal de exportación del RE y una señal de tráfico de membrana y un manguito capaz de generar luz en respuesta a una señal externa, en el que la luz es capaz de activar la proteína bomba iónica sensible a la luz.

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona kits para tratar una disfunción de la vejiga, incontinencia fecal y/o disfunción sexual en un individuo que lo necesite. En algunas realizaciones, el kit comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína bomba iónica sensible a la luz, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia al menos un 95 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:4, una señal de exportación del RE y una señal de tráfico de membrana y un manguito capaz de generar luz en respuesta a una señal externa, en el que la luz es capaz de activar la proteína bomba iónica sensible a la luz.

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona kits para tratar una disfunción de la vejiga, incontinencia fecal y/o disfunción sexual en un individuo que lo necesite. En algunas realizaciones, el kit comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína bomba iónica sensible a la luz, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia al menos un 95 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:23, una señal de exportación del RE y una señal de tráfico de membrana y un manguito capaz de generar luz en respuesta a una señal externa, en el que la luz es capaz de activar la proteína bomba iónica sensible a la luz.

En otros aspectos, el kit puede proporcionar adicionalmente un conjunto de instrucciones para administrar una cantidad eficaz del polinucleótido al individuo, en el que la proteína bomba iónica sensible a la luz se expresa en la membrana plasmática de una población de neuronas responsable de la inervación del músculo detrusor, una población de neuronas responsable de la inervación del músculo esfínter urinario externo en el individuo y/o una población de neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter anal externo en el individuo y/o instrucciones para colocar el manguito alrededor de la inervación del detrusor de los nervios raquídeos sacros y/o alrededor de la inervación del esfínter urinario externo del nervio pudiendo y/o alrededor de las inervaciones del esfínter anal externo del nervio pudiendo o los nervios raquídeos sacros. El kit también puede proporcionar instrucciones para usar cualquiera de las proteínas bomba iónica sensibles a la luz descritas anteriormente de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente. De manera similar, los manguitos lumínicos proporcionados en el kit pueden ser cualquiera de los manguitos lumínicos descritos anteriormente.

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un kit para tratar una disfunción de la vejiga en un individuo que lo necesita, donde el kit comprende: a) un polinucleótido que codifica una proteína opsina sensible a la luz, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia al menos un 95 % idéntica a una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11 y b) una fuente de luz capaz de generar luz en respuesta a una señal externa, en el que la luz es capaz de activar la proteína opsina.

Un kit en cuestión puede incluir además instrucciones para administrar una cantidad eficaz del polinucleótido al individuo, donde la proteína opsina sensible a la luz codificada por el polinucleótido se expresa en la membrana plasmática de una población de neuronas responsables de la inervación del músculo detrusor y/o una población de neuronas responsable de la inervación del músculo esfínter urinario externo en el individuo e instrucciones para colocar la fuente de luz alrededor de la inervación del detrusor del nervio raquídeo sacro y/o alrededor de la inervación del esfínter urinario externo del nervio pudiendo. En algunos casos, la disfunción de la vejiga es la hiperreflexia del detrusor y/o la disinergia del detrusor-esfínter externo.

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un kit para tratar la incontinencia fecal en un individuo que lo necesita, donde el kit comprende: a) un polinucleótido que codifica una proteína opsina sensible a la luz, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína opsina que comprende: i) una secuencia al menos un 95 % idéntica a la secuencia mostrada en las SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:23; ii) una señal de exportación del RE; iii) y una señal de tráfico de membrana; y b) una fuente de luz capaz de generar luz en respuesta a una señal externa, en el que la luz es capaz de activar la proteína opsina.

Un kit en cuestión puede incluir además instrucciones para administrar una cantidad eficaz del polinucleótido al individuo, donde la proteína opsina sensible a la luz codificada por el polinucleótido se expresa en la membrana plasmática de una población de neuronas responsable de la inervación del músculo esfínter anal externo en el individuo e instrucciones para colocar la fuente de luz alrededor de las inervaciones del esfínter anal externo de un nervio raquídeo sacro y/o la rama hemorroidal inferior del nervio pudiendo.

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un kit para tratar la incontinencia fecal en un individuo que lo necesita, donde el kit comprende: a) un polinucleótido que codifica una proteína opsina sensible a la luz, donde el

polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia al menos un 95 % idéntica a una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11 y b) una fuente de luz capaz de generar luz en respuesta a una señal externa, en el que la luz es capaz de activar la proteína opsina.

El kit puede incluir además instrucciones para administrar una cantidad eficaz del polinucleótido al individuo, en el que la proteína opsina sensible a la luz codificada por el polinucleótido se expresa en la membrana plasmática de una población de neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter anal externo en el individuo e instrucciones para colocar la fuente de luz alrededor de las inervaciones del esfínter anal externo de un nervio raquídeo sacro y/o la rama hemorroidal inferior del nervio pudendo.

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un kit para tratar la disfunción sexual en un individuo que lo necesite, donde el kit comprende: a) un polinucleótido que codifica una proteína opsina sensible a la luz, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia al menos un 95 % idéntica a una o más secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11 y b) una fuente de luz capaz de generar luz en respuesta a una señal externa, donde la luz es capaz de activar la proteína opsina.

El kit puede incluir además instrucciones para administrar una cantidad eficaz del polinucleótido al individuo, donde la proteína opsina sensible a la luz codificada por el polinucleótido se expresa en la membrana plasmática de una población de neuronas responsable de la inervación de los genitales en el individuo y las instrucciones para colocar la fuente de luz alrededor de las innervaciones genitales que tienen su origen en uno o más nervios raquídeos sacros, el nervio dorsal de la rama del pene del nervio pudendo y/o el nervio dorsal de la rama del clítoris del nervio pudendo.

Ejemplos

Ejemplo 1: Uso de la estimulación nerviosa basada en la optogenética en un modelo animal de disinergia del detrusor-esfínter externo (DDE) e hiperreflexia del detrusor (HD)

Este Ejemplo valida un modelo animal de DDE e HD para el tratamiento con los métodos optogenéticos descritos en la presente memoria. Se han utilizado modelos de gato con lesiones de la médula espinal para recrear las condiciones humanas de la DDE y la HD, habiéndose validado usando PET (Tai et al., 2004, *Experimental Neurol.*, 190:171). También existen modelos animales de hiperreflexia en las ratas con lesiones de la médula espinal (SCI) (Shaker et al., 2003, *NeuroUrol Urodyn.*, 22(7):693-8), así como en el ratón EAE, que es también un modelo para la esclerosis múltiple (Vignes et al., 2007, *J. Physiol.* 578(Pt2):439-50). En este Ejemplo, la bomba aniónica fotoactivable dirigida a la membrana halorodopsina de *Natronomonas pharaonis* (NpHR) se utiliza para hiperpolarizar los nervios responsables de la inervación del músculo detrusor de la vejiga y el esfínter urinario externo.

Materiales y métodos

Los gatos con lesiones de la médula espinal inducidas experimentalmente para replicar los síntomas de la DDE y la HD humanas se producen según métodos conocidos (Tai et al., 2004, *Experimental Neurol.* 190:171). Se inyecta halorodopsina marcada con proteína fluorescente amarilla (YFP) (YFP - NpHr3.0 y/o YFP - NpHR3.1; véase www.optogenetics.org) en un vector viral AAV1 y bajo el control del promotor *Thy1* felino directamente en el cuerpo de la célula neuronal motora somática de los nervios raquídeos sacros responsables de las innervaciones del detrusor. Además, la YFP-halorodopsina en un vector viral AAV1 bajo el control del promotor *Thy1* felino se inyecta en el núcleo de Onuf, el origen del nervio pudendo.

Construcción del manguito lumínico e implante quirúrgico

La construcción del manguito lumínico utiliza una pipeta de vidrio de borosilicato de 0,5 mm de diámetro interior. Las pipetas de vidrio se introducen cuidadosamente a 4 mm y en un canal de aproximadamente 0,5 mm de ancho longitudinalmente a lo largo de la longitud del manguito usando un taladro dental con una punta abrasiva. Una resina epoxi curada por radiación ultravioleta (Norland Products, Cranbury, NJ, NOA 81) se aplica al exterior del manguito y se cura con una lámpara de curado UV. Se aplican 16 LED ámbar pequeños (1,0 x 0,6 x 0,2 mm) (Rohm, Kyoto, Japón, SMLP12BC7T, 589 nm) al exterior del manguito de vidrio y se fijan en su sitio con la resina epoxi óptica curada con luz UV. Los LED están dispuestos en un perímetro concéntrico dirigido hacia el nervio periférico en el centro y micro-soldados manualmente con alambre magnético de cobre calibre 40. La intensidad y los tiempos de encendido/apagado de los LED individuales se miden con un medidor digital de potencia óptica y un fotodetector de alta velocidad (ThorLabs, Newton, NJ, S130A y DET10A). Las mediciones de intensidad se usan como entradas para un modelo de propagación de la luz, descrito a continuación y sirven para construir una gráfica de corriente eléctrica de entrada frente a intensidad de la luz para la estimación de la luz experimental.

El manguito de luz activable externamente con diodo emisor de luz (LED) se coloca quirúrgicamente para rodear cada nervio (uno o más nervios raquídeos sacros y/o el nervio pudendo; véase, por ejemplo, Llewellyn et al., 2010, Nat. Med., 16 (10):161-165).

5 Modelo de propagación de la luz

Se utiliza un modelo de propagación de la luz para verificar que todas las regiones de las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros, así como las innervaciones del esfínter externo del nervio pudendo (o el propio nervio pudendo) están expuestas a intensidades de luz que exceden esa intensidad mínima de la luz requerida para activar las bombas de cloruro NpHr3.0 y/o NpHR3.1 (3,5 mW/mm²; Gradinaru et al., 2010, Cell, 141:1-12). La propagación de la luz se modela utilizando el modelo de Kubelka-Munk como se describe Aravanis et al. para el tejido de dispersión difusa (2007, J Neural Eng 4, S143-56). Brevemente, la intensidad de la luz varía con la distancia mediante la ecuación

$$\frac{I(z)}{I(z=0)} = \frac{\rho^2}{(Sz + 1)(z + \rho)}$$

15 donde

$$\rho = r \sqrt{\left(\frac{n}{NA}\right)^2 - 1}$$

20 y S era la longitud de dispersión del tejido, z era la distancia desde la fuente de luz, r era el diámetro del chip LED, n era el índice de refracción del material que la luz atravesaba, NA era la apertura numérica del LED desde

$$NA = n \text{ sen } \theta_{1/2}$$

25 y 1/2 era el medio ángulo de divergencia del LED. Este modelo tiene en cuenta el efecto sobre la intensidad de la luz debido a la dispersión y a las pérdidas geométricas. El valor utilizado para la longitud de dispersión se determina empíricamente a partir de cortes de cerebro de ratón para longitudes de onda entre 400 y 900 nm y se supone que son similares en el tejido periférico. Este modelo también asume que no existe ninguna pérdida en la intensidad de la luz debido a la absorción, ni tiene en cuenta los fotones de dispersión múltiple. Los valores para 1/2 y r se toman de la hoja de producto del fabricante del LED, mientras que I(z=0) se midió con un medidor de potencia (ThorLabs, Newton, NJ, S130A) para un solo LED.

35 Utilizando un diámetro del nervio pudendo como referencia en este modelo, se puede determinar la variación relativa de intensidad óptica en la periferia del nervio y en el centro nervioso. Por lo tanto, se puede determinar cualquier caída de intensidad a través del nervio, así como la superficie mínima del nervio necesaria para exceder la intensidad mínima para la activación de la luz de las bombas de cloruro NpHr3.0 y/o NpHR3.1 (3,5 mW/mm²). El manguito lumínico puede superar los 25 mW mm⁻² en la superficie del nervio.

40 Imagen del axón motor del nervio pudendo y de los nervios raquídeos sacros

Los gatos adultos con lesiones en la médula espinal, preparados como se ha descrito anteriormente, se anestesian mediante inyección de ketamina y xilazina. El músculo detrusor y/o los músculos del esfínter urinario externo se exponen por incisión en la piel seguido por inyección intramuscular de 4 µl de tinción de marcado retrógrado de 5 % (Fast Blue, Polysciences, Warrington, PA). La incisión de la piel se cierra con un adhesivo tisular (VetBond, 3M, St. Paul, MN) y se deja que los gatos se recuperen. Después de una semana, los animales son anestesiados y sacrificados. Los cortes del nervio raquídeo pudendo y sacro se diseccionan y se fijan en paraformaldehído al 4 % durante 30 minutos a 25 °C. Las muestras son lavadas después dos veces en solución salina tamponada con fosfato 1X (en mM, 2,7 KCl, 1,76 KH₂PO₄, 137 NaCl, 10 NaHPO₄, pH 7,4) durante 5 minutos cada una a 25 °C, embebidas en agarosa con punto de fusión de baja temperatura a 50 °C y se cortan con vibratomo en cortes de 50 µm.

50 Después de una permeabilización de 30 min en Triton X-100 al 0,1 % (octilfenolpolil (étilenglicoléter)x) y suero de burro normal al 3 %, los cortes se incuban durante la noche con anticuerpo monoclonal anti-lamina de ratón 1:500 (Abcam, Cambridge, MA) y anticuerpo policlonal anti-tau de conejo 1:1000 (DAKO, Cambridgeshire, Reino Unido). Los cortes se lavan a continuación y se incuban durante 3 horas a 25 °C con anticuerpos secundarios conjugados con Cy3 o Cy5 fluorescente 1:1000 (Jackson Laboratories, West Grove, PA). Las imágenes de fluorescencia confocal se obtienen utilizando un microscopio de láser de barrido Leica TCS SP5 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) con un objetivo de inmersión de aceite 20X/0,70NA o 40X/1,25NA. Se adquieren múltiples imágenes en pila en serie de varios sujetos utilizando ajustes equivalentes.

60

Análisis de la imagen

El número, el tamaño y la intensidad de la fluorescencia de los axones motores (3 μm y G-ratio 0,5) se determinan mediante análisis manual utilizando el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD). El perímetro de la vaina de mielina marcada con lamina y el axolemma marcado con tau se delinean a mano para formar una región de interés. El diámetro de Feret y la intensidad media de los píxeles se determinaron automáticamente en ImageJ para la región de interés. La profundidad del axón dentro de los nervios raquídeos pudendos y sacros se determina buscando la distancia más corta entre el centro de cada axón y el exterior del nervio. El diámetro del axón motor frente a la intensidad de píxeles de la proteína fluorescente amarilla se evalúan para determinar la correlación estadísticamente significativa utilizando una prueba *t* de Student de dos colas pareada ($\alpha= 0,05$) después de la primera prueba de normalidad usando el ensayo de Lilliefors ($\alpha=0,05$) en Matlab (Mathworks, Natick, MA).

La distribución de las bombas de cloruro sensibles a la luz marcadas con YFP dentro de axones motores de un gato *Thy1::NpHR* se cuantifican examinando los cortes transversales de los nervios raquídeos pudendos y sacros paralelos y perpendiculares al eje largo de los axones.

Los estímulos proporcionados a través de los manguitos lumínicos evocan respuestas eléctricas y contráctiles del músculo detrusor y el esfínter urinario externo.

Se utiliza una señal externa para activar los LED. La activación de los LED raquídeos sacros y los LED pudendos son tales que cuando uno está encendido, el otro está apagado. Cuando los LED raquídeos sacros están encendidos, la vejiga está relajada y el esfínter urinario externo está activo, permitiendo el almacenamiento de la orina. Cuando los LED raquídeos sacros están apagados, el esfínter urinario externo está encendido permitiendo que el esfínter urinario externo se relaje y permita que la orina pase de la vejiga en contracción. Cuando se completa la evacuación, los LED raquídeos sacros se vuelven a encender y los LED del esfínter urinario externo se apagan.

Ejemplo 2: Uso de canales catiónicos sensibles a la luz para provocar la depleción sináptica inducida por la despolarización en un modelo animal de disinergia del detrusor-esfínter externo (DDE) e hiperreflexia del detrusor (HD)

Este Ejemplo valida un modelo animal de DDE e HD para el tratamiento con los métodos optogenéticos descritos anteriormente por el cual la función urinaria se restablece mediante la depleción sináptica inducida por la despolarización selectiva de las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros y las innervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo. Los modelos animales felinos o de roedores son idénticos a los utilizados en el Ejemplo 1.

Se inyecta SSFO marcada con proteína fluorescente amarilla (YFP) (pAAV-*Thy1*-hChR2 (E123T/T159C)-EYFP; véase www.optogenetics.org) en un vector viral AAV1 y bajo control del promotor *Thy1* felino directamente en el cuerpo celular de la neurona motora somática de los nervios raquídeos sacros (responsables de las innervaciones del detrusor) y en el núcleo de Onuf (responsable de las innervaciones del esfínter urinario externo).

Los manguitos lumínicos se fabrican como en el Ejemplo 1. Los manguitos lumínicos activables externamente con diodo emisor de luz (LED) se colocan quirúrgicamente para rodear las innervaciones del detrusor que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros y las innervaciones del esfínter urinario del nervio pudendo. La depleción sináptica inducida por la despolarización causada por la activación de las proteínas canal catiónico sensibles a la luz con luz que tiene una intensidad de al menos 100 Hz provoca la relajación del músculo detrusor, permitiendo así que la vejiga se llene. Además, la depleción sináptica inducida por la despolarización causada por la activación de las proteínas canal catiónico sensibles a la luz con luz que tiene una intensidad de por lo menos 100 Hz provoca la relajación del esfínter urinario externo, permitiendo así la evacuación de la orina.

Se utiliza una señal externa para activar los LED. La activación de los LED raquídeos sacros y los LED pudendos es tal que cuando unos están encendidos, los otros están apagados. Cuando los LED raquídeos sacros están encendidos, la vejiga está relajada y el esfínter urinario externo está activo, permitiendo el almacenamiento de la orina. Cuando los LED raquídeos sacros están apagados, los del esfínter urinario externo están encendidos, permitiendo que el esfínter urinario externo se relaje y permita que la orina pase de la vejiga en contracción. Cuando se completa la evacuación, los LED raquídeos sacros se vuelven a encender y los LED del esfínter urinario externo se apagan.

Ejemplo 3: Construcciones de vectores AAV

Se generaron las siguientes construcciones de virus adenoasociados (AAV): 1) AAV1:hsyn-ChR2-EYFP (AAV1 que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión de ChR2-eYFP operativamente unida a un promotor de sinapsina 1 humana); 2) AAV6- hsyn-ChR2-EYFP (AAV6 que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión ChR2-eYFP operativamente unida a un promotor de sinapsina 1 humana); 3) AAV1-hsyn-NpHR-EYFP (AAV1 que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión NpHR3.0-EYFP, unida operativamente a un promotor de sinapsina 1 humana); 4) AAV6-hsyn-

NpHR-EYFP (AAV6 que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión NpHR 3.0-EYFP, unida operativamente a un promotor de sinapsina 1 humana); 5) AAV1-hsyn-eARCH-EYFP (AAV1 que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión eARCH 3.0-EYFP, unida operativamente a un promotor de sinapsina 1 humana).

5 Los virus AAV de ADN monocatenario se produjeron en un sistema de baculovirus (Virovek, Hayward, CA, tal como se describe en el documento WO 2008/024998

Ejemplo 4: Inyecciones intramusculares de AAV que codifican opsinas en ratas

10 Se inyectó una dosis total de aproximadamente 1×10^{12} genomas virales (gv) en aproximadamente 12 μ l de construcciones descritas en el Ejemplo 3 en el músculo EUE (esfínter urinario externo) de ratas F344/Sprague Dawley hembra, 130-170 g cada una. En diversos días después de la inyección, se sacrificaron los animales y se evaluó la expresión de las opsinas codificadas por las construcciones en el núcleo dorsolateral (NDL) y en otras regiones de la médula espinal. La figura 1 representa esquemáticamente las diversas secciones de la médula espinal, incluyendo el NDL. Todas las construcciones codificaron proteínas de fusión opsina-EYFP (por ejemplo, ChR2-EYFP, NpHR-EYFP, eARCH-EYFP).

20 Se prepararon cortes de 40 nm de la médula espinal de la rata. Los cortes se tiñeron con DAPI y se examinaron con un microscopio de fluorescencia. La microscopía confocal se utilizó para contar neuronas motoras del NDL en todos los cortes mediante la visualización del marcaje con YFP. Las neuronas motoras se visualizaron utilizando un objetivo de 40x y se tomaron fotomicrografías de los cortes mediante la fusión de imágenes de los canales DAPI (que representa el núcleo) e YFP (que indica las regiones del cuerpo celular). Los cortes con un núcleo visible rodeado por YFP dentro del NDL se contaron sobre cortes seriados para determinar el número total de neuronas motoras para cada animal. En cada corte, se contaron las células como positivas si mostraban tanto la expresión de YFP como DAPI para la tinción nuclear. Los datos se representan en la Figura 2.

30 Como se muestra en la Figura 2, panel izquierdo, aproximadamente la mitad de todas las neuronas motoras pudendas expresaban la proteína codificada por las diversas construcciones de AAV inyectadas. Los valores de la literatura para el número total de neuronas motoras pudendas, medido mediante marcado retrógrado, es de aproximadamente 60 para DL derecha y DL izquierda y 120 total. (Kane et al. (2002) Anat. Rec. 266:21-29).

Ejemplo 5: Medición de la contracción del músculo EUE y de la presión en la vejiga en rata

35 Noventa días después de la inyección intramuscular de AAV1-hsyn-ChR2-EYFP en el EUE, se realizó una cistometría y se tomaron registros EMG del esfínter de la vejiga y del esfínter urinario externo. La cistometría implicó la colocación de un catéter en la vejiga del roedor que se engancha a un sensor de presión. Se colocaron electrodos en el EUE y se conectaron a un amplificador registrador para medir la actividad (EMG) de la contracción del músculo esfínter. Los datos se presentan en la Figura 3.

40 La Figura 3 muestra las contracciones del músculo EUE a diferentes frecuencias/duraciones de tiempo después de la estimulación óptica con luz azul en el nervio pudendo de ratas por vía intramuscular (en el EUE) inyectadas con AAV1-hsyn-ChR2-EYFP. Las contracciones ópticamente inducidas observadas siguen la frecuencia de pulsos de luz de 5-50 Hz para el nervio pudendo.

45 Los ejemplos, que están destinados a ser puramente ilustrativos de la invención y por lo tanto no deben ser considerados como limitativos de la invención de ninguna manera, también describen y detallan aspectos y realizaciones de la invención discutidos anteriormente. Los ejemplos anteriores y la descripción detallada se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

50 Aunque la invención anterior se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de entendimiento, será fácilmente evidente para los expertos en la materia a la luz de las enseñanzas de esta invención que se pueden hacer ciertos cambios y modificaciones sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

SECUENCIAS

La secuencia de aminoácidos de NpHR sin el péptido señal:

VTQRELFEFVLNDPLLASSLYINIALAGLSILLFVFMTRGLDDPRAKLIADVSTILVPVVSIASTY
GLASGLTISVLEMPAGHFAEGSSVMLGGEEVDGVVTMWGRYLTWALSTPMILLALGLLAG
SNAITKLFATITFDIAMCVTGLAAALTTSSHLMRWFWYAISCACFLVVLVYLJVEWAQDAKA
AGTADMFNLTLLTVVMWLGYPVWALGVEGIAVLPVGVTSWGYSEFLDIVAKYIFAFLLLN
60 YLTSNESVVSIGSILDVPSASGTPADD (SEQ ID NO:1).

La secuencia de aminoácidos de eYFP-NpHR3.0:

MTETLPPVTESAVALQAEVTQRELFEFVLNDPLLASSLYINIALAGLSILLFVFMTRGLDDPR
 AKLIAVSTILVPVVSIASTGLASGLTISVLEMPAGHFAEGSSVMLGGEEVDGVTMTWGRYL
 TWALSTPMILLALGLLAGSNATKLFATITFDIAMCVTGLAAALTTSSHLMRWFWYAISCACFLV
 VLYILLVEWAQDAKAAAGTADMFNLTLLKLLTVVMWLGYPVWALGVEGIAVLPVGVTSW
 GYSFLDIVAKYIFAFLLNYLTSNESVVSIGSILDVPSASGTPADDDAAAKSRITSEGEYIPLDQID
 INVVSKEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTGKLFICTTGKLPVPWPT
 LVTTFGYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTL
 VNRIELKGDIFKEDGNILGHKLEYNYNVSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADH
 YQQNTPIGDGPVLI.PDNHYI.SYQSAI.SKDPNEKRDHVMVLEFVTAAGITLGMDELYKFCYEN
 EV (SEQ ID NO:2).

5 La secuencia de aminoácidos de eYFP-NpHR3.1:

MVTQRELFEFVLNDPLLASSLYINIALAGLSILLFVFMTRGLDDPRAKLIAVSTILVPVVSIA
 STGLASGLTISVLEMPAGHFAEGSSVMLGGEEVDGVTMTWGRYL TWALSTPMILLALGLL
 AGSNATKLFATITFDIAMCVTGLAAALTTSSHLMRWFWYAISCACFLV VLYILLVEWAQDA
 KAAAGTADMFNLTLLKLLTVVMWLGYPVWALGVEGIAVLPVGVTSW GYSFLDIVAKYIFAFLL
 LNYLTSNESVVSIGSILDVPSASGTPADDDAAAKSRITSEGEYIPLDQIDINVVSKEELFTGVVP
 ILEVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTGKLFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLQCFARYP
 DHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGDIFKEDGNI
 L.GHKLEYNYNVSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLI.PD
 NHYLSYQSALS.KDPNEKRDHVMVLEFVTAAGITLGMDELYKFCYENEV (SEQ ID NO:3).

10 La secuencia de aminoácidos de GtR3:

ASSFGKALLEFVIVFACITLLLGINAAKSKAASRVLPATFVTGASIAFYFSMASGGGWVIAP
 DCRQLFVARYLDWLITPLLLIDLGLVAGVSRWDIMALCLSDVLMATGAFGSLTVGNVQW
 VWWFHFMCWFL.HIIFAL.GKSWAEAAKAKGGDSASVYSKIAGITVITWFCYVWVFAHGF
 GNFVTFEVLIVGLDVISKAVFGLILMSGAAATGYESI (SEQ ID NO:4).

La secuencia de aminoácidos de ChR2:

MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQWLA
 AGFSILLMPFYAYQTKWSTCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLATGHRVQWLR
 YAEWLLTCPVILHL.SNLTGL.SNDYSRRTMGLLVSDIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFCI.GL
 CYGANTFFHAAKAYIE.GYHITVPKGRRCRQVVTGMAWLFFVSWGMFPIL.FIL.GPEGFVLSVY
 GSTVGHITIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLVEDEAEAG
 AVP (SEQ ID NO:5).

La secuencia de aminoácidos de SFO:

MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQWLA
 AGFSILLMPFYAYQTKWSTCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLATGHRVQWLR
 YAEWLLTSPVIL.HI.SNLTGL.SNDYSRRTMGLLVSDIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFCI.GL
 CYGANTFFHAAKAYIE.GYHITVPKGRRCRQVVTGMAWLFFVSWGMFPIL.FIL.GPEGFVLSVY
 GSTVGHITIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLVEDEAEAG
 AVP (SEQ ID NO:6).

20 La secuencia de aminoácidos de SSFO:

MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQWLA
 AGFSILLMPFYAYQTKWSTCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLATGHRVQWLR
 YAEWLLTSPVIL.III.SNLTGL.SNDYSRRTMGLLVSAIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFCI.GL
 CYGANTFFHAAKAYIE.GYHITVPKGRRCRQVVTGMAWLFFVSWGMFPIL.FIL.GPEGFVLSVY
 GSTVGHITIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLVEDEAEAG
 AVP (SEQ ID NO:7).

25 La secuencia de aminoácidos de C1V1:

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLE
 NNGSVICIPNNGQCFCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTKWSTCG
 WEEIYVATIEMIKFIIIEYFHEFDEPAVIYSSNGNKTVWLR.YAEWLJ.TCPVLLJHL.SNLTGLK
 DDYSKRTMGIJ.VSDVGCIVWGATSAMCTGWTKIL.FFLISI.SYGMITYFHAAKVYIEAFIIT

VPKGICREL.VRVMAWTFFVAWGMFPVLFLL.GTEGFGHISPYGSAIGHSIL.DLI.AKNMWGV
 LGNYLRVKIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEVEITLVAEEED (SEQ ID NO:8).

5 La secuencia de aminoácidos de C1V1 (E122T):

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLE
 NNGSVICIPNNGQCFCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTKWSTCGWE
 TIYVATIEMIKFIIIEYFHEFDEPAVIYSSNGNKTVWLR.YAEWLJ.TCPVLLJHL.SNLTGLK.DDYS
 KRTMGIJ.VSDVGCIVWGATSAMCTGWTKIL.FFLISI.SYGMITYFHAAKVYIEAFIITVPKGI
 CREL.VRVMAWTFFVAWGMFPVLFLL.GTEGFGHISPYGSAIGHSIL.DLI.AKNMWGV.LGNYLR
 VKIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEVEITLVAEEED (SEQ ID NO:9).

10 La secuencia de aminoácidos de C1V1 (E162T):

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLE
 NNGSVICIPNNGQCFCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTKWSTCG
 WEEIYVATIEMIKFIIIEYFHEFDEPAVIYSSNGNKTVWLR.YATWLLTCPVLLIHL.SNLTGLK
 DDYSKRTMGIJ.VSDVGCIVWGATSAMCTGWTKIL.FFLISI.SYGMITYFHAAKVYIEAFIIT
 VPKGICREL.VRVMAWTFFVAWGMFPVLFLL.GTEGFGHISPYGSAIGHSIL.DLI.AKNMWGV
 LGNYLRVKIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEVEITLVAEEED (SEQ ID NO:10).

La secuencia de aminoácidos de C1V1 (E122T/E162T):

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLE
 NNGSVICIPNNGQCFCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTKWSTCG
 WEEIYVATIEMIKFIIIEYFHEFDEPAVIYSSNGNKTVWLR.YATWLLTCPVLLIHL.SNLTGLK
 DDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWTKIL.FFLISLSYGMITYFHAAKVYIEAFIIT
 VPKGICREL.VRVMAWTFFVAWGMFPVLFLL.GTEGFGHISPYGSAIGHSIL.DLI.AKNMWGV
 LGNYLRVKIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEVEITLVAEEED (SEQ ID NO:11).

15 La secuencia de aminoácidos de eArch:

MDPIALQAGYDLLGDGRPETLWLGIGTLLMLIGTFYFLVRGWGVTDKDKDAREYYAVTILVP
 GIASAAYLMSMFFGIGLTEVTVGGEMLDIYYARYADWLFTTPLLDDLALLAKVDRVTIGTL
 VGVDALMIVTGLIGALSHTAIARYSWWLFSTICMIVVLYFLATSLRSAAKERGPEVASTFN
 TLTALVVLWTAYPILWIIIGTEGAGVVGLGIETLLFMVLDVTAKVGFVGFILLRSRILGDTE
 APEPSAGADVSAAD (SEQ ID NO:23).

20 La secuencia de aminoácidos de eArch3.0-EYFP:

MDPIALQAGYDLLGDGRPETLWLGIGTLLMLIGTFYFLVRGWGVTDKDKDAREYYAVTILVP
 GIASAAYLMSMFFGIGLTEVTVGGEMLDIYYARYADWLFTTPLLDDLALLAKVDRVTIGTL
 VGVDALMIVTGLIGALSHTAIARYSWWLFSTICMIVVLYFLATSLRSAAKERGPEVASTFN
 TLTALVVLWTAYPILWIIIGTEGAGVVGLGIETLLFMVLDVTAKVGFVGFILLRSRILGDTE
 APEPSAGADVSAADRPVAVSKAAAKSRII'ISEGEYIPLDQIDINVVSKGEELITGVVPIVLE
 LDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLQC'FARYPDH
 MKQHDFKFSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFECDTLVNRIELKIDFKEDGNIL
 GHKLEYNYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPD
 NHYLSYQSALS KDPNEKRDMVLLFVTAAGITLGMDELKFCYENEV (SEQ ID NO:24).

25 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Deisseroth, Karl A.
 Aden, Elizabeth R.
 Gradinaru, Viviana

30 Delp, Scott L.

<120> Composiciones y métodos para el tratamiento de trastornos neurogénicos del suelo pélvico

<130> STAN-937WO

<150> US 61/601.298

<151> 21-02-2012

<160> 24

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 273

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 1

Val Thr Gln Arg Glu Leu Phe Glu Phe Val Leu Asn Asp Pro Leu Leu
1 5 10 15

Ala Ser Ser Leu Tyr Ile Asn Ile Ala Leu Ala Gly Leu Ser Ile Leu
20 25 30

Leu Phe Val Phe Met Thr Arg Gly Leu Asp Asp Pro Arg Ala Lys Leu
35 40 45

Ile Ala Val Ser Thr Ile Leu Val Pro Val Val Ser Ile Ala Ser Tyr
50 55 60

Thr Gly Leu Ala Ser Gly Leu Thr Ile Ser Val Leu Glu Met Pro Ala
65 70 75 80

Gly His Phe Ala Glu Gly Ser Ser Val Met Leu Gly Gly Glu Glu Val
85 90 95

Asp Gly Val Val Thr Met Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Trp Ala Leu Ser
100 105 110

Thr Pro Met Ile Leu Leu Ala Leu Gly Leu Leu Ala Gly Ser Asn Ala
115 120 125

Thr Lys Leu Phe Thr Ala Ile Thr Phe Asp Ile Ala Met Cys Val Thr
130 135 140

ES 2 628 006 T3

Gly Leu Ala Ala Ala Leu Thr Thr Ser Ser His Leu Met Arg Trp Phe
145 150 155 160

Trp Tyr Ala Ile Ser Cys Ala Cys Phe Leu Val Val Leu Tyr Ile Leu
165 170 175

Leu Val Glu Trp Ala Gln Asp Ala Lys Ala Ala Gly Thr Ala Asp Met
180 185 190

Phe Asn Thr Leu Lys Leu Leu Thr Val Val Met Trp Leu Gly Tyr Pro
195 200 205

Ile Val Trp Ala Leu Gly Val Glu Gly Ile Ala Val Leu Pro Val Gly
210 215 220

Val Thr Ser Trp Gly Tyr Ser Phe Leu Asp Ile Val Ala Lys Tyr Ile
225 230 235 240

Phe Ala Phe Leu Leu Leu Asn Tyr Leu Thr Ser Asn Glu Ser Val Val
245 250 255

Ser Gly Ser Ile Leu Asp Val Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Ala Asp
260 265 270

Asp

<210> 2
<211> 559
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 2

Met Thr Glu Thr Leu Pro Pro Val Thr Glu Ser Ala Val Ala Leu Gln
1 5 10 15

Ala Glu Val Thr Gln Arg Glu Leu Phe Glu Phe Val Leu Asn Asp Pro
20 25 30

Leu Leu Ala Ser Ser Leu Tyr Ile Asn Ile Ala Leu Ala Gly Leu Ser
35 40 45

Ile Leu Leu Phe Val Phe Met Thr Arg Gly Leu Asp Asp Pro Arg Ala
50 55 60

ES 2 628 006 T3

Lys Leu Ile Ala Val Ser Thr Ile Leu Val Pro Val Val Ser Ile Ala
 65 70 75 80
 Ser Tyr Thr Gly Leu Ala Ser Gly Leu Thr Ile Ser Val Leu Glu Met
 85 90 95
 Pro Ala Gly His Phe Ala Glu Gly Ser Ser Val Met Leu Gly Gly Glu
 100 105 110
 Glu Val Asp Gly Val Val Thr Met Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Trp Ala
 115 120 125
 Leu Ser Thr Pro Met Ile Leu Leu Ala Leu Gly Leu Leu Ala Gly Ser
 130 135 140
 Asn Ala Thr Lys Leu Phe Thr Ala Ile Thr Phe Asp Ile Ala Met Cys
 145 150 155 160
 Val Thr Gly Leu Ala Ala Ala Leu Thr Thr Ser Ser His Leu Met Arg
 165 170 175
 Trp Phe Trp Tyr Ala Ile Ser Cys Ala Cys Phe Leu Val Val Leu Tyr
 180 185 190
 Ile Leu Leu Val Glu Trp Ala Gln Asp Ala Lys Ala Ala Gly Thr Ala
 195 200 205
 Asp Met Phe Asn Thr Leu Lys Leu Leu Thr Val Val Met Trp Leu Gly
 210 215 220
 Tyr Pro Ile Val Trp Ala Leu Gly Val Glu Gly Ile Ala Val Leu Pro
 225 230 235 240
 Val Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Ser Phe Leu Asp Ile Val Ala Lys
 245 250 255
 Tyr Ile Phe Ala Phe Leu Leu Leu Asn Tyr Leu Thr Ser Asn Glu Ser
 260 265 270
 Val Val Ser Gly Ser Ile Leu Asp Val Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro
 275 280 285
 Ala Asp Asp Ala Ala Ala Lys Ser Arg Ile Thr Ser Glu Gly Glu Tyr
 290 295 300
 Ile Pro Leu Asp Gln Ile Asp Ile Asn Val Val Ser Lys Gly Glu Glu
 305 310 315 320

ES 2 628 006 T3

Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val
 325 330 335
 Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr
 340 345 350
 Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro
 355 360 365
 Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys
 370 375 380
 Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser
 385 390 395 400
 Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp
 405 410 415
 Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr
 420 425 430
 Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly
 435 440 445
 Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val
 450 455 460
 Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys
 465 470 475 480
 Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr
 485 490 495
 Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn
 500 505 510
 His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys
 515 520 525
 Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr
 530 535 540
 Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Phe Cys Tyr Glu Asn Glu Val
 545 550 555

<210> 3
 <211> 542

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 3

ES 2 628 006 T3

Met Val Thr Gln Arg Glu Leu Phe Glu Phe Val Leu Asn Asp Pro Leu
1 5 10 15

Leu Ala Ser Ser Leu Tyr Ile Asn Ile Ala Leu Ala Gly Leu Ser Ile
20 25 30

Leu Leu Phe Val Phe Met Thr Arg Gly Leu Asp Asp Pro Arg Ala Lys
35 40 45

Leu Ile Ala Val Ser Thr Ile Leu Val Pro Val Val Ser Ile Ala Ser
50 55 60

Tyr Thr Gly Leu Ala Ser Gly Leu Thr Ile Ser Val Leu Glu Met Pro
65 70 75 80

Ala Gly His Phe Ala Glu Gly Ser Ser Val Met Leu Gly Gly Glu Glu
85 90 95

Val Asp Gly Val Val Thr Met Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Trp Ala Leu
100 105 110

Ser Thr Pro Met Ile Leu Leu Ala Leu Gly Leu Leu Ala Gly Ser Asn
115 120 125

Ala Thr Lys Leu Phe Thr Ala Ile Thr Phe Asp Ile Ala Met Cys Val
130 135 140

Thr Gly Leu Ala Ala Ala Leu Thr Thr Ser Ser His Leu Met Arg Trp
145 150 155 160

Phe Trp Tyr Ala Ile Ser Cys Ala Cys Phe Leu Val Val Leu Tyr Ile
165 170 175

Leu Leu Val Glu Trp Ala Gln Asp Ala Lys Ala Ala Gly Thr Ala Asp
180 185 190

Met Phe Asn Thr Leu Lys Leu Leu Thr Val Val Met Trp Leu Gly Tyr
195 200 205

Pro Ile Val Trp Ala Leu Gly Val Glu Gly Ile Ala Val Leu Pro Val
210 215 220

ES 2 628 006 T3

Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Ser Phe Leu Asp Ile Val Ala Lys Tyr
 225 230 235 240

Ile Phe Ala Phe Leu Leu Leu Asn Tyr Leu Thr Ser Asn Glu Ser Val
 245 250 255

Val Ser Gly Ser Ile Leu Asp Val Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Ala
 260 265 270

Asp Asp Ala Ala Ala Lys Ser Arg Ile Thr Ser Glu Gly Glu Tyr Ile
 275 280 285

Pro Leu Asp Gln Ile Asp Ile Asn Val Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu
 290 295 300

Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn
 305 310 315 320

Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr
 325 330 335

Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val
 340 345 350

Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe
 355 360 365

Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala
 370 375 380

Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp
 385 390 395 400

Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu
 405 410 415

Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn
 420 425 430

Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr
 435 440 445

Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile
 450 455 460

Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln

ES 2 628 006 T3

465					470						475				480
Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His
				485					490					495	
Tyr	Leu	Ser	Tyr	Gln	Ser	Ala	Leu	Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg
			500					505					510		
Asp	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	Leu
		515					520					525			
Gly	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Lys	Phe	Cys	Tyr	Glu	Asn	Glu	Val		
	530					535					540				

<210> 4

<211> 223

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 4

ES 2 628 006 T3

Ala Ser Ser Phe Gly Lys Ala Leu Leu Glu Phe Val Phe Ile Val Phe
 1 5 10 15

Ala Cys Ile Thr Leu Leu Leu Gly Ile Asn Ala Ala Lys Ser Lys Ala
 20 25 30

Ala Ser Arg Val Leu Phe Pro Ala Thr Phe Val Thr Gly Ile Ala Ser
 35 40 45

Ile Ala Tyr Phe Ser Met Ala Ser Gly Gly Gly Trp Val Ile Ala Pro
 50 55 60

Asp Cys Arg Gln Leu Phe Val Ala Arg Tyr Leu Asp Trp Leu Ile Thr
 65 70 75 80

Thr Pro Leu Leu Leu Ile Asp Leu Gly Leu Val Ala Gly Val Ser Arg
 85 90 95

Trp Asp Ile Met Ala Leu Cys Leu Ser Asp Val Leu Met Ile Ala Thr
 100 105 110

Gly Ala Phe Gly Ser Leu Thr Val Gly Asn Val Lys Trp Val Trp Trp
 115 120 125

Phe Phe Gly Met Cys Trp Phe Leu His Ile Ile Phe Ala Leu Gly Lys
 130 135 140

Ser Trp Ala Glu Ala Ala Lys Ala Lys Gly Gly Asp Ser Ala Ser Val
 145 150 155 160

Tyr Ser Lys Ile Ala Gly Ile Thr Val Ile Thr Trp Phe Cys Tyr Pro
 165 170 175

Val Val Trp Val Phe Ala Glu Gly Phe Gly Asn Phe Ser Val Thr Phe
 180 185 190

Glu Val Leu Ile Tyr Gly Val Leu Asp Val Ile Ser Lys Ala Val Phe
 195 200 205

Gly Leu Ile Leu Met Ser Gly Ala Ala Thr Gly Tyr Glu Ser Ile
 210 215 220

<210> 5
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

5

10

ES 2 628 006 T3

<400> 5

Met	Asp	Tyr	Gly	Gly	Ala	Leu	Ser	Ala	Val	Gly	Arg	Glu	Leu	Leu	Phe
1				5					10					15	
Val	Thr	Asn	Pro	Val	Val	Val	Asn	Gly	Ser	Val	Leu	Val	Pro	Glu	Asp
			20					25					30		
Gln	Cys	Tyr	Cys	Ala	Gly	Trp	Ile	Glu	Ser	Arg	Gly	Thr	Asn	Gly	Ala
		35					40					45			
Gln	Thr	Ala	Ser	Asn	Val	Leu	Gln	Trp	Leu	Ala	Ala	Gly	Phe	Ser	Ile
	50					55						60			
Leu	Leu	Leu	Met	Phe	Tyr	Ala	Tyr	Gln	Thr	Trp	Lys	Ser	Thr	Cys	Gly
65					70					75					80
Trp	Glu	Glu	Ile	Tyr	Val	Cys	Ala	Ile	Glu	Met	Val	Lys	Val	Ile	Leu
				85					90					95	
Glu	Phe	Phe	Phe	Glu	Phe	Lys	Asn	Pro	Ser	Met	Leu	Tyr	Leu	Ala	Thr
			100					105					110		
Gly	His	Arg	Val	Gln	Trp	Leu	Arg	Tyr	Ala	Glu	Trp	Leu	Leu	Thr	Cys
		115					120					125			

ES 2 628 006 T3

Pro Val Ile Leu Ile His Leu Ser Asn Leu Thr Gly Leu Ser Asn Asp
 130 135 140

Tyr Ser Arg Arg Thr Met Gly Leu Leu Val Ser Asp Ile Gly Thr Ile
 145 150 155 160

Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Ala Thr Gly Tyr Val Lys Val Ile
 165 170 175

Phe Phe Cys Leu Gly Leu Cys Tyr Gly Ala Asn Thr Phe Phe His Ala
 180 185 190

Ala Lys Ala Tyr Ile Glu Gly Tyr His Thr Val Pro Lys Gly Arg Cys
 195 200 205

Arg Gln Val Val Thr Gly Met Ala Trp Leu Phe Phe Val Ser Trp Gly
 210 215 220

Met Phe Pro Ile Leu Phe Ile Leu Gly Pro Glu Gly Phe Gly Val Leu
 225 230 235 240

Ser Val Tyr Gly Ser Thr Val Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Met Ser
 245 250 255

Lys Asn Cys Trp Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His
 260 265 270

Glu His Ile Leu Ile His Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Lys Leu Asn
 275 280 285

Ile Gly Gly Thr Glu Ile Glu Val Glu Thr Leu Val Glu Asp Glu Ala
 290 295 300

Glu Ala Gly Ala Val Pro
 305 310

<210> 6
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 6

Met Asp Tyr Gly Gly Ala Leu Ser Ala Val Gly Arg Glu Leu Leu Phe
 1 5 10 15

5
 10

ES 2 628 006 T3

Val Thr Asn Pro Val Val Val Asn Gly Ser Val Leu Val Pro Glu Asp
 20 25 30
 Gln Cys Tyr Cys Ala Gly Trp Ile Glu Ser Arg Gly Thr Asn Gly Ala
 35 40 45
 Gln Thr Ala Ser Asn Val Leu Gln Trp Leu Ala Ala Gly Phe Ser Ile
 50 55 60
 Leu Leu Leu Met Phe Tyr Ala Tyr Gln Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly
 65 70 75 80
 Trp Glu Glu Ile Tyr Val Cys Ala Ile Glu Met Val Lys Val Ile Leu
 85 90 95
 Glu Phe Phe Phe Glu Phe Lys Asn Pro Ser Met Leu Tyr Leu Ala Thr
 100 105 110
 Gly His Arg Val Gln Trp Leu Arg Tyr Ala Glu Trp Leu Leu Thr Ser
 115 120 125
 Pro Val Ile Leu Ile His Leu Ser Asn Leu Thr Gly Leu Ser Asn Asp
 130 135 140
 Tyr Ser Arg Arg Thr Met Gly Leu Leu Val Ser Asp Ile Gly Thr Ile
 145 150 155 160
 Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Ala Thr Gly Tyr Val Lys Val Ile
 165 170 175
 Phe Phe Cys Leu Gly Leu Cys Tyr Gly Ala Asn Thr Phe Phe His Ala
 180 185 190
 Ala Lys Ala Tyr Ile Glu Gly Tyr His Thr Val Pro Lys Gly Arg Cys
 195 200 205
 Arg Gln Val Val Thr Gly Met Ala Trp Leu Phe Phe Val Ser Trp Gly
 210 215 220
 Met Phe Pro Ile Leu Phe Ile Leu Gly Pro Glu Gly Phe Gly Val Leu
 225 230 235 240
 Ser Val Tyr Gly Ser Thr Val Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Met Ser
 245 250 255
 Lys Asn Cys Trp Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His
 260 265 270

ES 2 628 006 T3

Glu His Ile Leu Ile His Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Lys Leu Asn
 275 280 285

Ile Gly Gly Thr Glu Ile Glu Val Glu Thr Leu Val Glu Asp Glu Ala
 290 295 300

Glu Ala Gly Ala Val Pro
 305 310

<210> 7
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 7

Met Asp Tyr Gly Gly Ala Leu Ser Ala Val Gly Arg Glu Leu Leu Phe
 1 5 10 15

Val Thr Asn Pro Val Val Val Asn Gly Ser Val Leu Val Pro Glu Asp
 20 25 30

Gln Cys Tyr Cys Ala Gly Trp Ile Glu Ser Arg Gly Thr Asn Gly Ala
 35 40 45

Gln Thr Ala Ser Asn Val Leu Gln Trp Leu Ala Ala Gly Phe Ser Ile
 50 55 60

Leu Leu Leu Met Phe Tyr Ala Tyr Gln Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly
 65 70 75 80

Trp Glu Glu Ile Tyr Val Cys Ala Ile Glu Met Val Lys Val Ile Leu
 85 90 95

Glu Phe Phe Phe Glu Phe Lys Asn Pro Ser Met Leu Tyr Leu Ala Thr
 100 105 110

Gly His Arg Val Gln Trp Leu Arg Tyr Ala Glu Trp Leu Leu Thr Ser
 115 120 125

Pro Val Ile Leu Ile His Leu Ser Asn Leu Thr Gly Leu Ser Asn Asp
 130 135 140

Tyr Ser Arg Arg Thr Met Gly Leu Leu Val Ser Ala Ile Gly Thr Ile
 145 150 155 160

5

10

ES 2 628 006 T3

Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Ala Thr Gly Tyr Val Lys Val Ile
 165 170 175

Phe Phe Cys Leu Gly Leu Cys Tyr Gly Ala Asn Thr Phe Phe His Ala
 180 185 190

Ala Lys Ala Tyr Ile Glu Gly Tyr His Thr Val Pro Lys Gly Arg Cys
 195 200 205

Arg Gln Val Val Thr Gly Met Ala Trp Leu Phe Phe Val Ser Trp Gly
 210 215 220

Met Phe Pro Ile Leu Phe Ile Leu Gly Pro Glu Gly Phe Gly Val Leu
 225 230 235 240

Ser Val Tyr Gly Ser Thr Val Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Met Ser
 245 250 255

Lys Asn Cys Trp Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His
 260 265 270

Glu His Ile Leu Ile His Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Lys Leu Asn
 275 280 285

Ile Gly Gly Thr Glu Ile Glu Val Glu Thr Leu Val Glu Asp Glu Ala
 290 295 300

Glu Ala Gly Ala Val Pro
 305 310

- <210> 8
- <211> 344
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia de aminoácidos sintética
- <400> 8

ES 2 628 006 T3

Met Ser Arg Arg Pro Trp Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Val Ala Leu
1 5 10 15

Ala Ala Gly Ser Ala Gly Ala Ser Thr Gly Ser Asp Ala Thr Val Pro
20 25 30

Val Ala Thr Gln Asp Gly Pro Asp Tyr Val Phe His Arg Ala His Glu
35 40 45

Arg Met Leu Phe Gln Thr Ser Tyr Thr Leu Glu Asn Asn Gly Ser Val

ES 2 628 006 T3

Tyr Leu Arg Val Lys Ile His Glu His Ile Leu Leu Tyr Gly Asp Ile
305 310 315 320

Arg Lys Lys Gln Lys Ile Thr Ile Ala Gly Gln Glu Met Glu Val Glu
325 330 335

Thr Leu Val Ala Glu Glu Glu Asp
340

<210> 9

<211> 344

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 9

ES 2 628 006 T3

Met Ser Arg Arg Pro Trp Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Val Ala Leu
1 5 10 15

Ala Ala Gly Ser Ala Gly Ala Ser Thr Gly Ser Asp Ala Thr Val Pro
20 25 30

Val Ala Thr Gln Asp Gly Pro Asp Tyr Val Phe His Arg Ala His Glu
35 40 45

Arg Met Leu Phe Gln Thr Ser Tyr Thr Leu Glu Asn Asn Gly Ser Val
50 55 60

Ile Cys Ile Pro Asn Asn Gly Gln Cys Phe Cys Leu Ala Trp Leu Lys
65 70 75 80

Ser Asn Gly Thr Asn Ala Glu Lys Leu Ala Ala Asn Ile Leu Gln Trp
85 90

Ile Thr Phe Ala Leu Ser Ala Leu Cys Leu Met Phe Tyr Gly Tyr Gln
100 105 110

Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly Trp Glu Thr Ile Tyr Val Ala Thr Ile
115 120 125

Glu Met Ile Lys Phe Ile Ile Glu Tyr Phe His Glu Phe Asp Glu Pro
130 135 140

Ala Val Ile Tyr Ser Ser Asn Gly Asn Lys Thr Val Trp Leu Arg Tyr
145 150 155 160

Ala Glu Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Leu Leu Ile His Leu Ser Asn

ES 2 628 006 T3

				165					170					175			
Leu	Thr	Gly	Leu	Lys	Asp	Asp	Tyr	Ser	Lys	Arg	Thr	Met	Gly	Leu	Leu		
			180					185					190				
Val	Ser	Asp	Val	Gly	Cys	Ile	Val	Trp	Gly	Ala	Thr	Ser	Ala	Met	Cys		
		195					200					205					
Thr	Gly	Trp	Thr	Lys	Ile	Leu	Phe	Phe	Leu	Ile	Ser	Leu	Ser	Tyr	Gly		
	210					215					220						
Met	Tyr	Thr	Tyr	Phe	His	Ala	Ala	Lys	Val	Tyr	Ile	Glu	Ala	Phe	His		
225					230					235					240		
Thr	Val	Pro	Lys	Gly	Ile	Cys	Arg	Glu	Leu	Val	Arg	Val	Met	Ala	Trp		
				245					250					255			
Thr	Phe	Phe	Val	Ala	Trp	Gly	Met	Phe	Pro	Val	Leu	Phe	Leu	Leu	Gly		
			260					265					270				
Thr	Glu	Gly	Phe	Gly	His	Ile	Ser	Pro	Tyr	Gly	Ser	Ala	Ile	Gly	His		
		275					280					285					
Ser	Ile	Leu	Asp	Leu	Ile	Ala	Lys	Asn	Met	Trp	Gly	Val	Leu	Gly	Asn		
	290					295					300						
Tyr	Leu	Arg	Val	Lys	Ile	His	Glu	His	Ile	Leu	Leu	Tyr	Gly	Asp	Ile		
305					310					315					320		
Arg	Lys	Lys	Gln	Lys	Ile	Thr	Ile	Ala	Gly	Gln	Glu	Met	Glu	Val	Glu		
				325					330					335			
Thr	Leu	Val	Ala	Glu	Glu	Glu	Asp										
			340														

<210> 10
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 10

ES 2 628 006 T3

Met Ser Arg Arg Pro Trp Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Val Ala Leu
1 5 10 15

Ala Ala Gly Ser Ala Gly Ala Ser Thr Gly Ser Asp Ala Thr Val Pro
20 25 30

ES 2 628 006 T3

Val Ala Thr Gln Asp Gly Pro Asp Tyr Val Phe His Arg Ala His Glu
35 40 45

Arg Met Leu Phe Gln Thr Ser Tyr Thr Leu Glu Asn Asn Gly Ser Val
50 55 60

Ile Cys Ile Pro Asn Asn Gly Gln Cys Phe Cys Leu Ala Trp Leu Lys
65 70 75 80

Ser Asn Gly Thr Asn Ala Glu Lys Leu Ala Ala Asn Ile Leu Gln Trp
85 90 95

Ile Thr Phe Ala Leu Ser Ala Leu Cys Leu Met Phe Tyr Gly Tyr Gln
100 105 110

Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly Trp Glu Glu Ile Tyr Val Ala Thr Ile
115 120 125

Glu Met Ile Lys Phe Ile Ile Glu Tyr Phe His Glu Phe Asp Glu Pro
130 135 140

Ala Val Ile Tyr Ser Ser Asn Gly Asn Lys Thr Val Trp Leu Arg Tyr
145 150 155 160

Ala Thr Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Leu Leu Ile His Leu Ser Asn
165 170 175

Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Ser Lys Arg Thr Met Gly Leu Leu
180 185 190

Val Ser Asp Val Gly Cys Ile Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Cys
195 200 205

Thr Gly Trp Thr Lys Ile Leu Phe Phe Leu Ile Ser Leu Ser Tyr Gly
210 215 220

Met Tyr Thr Tyr Phe His Ala Ala Lys Val Tyr Ile Glu Ala Phe His
225 230 235 240

Thr Val Pro Lys Gly Ile Cys Arg Glu Leu Val Arg Val Met Ala Trp
245 250 255

Thr Phe Phe Val Ala Trp Gly Met Phe Pro Val Leu Phe Leu Leu Gly
260 265 270

Thr Glu Gly Phe Gly His Ile Ser Pro Tyr Gly Ser Ala Ile Gly His

ES 2 628 006 T3

275	280	285													
Ser	Ile	Leu	Asp	Leu	Ile	Ala	Lys	Asn	Met	Trp	Gly	Val	Leu	Gly	Asn
290						295					300				
Tyr	Leu	Arg	Val	Lys	Ile	His	Glu	His	Ile	Leu	Leu	Tyr	Gly	Asp	Ile
305					310					315					320
Arg	Lys	Lys	Gln	Lys	Ile	Thr	Ile	Ala	Gly	Gln	Glu	Met	Glu	Val	Glu
				325					330						335
Thr	Leu	Val	Ala	Glu	Glu	Glu	Asp								
			340												

- <210> 11
- <211> 344
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia de aminoácidos sintética
- <400> 11

ES 2 628 006 T3

Met Ser Arg Arg Pro Trp Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Val Ala Leu
1 5 10 15

Ala Ala Gly Ser Ala Gly Ala Ser Thr Gly Ser Asp Ala Thr Val Pro
20 25 30

Val Ala Thr Gln Asp Gly Pro Asp Tyr Val Phe His Arg Ala His Glu
35 40 45

Arg Met Leu Phe Gln Thr Ser Tyr Thr Leu Glu Asn Asn Gly Ser Val
50 55 60

Ile Cys Ile Pro Asn Asn Gly Gln Cys Phe Cys Leu Ala Trp Leu Lys
65 70 75 80

Ser Asn Gly Thr Asn Ala Glu Lys Leu Ala Ala Asn Ile Leu Gln Trp
85 90 95

Ile Thr Phe Ala Leu Ser Ala Leu Cys Leu Met Phe Tyr Gly Tyr Gln
100 105 110

Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly Trp Glu Thr Ile Tyr Val Ala Thr Ile
115 120 125

Glu Met Ile Lys Phe Ile Ile Glu Tyr Phe His Glu Phe Asp Glu Pro
130 135 140

ES 2 628 006 T3

Ala Val Ile Tyr Ser Ser Asn Gly Asn Lys Thr Val Trp Leu Arg Tyr
145 150 155 160

Ala Thr Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Leu Leu Ile His Leu Ser Asn
165 170 175

Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Ser Lys Arg Thr Met Gly Leu Leu
180 185 190

Val Ser Asp Val Gly Cys Ile Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Cys
195 200 205

Thr Gly Trp Thr Lys Ile Leu Phe Phe Leu Ile Ser Leu Ser Tyr Gly
210 215 220

Met Tyr Thr Tyr Phe His Ala Ala Lys Val Tyr Ile Glu Ala Phe His
225 230 235 240

Thr Val Pro Lys Gly Ile Cys Arg Glu Leu Val Arg Val Met Ala Trp
245 250 255

Thr Phe Phe Val Ala Trp Gly Met Phe Pro Val Leu Phe Leu Leu Gly
260 265 270

Thr Glu Gly Phe Gly His Ile Ser Pro Tyr Gly Ser Ala Ile Gly His
275 280 285

Ser Ile Leu Asp Leu Ile Ala Lys Asn Met Trp Gly Val Leu Gly Asn
290 295 300

Tyr Leu Arg Val Lys Ile His Glu His Ile Leu Leu Tyr Gly Asp Ile
305 310 315 320

Arg Lys Lys Gln Lys Ile Thr Ile Ala Gly Gln Glu Met Glu Val Glu
325 330 335

Thr Leu Val Ala Glu Glu Glu Asp
340

<210> 12
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos sintética

10

<400> 12

ES 2 628 006 T3

Lys Ser Arg Ile Thr Ser Glu Gly Glu Tyr Ile Pro Leu Asp Gln Ile
1 5 10 15

Asp Ile Asn Val
20

5 <210> 13
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética
 <400> 13

Met Asp Tyr Gly Gly Ala Leu Ser Ala Val Gly Arg Glu Leu Leu Phe
1 5 10 15

Val Thr Asn Pro Val Val Val Asn Gly Ser
20 25

15 <210> 14
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética
 <400> 14

Met Ala Gly His Ser Asn Ser Met Ala Leu Phe Ser Phe Ser Leu Leu
1 5 10 15

Trp Leu Cys Ser Gly Val Leu Gly Thr Glu Phe
20 25

25 <210> 15
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética
 <400> 15

Met Gly Leu Arg Ala Leu Met Leu Trp Leu Leu Ala Ala Ala Gly Leu
1 5 10 15

Val Arg Glu Ser Leu Gln Gly
20

40 <210> 16
 <211> 18
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

5

<400> 16

Met Arg Gly Thr Pro Leu Leu Leu Val Val Ser Leu Phe Ser Leu Leu
1 5 10 15

Gln Asp

10

<210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 17

Val Lys Glu Ser Leu
1 5

20

<210> 18
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

30

<400> 18

Val Leu Gly Ser Leu
1 5

35

<210> 19
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 19

Asn Ala Asn Ser Phe Cys Tyr Glu Asn Glu Val Ala Leu Thr Ser Lys
1 5 10 15

45

<210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

55

<220>
 <221> misc_feature

ES 2 628 006 T3

<222> (2)..(2)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 20

5

Phe Xaa Tyr Glu Asn Glu
1 5

<210> 21

<211> 7

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

15

<400> 21

Phe Cys Tyr Glu Asn Glu Val
1 5

20

<210> 22

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

<400> 22

Met Thr Glu Thr Leu Pro Pro Val Thr Glu Ser Ala Val Ala Leu Gln
1 5 10 15

30

Ala Glu

<210> 23

<211> 258

35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintética

40

<400> 23

Met Asp Pro Ile Ala Leu Gln Ala Gly Tyr Asp Leu Leu Gly Asp Gly
1 5 10 15

ES 2 628 006 T3

Arg Pro Glu Thr Leu Trp Leu Gly Ile Gly Thr Leu Leu Met Leu Ile
 20 25 30
 Gly Thr Phe Tyr Phe Leu Val Arg Gly Trp Gly Val Thr Asp Lys Asp
 35 40 45
 Ala Arg Glu Tyr Tyr Ala Val Thr Ile Leu Val Pro Gly Ile Ala Ser
 50 55 60
 Ala Ala Tyr Leu Ser Met Phe Phe Gly Ile Gly Leu Thr Glu Val Thr
 65 70 75 80
 Val Gly Gly Glu Met Leu Asp Ile Tyr Tyr Ala Arg Tyr Ala Asp Trp
 85 90 95
 Leu Phe Thr Thr Pro Leu Leu Leu Leu Asp Leu Ala Leu Leu Ala Lys
 100 105 110
 Val Asp Arg Val Thr Ile Gly Thr Leu Val Gly Val Asp Ala Leu Met
 115 120 125
 Ile Val Thr Gly Leu Ile Gly Ala Leu Ser His Thr Ala Ile Ala Arg
 130 135 140
 Tyr Ser Trp Trp Leu Phe Ser Thr Ile Cys Met Ile Val Val Leu Tyr
 145 150 155 160
 Phe Leu Ala Thr Ser Leu Arg Ser Ala Ala Lys Glu Arg Gly Pro Glu
 165 170 175
 Val Ala Ser Thr Phe Asn Thr Leu Thr Ala Leu Val Leu Val Leu Trp
 180 185 190
 Thr Ala Tyr Pro Ile Leu Trp Ile Ile Gly Thr Glu Gly Ala Gly Val
 195 200 205
 Val Gly Leu Gly Ile Glu Thr Leu Leu Phe Met Val Leu Asp Val Thr
 210 215 220
 Ala Lys Val Gly Phe Gly Phe Ile Leu Leu Arg Ser Arg Ala Ile Leu
 225 230 235 240
 Gly Asp Thr Glu Ala Pro Glu Pro Ser Ala Gly Ala Asp Val Ser Ala
 245 250 255
 Ala Asp

ES 2 628 006 T3

<210> 24
 <211> 534
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

10

<400> 24

```

Met  Asp  Pro  Ile  Ala  Leu  Gln  Ala  Gly  Tyr  Asp  Leu  Leu  Gly  Asp  Gly
 1          5          10          15

Arg  Pro  Glu  Thr  Leu  Trp  Leu  Gly  Ile  Gly  Thr  Leu  Leu  Met  Leu  Ile
          20          25          30

Gly  Thr  Phe  Tyr  Phe  Leu  Val  Arg  Gly  Trp  Gly  Val  Thr  Asp  Lys  Asp
          35          40          45

Ala  Arg  Glu  Tyr  Tyr  Ala  Val  Thr  Ile  Leu  Val  Pro  Gly  Ile  Ala  Ser
 50          55          60

Ala  Ala  Tyr  Leu  Ser  Met  Phe  Phe  Gly  Ile  Gly  Leu  Thr  Glu  Val  Thr
 65          70          75          80

Val  Gly  Gly  Glu  Met  Leu  Asp  Ile  Tyr  Tyr  Ala  Arg  Tyr  Ala  Asp  Trp
          85          90          95

Leu  Phe  Thr  Thr  Pro  Leu  Leu  Leu  Leu  Asp  Leu  Ala  Leu  Leu  Ala  Lys
          100          105          110

Val  Asp  Arg  Val  Thr  Ile  Gly  Thr  Leu  Val  Gly  Val  Asp  Ala  Leu  Met
          115          120          125

Ile  Val  Thr  Gly  Leu  Ile  Gly  Ala  Leu  Ser  His  Thr  Ala  Ile  Ala  Arg
 130          135          140

Tyr  Ser  Trp  Trp  Leu  Phe  Ser  Thr  Ile  Cys  Met  Ile  Val  Val  Leu  Tyr
 145          150          155          160

Phe  Leu  Ala  Thr  Ser  Leu  Arg  Ser  Ala  Ala  Lys  Glu  Arg  Gly  Pro  Glu
          165          170          175

Val  Ala  Ser  Thr  Phe  Asn  Thr  Leu  Thr  Ala  Leu  Val  Leu  Val  Leu  Trp
          180          185          190

Thr  Ala  Tyr  Pro  Ile  Leu  Trp  Ile  Ile  Gly  Thr  Glu  Gly  Ala  Gly  Val
 195          200          205
    
```

ES 2 628 006 T3

Val Gly Leu Gly Ile Glu Thr Leu Leu Phe Met Val Leu Asp Val Thr
 210 215 220

Ala Lys Val Gly Phe Gly Phe Ile Leu Leu Arg Ser Arg Ala Ile Leu
 225 230 235 240

Gly Asp Thr Glu Ala Pro Glu Pro Ser Ala Gly Ala Asp Val Ser Ala
 245 250 255

Ala Asp Arg Pro Val Val Ala Val Ser Lys Ala Ala Ala Lys Ser Arg
 260 265 270

Ile Thr Ser Glu Gly Glu Tyr Ile Pro Leu Asp Gln Ile Asp Ile Asn
 275 280 285

Val Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 290 295 300

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 305 310 315 320

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 325 330 335

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 340 345 350

Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 355 360 365

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 370 375 380

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 385 390 395 400

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 405 410 415

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 420 425 430

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 435 440 445

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 450 455 460

ES 2 628 006 T3

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
465 470 475 480

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu
485 490 495

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
500 505 510

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Phe
515 520 525

Cys Tyr Glu Asn Glu Val
530

REIVINDICACIONES

1. Un primer polinucleótido para su uso en un método para el tratamiento de la hiperreflexia del detrusor y/o la disinergia detrusor-esfínter externo en un individuo que lo necesita,
 5 en donde dicho primer polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz que comprende: i) una secuencia al menos un 95 % idéntica a la secuencia mostrada en las SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:23; ii) una señal de exportación del RE y iii) una señal de tráfico de membrana, y en donde el método comprende:
- 10 administrar al individuo una cantidad eficaz de dicho primer polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una primera proteína opsina sensible a la luz, en donde la proteína opsina se expresa en la membrana plasmática de una población de neuronas responsables de la inervación del músculo detrusor y/o una población de neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter urinario externo en el individuo,
 15 en donde dicha primera proteína opsina induce la hiperpolarización de las neuronas que expresan la proteína opsina en respuesta a la luz, de modo que la hiperpolarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo detrusor permite el almacenamiento de orina en la vejiga y la hiperpolarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter urinario externo permite la evacuación de la orina de la vejiga.
2. El polinucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método comprende además:
- 20 administrar al individuo una cantidad eficaz de un segundo polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una segunda proteína opsina sensible a la luz, en donde la proteína opsina se expresa en la membrana plasmática de una población de neuronas responsables de la inervación del músculo detrusor y/o una población de neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter urinario externo en el individuo,
 25 en donde dicha segunda proteína opsina induce la despolarización de las neuronas, de modo que la despolarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo detrusor permite la evacuación de la orina de la vejiga y la despolarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter urinario externo permite el almacenamiento de la orina de la vejiga,
 30 en donde dicho segundo polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz que comprende una secuencia al menos un 95 % idéntica a la secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11.
3. Un polinucleótido para su uso en un método para el tratamiento de la hiperreflexia del detrusor y/o la disinergia del detrusor-esfínter externo en un individuo que lo necesita,
 35 en donde dicho polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz que comprende una secuencia al menos un 95 % idéntica a la secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11
 40 y en donde el método comprende:
- 45 administrar al individuo una cantidad eficaz de dicho polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína opsina sensible a la luz, en donde la proteína opsina se expresa en la membrana plasmática de una población de neuronas responsables de la inervación del músculo detrusor y/o una población de neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter urinario externo en el individuo,
 en donde dicha proteína opsina es capaz de inducir la despolarización o la depleción sináptica inducida por la despolarización de las neuronas que expresan la proteína opsina en respuesta a la luz, de modo que la despolarización o la depleción sináptica inducida por la despolarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo detrusor permite la evacuación de la orina de la vejiga o el almacenamiento de orina en la vejiga respectivamente y la despolarización o la depleción sináptica inducida por la despolarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter urinario externo permite el almacenamiento de la orina en la vejiga o la evacuación de la orina de la vejiga respectivamente.
4. El polinucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la población de neuronas responsables de la inervación del músculo esfínter urinario externo comprende neuronas del nervio pudendo en el individuo.
5. El polinucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde una fuente de luz capaz de generar luz en respuesta a una señal externa está colocada alrededor de las inervaciones del detrusor
 60 que tienen su origen en los nervios raquídeos sacros y/o alrededor de las inervaciones del esfínter urinario externo del nervio pudendo, en donde la luz es capaz de activar la proteína opsina sensible a la luz expresada en la membrana plasmática de las neuronas.
6. El polinucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el individuo controla externamente el estado de polarización de las neuronas responsables de la inervación del músculo detrusor y/o las neuronas responsables de la inervación del esfínter urinario externo activando la fuente de luz que rodea el nervio raquídeo
 65

sacro y/o el nervio pudiendo.

5 7. El polinucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el polinucleótido se administra mediante inyección del polinucleótido en el cuerpo celular de una neurona motora somática de uno o más nervios raquídeos sacros, en el nervio pudiendo o en el núcleo de Onuf.

10 8. El polinucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el polinucleótido es un vector, opcionalmente en donde dicho vector es un vector viral seleccionado del grupo que consiste en un vector AAV, tal como un vector AAV1, AAV2, AAV6 o AAV9, un vector retroviral, un vector adenoviral, un vector HSV y un vector lentiviral.

15 9. El polinucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la expresión de la proteína opsina sensible a la luz es controlada por un promotor seleccionado del grupo que consiste en un promotor EF1 α , un promotor CMV, un promotor CAG, un promotor de sinapsina, un promotor Thy1 y un promotor CAMKII.

Figura 1

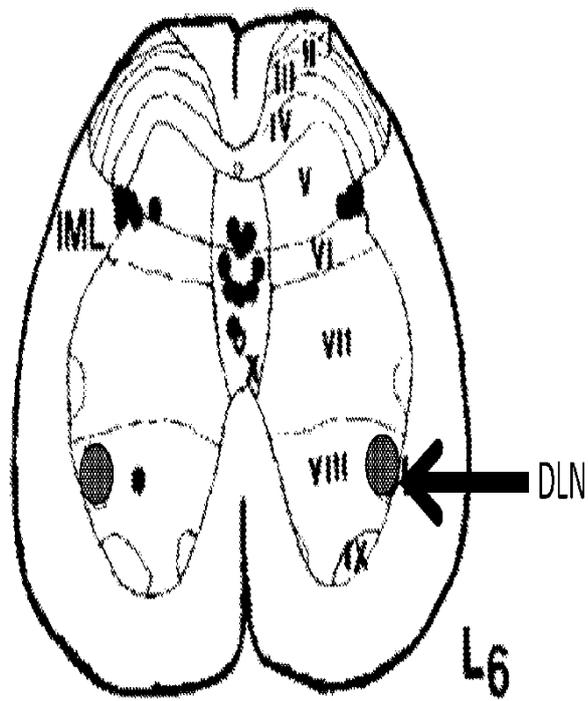


Figura 2

Números de neuronas motoras pudendas del EUE: medido frente a descrito

Comparación de serotipos con un título de $1e^{12}$ partículas

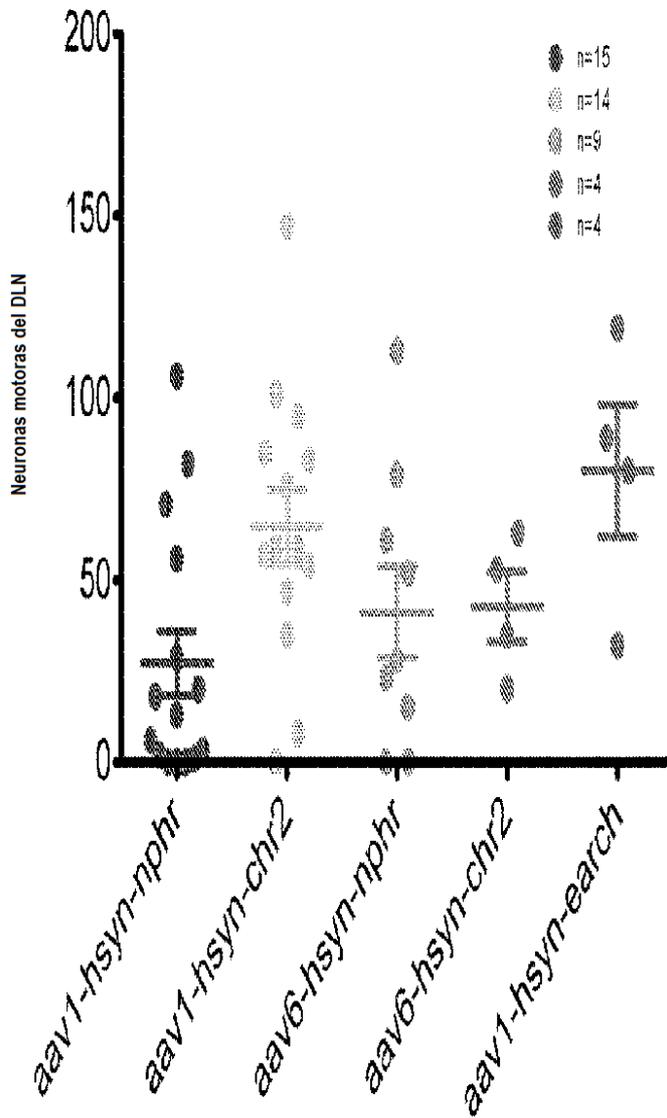


TABLA 1. Recuento de neuronas motoras pudendas por marcado retrógrado

Localización	Media	±DE	Rango	N
Dorsolateral*	60.8	10.6	45.0-71.4	8
DL izquierdo	58.0	13.0	33.7-71.5	9
DL derecho	63.1	11.0	44.1-72.8	9
Dorsomedial	51.7	8.4	18.5-53.4	9
DM izquierdo	31.3	9.1	17.2-43.0	9
DM derecho	32.1	8.8	14.4-44.6	9
Otro*	5.8	12.1	0.0-37.3	8
Otro izquierdo	1.8	2.9	0.0- 8.7	9
Otro derecho	9.9	24.7	0.0-75.5	9
Breedlove y Arnold, 1980*				
DM	46.9	11.1		8
McKenna y Nadelhaft, 1986*				
DL	57.0	6.6		5
DM	33.5	0.5		3
Oeyama et al., 1987*				
DL	62.7	6.7	52.0-71.0	6
DM	43.6	8.9	28.0-53.0	6
Kerns et al., 2007*				
DL	56.4	23.5		7

*La media se ajustó con el factor de corrección de Abercrombie.

Kane et al., 2002

Figura 3 Estimulación óptica del nervio pudendo que expresa ChR2

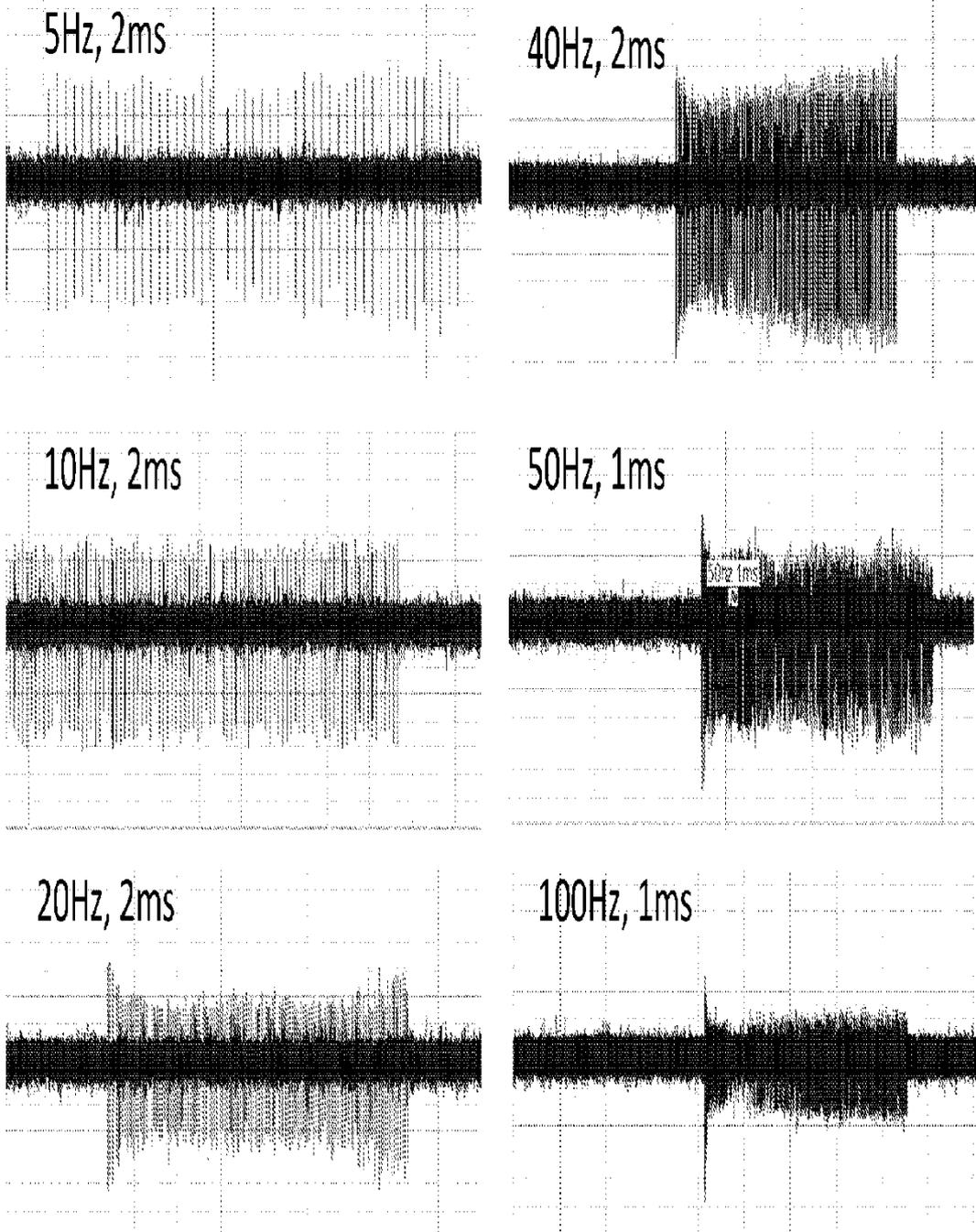


Figura 4

El Problema:

Paciente con antecedentes de traumatismo o enfermedad neurodegenerativa que tiene vejiga paralizada

