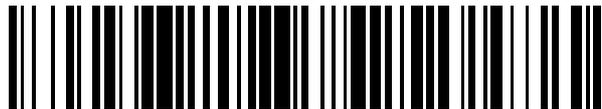


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 114**

51 Int. Cl.:

**A61N 5/06** (2006.01)  
**C12N 13/00** (2006.01)  
**C07K 14/405** (2006.01)  
**G01N 33/487** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61K 41/00** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2012 PCT/US2012/064665**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013 WO13071231**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2012 E 12808926 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2776455**

54 Título: **Canalrodopsinas para el control óptico de células**

30 Prioridad:

**12.11.2011 US 201161559076 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.03.2018**

73 Titular/es:

**MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY (50.0%)**  
**77 Massachusetts Avenue**  
**Cambridge, MA 02139, US y**  
**THE GOVERNORS OF THE UNIVERSITY OF ALBERTA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KLAPOETKE, NATHAN;**  
**CHOW, BRIAN, YICHIUN;**  
**BOYDEN, EDWARD;**  
**WONG, GANE, KA-SHU y**  
**CHO, YONGKU PETER**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 660 114 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

Canalrodopsinas para el control óptico de células

5 Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno con las subvenciones NIH 1DP2OD002002, NIH 1RC1MH088182, NIH 1R01NS067199, NIH 1R01DA029639 y NIH 1R01NS075421 de los Institutos Nacionales de Salud; NSF DMS 0848804, premio CAREER de la NSF CBET 1053233 y NSF EFRI 0835878 de la Fundación Nacional para la Ciencia; Early Career Translational Research Award de Living Foundries de DARPA, Wallace H. Coulter Foundation Department of Defense MRMC/CDMRP, Post-Traumatic Stress Disorder Concept Award Human Frontiers Science Program. El gobierno de Estados Unidos tiene determinados derechos sobre la invención.

**Campo de la invención**

15 La invención, en algunos aspectos, se refiere a composiciones y métodos para alterar la conductancia a través de las membranas, y también se refiere al uso de canales iónicos activados por luz exógenos en células y sujetos.

**Antecedentes de la invención**

20 Alterar y controlar la permeabilidad iónica de la región subcelular y la membrana celular ha permitido el examen de las características de células, tejidos y organismos. Se han usado bombas y canales accionados por luz para silenciar o potenciar la actividad celular y se ha propuesto su uso para la selección de fármacos, aplicaciones terapéuticas y para explorar la función celular y subcelular.

25 Se han desarrollado métodos genéticos-moleculares para preparar células que pueden activarse (por ejemplo, despolarizarse) o inactivarse (por ejemplo, hiperpolarizarse) mediante longitudes de onda de luz específicas (véase, por ejemplo, Han, X. y E. S. Boyden, 2007, PLoS ONE 2, e299). Se ha identificado que el canal catiónico activado por luz, canalrodopsina-2 (ChR2), y la bomba de cloruro activada por luz, halorodopsina (Halo/NpHR), cuando se expresan transgénicamente en células tales como neuronas, las hace sensibles a activarse mediante luz azul y silenciarse mediante luz amarilla, respectivamente (Han, X. y E. S. Boyden, 2007, PLoS ONE 2(3): e299; Boyden, E. S., *et. al.*, 2005, Nat Neurosci. Septiembre de 2005; 8(9):1263-8. Epub 14 de agosto de 2005.). Las bombas y los canales activados por luz identificados previamente, se han limitado a activación por longitudes de onda de luz particulares, limitando así su utilidad.

**Sumario de la invención**

35 La invención proporciona un polipéptido de canal iónico activado por luz aislado, que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de canal de *Chlamydomonas noctigama* activado por luz de tipo natural o modificado, tal como se define en la reivindicación 1. La invención también proporciona un ácido nucleico que codifica para el polipéptido, tal como se define en la reivindicación 5, y un vector que comprende el ácido nucleico, tal como se define en la reivindicación 7. La invención proporciona además el polipéptido para su uso en un método de tratamiento médico de un sujeto, tal como se define en la reivindicación 9, y el polipéptido, ácido nucleico o vector para su uso en un método de tratamiento de un trastorno en un sujeto, tal como se define en la reivindicación 11. La invención también proporciona un método de alteración de la conductividad iónica de una membrana, en el que el método se lleva a cabo *in vitro*, tal como se define en la reivindicación 15.

45 Por tanto, la invención se refiere, en parte, a polipéptidos de canales iónicos activados por luz aislados y a métodos para su uso. La invención también incluye secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican para los canales iónicos accionados por luz de la invención así como vectores y constructos que comprenden tales secuencias de ácido nucleico. Además, la invención en algunos aspectos utiliza la expresión de polipéptidos de canales iónicos activados por luz en células, así como proporciona métodos para usar los canales iónicos activados por luz para alterar la conductancia a través de las membranas, y para su uso en el tratamiento de trastornos.

50 Tal como se indicó anteriormente, la invención reivindicada incluye un ácido nucleico que codifica para el polipéptido de canal iónico activado por luz aislado de la invención. Al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica para un canal iónico accionado por luz puede incorporarse en al menos una célula, región subcelular o región extracelular diana, funcionando el canal iónico para cambiar el paso transmembrana de iones en respuesta a una longitud de onda de luz específica. Exponer una célula excitable que incluye un canal iónico accionado por luz expresado de la invención a una longitud de onda de luz que activa el canal, puede dar como resultado despolarización de la célula excitable. Al poner en contacto una célula que incluye un canal iónico activado por luz de la invención con longitudes de onda de luz particulares, la célula se despolariza. Puede usarse una pluralidad de canales iónicos activados por luz activados por diferentes longitudes de onda de luz en pluralidades solapantes o no solapantes de células para lograr despolarización multicolor.

65 Los canales de la invención pueden expresarse genéticamente en células específicas (por ejemplo, usando un virus u otros medios de administración) y usarse luego para controlar células en organismos intactos (incluyendo seres humanos) así como células *in vitro*, en respuesta a pulsos de luz. Dado que estos canales tienen espectros de

activación diferentes entre sí y diferentes del estado de la técnica (por ejemplo, ChR2/VChR1), también permiten que se usen múltiples colores de luz para despolarizar diferentes conjuntos de células en el mismo tejido, expresando canales con diferentes espectros de activación genéticamente en diferentes células, e iluminando después el tejido con diferentes colores de luz.

5 Las canalrodopsinas eucariotas incluyen rodopsina de *Chloromonas subdivisa* (también denominada en el presente documento: "ChR87"), de *Chlamydomonas noctigama* (también denominada en el presente documento: "Chrimson" o "Chr88") y de *Stigeoclonium helveticum* (también denominada en el presente documento: "Chronos" o "ChR90"), y derivados de las mismas. La presente invención reivindicada usa *Chlamydomonas noctigama*. Estas canalrodopsinas, o derivados de las mismas, pueden usarse para despolarizar células excitables. Estas canalrodopsinas, o derivados de las mismas, también pueden usarse para modificar el pH de las células, o para introducir cationes como transmisores químicos.

15 La capacidad de perturbar, modificar o controlar ópticamente la función celular ofrece muchas ventajas respecto a mecanismos de manipulación física, tales como velocidad, no invasividad, y la capacidad de abarcar fácilmente amplias escalas espaciales desde la nanoescala hasta la macroescala. Un enfoque de este tipo es un enfoque optogenético, en el que se usan polipéptidos de membrana activados por luz expresados de manera heteróloga, tales como un canal iónico activado por luz de la invención, para mover iones con diversos espectros de luz.

20 Tal como se indicó anteriormente, según un aspecto de la invención, se proporcionan métodos de alteración de la conductividad iónica de una membrana, tal como se define en la reivindicación 15. Los métodos incluyen a) expresar en una membrana un polipéptido de canal iónico activado por luz según la invención y b) poner en contacto el polipéptido de canal iónico activado por luz con una luz que activa el canal iónico activado por luz y altera la conductividad iónica de la membrana, en el que el método se lleva a cabo *in vitro*. En algunas realizaciones, la luz de activación tiene una longitud de onda de entre 365 nm y 700 nm. En determinadas realizaciones, la luz de activación tiene una longitud de onda de desde 530 nm hasta 640 nm, y opcionalmente, la luz de activación tiene una longitud de onda de 590 nm. En algunas realizaciones, poner en contacto el polipéptido de canal iónico activado por luz con una luz que tiene una longitud de onda mayor de 720 nm no activa el canal iónico. En algunas realizaciones, la membrana no es una membrana en la que se produce el canal iónico activado por luz de manera natural. En algunas realizaciones, el canal iónico activado por luz es un canal iónico aislado. En algunas realizaciones, la membrana está en la célula. En algunas realizaciones, la célula es una célula neuronal y el método comprende además poner en contacto el polipéptido de canal iónico con una luz que tiene una longitud de onda de hasta 660 nm en condiciones adecuadas para producir un disparo en la célula neuronal. En determinadas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido de canal iónico activado por luz comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta como SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de canal iónico activado por luz comprende SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de canal iónico activado por luz comprende una secuencia modificada de canal iónico de *Chlamydomonas noctigama* activado por luz que tiene una identidad de al menos el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95% o el 99% con respecto a los aminoácidos 86-320 de SEQ ID NO: 2 y una identidad del 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a los aminoácidos restantes en la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 2. En determinadas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de canal iónico activado por luz comprende SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de canal iónico activado por luz comprende una secuencia modificada de canal iónico de *Chlamydomonas noctigama* activado por luz que tiene una identidad de al menos el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95% o el 99% con respecto a los aminoácidos 86-320 de SEQ ID NO: 5 y una identidad del 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a los aminoácidos restantes en la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 5.

50 En determinadas realizaciones, la membrana es una membrana celular. En algunas realizaciones, la célula es una célula humana. En algunas realizaciones, la membrana es una membrana celular de una célula neuronal, una célula del sistema nervioso, una célula cardíaca, una célula del sistema circulatorio, una célula del sistema visual o una célula del sistema auditivo. En determinadas realizaciones, alterar la conductividad iónica de la membrana despolariza la célula.

55 Tal como se indicó anteriormente, según otro aspecto de la invención, se proporciona un polipéptido de canal iónico activado por luz aislado, tal como se define en la reivindicación 1. El polipéptido de canal iónico activado por luz incluye una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de canal de *Chlamydomonas noctigama* activado por luz de tipo natural o modificado. En algunas realizaciones, el polipéptido de canal iónico activado por luz comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de *Chlamydomonas noctigama* activado por luz de tipo natural o modificado y activar el canal iónico comprende poner en contacto el polipéptido de canal iónico con una luz que tiene una longitud de onda de entre 365 nm y 700 nm. En algunas realizaciones, activar el canal iónico comprende poner en contacto el polipéptido de canal iónico con una luz que tiene una longitud de onda de desde 530 nm hasta 640 nm, y que tiene opcionalmente una longitud de onda de 590 nm. En algunas realizaciones, poner en contacto el polipéptido de canal iónico con una luz que tiene una longitud de onda mayor de 720 nm no activa el canal iónico. En determinadas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido de canal iónico activado por luz comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta como SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de canal iónico activado por luz comprende SEQ ID NO: 2. En algunas

realizaciones, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de canal iónico activado por luz comprende una secuencia modificada de canal iónico de *Chlamydomonas noctigama* activado por luz que tiene una identidad de al menos el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95% o el 99% con respecto a los aminoácidos 86-320 de SEQ ID NO: 2 y una identidad del 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a los aminoácidos restantes en la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de canal iónico activado por luz comprende SEQ ID NO: 5. En determinadas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de canal iónico activado por luz comprende una secuencia modificada de canal iónico de *Chlamydomonas noctigama* activado por luz que tiene una identidad de al menos el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95% o el 99% con respecto a los aminoácidos 86-320 de SEQ ID NO: 5 y una identidad del 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a los aminoácidos restantes en la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, el polipéptido de canal iónico activado por luz se expresa en una membrana. En determinadas realizaciones, la membrana es una membrana celular de mamífero. En algunas realizaciones, la célula es una célula excitable. En algunas realizaciones, la célula está en un sujeto. En algunas realizaciones, la membrana es una membrana celular de una célula neuronal, una célula del sistema nervioso, una célula cardíaca, una célula del sistema circulatorio, una célula del sistema visual o una célula del sistema auditivo. En determinadas realizaciones, alterar la conductividad iónica de la membrana despolariza la célula.

Tal como se indicó anteriormente, según otro aspecto de la invención, se proporciona un vector que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica para cualquiera de los polipéptidos de canales iónicos activados por luz mencionados anteriormente, tal como se define en la reivindicación 7.

Según un aspecto que se describe, pero no se reivindica, se proporciona una célula que incluye cualquiera de los polipéptidos de canales iónicos activados por luz mencionados anteriormente y la célula no es una célula en la que se produce el polipéptido de canal iónico activado por luz de manera natural. En algunas realizaciones, la célula es una célula de mamífero y en determinadas realizaciones la célula es una célula humana.

Según un aspecto que se describe, pero no se reivindica, se proporcionan métodos de evaluación del efecto de un compuesto candidato sobre la conductividad iónica de una membrana. Los métodos incluyen (a) poner en contacto una membrana de prueba que comprende el polipéptido de canal iónico activado por luz aislado de una cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente con luz en condiciones adecuadas para alterar la conductividad iónica de la membrana; (b) poner en contacto la membrana de prueba con un compuesto candidato; y (c) identificar la presencia o ausencia de un cambio en la conductividad iónica de la membrana puesta en contacto con la luz y el compuesto candidato en comparación con la conductividad iónica en una célula de control puesta en contacto con la luz y no puesta en contacto con el compuesto candidato; en el que un cambio en la conductividad iónica en la membrana de prueba en comparación con el control indica un efecto del compuesto candidato sobre la conductividad iónica de la membrana de prueba. En algunas realizaciones, la membrana está en una célula. En determinadas realizaciones, alterar la conductividad iónica de la membrana despolariza la célula. En algunas realizaciones, un cambio es un aumento en la conductividad iónica de la membrana. En algunas realizaciones, el cambio es una disminución en la conductividad iónica de la membrana.

Según otro aspecto de la invención, se proporcionan un polipéptido de canal iónico activado por luz, un ácido nucleico o un vector, para su uso en un método de tratamiento de un trastorno en un sujeto, tal como se define en la reivindicación 11. El método incluye (a) administrar a un sujeto que necesita tal tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de canal iónico activado por luz o un ácido nucleico o un vector de una cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente, para tratar el trastorno, mediante lo cual dicha administración da como resultado la expresión del canal iónico activado por luz en una célula en el sujeto, y (b) poner en contacto la célula con luz y activar el canal iónico activado por luz en la célula en condiciones suficientes para alterar la conductividad iónica de una membrana celular, en el que la alteración de la conductividad de la membrana celular trata el trastorno. En algunas realizaciones, alterar la conductividad iónica de la membrana despolariza la célula.

Según un aspecto que se describe, pero no se reivindica, se proporcionan métodos de realización de un ensayo de activación de canales iónicos por luz de 2, 3, 4, 5 o más colores en una población de células. Los métodos incluyen (a) expresar un canal iónico activado por luz azul en una primera subpoblación de una población de células; (b) expresar un canal iónico activado por luz roja en una segunda subpoblación de la población de células, en el que las subpoblaciones primera y segunda son subpoblaciones no solapantes; (c) poner en contacto la población de células con una pluralidad de dosis de prueba de luz azul que comprende combinaciones de longitud de onda, ancho de pulso y potencia de luz azul; (d) medir la desviación de voltaje transmembrana en una célula de la segunda subpoblación de células puestas en contacto con la dosis de prueba de luz azul; (e) determinar la dosis de luz azul de prueba que comprende una potencia de luz azul máxima que activa el canal iónico activado por luz azul en la primera subpoblación de células y da como resultado una desviación de voltaje transmembrana subumbral mínima en la segunda subpoblación de células; (f) poner en contacto la población de células con una pluralidad de dosis de prueba de luz azul que comprende una potencia menor que la potencia máxima de luz azul de (e); (g) determinar las dosis de prueba de luz azul de (f) que activan el canal iónico activado por luz azul; (h) poner en contacto la población de células con una pluralidad de dosis de prueba de luz roja que comprende combinaciones de longitud de onda, ancho de pulso y potencia de luz roja, (i) determinar una dosis de prueba de luz roja que comprende una potencia de

luz roja que activa la segunda subpoblación de células; y (j) realizar un ensayo de activación que comprende poner en contacto la población de células con la dosis de prueba de luz azul determinada en (g) y la dosis de prueba de luz roja determinada en (i). En determinadas realizaciones, la pluralidad de dosis de prueba de luz azul comprende longitudes de onda, anchos de pulso y potencias seleccionados independientemente de entre 400 nm y 500 nm, 1 ms y 5 ms, y  $10 \mu\text{W}/\text{mm}^2$  y  $1,0 \text{ mW}/\text{mm}^2$ , respectivamente. En algunas realizaciones, la dosis de prueba de luz roja de (i) es la dosis de prueba que comprende una potencia de luz roja mínima que activa la segunda población de células. En algunas realizaciones, medir la desviación de voltaje transmembrana en (d) comprende pinzamiento zonal de una célula de la segunda población de células y determinación de uno o más cambios de voltaje en la célula. En determinadas realizaciones, la determinación en (e) comprende alterar la dosis de luz azul aumentando la potencia de luz azul desde  $0,5 \text{ mW}/\text{mm}^2$  hasta  $10 \text{ mW}/\text{mm}^2$ ; y medir la desviación de voltaje transmembrana subumbral en la segunda subpoblación de células. En algunas realizaciones, la desviación de voltaje subumbral mínima es de menos de 15 mV, menos de 10 mV o menos de 5 mV. En algunas realizaciones, la potencia de luz azul máxima en (e) es de entre  $0,4 \text{ mW}/\text{mm}^2$  y  $0,6 \text{ mW}/\text{mm}^2$ . En algunas realizaciones, la potencia de luz azul en (g) es de entre  $50 \mu\text{W}/\text{mm}^2$  y  $0,4 \text{ mW}/\text{mm}^2$ . En determinadas realizaciones, el canal iónico activado por luz roja comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de *Chlamydomonas noctigama* activado por luz de tipo natural o modificado. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido de canal iónico activado por luz roja comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta como SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de canal iónico activado por luz roja comprende SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de canal iónico activado por luz roja comprende una secuencia modificada de canal iónico de *Chlamydomonas noctigama* activado por luz que tiene una identidad de al menos el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95% o el 99% con respecto a los aminoácidos 86-320 de SEQ ID NO: 2 y una identidad del 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a los aminoácidos restantes en la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 2. En determinadas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de canal iónico activado por luz roja comprende SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de canal iónico activado por luz roja comprende una secuencia modificada de canal iónico de *Chlamydomonas noctigama* activado por luz que tiene una identidad de al menos el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95% o el 99% con respecto a los aminoácidos 86-320 de SEQ ID NO: 5 y una identidad del 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a los aminoácidos restantes en la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, el canal iónico activado por luz azul comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de *Stigeoclonium helveticum* activado por luz de tipo natural o modificado. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido de canal iónico activado por luz azul comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta como SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de canal iónico activado por luz azul comprende SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de canal iónico activado por luz azul comprende una secuencia modificada de canal iónico de *Stigeoclonium helveticum* activado por luz que tiene una identidad de al menos el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95% o el 99% con respecto a los aminoácidos 61-295 de SEQ ID NO: 7 y una identidad del 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a los aminoácidos restantes en la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la pluralidad de dosis de prueba de luz roja comprende longitudes de onda, anchos de pulso y potencias seleccionados independientemente de entre 600 nm y 740 nm, 1 ms y 5 ms, y  $0,1 \text{ mW}/\text{mm}^2$  y  $100 \text{ mW}/\text{mm}^2$ , respectivamente.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un gráfico de fotocorrientes de canalrodopsina medidas en neuronas del hipocampo cultivadas. La figura 1A muestra resultados usando fotocorriente pico de luz roja ( $660 \text{ nm}$ ) a  $10 \text{ mW mm}^{-2}$  para iluminación de 1 s. ChR88 es la única canalrodopsina sensible a la luz roja con una fotocorriente significativa a  $660 \text{ nm}$ . La figura 1B muestra resultados usando fotocorriente pico de luz azul ( $4,23 \text{ mW mm}^{-2}$ ) o verde ( $3,66 \text{ mW mm}^{-2}$ ) a igual flujo de fotones para iluminación de 5 ms. ChR87, ChR88 y ChR90 tienen todas una fotocorriente mayor que o comparable a ChR2. Las barras negras indican luz azul, las barras de rayas horizontales indican luz verde.

La figura 2 es un gráfico que muestra el espectro de acción a igual dosis de fotones en todas las longitudes de onda registradas en células HEK293FT. ChR2 (pico a  $470 \text{ nm}$ ) y VChR1 (pico a  $545 \text{ nm}$ ) representan el intervalo de sensibilidad de color de canalrodopsina existente. ChR87 (pico a  $515 \text{ nm}$ ) y ChR90 (pico a  $500 \text{ nm}$ ) son canalrodopsinas sensibles a la luz azul y verde. Mientras que ChR88 (pico a  $590 \text{ nm}$ ) es la primera canalrodopsina natural sensible a la luz roja.

La figura 3 proporciona trazados de ejemplo de disparos neuronales accionados ópticamente en neuronas del hipocampo cultivadas. La figura 3A muestra trenes de disparos neuronales accionados por luz roja a baja frecuencia para Ch88. Generalmente, ChR88 puede accionar de manera fiable disparos neuronales de hasta 5 Hz. Sin embargo, a una frecuencia mayor tal como 20 Hz, ChR88 desensibiliza y/o provoca bloqueo de despolarización. La figura 3B muestra trenes de disparos neuronales accionados por luz verde a alta frecuencia para Ch90. Debido a la rápida cinética de recuperación de fotocorriente pico y tau off de ChR90, puede accionar temporalmente disparos neuronales precisos a la frecuencia más alta que una neurona puede mediar.

La figura 4 proporciona gráficos que muestran la cinética de canalrodopsina medida con voltaje de cultivo de neuronas del hipocampo fijado a  $-65 \text{ mV}$ . La figura 4A muestra una cinética de desactivación del canal exponencial

individual basada en un pulso de 5 ms. ChR90 tiene la cinética de desactivación más rápida (3,5 ms) observada en todas las canalrodopsinas naturales. La figura 4B muestra la razón de recuperación de fotocorriente pico basada en la iluminación de 1 s. ChR87 y ChR90 tienen ambos una rápida recuperación de fotocorriente pico a aproximadamente el 70%. Sin embargo, ChR88 tiene una cinética de recuperación lenta similar a Char2.

5 La figura 5 proporciona gráficos y trazados que muestran la caracterización de la diafonía con luz azul de Chrimson en neuronas cultivadas. La figura 5A muestra el espectro de acción de Chrimson y la longitud de onda de luz azul (470 nm) usada para iluminación. Se eligió la longitud de onda para minimizar la diafonía. La figura 5B proporciona trazados representativos de una sola neurona en diversas condiciones de iluminación. Cuando se duplica la potencia de luz azul desde 0,1 hasta 0,2  $\text{mW mm}^{-2}$  mientras que el protocolo de estimulación se fija como 5 ms 5 Hz, la desviación de voltaje también se duplica. Sin embargo, cuando la potencia de luz azul se fija a 0,1  $\text{mW mm}^{-2}$  pero la duración del pulso se cambia desde 5 ms hasta 1000 ms, la diafonía cambia desde <5 mV hasta disparo neuronal completo, de manera correspondiente. Esto significa que la diafonía de luz azul es una función tanto de la potencia de luz como de la duración del pulso de luz (recuento total de fotones).

15 La figura 6 proporciona gráficos y trazados que ilustran la sensibilidad a la luz azul de Chronos y ChR2 en neuronas del hipocampo cultivadas. La figura 6A es una curva de irradiancia de disparo neuronal para neuronas individuales. La figura 6B muestra la potencia de luz más baja necesaria para una probabilidad de disparo neuronal del 100% de una célula individual frente a fluorescencia de GFP. Chronos (círculos) es aproximadamente 5 veces más sensible a la luz que ChR2 (triángulos) a un nivel de expresión dado (GFP). La figura 6C proporciona trazados de ejemplo de la formación de disparos neuronales por Chronos a diversas potencias de luz. La figura 6D ilustra que los controles no muestran diferencias eléctricas significativas entre neuronas que expresan ChR2 y Chronos.

25 La figura 7 proporciona un gráfico e imágenes fotomicrográficas que ilustran la estrategia usada para la caracterización de cortes de Chronos y Chrimson. La figura 7A muestra la longitud de onda de iluminación usada para los experimentos de corte. La figura 7B son imágenes micrográficas que muestran la histología para el constructo de fusión de Chronos y Chrimson-GFP expresado individualmente en la corteza visual de capa 2/3 en ratones.

30 La figura 8 proporciona gráficos que ilustran la caracterización de pinzamiento zonal de células completas de la sensibilidad a la luz azul y roja de Chrimson y Chronos en corte. La figura 8A ilustra que luz roja provoca disparos neuronales del 100% en neuronas que expresan Chrimson pero no en neuronas que expresan Chronos entre 1-6,5  $\text{mW mm}^{-2}$ . La figura 8B muestra que la luz azul a 0,2-0,5  $\text{mW mm}^{-2}$  puede provocar disparos neuronales del 100% en células que expresan Chronos pero no en células que expresan Chrimson. Sin embargo, puede producirse diafonía de disparos neuronales completa en células que expresan Chrimson a potencias mayores de 0,6  $\text{mW mm}^{-2}$ . La figura 8C muestra el voltaje de diafonía de luz azul de neuronas que expresan Chrimson.

40 La figura 9 proporciona trazados de ejemplo de neuronas que expresan opsina con fijación de corriente en corte de capa 2/3 expresando luz azul 0,1  $\text{mW mm}^{-2}$ , luz roja 1  $\text{mW mm}^{-2}$ . No se observó diafonía bajo luz roja para Chronos mientras que se observó diafonía subumbral (<5 mV) bajo luz azul para Chrimson.

45 La figura 10 proporciona trazados de ejemplo de neuronas que no expresan opsina con fijación de voltaje en la capa 2/3 o 5, de manera post-sináptica con respecto a células que expresan opsina. Se observó diafonía post-sináptica cero tanto para Chronos como para Chrimson bajo iluminación de luz roja y azul respectivamente.

Chronos: luz azul 0,13  $\text{mW mm}^{-2}$ , luz roja 1,7  $\text{mW mm}^{-2}$ .

Chrimson: luz azul 0,37  $\text{mW mm}^{-2}$ , luz roja 1,7  $\text{mW mm}^{-2}$ .

50 La figura 11 proporciona un diagrama esquemático, una imagen fotomicrográfica y trazados que ilustran la iluminación por pulsos emparejados en corte que expresan diferencialmente Chrimson y Chronos en neuronas separadas. La figura 11A muestra un esquema de electroporación en útero de triple plásmido para obtener la expresión no solapante de Chrimson y Chronos. La figura 11B muestra la expresión de opsina en la corteza visual, no se observa solapamiento de GFP y mO2, la razón de marcaje de Chronos con respecto a Chrimson puede ajustarse valorando el plásmido Cre. La figura 11C muestra neuronas que no expresan opsina con fijación de voltaje en la estimulación por pulsos emparejados de la capa 2/3 para demostrar que se accionan selectivamente diferentes sinapsis por luz azul y roja; azul: 0,2  $\text{mW mm}^{-2}$ ; roja: 5  $\text{mW mm}^{-2}$ . Las flechas representan la aplicación de luz. Primer trazado desde arriba: la primera flecha indica luz azul, la segunda flecha indica luz roja; segundo trazado desde arriba: la primera flecha indica luz roja, la segunda flecha indica luz azul; tercer trazado desde arriba: ambas flechas representan luz roja; y cuarto trazado desde arriba: ambas flechas representan luz azul.

La figura 12 es un trazado que ilustra que Chrimson puede accionar disparos neuronales en el rojo lejano (660 nm) usando pulsos de 5 ms a 2,6  $\text{mW mm}^{-2}$  en neuronas del hipocampo cultivadas.

65 La figura 13 proporciona trazados que ilustran que el mutante ChR88 K176R tiene cinética mejorada (tau off de 13 ms) y puede mediar disparos neuronales de alta frecuencia en neuronas del hipocampo cultivadas. Se muestran



SEQ ID NO: 4 es una región transmembrana de ChR88 que incluye los residuos 86-320 de SEQ ID NO: 2

GTPGEKIGAQCQWIAFSIAIALLTFYGFSAWKATCGWEEVYVCCVEVLFVTLEIFKE  
FSSPATVYVLTSTGNHAYCLRYFEWLLSCPVILIKLSNLSGLKNDYSKRTMGLIVSCVGM  
IVFGMAAGLATDWLKWLLYIVSCIYGGYMYFQAACKCYVEANHSVPGHCRMVVK  
LMAYAYFASWGSYPILWAVGPEGLLKLSPYANSIGHSICDIIAKEFWTFLAHLRIKI  
HEHILIH.

5

SEQ ID NO: 5 se deriva de ChR88 e incluye sustitución de K176R

MAELISSATRSLFAAGGINPWPNPYHHEDMGC GGMTPTGECFSTEWVCDPSYGLSD  
AGYGYCFVEATGGYLVVGVEKKQAWLHSRGTPEKIGAQCQWIAFSIAIALLTFY  
GFSAWKATCGWEEVYVCCVEVLFVTLEIFKEFSSPATVYVLTSTGNHAYCLRYFEWLLS  
CPVILIRLSNLSGLKNDYSKRTMGLIVSCVGMIVFGMAAGLATDWLKWLLYIVSCIY  
GGYMYFQAACKCYVEANHSVPGHCRMVVKLMAYAYFASWGSYPILWAVGPEGLL  
KLSPYANSIGHSICDIIAKEFWTFLAHLRIKIHEHILIHGDIRKTTKMEIGGEEVEVEEF  
VEEDEDTV.

10 SEQ ID NO: 6 es una secuencia de aminoácidos de *Stigeoclonium helveticum*

METAATMTHAFISAVPSAEATIRGLLSAAAVVTPAADAHGETSNATTAGADHGCFP  
HINHGTELQHKIAVGLQWFTVIVAIVQLIFYGWHSEKATTGWEEVYVCVIELVKCFIE  
LFHEVDSPATVYQTNNGGAVIWLRYSMWLLTCPVILIHLSNLTGLHEEYSKRTMTILV  
TDIGNIVWGITA AFTKGPLKILFFMIGLFYGVTCFFQIAKVYIESYHTLPKGVCRKICKI  
MAYVFFCSWLMFPVMFIAGHEGLGLITPYTSGIGHLILDLSKNTWGFLGHHLRVKIH  
EHILIHGDIRKTTTINVAGENMEIETFVDEEEEGGVNHGTADLAHRASFQKMGDRLR  
AQGVTVRASLDAHEVPPADEENKFAQKSAAANMPAYNPGKVILIVPDMSMVDYFR  
DQFEQLPTRMELLPALGMDT.

15

SEQ ID NO: 7 es una secuencia de aminoácidos que codifica para ChR90 que incluye los residuos 1-325 de SEQ ID NO: 6

METAATMTHAFISAVPSAEATIRGLLSAAAVVTPAADAHGETSNATTAGADHGCFP  
HINHGTELQHKIAVGLQWFTVIVAIVQLIFYGWHSEKATTGWEEVYVCVIELVKCFIE  
LFHEVDSPATVYQTNNGGAVIWLRYSMWLLTCPVILIHLSNLTGLHEEYSKRTMTILV  
TDIGNIVWGITA AFTKGPLKILFFMIGLFYGVTCFFQIAKVYIESYHTLPKGVCRKICKI  
MAYVFFCSWLMFPVMFIAGHEGLGLITPYTSGIGHLILDLSKNTWGFLGHHLRVKIH  
EHILIHGDIRKTTTINVAGENMEIETFVDEEEEGGV.

20

SEQ ID NO: 8 es una secuencia de ADN con codones optimizados de mamífero que codifica para el polipéptido de canal iónico activado por luz ChR90



atgagcagactggtc gccgcttcttggctgctggtctctctctctgcggaattaccagcacaacaacagcctctagcgcgccagcag  
 cttctctacagacggaacagccgccgcagcagtgctctactacgccatgaacggcttcgacgagctggctaaaggagccgtggtgc  
 cagaagaccacttfgtctgcgaccagccgacaagtgcattgctccgcttggctgcacagccacggaagcaaggaggagaa gacc  
 gccctaccgcatgacagtgatcgtgttcgccgtctgcatcaca gectgctgtctacgccctaccagacttggaggactacttgggtt  
 gggaggagggtgtacgtgaccatcctgagctggccacgtctgcttcggactctggcacgaggte gatagcccttgacctgtacctg  
 agcacaggcaacatggctcctggtgagatacggcgagtggtgctgacttgcgccctgactctgatccacctgagcaacctgaccg  
 gcatgaagaacgactacaacaagcggacatggccctgctggtgacagctgggctgtatcgtgtgggaacaacagccgccctg  
 agcaccgatttcgtgaagatcctctctctctgggectgctgacggctctacacctctacgccgccgcaagatctacatcaggg  
 cctaccacaccgtgcccaagggcattttagacagctcgtgcggctgcaggcctacgactctctctacttggagcatgttcccatec  
 tgttcatggctggcccagaggggattcggcaagatcaccgctacagcagcgggaatgccccacgaagtgtgcgatctctgagcaag  
 aacctctgggacctgatgggaccactcctccgctgaagatccacgagcacaacctgggtgcacggcaacatcaccagaagacc  
 ggtcaacgtggccggcgacatgggtggaactggacacctacgtggaccaggacgaggaacacgacgagggga.

SEQ ID NO: 13 es una región transmembrana de ChR87 que incluye los residuos 81-315 de SEQ ID NO: 11

GSKEEKTAFTVMQWIVFAVCHSLLFYAYQTRATCGWEEVYVTHIELVHVCFLWH  
 EVDSPCTLYLSTGNMVLWLR YAEWLLTCPVILIHLSNLTGMKNDYKRTMALLVSD  
 VGCIVWGTTAALSTDFVKIIFFFLGLLYGFYTFYAAAKIYIEAYHTVPKGICRQLVRLQ  
 AYDFFFTWSMFPILFMVGP EFGKITAYSSGIAHEVCDLLSKNLWGLMGHFIRVKIHE  
 5 HILVH.

SEQ ID NO: 14 secuencia de aminoácidos para rodopsina de *Neochlorosarcina* sp. Rodopsina. Este canal iónico activado por luz se denomina en el presente documento ChR62.

MADFVWQGAGNGGPSAMVSHYPNGSVLLESSGSCYCEDWYTSRGNHVEHSLSNAC  
 DWFAFAISVIFLVYYAWAAFNSSVGVWEEIYVCTVELIKVSIDQFLSSNSPCTLYLSTG  
 NRVLWIRYGEWLLTCPVILIHLSNVTGLKDNYSKRTMALLVSDIGTIVFGVTSAMCT  
 GYPKVIFFILGCCYGAN TFFNAAKVYLEAHHTLPKGS CRTLR LMA YTY YASWGMFP  
 10 ILFVLGPESFGHMNMYQSNIAHTVIDLMSKNIWGM LGHFLRHKIREHILIHGDLR TTT  
 TVNVAGEEMQVETMVA AEDADETTV.

SEQ ID NO: 15 es la secuencia de ADN con codones optimizados de mamífero para la rodopsina de *Neochlorosarcina*. Este canal iónico activado por luz se denomina en el presente documento ChR62.

atggccgacttcgtgtggcagggagctggaacggaggaccaagcgcacatgggtgcccactacccaatggcagcgtgctgctgga  
 gagctccggcagctgctactgtgaagactgggtatactctcggggcaaccacgtggagcattctctgagtaatgcttgcgattggttgc  
 ctttgcatacagcgtgattttcctgggtgactatgcctgggcegetttaactctagtgtgggctgggaggaaatctacgtgtgcaccgtgg  
 agctgatcaagggtgagcaftgatcagttcctgagctccaactctccttgacctgtacctgagtacagggaatagggtgctgtggtatca  
 gatatggcgaatggctgctgactgtccagtgatectgattcactgtccaacgtgacaggctgaaggacaactacttaaacgcacta  
 tggctctgctgggtgagtgatcgggaccatcgtgttcggcgtgacttctgcatgtgcaccggatccccaaagtgatcttctttattctg  
 15 ggctgctgttatggagetaaacattctttaatgcgcctaagggtgacttggaggccaccatacactgectaaaggctctttaggact  
 ctgatcagaactgatggcctatacctactatgctagtggggaatgtcccattctgtttgctgggacctgagagcttcggccacatga  
 acatgtaaccagtc caatacgcgccataccgtgattgacctgatgtccaagaacalctggggaatgctggggcacttctgcggcataaa  
 attcgggagcacatcctgattcatggagatctcggaccacaactaccgtgaatgtgctggggaggaaatgcagggtggaacaatg  
 gtggccgctgaggacgccgatgaaacaactgtg.

SEQ ID NO: 16 es la secuencia de aminoácidos para rodopsina de *Heterochlamydomonas inaequalis*. Este canal iónico activado por luz se denomina en el presente documento ChR93.

20

MGGIGGGGIQPRDYSYGANGTVCVNPVCFCLDWQQPFGSNMENNVSQGFQLFTIA  
 LSACILMFYAYEWYKATCGWEEIYVCVEMSKICIELVHEYDTPFCLYLATGSRVLW  
 LRYAEWLMTCPVILIHLSNITGLGTDYNKRTMVLMSDIGCIVFGATAAFANEGYVK  
 CACFLGMAWGMNTFYNAAKVYYESYVLVPSGICKLLVAVMAGLYYVSWSLFPIL  
 FAIGPEGFGVISLQASTIGHTIADVLSKNMWGLMGHFLRVQIYKHILLHGNIRKPIKLH  
 MLGEEVEVMALVSEEGEDTV.

SEQ ID NO: 17 es la secuencia de ADN con codones optimizados de mamífero para la rodopsina de *Heterochlamydomonas inaequalis*, este canal iónico activado por luz se denomina en el presente documento ChR93.

5

atggggaggaattggcggaggcggcattcagcctagagactacagctacggcgccaacggaacagctctgcgtgaaccccagcgtct  
 gcttctgctggatggcagcagcccttcggctctaactggagaacaacgtgtccagggcttcagctgtttaccatcgccctgagc  
 gectgcalcctgatgttclacggclacgagtggtacaaggccacttgcgggtgggaggagatctacgtctgcgtgggtggagatgagca  
 agatttgcctcagagctgggtgcacgagtagacaccccccttttgcctgtacttggccaccggcagcagagctcttggctgagatacgc  
 cgagtggctcatgacttccccgtgactctgatccactgagcaacatcaccggactgggcaccgactacaacaaggccaccatgggt  
 gctctgatgagcgacatcggttgcctcgttctggcgccacagcagcattcgccaacgagggctacgtgaagtgccttcttctctgc  
 tgggcatggcttggggcatgaacacctctacaacggcgccaagggtgtactacgagagctacgtctgttggctcccggaatttcaa  
 gctgtctgggtggcctgatggcggactgtactacgttcttggagcctgttccccatcctgtttgccatcgccagaggggatttggcgt  
 gatcagcctgcagggcagcaccattggccacacaatcgccgacgtgctgagcaagaacatgtggggcctgatgggcccacttctctgc  
 ggggtcagatctacaagcacatcctgtctgcacggcaacatccgggaagcctatcaagctgcacatctgggcgaggagggtggaagtg  
 atggcctctgggtccgaggaggaggagagataccgtg.

SEQ ID NO: 18 es la secuencia de ADN con codones optimizados de mamífero que codifica para la canalrodopsina-2 de tipo natural, (véase: Boyden, E. *et al.*, Nature Neuroscience 8, 1263 - 1268 (2005) y Nagel, G., *et al.* PNAS 25 de noviembre de 2003 vol. 100 n.º 2413940-13945), también denominada en el presente documento ChR2:

10

atggactatggcggcgtttgtctgcccgcggacgcgaactttgttctactaatcctgtggtggtgaacgggtccgctctggctcctg  
 aggatcaatgttactgtgccggatggatgaatctcggggcacgaacggcgctcagaccgcgtcaaatgtctcagtggtctgcagc  
 aggatcagcaitttctgtctgalgttctatgcctaccaaacctggaaatctacatggcgtgggaggagatctatgtgtgcgccattgaa  
 atggtaaggtgattctcagttctttttgagtttaagaatccctctatgctctaccttggccacaggacaccgggtgcagtggtctgcctat  
 gcagagtggctgtcacttgtctgtccttctatccactgagcaaccctaccggcctgagcaaacgactacagcaggagaaccatgg  
 gactcctgtctcagacatcgggactatcgtgtggggggctaccagcggcatggcaaccggctatgtaaaagtcacttcttttctgtgg  
 attgtctatggcgcgaacacatttttcacggcgccaaagcatalatcgagggttatcactgtgccaagggtcgggtccggcaggt  
 cgtgaccggcatggcattggctgttttctgtgagctgggtatgttcccaattctcttcttttggggcccgaagggtttggcgtcctgagcg  
 tclatggctccaccgtagggtcacacgatlattgatctgatgagtaaaaatgttgggggttgttgggacactacctgcgcgtctgatcca  
 cgagcacatattgattcaggagataccgcaaaaccacaaactgaacatcgccgggaacggagatcagggtcggagactctcgtcga  
 agacgaagccgaggccggagccgtg.

SEQ ID NO: 19 es la secuencia de aminoácidos de la canalrodopsina-2 de tipo natural, (véase: Boyden, E. *et al.*, Nature Neuroscience 8, 1263 - 1268 (2005) y Nagel, G., *et al.* PNAS 25 de noviembre de 2003 vol. 100 n.º 24 13940-13945), también denominada en el presente documento ChR2:

15

MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVL  
 QWLAAGFSILLMFYAYQTWKSTCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLAT  
 GHRVQWLRYAEWLLTCPVILIHLSNLTGLSNDYSRRTMGLLVSDIGTIVWGATSAM

ATGYVKVIFFLGLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPGRCRQVVTGMAWLFF  
 VSWGMPILFILGPEGFGVLSVYGSTVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHI  
 LIHDIRKTTKLNIGGTEIEVETLVEDEAEAGAV.

20

SEQ ID NO: 20 es la secuencia de ADN de la secuencia señal "ss" del antígeno del CMH de clase I truncado: gtcctgtcagcgtctctgtgttggcagccgctgtcctcagactcagaccggcc.

25

SEQ ID NO: 21 es la secuencia de aminoácidos de la secuencia señal "ss" del antígeno del CMH de clase I

truncado: MVPCTLLLLLAAALAPTQTRA.

SEQ ID NO: 22 es la secuencia de ADN de la secuencia de exportación del RE (también denominada en el presente documento ER2<sup>2</sup>): tctgctacgagaatgaagtg.

5 SEQ ID NO: 23 es la secuencia de aminoácidos de la secuencia de exportación del RE (también denominada en el presente documento "ER2<sup>2</sup>"): FCYENEV.

10 SEQ ID NO: 24 es la secuencia de ADN de KGC, que es una secuencia de exportación C-terminal del canal de potasio Kir2.1: aaatccagaattacttctgaaggggagtatatccctctggatcaaatagacatcaatgtt.

SEQ ID NO: 25 es la secuencia de aminoácidos de KGC, que es una secuencia de exportación C-terminal del canal de potasio Kit2.1: KSRITSEGEYIPLDQIDINV.

## 15 Descripción detallada

La invención proporciona un polipéptido de canal iónico activado por luz aislado tal como se define en la reivindicación 1. La presente solicitud describe la expresión en células de polipéptidos de canales iónicos accionados por luz que pueden activarse por contacto con uno o más pulsos de luz, lo que da como resultado una fuerte despolarización de la célula. Los canales activados por luz de la invención, también denominados en el presente documento canales iónicos activados por luz, pueden expresarse en células, tejidos y/u organismos específicos y usarse para controlar células *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* en respuesta a pulsos de luz de una longitud de onda adecuada. Las secuencias de *Chlamydomonas* tales como Chrimson y derivados de la misma, se activan fuertemente por contacto con luz roja.

25 Los canales iónicos activados por luz de la invención son canales iónicos y pueden expresarse en una membrana de una célula. Un canal iónico es una proteína integral de membrana que forma un poro a través de una membrana y ayuda a establecer y modular el pequeño gradiente de voltaje que existe a través de la membrana plasmática de todas las células y también se encuentra en membranas subcelulares de orgánulos tales como el retículo endoplasmático (RE), las mitocondrias, etc. Cuando se activa un canal iónico activado por luz de la invención poniendo en contacto la célula con luz apropiada, el poro se abre y permite la conductancia de iones tales como sodio, potasio, calcio, etc. a través del poro.

35 Los canales activados por luz pueden usarse para modificar el potencial transmembrana (y/o la composición iónica) de las células (y/o sus regiones subcelulares y su entorno local). Por ejemplo, el uso de canales catiónicos de rectificación interna despolarizará las células moviendo iones cargados positivamente desde el medio extracelular hasta el citoplasma. En determinadas condiciones, su uso puede disminuir el pH intracelular (y/o la concentración catiónica) o aumentar el pH extracelular (y/o la concentración catiónica). En algunas realizaciones, la presencia de canales iónicos activados por luz en una, dos, tres, o más (por ejemplo una pluralidad) de células en un tejido u organismo, puede dar como resultado despolarización de la única célula o la pluralidad de células poniendo en contacto los canales iónicos activados por luz con luz de longitud de onda adecuada.

### *Canales iónicos activados por luz derivados de Chlamydomonas*

45 La invención reivindicada se basa en un polipéptido de canal iónico activado por luz aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de canal de *Chlamydomonas noctigama* activado por luz de tipo natural o modificado, tal como se define en la reivindicación 1.

50 Cuando se expresan en una célula, los canales iónicos activados por luz de la invención identificados que tienen una secuencia de canal de iónico activado por luz de *Chlamydomonas* o un derivado de la misma, pueden activarse poniendo en contacto la célula con luz que tiene una longitud de onda de entre aproximadamente 365 nm y 700 nm, entre 530 nm y 640 nm, y en algunas realizaciones, puede producirse una activación pico tras el contacto con luz que tiene una longitud de onda de 590 nm. Los ejemplos de estos canales iónicos activados por luz incluyen ChR88 (también denominado en el presente documento Chrimson), secuencia de Chrimson sustituido con K176R tal como SEQ ID NO: 5; y derivados funcionales de los mismos.

60 Poner en contacto una célula excitable que incluye un canal iónico activado por luz derivado de *Chlamydomonas* de la invención con una luz en el intervalo de longitudes de onda de activación despolariza fuertemente la célula. Las longitudes de onda de luz a modo de ejemplo que pueden usarse para despolarizar una célula que expresa un canal iónico activado por luz derivado de *Chlamydomonas* de la invención, incluyen longitudes de onda desde al menos aproximadamente 365 nm, 385 nm, 405 nm, 425 nm, 445 nm, 465 nm, 485 nm, 505 nm, 525 nm, 545 nm, 565 nm, 585 nm; 605 nm, 625 nm, 645 nm, 665 nm, 685 nm; y 700 nm, incluyendo todas longitudes de onda entre medias. En algunas realizaciones, los canales iónicos activados por luz derivados de *Chlamydomonas* de la invención tienen sensibilidad a la longitud de onda pico de 590 nm, y pueden producir disparos neuronales de hasta 660 nm.

65 En algunas realizaciones, un canal iónico activado por luz derivado de *Chlamydomonas*, siendo un ejemplo no

limitativo del mismo Chrimson o un Chrimson sustituido con K176R expuesto como SEQ ID NO: 5, puede accionar temporalmente disparos neuronales precisos con anchura de pulso de 1-5 ms a de  $0,5 \text{ mW/mm}^2$  a  $> 10 \text{ mW/mm}^2$  en neuronas a su longitud de onda óptima en corte y en cultivo celular; y puede estimular a una frecuencia de hasta 10 Hz de manera fiable a su longitud de onda óptima. En algunas realizaciones, una longitud de onda óptima para un canal iónico activado por luz derivado de *Chlamydomonas* es de entre 530 nm y 640 nm. El canal iónico activado por luz derivado de *Chlamydomonas* sustituido que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 5, tiene un tau off disminuido de desde 25 ms hasta 13 ms, y este mutante K176R puede estimular a una frecuencia de hasta 60 Hz de manera fiable a una longitud de onda óptima, que puede ser de entre 530 nm y 640 nm.

Los canales iónicos activados por luz de la invención tales como ChR88 y derivados del mismo pueden usarse para despolarizar células excitables en las que se expresan uno o más canales iónicos activados por luz de la invención. En algunas realizaciones, los canales iónicos activados por luz derivados de *Chlamydomonas* de la invención pueden expresarse en una subpoblación de células en una población de células que también incluye una o más subpoblaciones de células adicionales que expresan canales iónicos activados por luz que se activan por longitudes de onda de luz que no activan un canal iónico activado por luz derivado de *Chlamydomonas* de la invención.

Los canales iónicos activados por luz derivados de *Chlamydomonas* de la invención permiten la conductancia de iones y despolarización cuando se ponen en contacto en condiciones adecuadas con una longitud de onda apropiada de luz. Tal como entenderán los expertos en la técnica, el término “despolarizado” usado en el contexto de células significa un cambio ascendente en el voltaje celular. Por ejemplo, en una célula excitable a un voltaje inicial de aproximadamente -65 mV, un cambio positivo de voltaje, por ejemplo, de hasta 5, 10, 15, 20, 30, 40, o más milivoltios (mV) es una despolarización de esa célula. Cuando el cambio de voltaje es suficiente para alcanzar el umbral de voltaje de inicio de disparo neuronal de la célula, aparece como resultado un potencial de acción (por ejemplo, un disparo). Cuando se despolariza una célula activando un canal iónico activado por luz de la invención con una longitud de onda apropiada de luz, el voltaje celular se vuelve más positivo que el nivel inicial, y una señal de entrada puede elevar más fácilmente el voltaje de la célula lo suficientemente para alcanzar el umbral y desencadenar un potencial de acción en la célula. Se ha descubierto que, poniendo en contacto una célula que expresa un canal iónico activado por luz derivado de *Chlamydomonas* de la invención con luz en el intervalo de entre aproximadamente 365 nm y aproximadamente 700 nm, el voltaje de la célula se vuelve menos negativo y puede elevarse en al menos aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mV (según el tipo de célula) despolarizando por tanto, la célula. Tal como se usa en el presente documento, el término “activar” cuando se usa en referencia con un canal iónico activado por luz de la invención, significa abrir el canal haciéndolo permisivo a la conducción iónica a través del canal.

Se proporcionan intervalos específicos de longitudes de onda de luz que en algunas realizaciones de la invención son útiles para activar canales iónicos de la invención y se describen en el presente documento. Se entenderá que es una luz de longitud de onda apropiada para la activación y tendrá una potencia e intensidad apropiadas para la activación. Se conoce bien en la técnica que la duración, intensidad y potencia del pulso de luz son parámetros que pueden alterarse cuando se activa un canal con luz. Por tanto, un experto en la técnica podrá ajustar la potencia y la intensidad de manera apropiada cuando se usa una longitud de onda que se enseña en el presente documento que activa un canal iónico activado por luz de la invención. Una luz de dosis que entra en contacto con un canal iónico activado por luz de la invención puede determinarse basándose en la longitud de onda, la longitud de pulso y la potencia de la luz que entra en contacto con el canal iónico activado por luz. Por tanto, como ejemplo no limitativo, una dosis puede tener una longitud de onda de 550 nm, una longitud de pulso de 4 ms y una potencia de  $0,5 \text{ mW/mm}^2$  y otra dosis de luz puede tener una longitud de onda de 550 nm, una longitud de pulso de 3 ms y una potencia de  $0,5 \text{ mW/mm}^2$ . Los expertos en la técnica entenderán métodos para seleccionar una dosis de luz seleccionando independientemente una longitud de onda, una longitud de pulso y una potencia para la luz con la que se pone en contacto un canal iónico activado por luz de la invención. En algunas realizaciones, la longitud de onda y la longitud de pulso pueden mantenerse constantes, y aumentarse incrementalmente la potencia para examinar los parámetros de activación de un canal iónico activado por luz de la invención. De manera similar, en determinadas realizaciones de la invención pueden incluirse aumentos de longitud de onda incrementales mientras que la longitud de pulso y la potencia se mantienen constantes; o la longitud de pulso incremental aumenta mientras que la longitud de onda y la potencia se mantienen constantes. En algunas realizaciones de la invención, pueden alterarse de manera incremental dos o más de longitud de onda, longitud de pulso y potencia de una luz para examinar el efecto sobre la activación de un canal iónico activado por luz de la invención.

Un beneficio de un canal iónico activado por luz de la invención es la capacidad de “ajustar” la respuesta del canal iónico activado por luz usando variables de iluminación apropiadas (por ejemplo, longitud de onda, intensidad, duración, etc.) (también denominado en el presente documento dosis) para activar el canal. Los métodos de ajuste de las variables de iluminación se conocen bien en la técnica y pueden encontrarse métodos representativos en publicaciones tales como: Lin, J., *et al.*, *Biophys. J.* 4 de marzo de 2009; 96(5):1803-14; Wang, H., *et al.*, 2007 *Proc Natl Acad Sci USA*. 8 de mayo de 2007; 104(19):8143-8. Epub 1 de mayo de 2007. Por tanto, es posible utilizar un intervalo estrecho de una o más características de iluminación para activar un canal iónico activado por luz de la invención. La expresión de canales iónicos activados por luz que se activan por diferentes longitudes de onda de luz en subpoblaciones diferentes, separadas, en una población de células puede permitir la aplicación de diferentes parámetros de iluminación a la población con el efecto de activar diferencialmente las diferentes subpoblaciones

mediante el uso longitudes de onda de luz específicas. De este modo se permite la activación controlada de una población mixta de canales activados por luz.

5 La invención reivindicada proporciona un ácido nucleico tal como se define en la reivindicación 5 y un vector tal como se define en la reivindicación 7. Por tanto, la invención incluye en parte ácidos nucleicos aislados que comprenden secuencias que codifican para los canales iónicos activados por luz de la invención así como vectores y constructos que comprenden tales secuencias de ácido nucleico. La expresión de polipéptidos codificados por las secuencias de ácido nucleico en células, tejidos y organismos se da a conocer, pero no se reivindica.

10 No todas las canalrodopsinas pueden expresarse en células y utilizarse de esta manera, porque muchas no circulan y/o funcionan adecuadamente en células de mamífero. Chrimson responde fuertemente a la luz roja lejana, y por tanto, dado que otras canalrodopsinas que despolarizan células responden fuertemente a la luz ultravioleta o luz azul, Chrimson puede expresarse en una población de células separada de una población de células que expresan una de estas otras opsinas, permitiendo que se usen múltiples colores de luz para excitar estas dos poblaciones de  
15 células o proyecciones neuronales de un lugar, en momentos diferentes.

Los canales activados por luz pueden usarse para modificar el potencial transmembrana (y/o la composición iónica) de las células (y/o sus regiones subcelulares, y su entorno local). En particular, el uso de canales catiónicos de  
20 rectificación interna despolarizará las células moviendo iones cargados positivamente desde el medio extracelular hasta el citoplasma. En determinadas condiciones, su uso puede disminuir el pH intracelular (y/o la concentración catiónica) o aumentar el pH extracelular (y/o la concentración catiónica).

En comparación con las secuencias génicas naturales usadas convencionalmente para despolarizar neuronas, Chronos ha mejorado de manera demostrable la generación de fotocorriente en todas las longitudes de onda de  
25 iluminación excepto para la longitud de onda roja. Además, Chronos puede despolarizar células en respuesta a un pulso <5 ms de 50-100  $\mu\text{W mm}^{-2}$  de luz azul o verde con suficiente independencia espectral de la mayoría de canalrodopsinas verdes o rojas tales como ChR87 o Chrimson, permitiendo por tanto que se usen múltiples colores de luz para despolarizar diferentes conjuntos de células en el mismo tejido, expresando simplemente bombas con  
30 diferentes espectros de activación genéticamente en diferentes células, e iluminando después el tejido con diferentes colores de luz. En un ejemplo no limitativo de una realización, un conjunto de células en un tejido, por ejemplo neuronas excitadoras, expresa Chrimson, y un segundo conjunto expresa Chronos e iluminar el tejido con luz de 630 nm se despolarizará preferiblemente el primer conjunto, e iluminar el tejido con luz de 470 nm a bajas potencias (<5  $\text{mW mm}^{-2}$ ) se despolarizará preferiblemente el segundo conjunto. Otros pares de dianas que podrían modularse con dos colores de luz en la misma zona de iluminación incluyen, pero no se limitan a, dos proyecciones  
35 a/de un sitio, o combinaciones de la célula, sus proyecciones, y sus orgánulos, dada la capacidad de dirigirse a la molécula a nivel subcelular.

Se ha identificado que los canales iónicos activados por luz de la invención, en algunas realizaciones de la invención, se activan a diferentes longitudes de onda que los canales iónicos activados por luz previamente  
40 identificados. Por tanto, los canales iónicos activados por luz de la invención pueden usarse o bien solos, usando un espectro de luz selectivo para la activación y despolarización y también pueden usarse en combinación con otros canales iónicos activados por luz que utilizan diferente longitud de onda de luz para la activación y despolarización, permitiendo por tanto que se usen dos, tres, cuatro o más longitudes de onda de luz diferentes para despolarizar  
45 diferentes conjuntos o subpoblaciones de células en un tejido u organismo expresando canales con diferentes espectros de activación en diferentes células e iluminando después el tejido y/u organismo con las longitudes de onda de luz apropiadas para activar los canales y despolarizar las células.

Puede usarse un canal iónico activado por luz de *Chlamydomonas noctigama* o un derivado del mismo junto con un canal iónico activado por luz de *Stigeoclonium helveticum* o un derivado del mismo. Los dos canales iónicos  
50 activados por luz son sensibles a y pueden activarse con longitudes de onda de luz diferentes entre sí. Tal como se describe en el presente documento, determinados canales iónicos activados por luz de la invención pueden despolarizar células en respuesta fuerte a la luz con suficiente independencia espectral de la de los otros canales iónicos activados por luz de la invención, permitiendo por tanto que se usen múltiples colores de luz para despolarizar diferentes conjuntos de células en el mismo tejido, expresando canales con diferentes espectros de  
55 activación genéticamente en diferentes células, e iluminando después el tejido con diferentes colores de luz a una dosis adecuada para activar un tipo de canal iónico activado por luz pero no el otro tipo de canal iónico activado por luz. En un ejemplo no limitativo, si un primer subconjunto de células en un tejido (por ejemplo, neuronas excitadoras) expresa ChR88, y un segundo subconjunto expresa canales iónicos activados por luz ChR90 de la invención, iluminar después el tejido con una dosis de luz tal como 625 nm, 2  $\text{mW/mm}^2$  despolarizará/accionará preferiblemente  
60 disparos neuronales en el primer subconjunto (ChR88), e iluminar el tejido con una dosis de luz tal como 470 nm 0,2  $\text{mW/mm}^2$  luz despolarizará/accionará preferiblemente disparos neuronales en el segundo subconjunto (ChR90). Otros pares de dianas que podrían modularse con dos colores de luz en la misma zona de iluminación incluyen, pero no se limitan a, dos proyecciones a/de un sitio, o combinaciones de la célula, sus proyecciones y sus orgánulos, dada la capacidad de dirigirse a la molécula a nivel subcelular.

65

*Taxonomía y fuentes de secuencia*

En particular, la presente invención incluye, en parte, canales iónicos activados por luz novedosos. Pueden usarse para despolarizar células. Pueden expresarse en células uno o más canales iónicos activados por luz recientemente identificados.

5 Los canales iónicos activados por luz de la invención tienen secuencias de aminoácidos derivadas de rodopsinas de *Chlamydomonas* que se expresan de manera natural en el género *Chlamydomonas noctigama*. *Chlamydomonas noctigama* son fitoplancton y pueden encontrarse en ambientes de agua dulce. La invención usa secuencias aisladas de ácido nucleico y/o aminoácido de tipo natural o modificado de canalrodopsina de *Chlamydomonas noctigama*.

15 En el polipéptido de canal iónico activado por luz aislado de la invención reivindicada, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de canal de *Chlamydomonas noctigama* activado por luz de tipo natural o modificado, en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido de canal iónico activado por luz comprende una SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos del polipéptido de canal iónico activado por luz comprende una secuencia modificada de canal iónico activado por luz de *Chlamydomonas noctigama* que tiene una identidad de al menos el 70% con respecto a los aminoácidos 86-320 de SEQ ID NO: 2 y una identidad de al menos el 95% con respecto a los aminoácidos restantes en la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 2. Un polipéptido de canal iónico activado por luz modificado (también denominado derivado de un canal iónico activado por luz) frente a un canal iónico activado por luz que se produce de manera natural puede alterarse mediante una sustitución de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más aminoácidos, mediante una inserción y/o deleción de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más aminoácidos en una o varias posiciones. Tanto un polipéptido de canal iónico activado por luz de tipo natural como los derivados del mismo tienen una identidad de al menos el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, o el 100%, con la secuencia de la región transmembrana del polipéptido de canal iónico activado por luz de tipo natural, siempre que mantengan la funcionalidad del canal. Para ChR87, que se describe, pero no se reivindica, la secuencia de aminoácidos de la región transmembrana se expone como SEQ ID NO: 13, que incluye los residuos de aminoácido 81-315 de SEQ ID NO: 11. Para ChR88, la secuencia de aminoácidos de la región transmembrana se expone como SEQ ID NO: 4, que incluye los residuos de aminoácido 86-320 de SEQ ID NO: 2. Para ChR90, que se describe, pero no se reivindica, la secuencia de aminoácidos de la región transmembrana se expone como SEQ ID NO: 9, que incluye los residuos de aminoácido 61-295 de SEQ ID NO: 7.

35 En cambio, el nivel de identidad entre un canal iónico activado por luz modificado o derivado de la invención y el tipo natural del que se deriva puede estar más limitado para mantener la función del canal iónico activado por luz. La secuencia de aminoácidos de una región no transmembrana de un canal iónico activado por luz modificado o derivado de la invención, tiene una identidad de al menos el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de canal iónico activado por luz de tipo natural de la que se derivan.

40 En algunas realizaciones, un canal iónico activado por luz de la invención puede ser un derivado de ChR88 y tener una identidad de al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a las regiones no transmembrana de la secuencia de polipéptido de tipo natural (SEQ ID NO: 2) del polipéptido de canal iónico activado por luz del que se deriva. En otro ejemplo no limitativo de un canal iónico activado por luz derivado de ChR88, un polipéptido que incluye sustitución de K176R en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 funciona como un canal iónico activado por luz de la invención.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "identidad" se refiere al grado de parentesco entre dos o más secuencias de polipéptido, que puede determinarse por la coincidencia entre las secuencias. El porcentaje se obtiene como el porcentaje de aminoácidos idénticos en dos o más secuencias considerando los huecos y otras características de secuencia. La identidad entre secuencias de polipéptido puede determinarse por medio de procedimientos conocidos. Están disponibles algoritmos y programas se usan de manera rutinaria los expertos en la técnica para determinar la identidad entre secuencias de polipéptido. Los ejemplos no limitativos de programas y algoritmos incluyen BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul *et al.*, NCB NLM NIH Bethesda Md. 20894; Altschul *et al.*, 1990). Están disponibles programas BLAST en línea de la Biblioteca Nacional de Medicina, por ejemplo, en [blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

55 Un experto en la técnica comprenderá que los canales iónicos activados por luz de la invención pueden identificarse basándose en la similitud u homología de secuencia con un canal iónico activado por luz dado a conocer en el presente documento. Se entenderá que pueden identificarse canales iónicos activados por luz adicionales usando alineación de secuencia con uno de los canales iónicos activados por luz o derivados de los mismos identificados en el presente documento.

60 Los canales iónicos activados por luz de la invención son polipéptidos de canal transmembrana que usan energía lumínica para abrirse, permitiendo la conductancia de iones a través de su poro, alterando así el potencial de la membrana en la que se expresan. Un ejemplo no limitativo de un ion que puede moverse a través de un poro de la invención incluye un ion de sodio, un ion de potasio, un ion de calcio, un protón, etc. Pueden usarse métodos de rutina para medir diferentes corrientes de iones para los canales iónicos activados por luz de la invención. Los canales iónicos activados por luz de la invención pueden activarse mediante luz y/o pulsos de luz sostenidos y

permitiendo la conductancia de iones tras la activación; los canales iónicos activados por luz de la invención pueden despolarizar células y alterar el voltaje en células y orgánulos en los que se expresan.

5 Las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico de rodopsina de *Chloromonas subdivisa*, *Chlamydomonas noctigama*, *Stigeoclonium helveticum* de tipo natural y modificadas (derivadas) descritas y usadas en el presente documento son secuencias “aisladas”. Tal como se usa en el presente documento, el término “aislado” usado en referencia a un polinucleótido, secuencia de ácido nucleico, o secuencia de polipéptido de una rodopsina, significa un polinucleótido, secuencia de ácido nucleico, o secuencia de polipéptido que está separada de su entorno nativo y presente en cantidad suficiente para permitir su identificación o uso. Por tanto, un polinucleótido, secuencia de ácido nucleico o secuencia de polipéptido aislado de la invención es un polinucleótido, secuencia de ácido nucleico, o secuencia de polipéptido que no es parte de o está incluido en su célula u organismo de tipo natural nativo. Por ejemplo, un ácido nucleico o secuencia de polipéptido puede expresarse de manera natural en una célula u organismo de un miembro del género *Chloromonas*, pero cuando la secuencia no es parte de o está incluida en una célula u organismo de *Chloromonas* se considera que está aislada. De manera similar, un ácido nucleico o secuencia de polipéptido puede expresarse de manera natural en una célula u organismo de un miembro del género *Chlamydomonas*, pero cuando la secuencia no es parte de o está incluida en una célula u organismo de *Chlamydomonas*, se considera que está aislada. De manera similar, un ácido nucleico o secuencia de polipéptido puede expresarse de manera natural en una célula u organismo de un miembro del género *Stigeoclonium*, pero cuando la secuencia no es parte de o está incluida en una célula u organismo de *Stigeoclonium*, se considera que está aislada. Por tanto, un ácido nucleico o secuencia de polipéptido de un polipéptido o ácido nucleico de canales iónicos activados por luz de *Chloromonas*, *Chlamydomonas*, *Stigeoclonium*, u otro, que está presente en un vector, en una célula, tejido u organismo heterólogo, etc., todavía se considera que es una secuencia aislada. Tal como se usa en el presente documento el término “huésped” usado en referencia a una membrana o célula en la que se expresa un canal iónico activado por luz de la invención, significa una membrana o célula que no es una célula o membrana en la que se expresa el canal iónico activado por luz en la naturaleza. Por tanto, una membrana, célula, tejido u organismo huésped para una molécula de canal iónico activado por luz de la invención (tal como un polipéptido de canal iónico activado por luz o su ácido nucleico codificante), tal como se usa en el presente documento es una membrana, célula, tejido u organismo en el que la molécula de canal iónico activado por luz de la invención no se produce de manera natural y en el que el canal iónico activado por luz no se expresa de manera natural. Los ejemplos de una membrana, célula, tejido u organismo huésped incluyen, pero no se limitan a membranas, células y tejidos de mamífero (incluyendo, pero no limitándose a, primate no humano, ser humano, etc.), insecto y ave; así como organismos tales como mamíferos, insectos y aves. El término “heterólogo” tal como se usa en el presente documento, significa una membrana, célula, tejido u organismo que no es la célula, tejido u organismo nativo, y un polipéptido de canal iónico activado por luz de la invención o su ácido nucleico codificante pueden estar presentes en una membrana, célula, tejido u organismo heterólogo. Los términos “proteína”, “polipéptidos” y “péptidos” se usan de manera intercambiable en el presente documento.

#### *Secuencias de canales iónicos activados por luz que incluyen secuencias modificadas y derivadas*

40 Un canal iónico activado por luz de la invención puede comprender una secuencia de polipéptido de tipo natural o puede ser una secuencia de polipéptido modificada. Tal como se usa en el presente documento, el término “modificado” o “modificación” en referencia a un ácido nucleico o secuencia de polipéptido se refiere a un cambio de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más aminoácidos en la secuencia en comparación con la secuencia de tipo natural u otra de la que se derivó. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido modificada puede ser idéntica a una secuencia de polipéptido de tipo natural excepto porque tiene una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, deleciones, inserciones de aminoácido, o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones de la invención, una secuencia modificada puede incluir una, dos, tres, cuatro o más sustituciones de aminoácido en una secuencia de polipéptido de canal iónico activado por luz de tipo natural, o en cualquier otra secuencia de polipéptido de canal iónico activado por luz de la invención.

50 La invención, en algunos aspectos también incluye polipéptidos de canales iónicos activados por luz que tienen una o más sustituciones u otras modificaciones de las descritas en el presente documento. Por ejemplo, las secuencias de polipéptidos de canales iónicos activados por luz proporcionadas en el presente documento pueden modificarse con una o más sustituciones, deleciones, inserciones u otras modificaciones y tales canales iónicos activados por luz derivados pueden someterse a prueba usando métodos descritos en el presente documento para determinar las características que incluyen, pero no se limitan a: expresión, localización, activación y despolarización celular en respuesta al contacto con luz usando métodos dados a conocer en el presente documento. Las modificaciones a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, sustituciones de aminoácido conservativas, que producirán moléculas que tienen características funcionales similares a las de la molécula de la que se hacen tales modificaciones. Las sustituciones de aminoácido conservativas son sustituciones que no dan como resultado un cambio significativo en la actividad o estructura terciaria de una proteína o polipéptido seleccionado. Tales sustituciones implican normalmente reemplazar un residuo de aminoácido seleccionado por un residuo diferente que tiene propiedades fisicoquímicas similares. Por ejemplo, la sustitución de Glu por Asp se considera una sustitución conservativa porque ambos son aminoácidos cargados negativamente de tamaño similar. Los expertos en la técnica conocen las agrupaciones de aminoácidos por las propiedades fisicoquímicas. Los siguientes grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: 1) alanina (A), glicina (G); 2) ácido aspártico (D),

ácido glutámico (E); 3) asparagina (N), glutamina (Q); 4) arginina (R), lisina (K); 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); 6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W); 7) serina (S), treonina (T); y 8) cisteína (C), metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins* (1984)). Pueden identificarse y someterse a prueba canales iónicos activados por luz que incluyen modificaciones, que incluyen pero no se limitan a una, dos, tres, cuatro o más sustituciones de aminoácido conservativas para determinar las características que incluyen, pero no se limitan a: expresión, localización, activación y despolarización celular y efectos de despolarización en respuesta al contacto con la luz usando métodos dados a conocer en el presente documento. Tal como se describe en otra parte en el presente documento, algunas regiones de polipéptido tales como la región transmembrana de un canal iónico activado por luz de la invención, pueden incluir modificaciones que dan como resultado una identidad menos de 100%, el 95%, el 90%, el 85%, el 80%, el 75% con la secuencia de la que se derivan, aún puede tener una identidad de al menos el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99%, o el 100% en sus regiones no transmembrana del polipéptido.

La identidad de secuencia puede determinarse usando técnicas convencionales conocidas en la técnica.

Los polipéptidos de los canales iónicos activados por luz de la invención pueden ser más cortos o más largos que las secuencias de polipéptidos de canales iónicos activados por luz expuestas en el presente documento. Por tanto, un polipéptido de canal iónico activado por luz puede ser un polipéptido de longitud completa o fragmento funcional del mismo. Además, pueden usarse ácidos nucleicos de la invención para obtener regiones codificantes adicionales, y por tanto secuencias de polipéptido adicionales, usando técnicas conocidas en la técnica.

En algunos aspectos de la invención, secuencias de polipéptido de canal iónico activado por luz sustancialmente similares pueden tener una identidad de al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, o el 99% o el 100% con respecto a la secuencia de polipéptido de canal iónico activado por luz ChR88. Pueden usarse herramientas y métodos de alineación conocidos en la técnica para alinear secuencias sustancialmente similares que permiten la identificación de la posición de los aminoácidos que puede modificarse tal como se describe en el presente documento para preparar un canal iónico activado por luz de la invención. Pueden usarse herramientas y programas informáticos de análisis de secuencia convencionales, tales como los usados para alineación, etc. para identificar canales iónicos activados por luz de la invención que comparten una o más propiedades funcionales con un canal iónico activado por luz descrito en el presente documento.

Las modificaciones de secuencia pueden ser de una o más de tres clases: sustituciones, inserciones o deleciones. Estas secuencias modificadas, (que también pueden denominarse variantes o derivados) se preparan ordinariamente mediante mutagénesis específica de sitio de ácidos nucleicos en el ADN que codifica para un polipéptido de canal iónico activado por luz, usando un casete o mutagénesis de PCR u otras técnicas conocidas en la técnica, para producir ADN que codifica para el canal iónico activado por luz modificado, y después expresando el ADN en cultivo celular recombinante. Las variantes de secuencias de aminoácidos se caracterizan por la naturaleza predeterminada de la variación, una característica que las diferencia de variaciones entre especie o alélicas que se producen de manera natural de los canales iónicos activados por luz de la invención. Los canales iónicos activados por luz modificados presentan generalmente la misma actividad biológica cualitativa que el canal iónico activado por luz que se produce de manera natural (por ejemplo, tipo natural), aunque también pueden seleccionarse variantes que tienen características modificadas.

Puede predeterminarse un sitio o región para introducir una modificación de secuencia de aminoácidos, y no es necesario predeterminar la mutación *per se*. Por ejemplo, para optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, puede llevarse a cabo mutagénesis al azar en el codón o región diana y examinarse el canal iónico activado por luz modificado expresado para determinar la combinación óptima de actividad deseada. Se conocen bien técnicas para realizar mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en ADN que tiene una secuencia bien conocida, por ejemplo, mutagénesis mediante cebador de M13 y mutagénesis mediante PCR.

Las sustituciones de aminoácido son normalmente de residuos individuales; y las inserciones serán habitualmente del orden de desde aproximadamente 1 hasta 20 aminoácidos, aunque pueden tolerarse inserciones considerablemente mayores. Las deleciones pueden oscilar entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 residuos, aunque en algunos casos las deleciones pueden ser mucho mayores.

Pueden usarse sustituciones, deleciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas para llevar a un canal iónico activado por luz modificado final de la invención. Generalmente estos cambios se realizan en algunos aminoácidos para minimizar la alteración de la molécula. Sin embargo, pueden tolerarse cambios mayores en determinadas circunstancias.

Las variantes de canales iónicos activados por luz expuestas en el presente documento pueden presentar la misma actividad cualitativa de canal iónico activado por luz que ChR88 pero pueden mostrar algunas características alteradas tales como fotocorriente, estabilidad, velocidad, compatibilidad y toxicidad alteradas, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, el polipéptido puede modificarse de manera que tenga una fotocorriente aumentada y/o tenga menos toxicidad que otro polipéptido de canal iónico activado por luz.

Un polipéptido de canal iónico activado por luz modificado (o derivado) de la invención puede incorporar

aminoácidos no naturales así como aminoácidos naturales. Un aminoácido no natural puede incluirse en un canal iónico activado por luz de la invención para potenciar una característica tal como fotocorriente, estabilidad, velocidad, compatibilidad, o para reducir la toxicidad, etc.

5 Según los principios de esta invención, el rendimiento de las moléculas o clases de moléculas de canales iónicos activados por luz puede ajustarse para uso óptimo, incluido en el contexto de su uso junto con otras moléculas o aparato óptico. Por ejemplo, con el fin de lograr un contraste óptimo para estimulación por múltiples colores, puede desearse o bien mejorar o bien disminuir el rendimiento de una molécula con respecto a otra, mediante la anexión de secuencias que potencian la circulación o creación de variantes genéticas mediante mutagénesis dirigida al sitio, evolución dirigida, transposiciones genéticas, o alteración del uso de codones. Las moléculas o clases de moléculas de canales iónicos activados por luz pueden tener una sensibilidad espectral inherentemente variable. Esto puede usarse ventajosamente *in vivo* (donde la dispersión y la absorción variarán con respecto a la longitud de onda, la coherencia y la polarización), ajustando la linealidad o no linealidad de la respuesta a la iluminación óptica con respecto al tiempo, la potencia y el historial de iluminación.

15 En algunas realizaciones, la invención incluye el uso de mutagénesis dirigida al sitio direccionada en residuos de aminoácido específicos de canalrodopsinas de *Chlamydomonas noctigama*. Pueden identificarse ubicaciones específicas para mutaciones individuales y pueden situarse solas, o en combinación con dos o más mutaciones adicionales en una secuencia de canalrodopsina y someterse a prueba con respecto a su amplitud de fotocorriente y activación. Por tanto, las secuencias de los canales iónicos activados por luz de la invención, y/o secuencias de canalrodopsina similares pueden modificarse y pueden someterse a prueba los polipéptidos resultantes usando métodos dados a conocer en el presente documento.

25 Otro aspecto de la invención proporciona secuencias de ácido nucleico que codifican para un canal iónico activado por luz de la invención. Un experto en la técnica entenderá que los polipéptidos de canales iónicos activados por luz de la presente invención pueden codificarse por diversos ácidos nucleicos. Cada aminoácido en la proteína está representado por uno o más conjuntos de 3 ácidos nucleicos (codones). Debido a que muchos aminoácidos están representados por más de un codón, no hay una única secuencia de ácido nucleico que codifique para una proteína dada. Los expertos en la técnica entienden bien cómo obtener un ácido nucleico que puede codificar para los polipéptidos de los canales iónicos activados por luz de la invención conociendo la secuencia de aminoácidos de la proteína. Una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido o proteína es el "gen" de ese polipéptido o proteína. Un gen puede ser ARN, ADN u otro ácido nucleico que codificará para el polipéptido o proteína.

35 Se entiende en la técnica que los sistemas de codones en diferentes organismos pueden ser ligeramente diferentes, y que, por tanto, cuando se desea la expresión de una proteína dada de un organismo dado, puede modificarse la secuencia de ácido nucleico para la expresión dentro de ese organismo. Por tanto, en algunas realizaciones, un polipéptido de canal iónico activado por luz de la invención está codificado por una secuencia de ácido nucleico con codones optimizados de mamífero que, en algunas realizaciones, puede ser una secuencia de ácido nucleico con codones optimizados de ser humano. Un aspecto de la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica para un canal iónico activado por luz que está optimizado para la expresión con una célula de mamífero. En algunas realizaciones de la invención, un ácido nucleico que codifica para un canal iónico activado por luz de la invención incluye una secuencia de ácido nucleico optimizada para la expresión en una célula humana.

#### Administración de canales iónicos activados por luz

45 La administración de un polipéptido de canal iónico activado por luz a una célula y/o la expresión de un canal iónico activado por luz en una célula puede realizarse usando medios de administración conocidos en la técnica.

50 Un polipéptido de canal iónico activado por luz de la invención puede incluirse en una proteína de fusión. Se conoce bien en la técnica cómo preparar y utilizar proteínas de fusión que comprenden una secuencia de polipéptido. En determinadas realizaciones de la invención, puede usarse una proteína de fusión para administrar un canal iónico activado por luz a una célula y también puede usarse en algunas realizaciones para dirigir un canal iónico activado por luz de la invención a células específicas o a células, tejidos o regiones específicos en un sujeto. Puede usarse direccionamiento y secuencias de direccionamiento adecuadas para administrar a una célula, tejido o región deseados usando procedimientos conocidos en la técnica.

60 Un polipéptido de canal iónico activado por luz de la invención puede ser no tóxico, o sustancialmente no tóxico, en células en las que se expresa. En ausencia de luz, un canal iónico activado por luz de la invención no altera significativamente la salud celular o la actividad eléctrica en curso en la célula en la que se expresa.

65 Un canal iónico activado por luz de la invención puede introducirse genéticamente en una membrana celular, y se proporcionan reactivos y métodos para la expresión genéticamente dirigida del polipéptido de canal iónico activado por luz (ChR88 o un derivado del mismo). Puede usarse direccionamiento genético para administrar polipéptidos de canales iónicos activados por luz a tipos de células específicos, a subtipos de células específicos, a regiones espaciales específicas dentro de un organismo, y a regiones subcelulares dentro de una célula. Direccionamiento genético también se refiere al control de la cantidad de polipéptido de canal iónico activado por luz expresado, y al

momento de la expresión.

Puede proporcionarse un reactivo para la expresión genéticamente dirigida de un polipéptido de canal iónico activado por luz, en el que el reactivo comprende un vector que contiene el gen para el polipéptido de canal iónico activado por luz.

Tal como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede transportar entre diferentes entornos genéticos otro ácido nucleico al que se ha unido operativamente. El término "vector" también se refiere a un virus u organismo que puede transportar la molécula de ácido nucleico. Un tipo de vector es un episoma, es decir, una molécula de ácido nucleico que puede realizar replicación extracromosómica. Algunos vectores útiles son los que pueden realizar replicación y/o expresión autónoma de los ácidos nucleicos a los que se unen. Los vectores que pueden dirigir la expresión de genes a los que se unen operativamente también se denominan en el presente documento "vectores de expresión". Otros vectores útiles incluyen, pero no se limitan a virus tales como lentivirus, retrovirus, adenovirus y fagos. Los vectores útiles en la invención pueden insertar genéticamente polipéptidos de canales iónicos activados por luz en células que se dividen y que no se dividen y pueden insertar polipéptidos de canales iónicos activados por luz en células que son células *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*.

Los vectores útiles en la invención pueden incluir secuencias adicionales que incluyen, pero no se limitan a, una o más secuencias señal y/o secuencias promotoras, o una combinación de las mismas. Los vectores de expresión y métodos de su uso se conocen bien en la técnica. Se proporcionan ejemplos no limitativos de vectores de expresión adecuados y métodos para su uso en el presente documento.

En determinadas realizaciones de la invención, un vector puede ser un lentivirus que comprende el gen para un canal iónico activado por luz de la invención, basándose en ChR88 o un derivado o variante del mismo. Un lentivirus es un ejemplo no limitativo de un vector que puede usarse para crear una línea celular estable. El término "línea celular", tal como se usa en el presente documento, es un cultivo celular establecido que continuará proliferando dado el medio apropiado.

Los promotores que pueden usarse en métodos y vectores de la invención incluyen, pero no se limitan a, promotores específicos de células o promotores generales. En la técnica se conocen bien métodos para seleccionar y usar promotores específicos de células y promotores generales. Puede usarse un ejemplo no limitativo de un promotor de uso general que permite la expresión de un polipéptido de canal iónico activado por luz en una amplia variedad de tipos de células, por tanto, un promotor para un gen que se expresa ampliamente en una variedad de tipos de células, por ejemplo un "gen de mantenimiento" para expresar un polipéptido de canal iónico activado por luz en una variedad de tipos de células. Se proporcionan ejemplos no limitativos de promotores generales en otra parte en el presente documento y en la técnica se conocen bien promotores alternativos adecuados.

En determinadas realizaciones de la invención, un promotor puede ser un promotor inducible, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a con tetraciclina o sin tetraciclina, o Cre-ER inducible por tamoxifeno.

#### *Métodos de uso de los canales iónicos activados por luz de la invención*

Los canales iónicos activados por luz de la invención son muy adecuados para seleccionar como diana células y alterar específicamente actividades celulares asociadas a voltaje. Los canales iónicos activados por luz de la invención pueden utilizarse para introducir cationes en las células, activando así vías de señalización endógenas (tales como la señalización dependiente de calcio), y luego se aplican fármacos que modulan la respuesta de la célula (usando un colorante sensible a calcio o a voltaje). Esto permite nuevos tipos de selección de fármacos usando sólo luz para activar los canales de interés, y usando sólo luz para leer los efectos de un fármaco sobre los canales de interés.

Chrimson puede activarse mediante rojo lejano y, por tanto, permite la excitación de células con un color de luz hasta ahora no usado en biotecnología para la excitación de células. Al usar, por ejemplo, Chrimson y Chronos juntos, se hace posible la excitación de dos poblaciones diferentes de células en el mismo tejido o en la misma placa de cultivo. Esta excitación simultánea de dos colores es particularmente prometedora para tejidos complejos como el cerebro.

El rendimiento de las moléculas o clases de moléculas mencionadas anteriormente puede ajustarse para un uso óptimo, particularmente en el contexto de su uso junto con otras moléculas o aparato óptico. Tal ajuste puede realizarse usando métodos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, con el fin de lograr un contraste óptimo para la estimulación por múltiples colores, puede desearse o bien mejorar o bien disminuir el rendimiento de una molécula con respecto a otra, mediante la anexión de secuencias que potencian la circulación o creación de variantes genéticas mediante mutagénesis dirigida al sitio, evolución dirigida, transposiciones genéticas, o alteración del uso de codones. Las moléculas o clases de moléculas pueden tener una sensibilidad espectral inherentemente variable que puede ser funcionalmente ventajosa *in vivo* (donde la dispersión y la absorción variarán con respecto a la longitud de onda, la coherencia y la polarización), ajustando la linealidad o no linealidad de la respuesta a la

iluminación óptica con respecto al tiempo, la potencia y el historial de iluminación.

5 Pueden introducirse cationes en las células, activando así vías de señalización endógenas (tales como la señalización dependiente de calcio), y pueden aplicarse fármacos que modulan la respuesta de la célula (usando un colorante sensible a calcio o a voltaje). Esto permite nuevos tipos de selección de fármacos usando sólo luz para activar los canales de interés, y usando sólo luz para leer los efectos de un fármaco sobre los canales de interés.

10 El canal activado por luz puede usarse para disminuir el pH de la célula. Puede usarse una técnica de este tipo para tratar la alcalosis.

15 Pueden usarse bombas de protones activadas por luz para determinar el efecto acoplado de hiperpolarización y alcalinización intracelular. Por ejemplo, ambos fenómenos pueden inducir disparos neuronales espontáneos en neuronas desencadenando corrientes catiónicas inducidas por hiperpolarización o hiperexcitabilidad dependiente del pH.

Es posible generar voltaje subcelular o gradientes de pH, particularmente en las sinapsis y en vesículas sinápticas para alterar la transmisión sináptica, y en mitocondrias para mejorar la síntesis de ATP.

20 Puede usarse luz roja lejana (660 nm) para realizar estimulación no invasiva transcraneal y/o transdural para modular circuitos neuronales.

25 Actualmente se han puesto en práctica diversas composiciones de materia, por ejemplo: se han preparado plásmidos que codifican para los genes anteriores; se han preparado lentivirus que portan cargas útiles que codifican para los genes anteriores; se han preparado virus adenoasociados que portan cargas útiles que codifican para los genes anteriores; se han preparado células que expresan los genes anteriores; y se han preparado animales que expresan esos genes. (Véase, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense 20110165681).

30 Se demostró la operación de trabajo de un prototipo de esta invención expresando genéticamente moléculas de canales iónicos activados por luz de la invención en células excitables, iluminando las células con longitudes de onda de luz adecuadas y demostrando una despolarización rápida de las células en respuesta a la luz, así como la liberación rápida de la despolarización al cesar la luz. Dependiendo de la implementación particular, la invención permite un control lumínico de las funciones celulares *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*.

35 Las canalrodopsinas de la invención y derivados de las mismas pueden usarse en células de mamíferos sin necesidad de ningún tipo de complemento químico, y en condiciones de entorno celular y concentraciones iónicas normales. Por ejemplo, se han usado genes que codifican para canalrodopsinas de *Chlamydomonas*. Estas secuencias en forma optimizada de ratón o humanizada permiten la despolarización a las longitudes de onda descritas en el presente documento.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término "canal iónico" significa un polipéptido transmembrana que forma un poro, que cuando se activa se abre, permitiendo la conductancia de iones a través del poro a través de la membrana. Muchos canales iónicos no se expresan bien en una célula y/o su expresión puede ser tóxica para la célula y reducir la salud celular. Por tanto, fue necesario preparar y seleccionar numerosos polipéptidos de canales iónicos activados por luz de canalrodopsinas para identificar canales iónicos activados por luz de la invención que pueden expresarse en células sin reducir significativamente la salud y viabilidad celulares.

50 Se ha encontrado que los canales iónicos activados por luz de la invención son adecuados para la expresión y el uso en células de mamíferos sin necesidad de ningún tipo de complemento químico, y en condiciones normales de entorno celular y concentraciones iónicas. Se ha encontrado que los canales iónicos activados por luz de la invención difieren de los canales previamente identificados. Los canales iónicos activados por luz de Chrimson se activan a longitudes de onda de luz en un intervalo de 365 nm a 700 nm, con una activación óptima a partir de luz que oscila entre 530 nm y 640 nm, y una activación óptima pico a una longitud de onda de 590 nm.

#### 55 *Células y sujetos*

Una célula usada en la invención puede ser una célula excitable o una célula no excitable. Una célula en la que puede expresarse un canal iónico activado por luz de la invención y que puede usarse en la invención incluye células procariotas y eucariotas. Las células útiles incluyen pero no se limitan a células de mamíferos. Los ejemplos de células en las que puede expresarse un canal iónico activado por luz de la invención son células excitables, que incluyen células que pueden producir y responder a señales eléctricas. Los ejemplos de tipos de células excitables incluyen, pero no se limitan a una neurona, células musculares, células cardíacas y células secretoras (tales como células pancreáticas, células de médula suprarrenal, células de la hipófisis, etc.).

65 Los ejemplos no limitativos de células que pueden usarse en la invención incluyen: células neuronales, células del sistema nervioso, células cardíacas, células del sistema circulatorio, células del sistema visual, células del sistema auditivo, células secretoras, células endocrinas o células musculares. En algunas realizaciones, una célula usada

junto con la invención puede ser una célula normal sana, que se desconoce que tenga una enfermedad, trastorno o estado anómalo. En algunas realizaciones, una célula usada junto con la invención puede ser una célula anómala, por ejemplo, una célula que se ha diagnosticado que tiene un trastorno, enfermedad o estado, incluyendo, pero sin limitarse a, una célula degenerativa, una célula que porta enfermedad neurológica, un modelo celular de una enfermedad o estado, una célula lesionada, etc. En algunas realizaciones de la invención, una célula puede ser una célula de control.

Los canales iónicos activados por luz de la invención pueden expresarse en células de cultivo, células en disolución, células obtenidas de sujetos, y/o células en un sujeto (células *in vivo*). Los canales iónicos activados por luz pueden expresarse y activarse en células cultivadas, tejidos cultivados (por ejemplo, preparaciones de cortes de cerebro, etc.), y en sujetos vivos, etc. Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" puede referirse a un ser humano, primate no humano, vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato, roedor, mosca o cualquier otro organismo vertebrado o invertebrado.

#### Controles y pruebas de compuesto candidato

Los canales iónicos activados por luz de la invención y métodos que usan los canales iónicos activados por luz de la invención pueden usarse para evaluar cambios en células, tejidos y sujetos en los que se expresan. Los canales iónicos activados por luz de la invención pueden usarse para identificar los efectos de compuestos candidatos en células, tejidos y sujetos. Los resultados de someter a prueba un canal iónico activado por luz de la invención pueden compararse ventajosamente con un control. En algunas realizaciones de la invención, pueden expresarse uno o más canales iónicos activados por luz de la invención (ChR88 o un derivado del mismo) en una población de células y usarse para someter a prueba el efecto de compuestos candidatos sobre las células.

Tal como se usa en el presente documento, un control puede ser un valor predeterminado, que puede adoptar una variedad de formas. Puede ser un único valor de corte, tal como una mediana o media. Puede establecerse basándose en grupos comparativos, tales como células o tejidos que incluyen el canal iónico activado por luz y se ponen en contacto con luz, pero no se ponen en contacto con el compuesto candidato y el mismo tipo de células o tejidos que se encuentran en la misma condición de prueba se ponen en contacto con el compuesto candidato. Otro ejemplo de grupos comparativos puede incluir células o tejidos que tienen un trastorno o estado y grupos sin el trastorno o estado. Otro grupo comparativo pueden ser células de un grupo con una historia familiar de una enfermedad o estado y células de un grupo sin tal historia familiar. Puede disponerse un valor predeterminado, por ejemplo, cuando una población sometida a prueba se divide por igual (o de manera desigual) en grupos basándose en los resultados de las pruebas. Los expertos en la técnica pueden seleccionar grupos de control y valores apropiados para su uso en métodos comparativos.

Como ejemplo no limitativo del uso de un canal iónico activado por luz para identificar un compuesto o agente terapéutico candidato, un canal iónico activado por luz de la invención puede expresarse en una célula excitable en cultivo o en un sujeto y la célula excitable puede ponerse en contacto con una luz que activa el canal iónico activado por luz y con un compuesto terapéutico candidato. En una realización, una célula de prueba que incluye un canal iónico activado por luz de la invención puede ponerse en contacto con una luz que despolariza la célula y también ponerse en contacto con un compuesto candidato. La célula, tejido y/o sujeto que incluye la célula puede monitorizarse para determinar la presencia o ausencia de un cambio que se produce en las condiciones de prueba frente a las condiciones de control. Por ejemplo, en una célula, un cambio puede ser un cambio en la despolarización o en una característica de la célula mediada por despolarización en la célula de prueba frente a una célula de control, y un cambio en la despolarización o la característica de la célula mediada por despolarización en la célula de prueba en comparación con el control puede indicar que el compuesto candidato tiene un efecto sobre la célula de prueba o tejido que incluye la célula. En algunas realizaciones, una característica de la célula mediada por despolarización puede ser un potencial de acción, cambio de pH en una célula, liberación de un neurotransmisor, etc. y en algunas realizaciones, puede incluir un efecto posterior en una o más células adicionales, que se produce debido a la despolarización de la célula que incluye el canal iónico activado por luz. Pueden usarse métodos conocidos en la técnica para evaluar la despolarización y las características de la célula mediadas por despolarización y cambios en la despolarización o en las características de la célula mediadas por despolarización tras la activación de un canal iónico activado por luz de la invención, con o sin contacto adicional con un compuesto candidato.

Los métodos de identificación de compuestos candidatos que se realizan en un sujeto, pueden incluir expresar un canal iónico activado por luz en un sujeto, poner en contacto el sujeto con una luz en condiciones adecuadas para activar el canal iónico activado por luz y despolarizar la célula, y administrar al sujeto un compuesto candidato. Entonces, el sujeto se monitoriza para determinar si se produce cualquier cambio que difiera de un efecto de control en un sujeto. Por tanto, por ejemplo, una célula en cultivo puede ponerse en contacto con una luz apropiada para activar un canal iónico activado por luz de la invención en presencia de un compuesto candidato. Puede medirse un resultado de tal contacto con el compuesto candidato y compararse con un valor de control como determinación de la presencia o ausencia de un efecto del compuesto candidato.

Los métodos de identificación de los efectos de compuestos candidatos que usan canales iónicos activados por luz

de la invención también incluyen etapas y ensayos adicionales para caracterizar adicionalmente un cambio identificado en la célula, tejido o sujeto cuando la célula se pone en contacto con el compuesto candidato. En algunas realizaciones, las pruebas en una célula, tejido o sujeto también pueden incluir una o más células que tienen un canal iónico activado por luz de la invención, y que también tienen uno, dos, tres o más canales iónicos activados por luz diferentes adicionales, en el que al menos uno, dos, tres, cuatro o más de los canales iónicos activados por luz adicionales se activan por contacto con luz que tiene una longitud de onda diferente que la usada para activar el canal iónico activado por luz de la invención de Chrimson o derivado del mismo.

En un ejemplo no limitativo de un método de identificación de fármaco candidato que se describe, pero no se reivindica, las células que incluyen un canal iónico activado por luz de la invención se despolarizan, desencadenando de ese modo la liberación de un neurotransmisor de la célula, y luego se aplican fármacos que modulan la respuesta de la célula a la despolarización (determinada usando, por ejemplo, métodos de pinzamiento zonal u otros medios conocidos en la técnica adecuados). Tales métodos permiten nuevos tipos de selección de fármaco usando sólo luz para activar los canales de interés, y usando sólo luz para leer los efectos de un fármaco sobre los canales y células que contienen canales de interés.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de canales iónicos activados por luz de la invención pueden usarse en sistemas y ensayos de prueba para evaluar la circulación de proteínas de membrana y la función fisiológica en sistemas expresados de manera heteróloga y el uso de canales activados por luz para despolarizar una célula.

En algunos aspectos que se describen pero no se reivindican, pueden realizarse ensayos de dos colores. Por ejemplo, Chronos (para activación con luz azul) y Chrimson (para activación con luz roja) pueden expresarse en células de conjuntos separadas que representan poblaciones neuronales no solapantes. Tras la expresión, la población de células puede exponerse a la luz y pueden optimizarse la longitud de onda y el momento y la "dosis" de luz. Tal como se usa en el presente documento, el término "dosis" en referencia a la luz, puede considerar la longitud de onda, la longitud de pulso, la intensidad, de la luz con la que se pone en contacto un canal iónico activado por luz de la invención.

Se proporciona un ejemplo no limitativo de un procedimiento para optimizar el uso de poblaciones de células activadas por dos colores, que se describe, pero no se reivindica, tal como sigue. Se pone en contacto una población que tiene Chronos y Chrimson expresadas en diferentes subpoblaciones con luz azul que tiene una longitud de onda de entre 400 nm y 500 nm, o entre 450 nm y 500 nm, y que tiene un ancho de pulso de entre 1 y 5 ms para la activación. Un ancho de pulso de 5 ms proporciona una diafonía subumbral mínima en la luz azul, que se define como <15 mV, <10 mV, y de manera óptima como <5 mV. La potencia de luz azul máxima que puede usarse se determina usando células que expresan Chrimson mediante pinzamiento zonal, iluminando con luz azul y midiendo la desviación de voltaje. Se usa de manera óptima la potencia de luz azul de manera que la desviación de voltaje máxima es <10 mV, que en algunas realizaciones puede ser de 0,4 a 0,6 mW/mm<sup>2</sup>. La potencia de luz azul óptima que puede usarse para accionar Chronos se determina usando las mismas condiciones que antes, excepto porque se usa una potencia de luz menor, tal como de 50 µW/mm<sup>2</sup> a 0,4 mW/mm<sup>2</sup>, que en algunas realizaciones puede ser de 0,2 mW/mm<sup>2</sup>. La potencia depende del sistema de expresión y del tipo de célula usados para preparar la población. La población puede ponerse en contacto con luz roja que tiene una longitud de onda de entre 600 nm y 700 nm, o entre 620 nm y 640 nm, y con un ancho de pulso de entre 1 y 5 ms para la activación, que en algunas realizaciones puede optimizarse a 5 ms. En determinadas realizaciones de la invención, la potencia de luz óptima para accionar Chrimson en el rojo puede determinarse aumentando las potencias de luz desde por ejemplo, 0,1 mW/mm<sup>2</sup> hasta 100 mW/mm<sup>2</sup>, o desde 0,5 mW/mm<sup>2</sup> hasta 10 mW/mm<sup>2</sup>. El método puede optimizarse de manera que se usa una potencia de luz roja mínima para lograr disparos neuronales del 100% para Chrimson.

Se entenderá que pueden expresarse otros conjuntos de 2, 3, 4 o más canales iónicos activados por luz en subpoblaciones separadas de una población de células y luego exponerse a dosis de luz de una manera tal como se describe en este documento para optimizar su uso en ensayos y tratamientos. Un ejemplo no limitativo de un procedimiento para preparar y usar una población de células activadas por múltiples luces es tal como sigue. Se expresa un primer canal iónico activado por luz en una primera subpoblación de una población de células; se expresa un segundo canal iónico activado por luz en una segunda subpoblación de la población de células, en el que las subpoblaciones primera y segunda son subpoblaciones no solapantes, y el primer canal iónico activado por luz y el segundo canal iónico activado por luz tienen intervalos de longitudes de onda de luz de activación que no se solapan completamente. La población de células se pone en contacto con una pluralidad de primeras dosis de prueba de luz que comprenden combinaciones de longitud de onda, ancho de pulso y potencia que activan la primera subpoblación, y se mide la desviación de voltaje transmembrana en una célula de la segunda subpoblación de células puestas en contacto con las primeras dosis de prueba de luz. Se determina la primera dosis de prueba de luz que incluye una potencia de luz máxima que activa el canal iónico activado por luz en la primera subpoblación de células y da como resultado una desviación de voltaje transmembrana subumbral mínima en la segunda subpoblación de células. La población de células se pone entonces en contacto con una pluralidad de primeras dosis de luz de prueba que comprenden una potencia menor que la potencia de primera luz máxima que se determinó, y se determinan una primera dosis de prueba de luz que activa el primer canal iónico activado por luz (a menores potencias). La población de células se pone entonces en contacto con una pluralidad de segundas dosis de prueba de luz que incluyen combinaciones de longitud de onda, ancho de pulso y potencia de luz que activan la segunda

subpoblación, y se determina una segunda dosis de prueba de luz que comprende una segunda potencia de luz que activa la segunda subpoblación de células. Pueden realizarse ensayos usando una población de células de este tipo, que incluye poner en contacto la población de células con la primera dosis de prueba de luz y la segunda dosis de prueba de luz determinadas usando las etapas anteriores. El procedimiento descrito anteriormente de optimización de los parámetros de dosis de luz para canales iónicos activados por múltiples luces puede usarse para diseñar e implementar ensayos que incluyen los canales iónicos activados por luz de la invención, así como otros canales iónicos activados por luz que se conocen en la técnica.

#### *Métodos de tratamiento*

La invención reivindicada proporciona un polipéptido de canal iónico activado por luz para su uso en un método de tratamiento médico de un sujeto, tal como se define en la reivindicación 9. La invención reivindicada también proporciona un polipéptido de canal iónico activado por luz, un ácido nucleico o un vector para su uso en un método de tratamiento de un trastorno en un sujeto, tal como se define en la reivindicación 11. Tales métodos de tratamiento pueden incluir administrar a un sujeto que necesita tal tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un canal iónico activado por luz de la invención para tratar el trastorno. Se entenderá que un tratamiento puede ser un tratamiento profiláctico o puede ser un tratamiento administrado tras el diagnóstico de una enfermedad o estado. Un tratamiento de la invención puede reducir o eliminar un síntoma o característica de un trastorno, enfermedad o estado o puede eliminar el trastorno, enfermedad o estado por sí mismo. Se entenderá que un tratamiento de la invención puede reducir o eliminar el avance de una enfermedad, trastorno o estado y en algunos casos puede dar como resultado la regresión de la enfermedad, trastorno o estado. No es necesario que un tratamiento elimine completamente la enfermedad, trastorno o estado para ser eficaz. En algunas realizaciones de la invención, uno o más canales iónicos activados por luz de la invención (ChR88 o un derivado del mismo) pueden expresarse en una población de células y usarse para tratar un trastorno o estado.

La administración de un canal iónico activado por luz de la invención puede incluir la administración de una composición farmacéutica que incluye una célula, en la que la célula expresa el canal iónico activado por luz. La administración de un canal iónico activado por luz de la invención puede incluir la administración de una composición farmacéutica que incluye un vector, en la que el vector comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para el canal iónico activado por luz y la administración del vector da como resultado la expresión del canal iónico activado por luz en una célula en el sujeto.

Una cantidad eficaz de un canal iónico activado por luz es una cantidad que aumenta el nivel del canal iónico activado por luz en una célula, tejido o sujeto hasta un nivel que es beneficioso para el sujeto. Una cantidad eficaz también puede determinarse evaluando los efectos fisiológicos de la administración en una célula o sujeto, tal como una disminución en los síntomas tras la administración. Un experto habitual en la técnica conocerá otros ensayos y estos pueden emplearse para medir el nivel de respuesta a un tratamiento. La cantidad de un tratamiento puede variar, por ejemplo, aumentando o disminuyendo la cantidad del canal iónico activado por luz administrado, cambiando la composición terapéutica en la que se administra el canal iónico activado por luz, cambiando la vía de administración, cambiando el momento de dosificación, cambiando cantidades y parámetros de activación de un canal iónico activado por luz de la invención, y así sucesivamente. La cantidad eficaz variará con el estado particular que está tratándose, la edad y el estado físico del sujeto que está tratándose; la gravedad del estado, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia coincidente (si la hay), la vía específica de administración, y factores similares dentro del conocimiento y la experiencia del profesional sanitario. Por ejemplo, una cantidad eficaz puede depender de la ubicación y el número de células en el sujeto en el que va a expresarse el canal iónico activado por luz. Una cantidad eficaz también puede depender de la ubicación del tejido que va a tratarse.

Las cantidades eficaces también dependerán, por supuesto, del estado particular que está tratándose, la gravedad del estado, los parámetros del paciente individual incluyendo edad, estado físico, estatura y peso, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia coincidente (si la hay), la vía específica de administración y factores similares dentro del conocimiento y la experiencia del profesional sanitario. Estos factores los conocen bien los expertos habituales en la técnica y pueden abordarse únicamente con experimentación de rutina. Se prefiere generalmente que se use una dosis máxima de una composición para aumentar el nivel de un canal iónico activado por luz, y/o para alterar la duración o el momento de activación de un canal iónico activado por luz en un sujeto (solo o en combinación con otros agentes terapéuticos), es decir, la dosis o cantidad más alta segura según una opinión médica razonable. Sin embargo, los expertos habituales en la técnica entenderá que un paciente puede insistir en una dosis menor o dosis tolerable por razones médicas, razones psicológicas o prácticamente por cualquier otra razón.

Un canal iónico activado por luz de la invención (ChR88, o un derivado del mismo) puede administrarse usando métodos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, se administra un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de canal iónico activado por luz de la invención a un sujeto y en determinadas realizaciones se administra un polipéptido de canal iónico activado por luz a un sujeto. La manera y la dosificación administrada pueden ajustarse por el médico o veterinario individual, particularmente en el caso de cualquier complicación. La cantidad absoluta administrada dependerá de una variedad de factores, incluyendo el material seleccionado para la administración, si la administración es en dosis individuales o múltiples, y los parámetros de un sujeto individual

incluyendo edad, estado físico, estatura, peso y la fase de la enfermedad o estado. Estos factores los conocen bien los expertos habituales en la técnica y pueden abordarse únicamente con experimentación de rutina.

Las composiciones farmacéuticas que administran canales iónicos activados por luz de la invención pueden administrarse solas, en combinación entre sí, y/o en combinación con otras terapias farmacológicas, u otros regímenes de tratamiento que se administran a sujetos. Una composición farmacéutica usada contiene preferiblemente una cantidad eficaz de un compuesto terapéutico que aumentará el nivel de un polipéptido de canal iónico activado por luz hasta un nivel que produce la respuesta deseada en una unidad de peso o volumen adecuada para la administración a un sujeto.

Puede elegirse la dosis de una composición farmacéutica que se administra a un sujeto para aumentar el nivel de canal iónico activado por luz en células del sujeto según diferentes parámetros, en particular según el modo de administración usado y el estado del sujeto. Otros factores incluyen el periodo de tratamiento deseado. En el caso de que una respuesta en un sujeto sea insuficiente a las dosis iniciales aplicadas, pueden emplearse dosis mayores (o dosis mayores de manera eficaz mediante una vía de administración diferente, más localizada) en la medida en que lo permite la tolerancia del paciente. La cantidad y el momento de activación de un canal iónico activado por luz de la invención (por ejemplo, longitud de onda de luz, longitud de contacto de luz, etc.) que se ha administrado a un sujeto también pueden ajustarse basándose en la eficacia del tratamiento en un sujeto particular. Pueden determinarse los parámetros para la iluminación y activación de canales iónicos activados por luz que se han administrado a un sujeto usando métodos conocidos en la técnica y sin requerir experimentación excesiva.

Un experto habitual en la técnica conocerá diversos modos de administración que pueden usarse para administrar de manera eficaz una composición farmacéutica para aumentar el nivel de un canal iónico activado por luz de la invención en una célula, tejido o región corporal deseados de un sujeto. Los métodos para administrar una composición de este tipo u otro compuesto farmacéutico de la invención pueden ser administración tópica, intravenosa, oral, intracavitaria, intratecal, intrasinoval, bucal, sublingual, intranasal, transdérmica, intravítrea, subcutánea, intramuscular e intradérmica. La invención no está limitada por los modos particulares de administración dados a conocer en el presente documento. Las referencias convencionales en la técnica (por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, 1990) proporcionan modos de administración y formulaciones para la administración de diversas preparaciones y formulaciones farmacéuticas en portadores farmacéuticos. Un experto habitual en la técnica conocerá otros protocolos que son útiles para la administración de un compuesto terapéutico de la invención, en los que la cantidad de dosis, el esquema de administración, los sitios de administración, el modo de administración (por ejemplo, intraórgano) y similares variarán de los presentados en el presente documento.

Se lleva a cabo la administración de una célula o vector para aumentar los niveles de canal iónico activado por luz en un mamífero distinto de un ser humano; y la administración y el uso de los canales iónicos activados por luz de la invención, por ejemplo para fines de pruebas o fines terapéuticos veterinarios, sustancialmente en las mismas condiciones que se describieron anteriormente. Un experto habitual en la técnica entenderá que esta invención puede aplicarse tanto a seres humanos como a animales. Por tanto, se pretende que se use esta invención en zootecnia y medicina veterinaria así como en terapéutica humana.

Puede aplicarse un canal iónico activado por luz de la invención a células que incluyen pero no se limitan a una célula neuronal, una célula del sistema nervioso, una neurona, una célula cardíaca, una célula del sistema circulatorio, una célula del sistema visual, una célula del sistema auditivo, una célula muscular, o una célula endocrina, etc. Los trastornos y estados que pueden tratarse incluyen lesión, daño cerebral, estados neurológicos degenerativos (por ejemplo, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer), convulsión, pérdida de visión, pérdida de audición, etc.

#### *Trastornos, enfermedades y estados*

los canales iónicos activados por luz de la invención pueden usarse para dirigirse a células y membranas, y para alterar actividades celulares asociadas al voltaje. Un canal iónico activado por luz de la invención puede usarse para disminuir el pH de una célula en la que se expresa. Una técnica de este tipo puede usarse para tratar la alcalosis.

Se describen, pero no se reivindican, métodos para usar bombas de protones activadas por luz junto con el uso de canales iónicos activados por luz de la invención para determinar el efecto acoplado de hiperpolarización y alcalinización intracelular. Por ejemplo, ambos fenómenos pueden inducir disparos neuronales espontáneos en neuronas desencadenando corrientes catiónicas inducidas por hiperpolarización o hiperexcitabilidad dependiente del pH.

Se describe, pero no se reivindica, la expresión de los canales iónicos activados por luz de la invención en membranas celulares y luego la activación de los canales iónicos activados por luz y la generación de voltaje subcelular o gradientes de pH, particularmente en las sinapsis y en vesículas sinápticas para alterar la transmisión sináptica, y e mitocondrias para mejorar la síntesis de ATP.

La invención reivindicada proporciona un polipéptido de canal iónico activado por luz para su uso en un método de

tratamiento médico de un sujeto, tal como se define en la reivindicación 9. En algunas realizaciones, los canales iónicos activados por luz de la invención pueden usarse para el tratamiento de trastornos del sistema visual, por ejemplo, para tratar reducción o pérdida de visión. Puede administrarse un canal iónico activado por luz de la invención a un sujeto que tiene una reducción o pérdida de visión y el canal iónico activado por luz expresado puede funcionar como células sensibles a la luz en el sistema visual, permitiendo así una mejora de la función visual en el sujeto.

Se describe, pero no se reivindica, preparar secuencias de ácido nucleico y secuencias de polinucleótido; expresar en células y membranas los polipéptidos codificados por las secuencias de ácido nucleico y polinucleótido preparadas; iluminar las células y/o membranas con luz adecuada, y demostrar la despolarización rápida de la células y/o un cambio en la conductancia a través la membrana en respuesta a la luz, así como la liberación rápida de despolarización tras el cese de la luz. Se ha demostrado la capacidad para alterar de manera controlada el voltaje a través de las membranas y la despolarización de las células con luz. La presente invención permite el control con luz de las funciones celulares *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*, y los canales iónicos activados por luz de la invención y su uso tienen aplicaciones de amplio alcance para la selección de fármacos, tratamientos y aplicaciones de investigación, algunas de las cuales se describen en el presente documento.

La capacidad de perturbar, modificar o controlar ópticamente la función celular ofrece muchas ventajas respecto a mecanismos de manipulación física. Estas ventajas comprenden velocidad, no invasividad y la capacidad de abarcar fácilmente amplias escalas espaciales desde la nanoescala hasta la macroescala.

Los reactivos usados (y la clase de moléculas que representan), permiten, al menos: corrientes activadas por longitudes de onda de luz no útiles en canales iónicos activados por luz previos, canales iónicos activados por luz que cuando se activan, permiten eficazmente conductancia de calcio cero y diferentes espectros de moléculas más antiguas (proporcionando el control multicolor de las células).

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Se realizaron estudios para preparar secuencias y expresar canales iónicos activados por luz en células, tejidos y sujetos. Identificaciones y secuencias de aminoácidos de algunos de los canales iónicos activados por luz en los ejemplos son ChR88 (SEQ ID NO: 2); ChR90 (SEQ ID NO: 7); ChR87 (SEQ ID NO: 11); ChR62 (SEQ ID NO: 14), ChR93 (SEQ ID NO: 16) y ChR2 (SEQ ID NO: 19), ChR88 K176R (SEQ ID NO: 5). Se exponen métodos a modo de ejemplo no limitativos en el ejemplo 1. Se dan a conocer métodos generales que también pueden aplicarse a moléculas de canales activados por luz y métodos para su uso en publicaciones tales como la solicitud publicada estadounidense n.º 2010/0234273, solicitud publicada estadounidense n.º 20110165681, Chow BY, *et al.* Methods Enzymol. 2011;497:425-43; Chow, BY, *et al.* Nature 7 de enero de 2010; 463(7277): 98-102.

Se realizaron estudios para preparar secuencias y expresar canales iónicos activados por luz en células, tejidos y sujetos. Se exponen a continuación métodos a modo de ejemplo no limitativos.

#### (a) Electroporación en útero

Todos los procedimientos fueron según la Guide for the Care and Use of Laboratory de los Institutos Nacionales de Salud y fueron aprobados por el Massachusetts Institute of Technology Committee on Animal Care. Se usaron ratones C57BL/6J hembra embarazadas E16 para electroporación. Se realizó cirugía con anestesia con ketamina-xilazina y analgesia con buprenorfina, se inyectó disolución de ADN que contenía los plásmidos de interés en el ventrículo lateral de cada embrión usando un tubo capilar estirado. Se aplicaron cinco pulsos cuadrados (ancho de 50 ms, 1 Hz, 35 V) usando un electrodo de pinzas para la electroporación.

#### (b) Preparación de cortes

Se usaron ratones P20-P30 para la preparación de cortes. En animales más jóvenes fue difícil provocar respuestas sinápticas mediante fotoestimulación de axones callosos. Se anestesiaron los ratones con isoflurano y se perfundieron de manera transcardiaca con líquido cefalorraquídeo artificial (LCFA). Se extirpó el cerebro y se colocó en una disolución de corte helada que contenía cloruro de colina 110 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, D-glucosa 25 mM, ascorbato de sodio 11,6 mM, MgCl<sub>2</sub> 7 mM, piruvato de sodio 3,1 mM, KCl 2,5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25 mM y CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM. Se cortaron cortes frontales de 300 µm de espesor de la corteza visual con una máquina de corte vibratoria y se incubaron en LCFA oxigenado durante 45 min a 37°C antes de los registros.

#### (c) Electrofisiología del corte

Se realizaron registros a temperatura ambiente (22-24°C) con perfusión constante de LCFA oxigenado. Se visualizaron las neuronas usando óptica de interferencia diferencial infrarroja y se aplicaron parches con pipetas de borosilicato (resistencia 4-6 MO). La disolución intracelular contenía gluconato de potasio 120 mM, NaCl 5 mM,

MgCl<sub>2</sub> 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM, HEPES 10 mM, EGTA 1,1 mM, ATP de magnesio 4 mM, GTP disódico 0,4 mM, (pH 7,25; 290 mOsm). Se registraron las células a una profundidad de 30-120 um en el corte de cerebro. Se realizó fotoestimulación usando un LED azul (470 nm; Thorlabs, Newton, NJ) y un LED rojo (625 nm con filtro de 632/22 nm; Thorlabs).

5

(d) Cultivo, transfección, infección y obtención de imágenes de neuronas

Todos los procedimientos que implicaban animales se realizaron según la Guide for the Care and Use of Laboratory de los Institutos Nacionales de Salud y fueron aprobados por el Massachusetts Institute of Technology Committee on Animal Care. Se usaron ratones Swiss Webster o C57 [Taconic (Hudson, NY) o Jackson Labs (Bar Harbor, ME)]. Para los cultivos de hipocampo, se aislaron regiones del hipocampo de ratones posnatales del día 0 o día 1 y se digirieron con tripsina (1 mg/ml) durante ~12 min, y luego se trataron con disolución de Hanks complementada con suero bovino fetal al 10-20% e inhibidor de tripsina (Sigma Aldrich, St Louis, MO). Entonces se disoció el tejido mecánicamente con pipetas Pasteur, y se centrifugó a 1000 rpm a 4°C durante 10 min. Se sembraron en placas las neuronas disociadas a una densidad de aproximadamente cuatro hipocampos por 20 cubreobjetos de vidrio, se recubrieron con Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA). Para cultivos corticales, se prepararon neuronas corticales de ratón disociadas (posnatales, día 0 ó 1) tal como se describió anteriormente, y se sembraron en placa a una densidad de 100-200 k por cubreobjeto de vidrio recubierto con Matrigel (BD Biosciences). Se mantuvieron los cultivos en medio neurobasal complementado con B27 (Invitrogen [Life Technologies, Grand Isle, NY]) y glutamina. Se usaron indistintamente cultivos corticales y del hipocampo; no se observaron diferencias en el rendimiento del reactivo.

Se transfectaron las neuronas a los 3-5 días *in vitro* usando fosfato de calcio (Invitrogen), se usó fluorescencia de GFP para identificar satisfactoriamente neuronas transfectadas. Alternativamente, se infectaron las neuronas con 0,1-3 µl de lentivirus o virus adenoasociado (AAV) por pocillo a los 3-5 días *in vitro*.

25

(e) Cultivo y transfección de células HEK 293FT

Se mantuvieron células HEK 293FT (Invitrogen) a una confluencia de entre el 10-70% en medio D10 (Cellgro [Mediatech/Corning, Manassas, VA]) complementado con suero bovino fetal al 10% (Invitrogen), penicilina/estreptomycin al 1% (Cellgro) y piruvato de sodio al 1% (Biowhittaker, Walquersville, MD). Para el registro, se sembraron en placa las células a una confluencia del 5-20% en cubreobjetos de vidrio recubiertos con Matrigel (BD Biosciences). Se transfectaron las células adherentes aproximadamente 24 horas tras sembrar en placa con o bien kits de transfección de Lipofectamine Transit 293 (Mims Bio, LLC, Madison, Wt) o bien con kits de transfección de fosfato de calcio (Invitrogen), y se registraron mediante pinzamiento zonal de células completas entre 36-72 horas tras la transfección.

35

(f) Registro y estimulación óptica de pinzamiento zonal de células completas *in vitro*

Se realizaron registros de pinzamiento zonal de células completas usando un amplificador Muiteciamp 700B, un digitalizador Digidata 1440 y una pinza ejecutada por PC (Molecular Devices). Se bañaron las neuronas en Tyrode a temperatura ambiente que contenía NaCl 125 mM, KCl 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 10 mM, glucosa 30 mM, NBQX 0,01 mM y GABAzine 0,01 mM. Se ajustó el pH de Tyrode a 7,3 con NaOH y se ajustó la osmolaridad a 300 mOsm con sacarosa. Se bañaron las células HEK en una disolución de baño de Tyrode idéntica a la de las neuronas, pero que carecía de GABAzine y NBQX. Se tiró de pipetas de vidrio de borosilicato (Warner instruments, Hamden, CT) con un diámetro externo de 1,2 mm y un espesor de pared de 0,255 mm hasta una resistencia de 3-9 MΩ con un dispositivo de tracción de micropipetas P-97 Flaming/Brown (Sutter Instruments, Novato, CA) y se cargaron con una disolución que contenía K-gluconato 125 mM, NaCl 8 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,6 mM, EGTA 1 mM, HEPES 10 mM, Mg-ATP 4 mM y Na-GTP 0,4 mM. Se ajustó el pH de la disolución de la pipeta a 7,3 con KOH y se ajustó la osmolaridad a 298 mOsm con sacarosa. La resistencia de acceso fue de 5~30 MΩ, monitorizada en todo el registro de fijación de voltaje. El potencial de membrana en reposo fue de ~-60 mV para las neuronas y de ~-30 mV para las células HEK 293FT en registro con fijación de corriente.

45

50

Se midieron fotocorrientes con pulsos de luz de 500 ms en neuronas con fijación de voltaje a -60 mV, y en células HEK 293FT con fijación de voltaje a -30 mV. Se midieron las hiperpolarizaciones de membrana inducidas por luz con pulsos de luz de 500 ms en células con fijación de corriente en su potencial de membrana en reposo. Se administraron pulsos de luz para todas las longitudes de onda excepto 660 nm y se realizaron experimentos de caracterización de espectro con un conmutador óptico DG-4 con lámpara de xenón de 300 W (Sutter Instruments), controlados por medio de pulsos de TTL generados mediante un generador de señales Digidata. Se administró luz verde con un filtro paso banda de 575 ± 25 nm (Chroma) y un filtro paso banda de 575 ± 7,5 nm (Chroma Technology Grupo, Bellows Falls, VT). Se tomaron espectros de acción con un instrumento Till Photonics Polychrome V, lámpara de xenón de 150 W, ancho de banda de monocromador de 15 nm.

60

Se analizaron los datos usando Clampfit (Molecular Devices) y MATLAB (Mathworks, Inc.)

65

*(g) Registro de la conductancia de iones*

Se realizaron registros de pinzamiento zonal de células completas en células HEK293FT aisladas para medir con exactitud parámetros de células individuales. Se realizaron todos los registros usando un amplificador Axopatch 200B y un digitalizador Digidata 1440 (Molecular Devices) a temperatura ambiente. Con el fin de permitir el registro de células aisladas, se sembraron las células en placas a una densidad menor de 15.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos que contenían cubreobjetos de vidrio redondos (0,15 mm de grosor, 25 mm de diámetro, recubiertos con Matrigel reducido con factor del crecimiento al 2% en DMEM durante 1 h a 37°C). Para la mayoría de registros, se usó Tyrode como disolución extracelular, y la disolución intracelular consistió en (en mM) K-gluconato 125, NaCl 8, CaCl<sub>2</sub> 0,1, MgCl<sub>2</sub> 0,6, EGTA 1, HEPES 10, MgATP 4, NaGTP 0,4, pH 7,3 (ajustado con KOH), con 295-300 mOsm (ajustado con sacarosa). En la tabla 1 se enumeran las disoluciones extracelulares e intracelulares usadas para someter a prueba la permeabilidad de iones.

Tabla 1. Composiciones de disoluciones usadas en experimentos de permeabilidad de iones

Disolución	[Na] (mM)	[K] (mM)	[Ca] (mM)	[H] (mM)	pH	Otros
Intracelular	0	140	0	5,10E-05	7,4	EGTA 5 mM, MgCl <sub>2</sub> 2 mM, HEPES 10 mM
NaCl 145 mM	145	5	1	5,10E-05	7,4	HEPES 10 mM, glucosa 5 mM, MgCl <sub>2</sub> 2 mM
KCl 145 mM	0	145	1	5,10E-05	7,4	HEPES 10 mM, glucosa 5 mM, MgCl <sub>2</sub> 2 mM
CaCl <sub>2</sub> 90 mM	0	5	91	5,10E-05	7,4	HEPES 10 mM, glucosa 5 mM, MgCl <sub>2</sub> 2 mM
NaCl 5 mM	5	5	1	5,10E-04	6,4	NMDG 135 mM, HEPES 10 mM, glucosa 5 mM, MgCl <sub>2</sub> 2 mM

Se midieron los potenciales de unión líquida usando procedimientos convencionales para que fueran de 5,8 mV para las disoluciones extracelulares de CaCl<sub>2</sub> 90 mM y 4,9 mV para las de NaCl 5 mM, que se corrigieron durante el registro, las otras tuvieron un potencial de unión < 1 mV.

En todos los registros de pinzamiento zonal, se aplicó un punto de corte estricto de resistencia de acceso de menos de 25 MΩ y una corriente de retención de menos de ± 50 pA con el fin de garantizar una medición precisa. La resistencia de membrana típica era de entre 500 MΩ - 2 GΩ y la resistencia de pipeta era de entre 4 - 10 MΩ.

Se llevó a cabo fotoestimulación de células con pinzamiento zonal mediante un LED de 470 nm (Thorlabs) a 10 mW/mm<sup>2</sup> a menos que se indique lo contrario. Para la mayoría de experimentos, se administró iluminación de 1 s para medir fotocorrientes transitorias y en estado estacionario.

*(h) Construcción de plásmido y mutagénesis dirigida al sitio.*

Se obtuvieron opsinas con codones optimizados de mamífero y se sintetizaron mediante Genscript (Genscript Corp., NJ). Se fusionaron opsinas en marco, sin codones de terminación, por delante de GFP (usando BamHI y Angel) en un vector de lentivirus que contenía el promotor CaMKII, permitiendo la transfección de neuronas directa, la transfección de células HEK (la expresión en células HEK se permite por un promotor ubicuo aguas arriba del casete de lentivirus), y la producción y transfección de lentivirus. Las secuencias de aminoácidos de algunas opsinas que se sometieron a prueba fueron tal como sigue: ChR88 (SEQ ID NO: 2); ChR90 (SEQ ID NO: 7); ChR87 (SEQ ID NO: 11); ChR62 (SEQ ID NO: 14), ChR93 (SEQ ID NO: 16) y ChR2 (SEQ ID NO: 19), ChR88 K176R (SEQ ID NO: 5).

La secuencia señal "ss" del antígeno del CMH de clase I truncado se correspondía con la secuencia de aminoácidos (M)VPCTLLLLLAAALAPTQTRA (SEQ ID NO: 21), secuencia de ADN gtcccgctgcacgctgctctgctgtggcagccgctggctccgactcagacgctggcc (SEQ ID NO: 20). La secuencia de exportación del RE "ER2" se correspondía con la secuencia de aminoácidos FCYENEV (SEQ ID NO: 23), secuencia de ADN ttctgctacgagaatgaagtg (SEQ ID NO: 22). La secuencia señal "KGC" se correspondía con la secuencia de aminoácidos KSRITSEGEYIPLDQIDINV (SEQ ID NO: 25), secuencia de ADN de secuencia señal KGC: aaatccagaattacttctgaaggggagtatatccctctggatcaaatagacatcaatgtt. (SEQ ID NO: 24).

Se generaron mutantes puntuales para las pruebas de células HEK usando el kit QuikChange [Stratagene, (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)] en el gen de fusión de opsina-GFP insertado entre los sitios BamHI y Agel en una versión modificada de la estructura principal de pEGFP-N3 [Invitrogen, (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA)]. Se verificaron todos los constructos mediante secuenciación.

*(i) Preparación de lentivirus*

Se transfectaron células HEK293FT [Invitrogen (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA)] con el plásmido de lentivirus, el plásmido viral auxiliar pΔ8.74, y el plásmido de pseudotipado pMD2.G. Entonces se recogió el sobrenadante de células HEK transfectadas que contenían virus 48 horas después de la transfección, se purificó y

entonces se sedimentó mediante ultracentrifugación. Se volvió a suspender el sedimento de lentivirus en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el uso adicional *in vitro* o *in vivo*. El título final estimado es de aproximadamente  $10^9$  unidades infecciosas/ml.

#### 5 Ejemplo 2

Se expresaron los canales iónicos activados por luz VChR1, ChR1, ChR2, ChR87, ChR90 y ChR88 en neuronas del hipocampo cultivadas usando los métodos de cultivo, transfección, infección y obtención de imágenes de neuronas descritos en el ejemplo 1. Se llevaron a cabo estimulación óptica y registro de pinzamiento zonal de células completas *in vitro* en las neuronas usando los métodos descritos en el ejemplo 1. La figura 1 muestra fotocorrientes de canalrodopsina medidas en las neuronas del hipocampo cultivadas. La figura 1A muestra resultados usando fotocorriente pico de luz roja (660 nm) a  $10\text{ mW mm}^{-2}$  durante iluminación de 1 s. ChR88 es la única canalrodopsina sensible a la luz roja con una fotocorriente significativa a 660 nm. La figura 1B muestra resultados usando fotocorriente pico de luz azul ( $4,23\text{ mW mm}^{-2}$ ) o verde ( $3,66\text{ mW mm}^{-2}$ ) a igual flujo de fotones para iluminación de 5 ms. ChR87, ChR88 y ChR90 tienen todas una fotocorriente mayor que o comparable a ChR2. Las barras negras indican luz azul, las barras de rayas horizontales indican luz verde.

#### Ejemplo 3

Se transfectaron células HEK 293FT para expresar los canales iónicos activados por luz ChR2, ChR90, VChR1, ChR88 y ChR87 usando los métodos del ejemplo 1. Se llevaron a cabo estimulación óptica y registro de pinzamiento zonal de células completas *in vitro* en las células transfectadas y cultivadas usando los métodos descritos en el ejemplo 1. La figura 2 muestra el espectro de acción a igual dosis de fotones en todas las longitudes de onda registradas en células HEK293FT. ChR2 (pico a 470 nm) y VChR1 (pico a 545 nm) representan el intervalo de sensibilidad de color de canalrodopsina existente. ChR87 (pico a 515 nm) y ChR90 (pico a 500 nm) son canalrodopsinas sensibles a la luz azul y verde. Mientras que ChR88 (pico a 590 nm) es la primera canalrodopsina natural sensible a la luz roja.

#### Ejemplo 4

Se expresaron los canales iónicos activados por luz ChR90 y ChR88 en neuronas del hipocampo cultivadas usando los métodos de cultivo, transfección, infección y obtención de imágenes de neuronas descritos en el ejemplo 1. Se llevaron a cabo estimulación óptica y registro de pinzamiento zonal de células completas *in vitro* en las neuronas usando los métodos descritos en el ejemplo 1. La figura 3 muestra disparos neuronales accionados ópticamente en las neuronas del hipocampo cultivadas. La figura 3A muestra trenes de disparos neuronales accionados por luz roja a baja frecuencia para Ch88. Generalmente, ChR88 podía accionar de manera fiable disparos neuronales de hasta 5 Hz. Sin embargo, a una frecuencia mayor tal como 20 Hz, ChR88 desensibiliza y/o provoca bloqueo de despolarización. La figura 3B muestra trenes de disparos neuronales accionados por luz verde a alta frecuencia para Ch90. Debido a la rápida cinética de recuperación de fotocorriente pico y tau off de ChR90, pudo accionar temporalmente disparos neuronales precisos a la frecuencia más alta que una neurona puede mediar.

#### Ejemplo 5

Se expresaron los canales iónicos activados por luz ChR88, ChR2, ChR87 y ChR90 en neuronas del hipocampo cultivadas usando los métodos de cultivo, transfección, infección y obtención de imágenes de neuronas descritos en el ejemplo 1. Se llevaron a cabo estimulación óptica y registro de pinzamiento zonal de células completas *in vitro* en las neuronas usando los métodos descritos en el ejemplo 1. La figura 4 ilustra los resultados y muestra la cinética de canalrodopsina medida en el voltaje de cultivo de neuronas del hipocampo fijado a  $-65\text{ mV}$ . La figura 4A muestra cinética de desactivación del canal exponencial única basada en un pulso de 5 ms. ChR90 tuvo la cinética de desactivación más rápida (3,5 ms) observada en todas las canalrodopsinas naturales. La figura 4B muestra la razón de recuperación de fotocorriente pico basada en la iluminación de 1 s. ChR87 y ChR90 tuvieron ambos una rápida recuperación de fotocorriente pico a aproximadamente el 70%. Sin embargo, ChR88 tuvo una cinética de recuperación lenta similar a ChR2.

#### 55 Ejemplo 6

Se expresaron los canales iónicos activados por luz Chrimson (ChR88) en neuronas del hipocampo cultivadas usando los métodos de cultivo, transfección, infección y obtención de imágenes de neuronas descritos en el ejemplo 1. Se llevaron a cabo estimulación óptica y registro de pinzamiento zonal de células completas *in vitro* en las neuronas usando los métodos descritos en el ejemplo 1. La figura 5 muestra la caracterización de la diafonía de luz azul de Chrimson en neuronas cultivadas. La figura 5A muestra el espectro de acción de Chrimson y la longitud de onda de luz azul (470 nm) usada para iluminación. Se eligió la longitud de onda para minimizar la diafonía. La figura 5B muestra trazados representativos de una sola neurona en diversas condiciones de iluminación. Cuando se duplicó la potencia de luz azul desde  $0,1$  hasta  $0,2\text{ mW mm}^{-2}$  mientras que el protocolo de estimulación se fijó como  $5\text{ ms } 5\text{ Hz}$ , la desviación de voltaje también se duplicó. Sin embargo, cuando la potencia de luz azul se fijó a  $0,1\text{ mW mm}^{-2}$  pero la duración del pulso cambió desde 5 ms hasta 1000 ms, la diafonía cambió desde  $<5\text{ mV}$  hasta disparo

neuronal completo, de manera correspondiente. Esto significa que la diafonía de luz azul era una función tanto de la potencia de luz como de la duración del pulso de luz (recuento total de fotones).

#### Ejemplo 7

5 Se expresaron los canales iónicos activados por luz Chronos (ChR90) y ChR2 en neuronas del hipocampo cultivadas usando los métodos de cultivo, transfección, infección y obtención de imágenes de neuronas descritos en el ejemplo 1. Se llevaron a cabo estimulación óptica y registro de pinzamiento zonal de células completas *in vitro* en las neuronas usando los métodos descritos en el ejemplo 1. La figura 6 ilustra la sensibilidad a la luz azul de Chronos y ChR2 en neuronas del hipocampo cultivadas. La figura 6A es una curva de irradiancia de disparo neuronal para neuronas individuales. La figura 6B muestra la potencia de luz más baja necesaria para una probabilidad de disparo neuronal del 100% de una célula individual frente a fluorescencia de GFP. Chronos (círculos) era aproximadamente 5 veces más sensible a la luz que ChR2 (triángulos) a un nivel de expresión dado (GFP). La figura 6C muestra trazados de ejemplo de la formación de disparos neuronales por Chronos a diversas potencias de luz. La figura 6D ilustra que los controles no mostraron diferencias eléctricas significativas entre neuronas que expresan ChR2 y Chronos.

#### Ejemplo 8

20 Se usaron métodos de electroporación en útero y preparación de cortes tal como se describe en el ejemplo 1 para examinar la activación de Chronos (ChR90) y Chrimson (ChR88). La figura 7 ilustra la estrategia usada para la caracterización de cortes de Chronos y Chrimson. La figura 7A muestra la longitud de onda de iluminación usada para los experimentos de corte. La figura 7B proporciona imágenes micrográficas que muestran la histología para el constructo de fusión de Chronos y Chrimson-GFP expresado individualmente en la corteza visual de capa 2/3 en ratones.

#### Ejemplo 9

30 Se usaron métodos de electroporación en útero, preparación de cortes y electrofisiología de cortes tal como se describe en el ejemplo 1 para caracterizar la sensibilidad a la luz azul y roja de Chrimson (ChR88) y Chronos (ChR90) en preparaciones de corte. La figura 8 ilustra resultados obtenidos usando métodos de pinzamiento zonal de células completas. La figura 8A muestra que la luz roja provocó disparos neuronales del 100% en neuronas que expresan Chrimson pero no en neuronas que expresan Chronos entre  $mW\ mm^{-2}$ . La figura 8B muestra que la luz azul a  $0,2-0,5\ mW\ mm^{-2}$  pudo provocar disparos neuronales del 100% en células que expresan Chronos pero no en células que expresan Chrimson. Sin embargo, puede producirse diafonía de disparos neuronales completa en células que expresan Chrimson a potencias mayores de  $0,6\ mW\ mm^{-2}$ . La figura 8C muestra el voltaje de diafonía de luz azul de neuronas que expresan Chrimson.

#### Ejemplo 10

40 Se usaron métodos de electroporación en útero, preparación de cortes y electrofisiología de cortes tal como se describe en el ejemplo para caracterizar Chrimson (ChR88) y Chronos (ChR90). La figura 9 ilustra resultados con trazados de ejemplo de neuronas que expresan opsina con fijación de corriente en corte de capa 2/3 expresando luz azul  $0,1\ mW\ mm^{-2}$ , luz roja  $1\ mW\ mm^{-2}$ . No se observó diafonía bajo luz roja para Chronos mientras que se observó diafonía subumbral mínima ( $<5\ mV$ ) bajo luz azul para Chrimson.

50 La figura 10 ilustra resultados con trazados de ejemplo de neuronas que no expresan opsina con fijación de voltaje en la capa 2/3 o 5, de manera postsináptica con respecto a células que expresan opsina. Se observó diafonía postsináptica cero tanto para Chronos como para Chrimson bajo iluminación de luz roja y azul respectivamente. Chronos: luz azul  $0,13\ mW\ mm^{-2}$ , luz roja  $1,7\ mW\ mm^{-2}$ . Chrimson: luz azul  $0,37\ mW\ mm^{-2}$ , luz roja  $1,7\ mW\ mm^{-2}$ .

55 La figura 11 ilustra resultados de estudios de iluminación por pulsos emparejados en corte que expresan diferencialmente Chrimson y Chronos en neuronas separadas. La figura 11A muestra un esquema de electroporación en útero de triple plásmido usado para obtener la expresión no solapante de Chrimson y Chronos. La figura 11B muestra la expresión de opsina en la corteza visual, no se observó solapamiento de GFP y mO2, la razón de marcaje de Chronos con respecto a Chrimson puede ajustarse valorando el plásmido Cre. La figura 11C muestra neuronas que no expresan opsina con fijación de voltaje en la estimulación por pulsos emparejados de la capa 2/3 para demostrar que se accionaron selectivamente diferentes sinapsis por luz azul y roja. Azul  $0,2\ mW\ mm^{-2}$ ; roja:  $5\ mW\ mm^{-2}$ .

#### Ejemplo 11

65 Se expresaron los canales iónicos activados por luz Chrimson (ChR88) en neuronas del hipocampo cultivadas usando los métodos de cultivo, transfección, infección y obtención de imágenes de neuronas descritos en el ejemplo 1. Se llevaron a cabo estimulación óptica y registro de pinzamiento zonal de células completas *in vitro* en las neuronas usando los métodos descritos en el ejemplo 1. La figura 12 ilustró resultados que mostraron que Chrimson

podía accionar disparos neuronales en el rojo lejano (660 nm) usando pulsos de 5 ms a 2,6 mW mm<sup>-2</sup> en neuronas del hipocampo cultivadas.

#### Ejemplo 12

5 Se expresaron canales iónicos activados por luz con Chrimson sustituido (ChR88), denominados “ChR-88 K176R”, que tenían una secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 5, en neuronas del hipocampo cultivadas usando los métodos de cultivo, transfección, infección y obtención de imágenes de neuronas descritos en el ejemplo 1. Se llevaron a cabo estimulación óptica y registro de pinzamiento zonal de células completas *in vitro* en las  
10 neuronas usando los métodos descritos en el ejemplo 1. La figura 13 muestra resultados que indican que el mutante ChR88 K176R tenía cinética mejorada (tau off de 13 ms) y podía mediar disparos neuronales de alta frecuencia en neuronas del hipocampo cultivadas. Se muestran ejemplos de trazados con fijación de corriente de una neurona individual que expresa ChR88 K176R. La figura 13A muestra que ChR88 K176R podía accionar de manera fiable  
15 disparos neuronales de desde 1 hasta 10 mW mm<sup>-2</sup> a una estimulación de 625 nm, 5 Hz. La figura 13B muestra trenes de disparos neuronales accionados por luz roja (625 nm) a diversas frecuencias para ChR88 K176R. Se usa una potencia de luz de 1 mW mm<sup>-2</sup> para todas las frecuencias. La figura 13C muestra control de inyección de corriente que demostró que en la neurona podían producirse disparos neuronales a las frecuencias indicadas.

#### Ejemplo 13

20 Se usaron los métodos de registro de la conductancia de iones expuestos en el ejemplo 1, para examinar la cinética de cierre de canal para ChR88, ChR90, ChR87 y ChR2 expresados en células HEK293. Se examinó y se comparó la cinética de cierre. Se usó un pulso de luz de 2 ms para activar canalrodopsina y todas las mediciones tuvieron fijación de voltaje a -65 mV. Chronos tuvo la cinética de cierre de canal más rápida y es independiente del voltaje.

#### Ejemplo 14

Los genes descritos en (a), (b) y (c) se expresaron en células usando los métodos proporcionados a continuación.

#### 30 Genes

a) El gen de *Chloromonas subdivisa* denominado en el presente documento ChR87 y que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en el presente documento como SEQ ID NO: 5 y una secuencia de ADN con codones optimizados de mamífero expuesta en el presente documento como SEQ ID NO: 6;

35 b) el gen para *Chlamydomonas noctigama* denominado en el presente documento ChR88 o Chrimson, y que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en el presente documento como SEQ ID NO: 1 y una secuencia de ADN con codones optimizados de mamífero expuesta en el presente documento como SEQ ID NO: 2; y

40 c) el gen para *Stigeoclonium helveticum*, denominado en el presente documento ChR90 o Chronos y que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en el presente documento como SEQ ID NO: 3 y que tiene una secuencia de ADN con codones optimizados de mamífero expuesta en el presente documento como SEQ ID NO: 4 se expresan en células tal como sigue.

#### 45 Métodos

(1) Se clonó el gen de opsina en un plásmido de empaquetamiento de lentivirus o virus adenoasociado (AAV), u otro plásmido de expresión deseado, y luego se clonó GFP después del gen preferido, eliminando el codón de terminación del gen de opsina, creando por tanto una proteína de fusión.

50 (2) El plásmido viral o de expresión contenía o bien un promotor general fuerte, un promotor específico de la célula, o bien un promotor general fuerte seguido por un elemento lógico más (tal como una secuencia lox-stop-lox, que se eliminará mediante recombinasa Cre expresada selectivamente en células en un animal transgénico, o en un segundo virus, permitiendo por tanto que el promotor general fuerte accione entonces el gen.

55 (3) Si se usa un plásmido viral, se sintetiza el vector viral usando el plásmido viral.

(4) Si se usa un virus, tal como es apropiado para la terapia génica (hasta la fecha, más de 600 personas se han tratado con AAV que portan diversas cargas genéticas útiles, en 48 ensayos clínicos independientes, sin un solo  
60 acontecimiento adverso), se inyecta el virus usando una pequeña aguja o cánula en el área de interés, administrando así el gen que codifica para la proteína de fusión de opsina en las células de interés. Si se usa otro vector de expresión, se somete a electroporación directamente o se inyecta ese vector en la célula u organismo (para expresar plenamente la opsina, o se obtiene una línea celular, o un ratón transgénico u otro animal).

65 (5) Iluminación con luz. Para Chronos, las longitudes de onda de iluminación pico son 500 nm +/- 15 nm. Para Chrimson, las longitudes de onda de iluminación pico son 590 nm +/- 15 nm.

5 (6) Para iluminar dos poblaciones de células diferentes (por ejemplo, en un único tejido) con dos colores de luz diferentes, en primer lugar se selecciona como diana una población con Chrimson, y la otra población con Chronos, usando dos virus diferentes (por ejemplo, con diferentes promotores o proteínas de recubrimiento) o dos plásmidos diferentes (por ejemplo, con dos promotores diferentes). Luego, después de que se exprese la molécula, se ilumina el tejido con luz de  $470 \pm 10$  nm o  $406 \pm 10$  nm para despolarizar preferiblemente las células que expresan Chronos, y se ilumina el tejido con luz de  $406 \pm 10$  nm o  $660 \pm 10$  nm, para despolarizar preferiblemente las células que expresan Chrimson.

10 (7) Las longitudes de onda anteriores ilustran modos de operación típicos, pero no se pretende limitar los protocolos que pueden usarse. Pueden usarse longitudes de onda o bien más estrechas o bien más amplias, o espectros de iluminación con centro diferente. Para usos protésicos, pueden implantarse los dispositivos usados para administrar luz. Para selección de fármacos, puede usarse una lámpara de xenón o LED para administrar la luz.

15 Los aspectos de la invención incluyen composiciones de materia que se han puesto en práctica, tal como se describe a continuación:

20 Se han preparado plásmidos que codifican para los genes anteriores, y se han usado para administrar genes en células, donde los genes se han expresado. Como vector a modo de ejemplo, se han preparado lentivirus que portan cargas útiles que codifican para los genes anteriores y se han usado para administrar genes en células dando como resultado la expresión de los canales iónicos activados por luz en las células. Además, se han preparado virus adenoasociados que portan cargas útiles que codifican para los genes anteriores y se han usado para administrar genes en células, dando como resultado la expresión de los canales iónicos activados por luz en las células. Se han preparado células que expresan los genes de canales iónicos activados por luz expuestos en el ejemplo 2. Se han preparado animales que incluyen células que expresan los genes de canales iónicos activados por luz dados a conocer en el presente documento.

#### Ejemplo 15

30 Se realizan ensayos de dos colores. Chronos (para activación de luz azul) y Chrimson (para activación de luz roja) se expresan en conjuntos de células separados que representan poblaciones neuronales no solapantes. Tras la expresión, la población de células se expone a la luz y se optimizan la longitud de onda y el momento y "la dosis" de luz siguiendo los siguientes parámetros.

35 La población se pone en contacto con luz azul que tiene una longitud de onda de entre 450 nm y 500 nm, y con un ancho de pulso de entre 1 y 5 ms para la activación. Un ancho de pulso de 5 ms proporciona diafonía subumbral mínima en la luz azul, que se define como  $<15$  mV,  $<10$  mV, y de manera óptima como  $<5$  mV.

40 (1) La potencia de luz azul máxima que puede usarse se determina mediante pinzamiento zonal de células que expresan Chrimson, iluminado con luz azul y midiendo la desviación de voltaje. Usando de manera óptima la potencia de luz azul de manera que la desviación de voltaje máxima es  $<10$  mV, habitualmente de 0,4 a 0,6 mW/mm<sup>2</sup>.

45 (2) La potencia de luz azul óptima que puede usarse para accionar Chronos se determina usando las mismas condiciones que antes en (1), excepto porque se usa una potencia de luz menor, tal como de 50 mW/mm<sup>2</sup> a 0,4 mW/mm<sup>2</sup>, y de manera óptima 0,2 mW/mm<sup>2</sup>. La potencia depende el sistema de expresión y del tipo de célula usados en el estudio.

50 Se pone en contacto la población con luz roja que tiene una longitud de onda de entre 620 nm y 640 nm, y con un ancho de pulso de entre 1 y 5 ms para la activación, que puede optimizarse a 5 ms. Se determina la potencia de luz óptima para accionar Chrimson en el rojo aumentando las potencias de luz desde 0,5 mW/mm<sup>2</sup> hasta 10 mW/mm<sup>2</sup>. El método se optimiza de manera que se usa una potencia de luz roja mínima para lograr disparos neuronales del 100% para Chrimson.

#### 55 Lista de secuencias

<110> Instituto Tecnológico de Massachusetts; los directores de la Universidad de Alberta Klapoetke, Nathan Chow, Brian Y Boyden, Edward Wong, Gane K

60 <120> CANALRODOPSINAS PARA EL CONTROL ÓPTICO DE CÉLULAS

<130> ML01.004

<150> 61/559076

65 <151> 12-11-2011

ES 2 660 114 T3

<160> 25

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1  
 <211> 669  
 <212> PRT  
 <213> *Chlamydomonas noctigama*

10 <400> 1

Met Ala Glu Leu Ile Ser Ser Ala Thr Arg Ser Leu Phe Ala Ala Gly  
 1 5 10 15

Gly Ile Asn Pro Trp Pro Asn Pro Tyr His His Glu Asp Met Gly Cys  
 20 25 30

Gly Gly Met Thr Pro Thr Gly Glu Cys Phe Ser Thr Glu Trp Trp Cys  
 35 40 45

Asp Pro Ser Tyr Gly Leu Ser Asp Ala Gly Tyr Gly Tyr Cys Phe Val  
 50 55 60

Glu Ala Thr Gly Gly Tyr Leu Val Val Gly Val Glu Lys Lys Gln Ala  
 65 70 75 80

Trp Leu His Ser Arg Gly Thr Pro Gly Glu Lys Ile Gly Ala Gln Val  
 85 90 95

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

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

Cys Cys Val Glu Val Leu Phe Val Thr Leu Glu Ile Phe Lys Glu Phe  
 130 135 140

ES 2 660 114 T3

Ser Ser Pro Ala Thr Val Tyr Leu Ser Thr Gly Asn His Ala Tyr Cys  
145 150 155 160

Leu Arg Tyr Phe Glu Trp Leu Leu Ser Cys Pro Val Ile Leu Ile Lys  
165 170 175

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

Gly Leu Ile Val Ser Cys Val Gly Met Ile Val Phe Gly Met Ala Ala  
195 200 205

Gly Leu Ala Thr Asp Trp Leu Lys Trp Leu Leu Tyr Ile Val Ser Cys  
210 215 220

Ile Tyr Gly Gly Tyr Met Tyr Phe Gln Ala Ala Lys Cys Tyr Val Glu  
225 230 235 240

Ala Asn His Ser Val Pro Lys Gly His Cys Arg Met Val Val Lys Leu  
245 250 255

Met Ala Tyr Ala Tyr Phe Ala Ser Trp Gly Ser Tyr Pro Ile Leu Trp  
260 265 270

Ala Val Gly Pro Glu Gly Leu Leu Lys Leu Ser Pro Tyr Ala Asn Ser  
275 280 285

Ile Gly His Ser Ile Cys Asp Ile Ile Ala Lys Glu Phe Trp Thr Phe  
290 295 300

Leu Ala His His Leu Arg Ile Lys Ile His Glu His Ile Leu Ile His  
305 310 315 320

Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Lys Met Glu Ile Gly Gly Glu Glu Val  
325 330 335

Glu Val Glu Glu Phe Val Glu Glu Glu Asp Glu Asp Thr Val Thr His  
340 345 350

Pro Thr Ser Asn Leu Ala Asn Arg Asn Ser Phe Val Ile Met Ala Glu  
355 360 365

Arg Met Arg Ala Arg Gly Ile Asp Val Arg Ala Ser Leu Asp Arg Asn  
370 375 380

Gly Pro Met Ile Glu Ser Gly Arg Val Ile Leu Ala Asp Thr Asp Ile  
385 390 395 400

ES 2 660 114 T3

Phe Val Thr Glu Met Phe Lys Ala Gln Phe Ala Gln Leu Pro Ala Ala  
 405 410 415  
 Ile Glu Leu Ile Pro Ala Leu Gly Ala Asp Asn Ala Leu Gln Leu Val  
 420 425 430  
 Gln Gln Ala Ser Val Leu Gly Gly Cys Asp Phe Val Met Val His Pro  
 435 440 445  
 Gln Phe Leu Lys Asp Asn Ser Pro Ser Gly Leu Val Ala Arg Leu Arg  
 450 455 460  
 Met Met Gly Gln Arg Val Val Ala Phe Gly Pro Ala Asn Leu Arg Glu  
 465 470 475 480  
 Leu Ile Glu Ser Cys Asp Val Asp Ala Trp Ile Glu Ala Pro Pro Ile  
 485 490 495  
 Asn Leu Tyr Gln Leu Arg Gln Val Val Ala Gln Met Gln Leu Met Arg  
 500 505 510  
 Arg Gln Ala Ala Met Met Gly Gly Met Gly Gly Gly Met Lys Gly Gly  
 515 520 525  
 Met Ser Gly Met Gly Met Gly Met His Ala Gly Ser Met Trp Lys Gln  
 530 535 540  
 Gln Gln Met Met Met Gln Gln Asp Gly Ser Ala Met Met Met Pro Ala  
 545 550 555 560  
 Met Gln Gly Gly Ala Ala Ser Met Arg Gly Ser Gly Leu Ile Ser Ala  
 565 570 575  
 Gln Pro Gly Arg Gln Ala Ser Leu Gly Gly Pro Gln Ser Val Met Met  
 580 585 590  
 Gly Ser Ala Met Val Gly Ser Asn Pro Leu Phe Gly Thr Ala Pro Ser  
 595 600 605  
 Pro Leu Gly Ser Ala Val Gly Ala Glu Ala Met Gly His Asn Leu Tyr  
 610 615 620  
 Gly Asn Gln Ala Ala Ala Gly Gly Ile Pro Ala Ala Ser Ala Ala Ala  
 625 630 635 640  
 Asp Gly Thr Asp Val Glu Met Met Gln Gln Leu Met Ser Glu Ile Asp  
 645 650 655  
 Arg Leu Lys Gly Glu Leu Gly Glu Gln Asp Met Pro Arg  
 660 665

ES 2 660 114 T3

<210> 2

<211> 350

<212> PRT

5 <213> *Chlamydomonas noctigama*

<400> 2

Met Ala Glu Leu Ile Ser Ser Ala Thr Arg Ser Leu Phe Ala Ala Gly  
1 5 10 15

Gly Ile Asn Pro Trp Pro Asn Pro Tyr His His Glu Asp Met Gly Cys  
20 25 30

Gly Gly Met Thr Pro Thr Gly Glu Cys Phe Ser Thr Glu Trp Trp Cys  
35 40 45

Asp Pro Ser Tyr Gly Leu Ser Asp Ala Gly Tyr Gly Tyr Cys Phe Val  
50 55 60

Glu Ala Thr Gly Gly Tyr Leu Val Val Gly Val Glu Lys Lys Gln Ala  
65 70 75 80

Trp Leu His Ser Arg Gly Thr Pro Gly Glu Lys Ile Gly Ala Gln Val  
85 90 95

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

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

Cys Cys Val Glu Val Leu Phe Val Thr Leu Glu Ile Phe Lys Glu Phe  
130 135 140

Ser Ser Pro Ala Thr Val Tyr Leu Ser Thr Gly Asn His Ala Tyr Cys  
145 150 155 160

Leu Arg Tyr Phe Glu Trp Leu Leu Ser Cys Pro Val Ile Leu Ile Lys  
165 170 175

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

Gly Leu Ile Val Ser Cys Val Gly Met Ile Val Phe Gly Met Ala Ala  
195 200 205

ES 2 660 114 T3

Gly Leu Ala Thr Asp Trp Leu Lys Trp Leu Leu Tyr Ile Val Ser Cys  
 210 215 220

Ile Tyr Gly Gly Tyr Met Tyr Phe Gln Ala Ala Lys Cys Tyr Val Glu  
 225 230 235 240

Ala Asn His Ser Val Pro Lys Gly His Cys Arg Met Val Val Lys Leu  
 245 250 255

Met Ala Tyr Ala Tyr Phe Ala Ser Trp Gly Ser Tyr Pro Ile Leu Trp  
 260 265 270

Ala Val Gly Pro Glu Gly Leu Leu Lys Leu Ser Pro Tyr Ala Asn Ser  
 275 280 285

Ile Gly His Ser Ile Cys Asp Ile Ile Ala Lys Glu Phe Trp Thr Phe  
 290 295 300

Leu Ala His His Leu Arg Ile Lys Ile His Glu His Ile Leu Ile His  
 305 310 315 320

Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Lys Met Glu Ile Gly Gly Glu Glu Val  
 325 330 335

Glu Val Glu Glu Phe Val Glu Glu Glu Asp Glu Asp Thr Val  
 340 345 350

<210> 3  
 <211> 1050  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético, ADN con codones optimizados de mamífero

10 <400> 3

atggctgagc tgatcagcag cgccaccaga tctctgtttg ccgccggagg catcaaccct 60  
 tggcctaacc cctaccacca cgaggacatg ggctgtggag gaatgacacc tacaggcgag 120  
 tgcttcagca ccgagtgggtg gtgtgaccct tcttacggac tgagcgacgc cggatacggg 180  
 tattgcttcg tggaggccac aggcggctac ctggctcgtgg gagtggagaa gaagcaggct 240  
 tggctgcaca gcagaggcac accaggagaa aagatcggcg cccaggtctg ccagtggatt 300  
 gctttcagca tcgccatcgc cctgctgaca ttctacggct tcagcgcctg gaaggccact 360  
 tgcggttggg aggaggtcta cgtctgttgc gtcgaggtgc tgttcgtgac cctggagatc 420  
 ttcaaggagt tcagcagccc cgccacagtg tacctgtcta ccggcaacca cgcctattgc 480

ES 2 660 114 T3

ctgcgctact tcgagtggct gctgtcttgc cccgtgatcc tgatcaagct gagcaacctg 540  
 agcggcctga agaacgacta cagcaagcgg accatgggcc tgatcgtgtc ttgctgtggga 600  
 atgatcgtgt tcggcatggc cgcaggactg gctaccgatt ggctcaagtg gctgctgtat 660  
 atcgtgtctt gcatctacgg cggctacatg tacttccagg ccgccaagtg ctacgtggaa 720  
 gccaaccaca gcgtgcctaa aggccattgc cgcattggctg tgaagctgat ggcctacgct 780  
 tacttcgcct cttggggcag ctacccaatc ctctgggcag tgggaccaga aggactgctg 840  
 aagctgagcc cttacgcaa cagcatcggc cacagcatct gcgacatcat cgccaaggag 900  
 ttttgacct tcctggccca ccacctgagg atcaagatcc acgagcacat cctgatccac 960  
 ggcgacatcc ggaagaccac caagatggag atcggaggcg aggagtgga agtgggaagag 1020  
 ttcgtggagg aggaggacga ggacacagtg 1050

<210> 4

<211> 235

5 <212> PRT

<213> *Chlamydomonas noctigama*

<400> 4

Gly Thr Pro Gly Glu Lys Ile Gly Ala Gln Val Cys Gln Trp Ile Ala  
 1 5 10 15  
 Phe Ser Ile Ala Ile Ala Leu Leu Thr Phe Tyr Gly Phe Ser Ala Trp  
 20 25 30  
 Lys Ala Thr Cys Gly Trp Glu Glu Val Tyr Val Cys Cys Val Glu Val  
 35 40 45  
 Leu Phe Val Thr Leu Glu Ile Phe Lys Glu Phe Ser Ser Pro Ala Thr  
 50 55 60  
 Val Tyr Leu Ser Thr Gly Asn His Ala Tyr Cys Leu Arg Tyr Phe Glu  
 65 70 75 80  
 Trp Leu Leu Ser Cys Pro Val Ile Leu Ile Lys Leu Ser Asn Leu Ser  
 85 90 95  
 Gly Leu Lys Asn Asp Tyr Ser Lys Arg Thr Met Gly Leu Ile Val Ser  
 100 105 110  
 Cys Val Gly Met Ile Val Phe Gly Met Ala Ala Gly Leu Ala Thr Asp  
 115 120 125  
 Trp Leu Lys Trp Leu Leu Tyr Ile Val Ser Cys Ile Tyr Gly Gly Tyr  
 130 135 140

10

ES 2 660 114 T3

Met Tyr Phe Gln Ala Ala Lys Cys Tyr Val Glu Ala Asn His Ser Val  
145 150 155 160

Pro Lys Gly His Cys Arg Met Val Val Lys Leu Met Ala Tyr Ala Tyr  
165 170 175

Phe Ala Ser Trp Gly Ser Tyr Pro Ile Leu Trp Ala Val Gly Pro Glu  
180 185 190

Gly Leu Leu Lys Leu Ser Pro Tyr Ala Asn Ser Ile Gly His Ser Ile  
195 200 205

Cys Asp Ile Ile Ala Lys Glu Phe Trp Thr Phe Leu Ala His His Leu  
210 215 220

Arg Ile Lys Ile His Glu His Ile Leu Ile His  
225 230 235

<210> 5

<211> 350

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 5

Met Ala Glu Leu Ile Ser Ser Ala Thr Arg Ser Leu Phe Ala Ala Gly  
1 5 10 15

Gly Ile Asn Pro Trp Pro Asn Pro Tyr His His Glu Asp Met Gly Cys  
20 25 30

Gly Gly Met Thr Pro Thr Gly Glu Cys Phe Ser Thr Glu Trp Trp Cys  
35 40 45

Asp Pro Ser Tyr Gly Leu Ser Asp Ala Gly Tyr Gly Tyr Cys Phe Val  
50 55 60

Glu Ala Thr Gly Gly Tyr Leu Val Val Gly Val Glu Lys Lys Gln Ala  
65 70 75 80

Trp Leu His Ser Arg Gly Thr Pro Gly Glu Lys Ile Gly Ala Gln Val  
85 90 95

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

ES 2 660 114 T3

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

Cys Cys Val Glu Val Leu Phe Val Thr Leu Glu Ile Phe Lys Glu Phe  
130 135 140

Ser Ser Pro Ala Thr Val Tyr Leu Ser Thr Gly Asn His Ala Tyr Cys  
145 150 155 160

Leu Arg Tyr Phe Glu Trp Leu Leu Ser Cys Pro Val Ile Leu Ile Arg  
165 170 175

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

Gly Leu Ile Val Ser Cys Val Gly Met Ile Val Phe Gly Met Ala Ala  
195 200 205

Gly Leu Ala Thr Asp Trp Leu Lys Trp Leu Leu Tyr Ile Val Ser Cys  
210 215 220

Ile Tyr Gly Gly Tyr Met Tyr Phe Gln Ala Ala Lys Cys Tyr Val Glu  
225 230 235 240

Ala Asn His Ser Val Pro Lys Gly His Cys Arg Met Val Val Lys Leu  
245 250 255

Met Ala Tyr Ala Tyr Phe Ala Ser Trp Gly Ser Tyr Pro Ile Leu Trp  
260 265 270

Ala Val Gly Pro Glu Gly Leu Leu Lys Leu Ser Pro Tyr Ala Asn Ser  
275 280 285

Ile Gly His Ser Ile Cys Asp Ile Ile Ala Lys Glu Phe Trp Thr Phe  
290 295 300

Leu Ala His His Leu Arg Ile Lys Ile His Glu His Ile Leu Ile His  
305 310 315 320

Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Lys Met Glu Ile Gly Gly Glu Glu Val  
325 330 335

Glu Val Glu Glu Phe Val Glu Glu Glu Asp Glu Asp Thr Val  
340 345 350

<210> 6  
<211> 421  
5 <212> PRT

ES 2 660 114 T3

<213> *Stigeoclonium helveticum*

<400> 6

Met Glu Thr Ala Ala Thr Met Thr His Ala Phe Ile Ser Ala Val Pro  
 1 5 10 15

Ser Ala Glu Ala Thr Ile Arg Gly Leu Leu Ser Ala Ala Ala Val Val  
 20 25 30

Thr Pro Ala Ala Asp Ala His Gly Glu Thr Ser Asn Ala Thr Thr Ala  
 35 40 45

Gly Ala Asp His Gly Cys Phe Pro His Ile Asn His Gly Thr Glu Leu  
 50 55 60

Gln His Lys Ile Ala Val Gly Leu Gln Trp Phe Thr Val Ile Val Ala  
 65 70 75 80

Ile Val Gln Leu Ile Phe Tyr Gly Trp His Ser Phe Lys Ala Thr Thr  
 85 90 95

Gly Trp Glu Glu Val Tyr Val Cys Val Ile Glu Leu Val Lys Cys Phe  
 100 105 110

Ile Glu Leu Phe His Glu Val Asp Ser Pro Ala Thr Val Tyr Gln Thr  
 115 120 125

Asn Gly Gly Ala Val Ile Trp Leu Arg Tyr Ser Met Trp Leu Leu Thr  
 130 135 140

Cys Pro Val Ile Leu Ile His Leu Ser Asn Leu Thr Gly Leu His Glu  
 145 150 155 160

Glu Tyr Ser Lys Arg Thr Met Thr Ile Leu Val Thr Asp Ile Gly Asn  
 165 170 175

Ile Val Trp Gly Ile Thr Ala Ala Phe Thr Lys Gly Pro Leu Lys Ile  
 180 185 190

Leu Phe Phe Met Ile Gly Leu Phe Tyr Gly Val Thr Cys Phe Phe Gln  
 195 200 205

Ile Ala Lys Val Tyr Ile Glu Ser Tyr His Thr Leu Pro Lys Gly Val  
 210 215 220

Cys Arg Lys Ile Cys Lys Ile Met Ala Tyr Val Phe Phe Cys Ser Trp  
 225 230 235 240

ES 2 660 114 T3

Leu Met Phe Pro Val Met Phe Ile Ala Gly His Glu Gly Leu Gly Leu  
 245 250 255

Ile Thr Pro Tyr Thr Ser Gly Ile Gly His Leu Ile Leu Asp Leu Ile  
 260 265 270

Ser Lys Asn Thr Trp Gly Phe Leu Gly His His Leu Arg Val Lys Ile  
 275 280 285

His Glu His Ile Leu Ile His Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Thr Ile  
 290 295 300

Asn Val Ala Gly Glu Asn Met Glu Ile Glu Thr Phe Val Asp Glu Glu  
 305 310 315 320

Glu Glu Gly Gly Val Asn His Gly Thr Ala Asp Leu Ala His Arg Ala  
 325 330 335

Ser Phe Gln Lys Met Gly Asp Arg Leu Arg Ala Gln Gly Val Thr Val  
 340 345 350

Arg Ala Ser Leu Asp Ala His Glu Val Pro Pro Ala Asp Glu Glu Asn  
 355 360 365

Lys Phe Ala Gln Lys Ser Ala Ala Ala Asn Met Pro Ala Tyr Asn Pro  
 370 375 380

Gly Lys Val Ile Leu Ile Val Pro Asp Met Ser Met Val Asp Tyr Phe  
 385 390 395 400

Arg Asp Gln Phe Glu Gln Leu Pro Thr Arg Met Glu Leu Leu Pro Ala  
 405 410 415

Leu Gly Met Asp Thr  
 420

<210> 7

<211> 325

5 <212> PRT

<213> *Stigeoclonium helveticum*

<400> 7

Met Glu Thr Ala Ala Thr Met Thr His Ala Phe Ile Ser Ala Val Pro  
 1 5 10 15

Ser Ala Glu Ala Thr Ile Arg Gly Leu Leu Ser Ala Ala Ala Val Val  
 20 25 30

10

ES 2 660 114 T3

Thr Pro Ala Ala Asp Ala His Gly Glu Thr Ser Asn Ala Thr Thr Ala  
 35 40 45  
 Gly Ala Asp His Gly Cys Phe Pro His Ile Asn His Gly Thr Glu Leu  
 50 55 60  
 Gln His Lys Ile Ala Val Gly Leu Gln Trp Phe Thr Val Ile Val Ala  
 65 70 75 80  
 Ile Val Gln Leu Ile Phe Tyr Gly Trp His Ser Phe Lys Ala Thr Thr  
 85 90 95  
 Gly Trp Glu Glu Val Tyr Val Cys Val Ile Glu Leu Val Lys Cys Phe  
 100 105 110  
 Ile Glu Leu Phe His Glu Val Asp Ser Pro Ala Thr Val Tyr Gln Thr  
 115 120 125  
 Asn Gly Gly Ala Val Ile Trp Leu Arg Tyr Ser Met Trp Leu Leu Thr  
 130 135 140  
 Cys Pro Val Ile Leu Ile His Leu Ser Asn Leu Thr Gly Leu His Glu  
 145 150 155 160  
 Glu Tyr Ser Lys Arg Thr Met Thr Ile Leu Val Thr Asp Ile Gly Asn  
 165 170 175  
 Ile Val Trp Gly Ile Thr Ala Ala Phe Thr Lys Gly Pro Leu Lys Ile  
 180 185 190  
 Leu Phe Phe Met Ile Gly Leu Phe Tyr Gly Val Thr Cys Phe Phe Gln  
 195 200 205  
 Ile Ala Lys Val Tyr Ile Glu Ser Tyr His Thr Leu Pro Lys Gly Val  
 210 215 220  
 Cys Arg Lys Ile Cys Lys Ile Met Ala Tyr Val Phe Phe Cys Ser Trp  
 225 230 235 240  
 Leu Met Phe Pro Val Met Phe Ile Ala Gly His Glu Gly Leu Gly Leu  
 245 250 255  
 Ile Thr Pro Tyr Thr Ser Gly Ile Gly His Leu Ile Leu Asp Leu Ile  
 260 265 270  
 Ser Lys Asn Thr Trp Gly Phe Leu Gly His His Leu Arg Val Lys Ile  
 275 280 285

ES 2 660 114 T3

His Glu His Ile Leu Ile His Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Thr Ile  
 290 295 300

Asn Val Ala Gly Glu Asn Met Glu Ile Glu Thr Phe Val Asp Glu Glu  
 305 310 315 320

Glu Glu Gly Gly Val  
 325

<210> 8

<211> 975

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético, ADN con codones optimizados de mamífero

10

<400> 8

```

atggaacag cgcacacaat gaccacagcc tttatctcag ccgtgcctag cgccgaagcc      60
acaattagag gcctgctgag cgccgcagca gtggtgacac cagcagcaga cgctcacgga      120
gaaacctcta acgccacaac agccggagcc gatcacgggtt gcttccccca catcaaccac      180
ggaaccgagc tgcagcacia gatcgcagtg ggactccagt ggttcaccgt gatcgtggct      240
atcgtgcagc tcatcttcta cggttggcac agcttcaagg ccacaaccgg ctgggaggag      300
gtctacgtct gcgtgatcga gctcgtcaag tgcttcatcg agctgttcca cgaggtcagc      360
agcccagcca cagtgtacca gaccaacgga ggagccgtga tttggctgcg gtacagcatg      420
tggctcctga cttgccccgt gatcctgata cacctgagca acctgaccgg actgcacgaa      480
gagtacagca agcggacat gaccatcctg gtgaccgaca tcggcaacat cgtgtggggg      540
atcacagccg cttttacaaa gggccccctg aagatcctgt tcttcatgat cggcctgttc      600
tacggcgtga cttgcttctt ccagatcgcc aagggtgata tcgagagcta ccacaccctg      660
cccaaaggcg tctgcccggaa gatttgcaag atcatggcct acgtcttctt ctgctcttgg      720
ctgatgttcc ccgtgatggt catcgccgga cagcagggac tgggcctgat cacaccttac      780
accagcggaa tcggccacct gatcctggat ctgatcagca agaacacttg gggcttcctg      840
ggccaccacc tgagagtgaa gatccacgag cacatcctga tccacggcga catccggaag      900
acaaccacca tcaacgtggc cggcgagaac atggagatcg agaccttcgt cgacgaggag      960
gaggagggag gaggag      975
    
```

15 <210> 9

<211> 235

<212> PRT

<213> *Stigeoclonium helveticum*

20 <400> 9

ES 2 660 114 T3

Gly Thr Glu Leu Gln His Lys Ile Ala Val Gly Leu Gln Trp Phe Thr  
 1 5 10 15

Val Ile Val Ala Ile Val Gln Leu Ile Phe Tyr Gly Trp His Ser Phe  
 20 25 30

Lys Ala Thr Thr Gly Trp Glu Glu Val Tyr Val Cys Val Ile Glu Leu  
 35 40 45

Val Lys Cys Phe Ile Glu Leu Phe His Glu Val Asp Ser Pro Ala Thr  
 50 55 60

Val Tyr Gln Thr Asn Gly Gly Ala Val Ile Trp Leu Arg Tyr Ser Met  
 65 70 75 80

Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Ile Leu Ile His Leu Ser Asn Leu Thr  
 85 90 95

Gly Leu His Glu Glu Tyr Ser Lys Arg Thr Met Thr Ile Leu Val Thr  
 100 105 110

Asp Ile Gly Asn Ile Val Trp Gly Ile Thr Ala Ala Phe Thr Lys Gly  
 115 120 125

Pro Leu Lys Ile Leu Phe Phe Met Ile Gly Leu Phe Tyr Gly Val Thr  
 130 135 140

Cys Phe Phe Gln Ile Ala Lys Val Tyr Ile Glu Ser Tyr His Thr Leu  
 145 150 155 160

Pro Lys Gly Val Cys Arg Lys Ile Cys Lys Ile Met Ala Tyr Val Phe  
 165 170 175

Phe Cys Ser Trp Leu Met Phe Pro Val Met Phe Ile Ala Gly His Glu  
 180 185 190

Gly Leu Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Thr Ser Gly Ile Gly His Leu Ile  
 195 200 205

Leu Asp Leu Ile Ser Lys Asn Thr Trp Gly Phe Leu Gly His His Leu  
 210 215 220

Arg Val Lys Ile His Glu His Ile Leu Ile His  
 225 230 235

<210> 10  
 <211> 457  
 5 <212> PRT

ES 2 660 114 T3

<213> *Chloromonas subdivisa*

<400> 10

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

Gly Ile Thr Ser Thr Thr Thr Ala Ser Ser Ala Pro Ala Ala Ser Ser  
 20 25 30

Thr Asp Gly Thr Ala Ala Ala Ala Val Ser His Tyr Ala Met Asn Gly  
 35 40 45

Phe Asp Glu Leu Ala Lys Gly Ala Val Val Pro Glu Asp His Phe Val  
 50 55 60

Cys Gly Pro Ala Asp Lys Cys Tyr Cys Ser Ala Trp Leu His Ser His  
 65 70 75 80

Gly Ser Lys Glu Glu Lys Thr Ala Phe Thr Val Met Gln Trp Ile Val  
 85 90 95

Phe Ala Val Cys Ile Ile Ser Leu Leu Phe Tyr Ala Tyr Gln Thr Trp  
 100 105 110

Arg Ala Thr Cys Gly Trp Glu Glu Val Tyr Val Thr Ile Ile Glu Leu  
 115 120 125

Val His Val Cys Phe Gly Leu Trp His Glu Val Asp Ser Pro Cys Thr  
 130 135 140

Leu Tyr Leu Ser Thr Gly Asn Met Val Leu Trp Leu Arg Tyr Ala Glu  
 145 150 155 160

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

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

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

Phe Val Lys Ile Ile Phe Phe Phe Leu Gly Leu Leu Tyr Gly Phe Tyr  
 210 215 220

Thr Phe Tyr Ala Ala Ala Lys Ile Tyr Ile Glu Ala Tyr His Thr Val



ES 2 660 114 T3

<400> 11

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

Gly Ile Thr Ser Thr Thr Thr Ala Ser Ser Ala Pro Ala Ala Ser Ser  
 20 25 30

Thr Asp Gly Thr Ala Ala Ala Ala Val Ser His Tyr Ala Met Asn Gly  
 35 40 45

Phe Asp Glu Leu Ala Lys Gly Ala Val Val Pro Glu Asp His Phe Val  
 50 55 60

Cys Gly Pro Ala Asp Lys Cys Tyr Cys Ser Ala Trp Leu His Ser His  
 65 70 75 80

Gly Ser Lys Glu Glu Lys Thr Ala Phe Thr Val Met Gln Trp Ile Val  
 85 90 95

Phe Ala Val Cys Ile Ile Ser Leu Leu Phe Tyr Ala Tyr Gln Thr Trp  
 100 105 110

Arg Ala Thr Cys Gly Trp Glu Glu Val Tyr Val Thr Ile Ile Glu Leu  
 115 120 125

Val His Val Cys Phe Gly Leu Trp His Glu Val Asp Ser Pro Cys Thr  
 130 135 140

Leu Tyr Leu Ser Thr Gly Asn Met Val Leu Trp Leu Arg Tyr Ala Glu  
 145 150 155 160

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

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

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

Phe Val Lys Ile Ile Phe Phe Phe Leu Gly Leu Leu Tyr Gly Phe Tyr  
 210 215 220

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

ES 2 660 114 T3

Pro Lys Gly Ile Cys Arg Gln Leu Val Arg Leu Gln Ala Tyr Asp Phe  
 245 250 255

Phe Phe Thr Trp Ser Met Phe Pro Ile Leu Phe Met Val Gly Pro Glu  
 260 265 270

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

Cys Asp Leu Leu Ser Lys Asn Leu Trp Gly Leu Met Gly His Phe Ile  
 290 295 300

Arg Val Lys Ile His Glu His Ile Leu Val His Gly Asn Ile Thr Lys  
 305 310 315 320

Lys Thr Lys Val Asn Val Ala Gly Asp Met Val Glu Leu Asp Thr Tyr  
 325 330 335

Val Asp Gln Asp Glu Glu His Asp Glu Gly  
 340 345

<210> 12

<211> 1038

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético, ADN con codones optimizados de mamífero

10

<400> 12

atgagcagac tggtcgccgc ttcttggctg ctggctctcc tcctctgcgg aattaccagc 60  
 acaacaacag cctctagcgc cccagcagct tcttctacag acggaacagc cgccgcagca 120  
 gtgtctcact acgccatgaa cggcttcgac gagctggcta aaggagccgt ggtgccagaa 180  
 gaccactttg tctgcccacc agccgacaag tgctattgct ccgcttggct gcacagccac 240  
 ggaagcaagg aggagaagac cgccttcacc gtcattgcagt ggatcgtgtt cgccgtctgc 300  
 atcatcagcc tgctgttcta cgcctaccag acttggaggg ctacttgcgg ttgggaggag 360  
 gtgtacgtga ccatcatcga gctggtccac gtctgcttcg gactctggca cgaggtcgat 420  
 agcccttgta ccctgtacct gagcacaggc aacatggtcc tctggctgag atacgccgag 480  
 tggctgctga cttgccccgt gatcctgac cacctgagca acctgaccgg catgaagaac 540  
 gactacaaca agcggaccat ggccctgctg gtgtcagacg tgggctgtat cgtgtgggga 600  
 acaacagccg ccctgagcac cgatttcgtg aagatcatct tcttcttctt gggcctgctg 660  
 tacggcttct acaccttcta cgccgcgcc aagatctaca tcgaggccta ccacaccgtg 720  
 cccaagggca tttgtagaca gctcgtgcgg ctgcaggcct acgacttctt cttcacttgg 780

ES 2 660 114 T3

agcatgttcc ccatacctggt catggtcggc ccagagggat tcggcaagat caccgcctac 840  
 agcagcggaa tcgcccacga agtgtgcgat ctgctgagca agaactctg gggcctgatg 900  
 ggccacttca tccgcgtgaa gatccacgag cacatacctgg tgcacggcaa catcaccaag 960  
 aagaccaagg tcaacgtggc cggcgacatg gtggaactgg acacctacgt ggaccaggac 1020  
 gaggaacacg acgagggga 1038

<210> 13

<211> 235

5 <212> PRT

<213> *Chloromonas subdivisa*

<400> 13

Gly Ser Lys Glu Glu Lys Thr Ala Phe Thr Val Met Gln Trp Ile Val  
 1 5 10 15

Phe Ala Val Cys Ile Ile Ser Leu Leu Phe Tyr Ala Tyr Gln Thr Trp  
 20 25 30

Arg Ala Thr Cys Gly Trp Glu Glu Val Tyr Val Thr Ile Ile Glu Leu  
 35 40 45

Val His Val Cys Phe Gly Leu Trp His Glu Val Asp Ser Pro Cys Thr  
 50 55 60

Leu Tyr Leu Ser Thr Gly Asn Met Val Leu Trp Leu Arg Tyr Ala Glu  
 65 70 75 80

Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Ile Leu Ile His Leu Ser Asn Leu Thr  
 85 90 95

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

Asp Val Gly Cys Ile Val Trp Gly Thr Thr Ala Ala Leu Ser Thr Asp  
 115 120 125

Phe Val Lys Ile Ile Phe Phe Phe Leu Gly Leu Leu Tyr Gly Phe Tyr  
 130 135 140

Thr Phe Tyr Ala Ala Ala Lys Ile Tyr Ile Glu Ala Tyr His Thr Val  
 145 150 155 160

Pro Lys Gly Ile Cys Arg Gln Leu Val Arg Leu Gln Ala Tyr Asp Phe  
 165 170 175

10 Phe Phe Thr Trp Ser Met Phe Pro Ile Leu Phe Met Val Gly Pro Glu

ES 2 660 114 T3

180

185

190

Gly Phe Gly Lys Ile Thr Ala Tyr Ser Ser Gly Ile Ala His Glu Val  
 195 200 205

Cys Asp Leu Leu Ser Lys Asn Leu Trp Gly Leu Met Gly His Phe Ile  
 210 215 220

Arg Val Lys Ile His Glu His Ile Leu Val His  
 225 230 235

<210> 14

<211> 310

5 <212> PRT

<213> *Neochlorosarcina*

<400> 14

Met Ala Asp Phe Val Trp Gln Gly Ala Gly Asn Gly Gly Pro Ser Ala  
 1 5 10 15

Met Val Ser His Tyr Pro Asn Gly Ser Val Leu Leu Glu Ser Ser Gly  
 20 25 30

Ser Cys Tyr Cys Glu Asp Trp Tyr Thr Ser Arg Gly Asn His Val Glu  
 35 40 45

His Ser Leu Ser Asn Ala Cys Asp Trp Phe Ala Phe Ala Ile Ser Val  
 50 55 60

Ile Phe Leu Val Tyr Tyr Ala Trp Ala Ala Phe Asn Ser Ser Val Gly  
 65 70 75 80

Trp Glu Glu Ile Tyr Val Cys Thr Val Glu Leu Ile Lys Val Ser Ile  
 85 90 95

Asp Gln Phe Leu Ser Ser Asn Ser Pro Cys Thr Leu Tyr Leu Ser Thr  
 100 105 110

Gly Asn Arg Val Leu Trp Ile Arg Tyr Gly Glu Trp Leu Leu Thr Cys  
 115 120 125

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

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

10

Val Phe Gly Val Thr Ser Ala Met Cys Thr Gly Tyr Pro Lys Val Ile



ES 2 660 114 T3

atggccgact	tcgtgtggca	gggagctgga	aacggaggac	caagcgccat	ggtgtcccac	60
taccccaatg	gcagcgtgct	gctggagagc	tccggcagct	gctactgtga	agactgggat	120
acttctcggg	gcaaccacgt	ggagcattct	ctgagtaatg	cttgcgattg	gttcgccttt	180
gctatcagcg	tgattttctt	ggtgtactat	gcctgggccg	cttttaactc	tagtgtgggc	240
tgggagghaa	tctacgtgtg	caccgtggag	ctgatcaagg	tgagcattga	tcagttcctg	300
agctccaact	ctccttgtac	cctgtacctg	agtacaggga	atagggtgct	gtggatcaga	360
tatggcgaat	ggctgctgac	ttgtccagtg	atcctgattc	acctgtccaa	cgtgacaggg	420
ctgaaggaca	attactctaa	acgcactatg	gctctgctgg	tgagtgatat	cgggaccatc	480
gtgttcggcg	tgactttctg	catgtgcacc	ggatacccca	aagtgatctt	ctttattctg	540
ggctgctggt	atggagctaa	cacattcttt	aatgccgcta	aggtgtacct	ggaggcccac	600
catacactgc	ctaaaggctc	ttgtaggact	ctgatcagac	tgatggccta	tacctactat	660
gctagttggg	gaatgttccc	cattctgttt	gtgctgggac	ctgagagctt	cggccacatg	720
aacatgtacc	agtccaatat	cgcccatacc	gtgattgacc	tgatgtccaa	gaacatctgg	780
ggaatgctgg	ggcactttct	gcggcataaa	attcgcgagc	acatcctgat	tcatggagat	840
ctgctggacca	caactaccgt	gaatgtggct	ggggaggghaa	tgacagtgga	aacaatggtg	900
gccgctgagg	acgccgatga	aacaactgtg				930

5 <210> 16  
 <211> 304  
 <212> PRT  
 <213> *Heterochlamydomonas inaequalis*

10 <400> 16

ES 2 660 114 T3

Met Gly Gly Ile Gly Gly Gly Gly Ile Gln Pro Arg Asp Tyr Ser Tyr  
 1 5 10 15

Gly Ala Asn Gly Thr Val Cys Val Asn Pro Asp Val Cys Phe Cys Leu  
 20 25 30

Asp Trp Gln Gln Pro Phe Gly Ser Asn Met Glu Asn Asn Val Ser Gln  
 35 40 45

Gly Phe Gln Leu Phe Thr Ile Ala Leu Ser Ala Cys Ile Leu Met Phe  
 50 55 60

Tyr Ala Tyr Glu Trp Tyr Lys Ala Thr Cys Gly Trp Glu Glu Ile Tyr  
 65 70 75 80

Val Cys Val Val Glu Met Ser Lys Ile Cys Ile Glu Leu Val His Glu  
 85 90 95

Tyr Asp Thr Pro Phe Cys Leu Tyr Leu Ala Thr Gly Ser Arg Val Leu  
 100 105 110

Trp Leu Arg Tyr Ala Glu Trp Leu Met Thr Cys Pro Val Ile Leu Ile  
 115 120 125

His Leu Ser Asn Ile Thr Gly Leu Gly Thr Asp Tyr Asn Lys Arg Thr  
 130 135 140

Met Val Leu Leu Met Ser Asp Ile Gly Cys Ile Val Phe Gly Ala Thr  
 145 150 155 160

ES 2 660 114 T3

Ala Ala Phe Ala Asn Glu Gly Tyr Val Lys Cys Ala Cys Phe Leu Leu  
 165 170 175

Gly Met Ala Trp Gly Met Asn Thr Phe Tyr Asn Ala Ala Lys Val Tyr  
 180 185 190

Tyr Glu Ser Tyr Val Leu Val Pro Ser Gly Ile Cys Lys Leu Leu Val  
 195 200 205

Ala Val Met Ala Gly Leu Tyr Tyr Val Ser Trp Ser Leu Phe Pro Ile  
 210 215 220

Leu Phe Ala Ile Gly Pro Glu Gly Phe Gly Val Ile Ser Leu Gln Ala  
 225 230 235 240

Ser Thr Ile Gly His Thr Ile Ala Asp Val Leu Ser Lys Asn Met Trp  
 245 250 255

Gly Leu Met Gly His Phe Leu Arg Val Gln Ile Tyr Lys His Ile Leu  
 260 265 270

Leu His Gly Asn Ile Arg Lys Pro Ile Lys Leu His Met Leu Gly Glu  
 275 280 285

Glu Val Glu Val Met Ala Leu Val Ser Glu Glu Gly Glu Asp Thr Val  
 290 295 300

<210> 17  
 <211> 912  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético; ADN con codones optimizados de mamífero

10 <400> 17

atgggaggaa ttggcggagg cggcattcag cctagagact acagctacgg cgccaacgga 60  
 acagtctgcg tgaaccccga cgtctgcttc tgtctggatt ggcagcagcc cttcggctct 120  
 aacatggaga acaacgtgtc ccagggcttc cagctgttta ccatcgccct gagcgcctgc 180  
 atcctgatgt tctacgccta cgagtggtag aaggccactt gcggttggga ggagatctac 240  
 gtctgcgtgg tggagatgag caagatttgc atcgagctgg tgcacgagta cgacaccccc 300  
 ttttgctgt acctggccac cggcagcaga gtccctctggc tgagatacgc cgagtggctc 360  
 atgacttgcc ccgtgatcct gatccacctg agcaacatca ccggactggg caccgactac 420  
 aacaagcgga ccatggtgct cctgatgagc gacatcggtt gcatcgtgtt cggcgcacaca 480

ES 2 660 114 T3

gcagcattcg ccaacgaggg ctacgtgaag tgcgcttggt tcctgctggg catggcttgg 540  
 ggcatgaaca ctttctacaa cgccgccaag gtgtactacg agagctacgt gctgggtgcc 600  
 tccggaattt gcaagctgct ggtggccgtg atggccggac tgtactacgt gtcttgagc 660  
 ctgttcccca tcctgtttgc catcggccca gagggatttg gcgtgatcag cctgcaggcc 720  
 agcaccattg gccacacaat cgccgacgtg ctgagcaaga acatgtgggg cctgatgggc 780  
 cacttcctgc ggggtgcagat ctacaagcac atcctgctgc acggcaacat ccggaagcct 840  
 atcaagctgc acatgctggg cgaggaggtg gaagtgatgg ctctggtgtc cgaggagga 900  
 gaggataccg tg 912

<210> 18  
 <211> 927  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético; ADN con codones optimizados de mamífero

10

<400> 18

atggactatg gcggcgcttt gtctgccgtc ggacgcgaac ttttgttcgt tactaatcct 60  
 gtggtggtga acgggtccgt cctggtcctt gaggatcaat gttactgtgc cggatggatt 120  
 gaatctcgcg gcacgaacgg cgctcagacc gcgtcaaagt tcctgcagtg gcttgacgca 180  
 ggattcagca ttttgctgct gatgttctat gcctaccaa cctggaaatc tacatgcggc 240  
 tgggaggaga tctatgtgtg cgccattgaa atggttaagg tgattctcga gttctttttt 300  
 gagtttaaga atccctctat gctctacctt gccacaggac accgggtgca gtggctgcgc 360  
 tatgcagagt ggctgctcac ttgtcctgtc atccttatcc acctgagcaa cctcaccggc 420  
 ctgagcaacg actacagcag gagaaccatg ggactccttg tctcagacat cgggactatc 480  
 gtgtgggggg ctaccagcgc catggcaacc ggctatgta aagtcactct cttttgtctt 540  
 ggattgtgct atggcgcgaa cacatTTTTT cacgcccca aagcatatat cgagggttat 600  
 catactgtgc caaagggctg gtgccgccag gtcgtgaccg gcatggcatg gctgtttttc 660  
 gtgagctggg gtatgttccc aattctcttc attttggggc ccgaaggttt tggcgtcctg 720  
 agcgtctatg gctccaccgt aggtcacacg attattgatc tgatgagtaa aaattgttgg 780  
 gggttgttgg gacactacct gcgcgtcctg atccacgagc acatattgat tcacggagat 840  
 atccgcaaaa ccaccaaact gaacatcggc ggaacggaga tcgaggtcga gactctcgtc 900  
 gaagacgaag ccgaggccgg agccgtg 927

<210> 19  
 <211> 309  
 <212> PRT  
 <213> *Chlamydomonas reinhardtii*

15

ES 2 660 114 T3

<400> 19

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

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

ES 2 660 114 T3

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  
 305

<210> 20  
 <211> 60  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

10 <400> 20  
 gtcccgtgca cgctgctct gctgttgca gccgccctgg ctccgactca gacgcgggcc 60

15 <210> 21  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 21

Met Val Pro Cys Thr Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Leu Ala Pro  
 1 5 10 15

Thr Gln Thr Arg Ala  
 20

25 <210> 22  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <400> 22  
 ttctgctacg agaatgaagt g 21

40 <210> 23  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 660 114 T3

<223> Polipéptido sintético

<400> 23

Phe Cys Tyr Glu Asn Glu Val  
1 5

5

<210> 24

<211> 60

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

15 <400> 24

aaatccagaa ttactctga aggggagtat atccctctgg atcaaataga catcaatgtt 60

<210> 25

<211> 20

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

25

<400> 25

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

## REIVINDICACIONES

1. Polipéptido de canal iónico activado por luz aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de canal de *Chlamydomonas noctigama* activado por luz de tipo natural o modificado,
- 5 en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido de canal iónico activado por luz comprende SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos del polipéptido de canal iónico activado por luz comprende una secuencia modificada de canal iónico de *Chlamydomonas noctigama* activado por luz que tiene una identidad de al menos el 70% con respecto a los aminoácidos 86-320 de SEQ ID NO: 2 y una identidad de al menos el 95% con respecto a los
- 10 aminoácidos restantes en la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 2,
- mediante lo cual una secuencia de ácido nucleico o polipéptido puede expresarse de manera natural en una célula u organismo de un miembro del género *Chlamydomonas*, pero siempre que la secuencia no sea parte de o esté incluida en una célula u organismo de *Chlamydomonas*, se considera aislado.
- 15
2. Polipéptido según la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido de canal iónico activado por luz comprende una secuencia modificada de canal iónico de *Chlamydomonas noctigama* activado por luz que tiene una identidad de al menos el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95% o el 99% con respecto a los aminoácidos 86-320 de SEQ ID NO: 2 y una identidad de al menos el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a los aminoácidos restantes en la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 2.
- 20
3. Polipéptido según la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido de canal iónico activado por luz comprende SEQ ID NO: 5.
- 25
4. Polipéptido según la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido de canal iónico activado por luz comprende una secuencia modificada de canal iónico de *Chlamydomonas noctigama* activado por luz que tiene una identidad de al menos el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95% o el 99% con respecto a los aminoácidos 86-320 de SEQ ID NO: 5 y una identidad del 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con respecto a los aminoácidos restantes en la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 5.
- 30
5. Ácido nucleico que codifica para el polipéptido de canal iónico activado por luz aislado, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 35
6. Ácido nucleico según la reivindicación 5, en el que la secuencia de ácido nucleico es tal como se expone en SEQ ID NO: 3.
7. Vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 5 ó 6.
- 40
8. Vector según la reivindicación 7, en el que el vector es un vector de expresión.
9. Polipéptido de canal iónico activado por luz según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para su uso en un método de tratamiento médico de un sujeto.
- 45
10. Polipéptido para su uso en un método según la reivindicación 9, en el que el trastorno se selecciona de alcalosis y trastornos del sistema visual.
- 50
11. Polipéptido de canal iónico activado por luz según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, ácido nucleico según las reivindicaciones 5-6 o vector según las reivindicaciones 7-8, para su uso en un método de tratamiento de un trastorno en un sujeto, comprendiendo el método
- a) administrar a un sujeto que necesita tal tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho polipéptido de canal iónico activado por luz, dicho ácido nucleico o dicho vector, para tratar el trastorno, mediante lo cual dicha administración da como resultado la expresión del canal iónico activado por luz en una célula en el sujeto, y
- 55 b) poner en contacto la célula del sujeto con luz y activar el canal iónico activado por luz en la célula en condiciones suficientes para alterar la conductividad iónica de una membrana celular, en el que la alteración de la conductividad de la membrana celular trata el trastorno.
- 60
12. Polipéptido, ácido nucleico o vector para su uso en un método según la reivindicación 11, en el que la alteración de la conductividad iónica de la membrana despolariza la célula.
13. Polipéptido, ácido nucleico o vector para su uso en un método según la reivindicación 11, en el que el trastorno se selecciona de lesión, daño cerebral y estados neurológicos degenerativos.
- 65
14. Polipéptido, ácido nucleico o vector para su uso en un método según la reivindicación 13, en el que el trastorno se selecciona de enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, convulsión, pérdida de visión y pérdida de

audición.

15. Método de alteración de la conductividad iónica de una membrana, comprendiendo el método,

- 5 a) expresar, en una membrana celular huésped, un polipéptido de canal iónico activado por luz tal según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y
- b) poner en contacto el polipéptido de canal iónico activado por luz con una luz que activa el canal iónico activado por luz y altera la conductividad iónica de la membrana,
- 10 en el que el método se lleva a cabo *in vitro*.

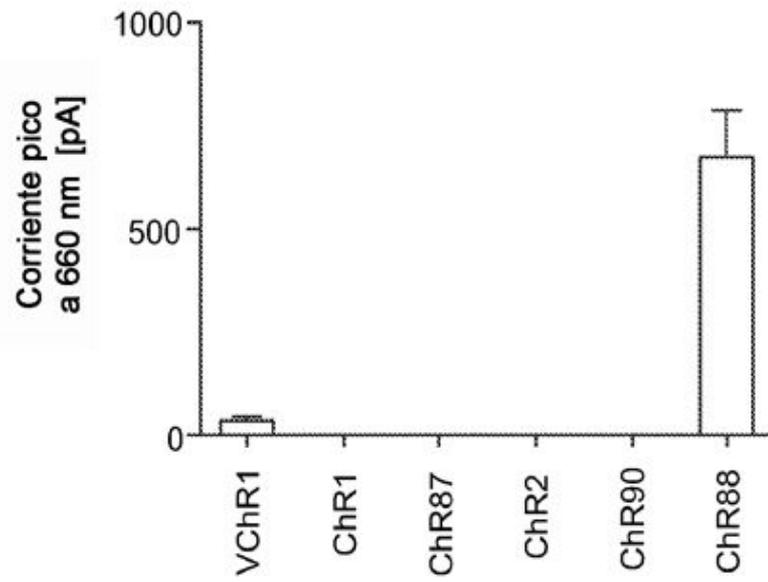


FIG. 1A

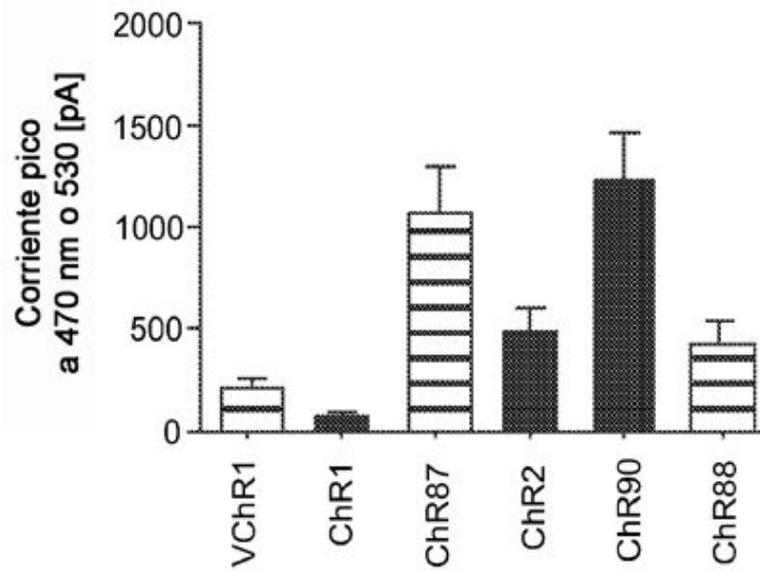


FIG. 1B

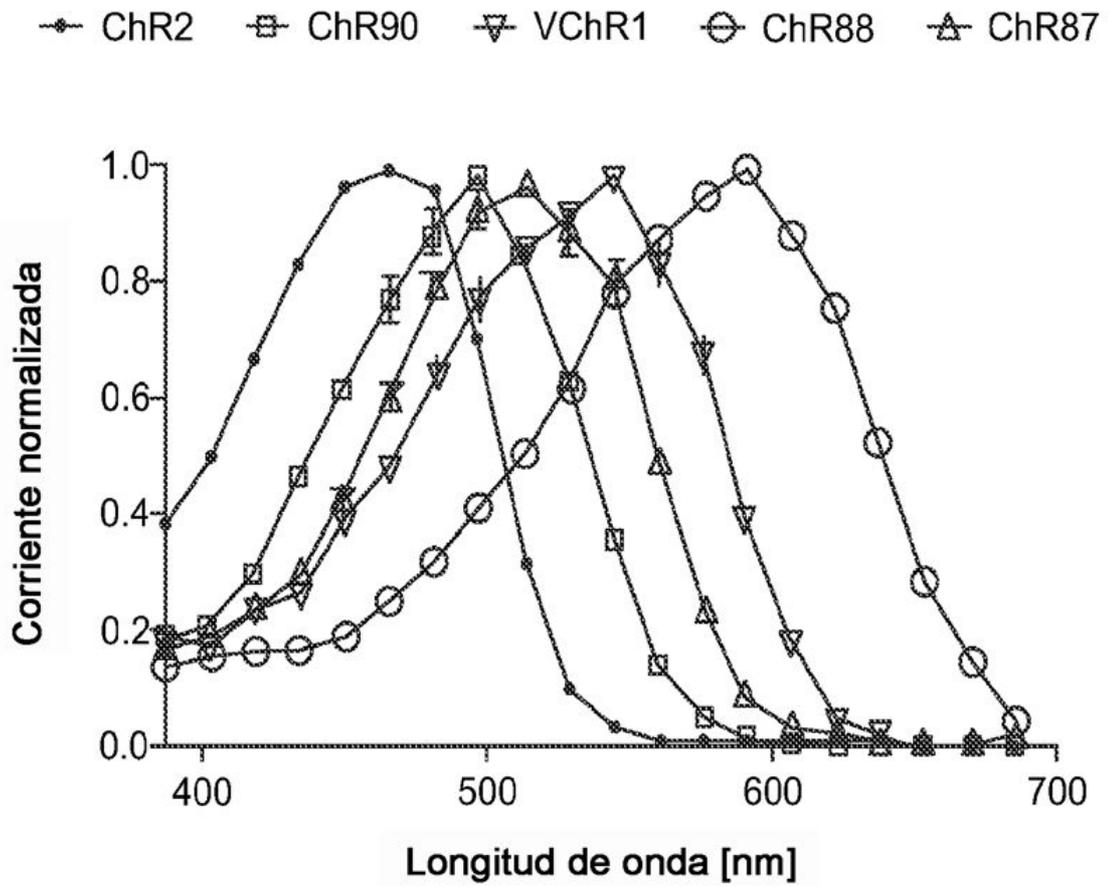


FIG. 2

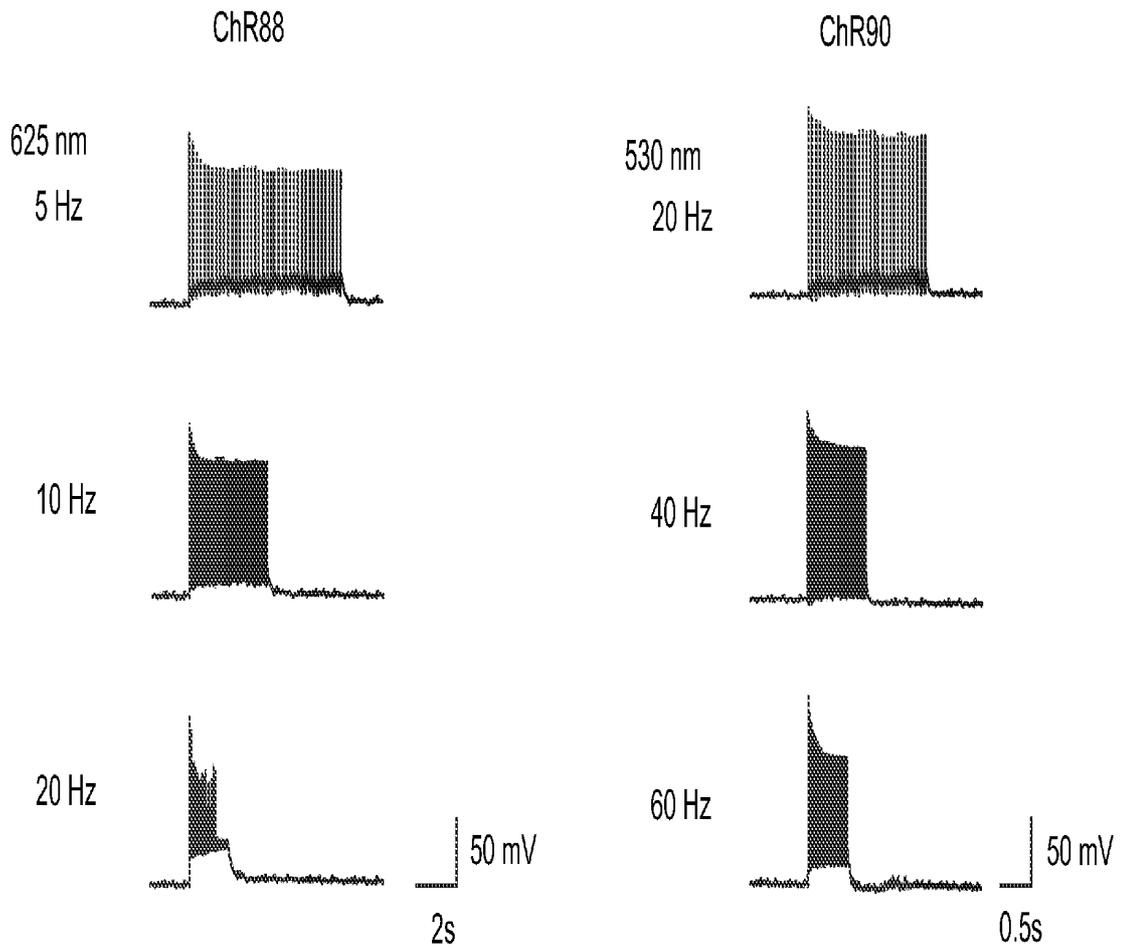


FIG. 3A

FIG. 3B

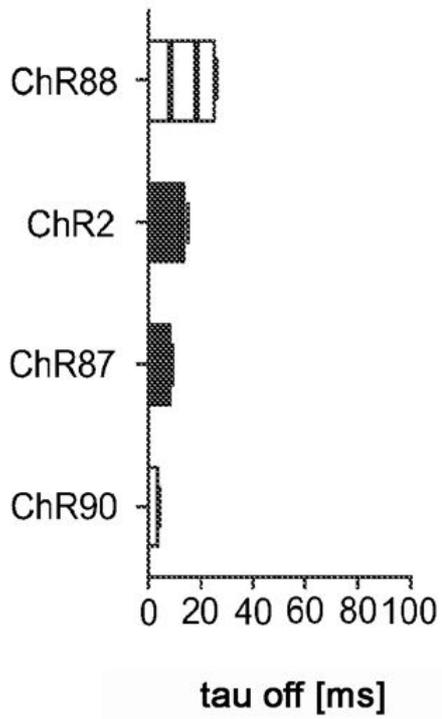


FIG. 4A

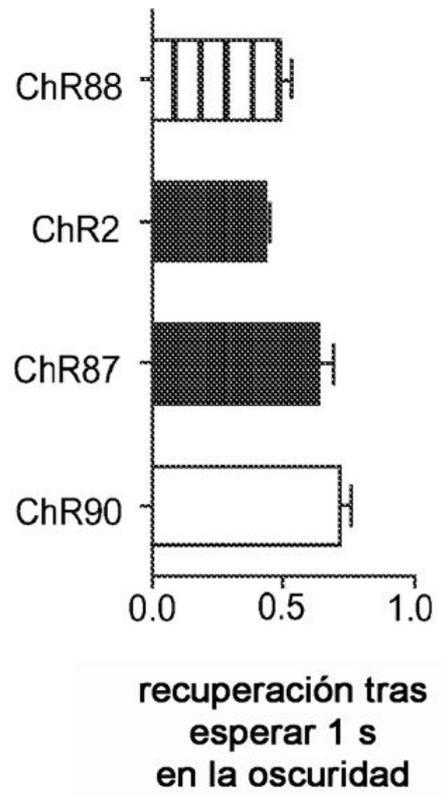


FIG. 4B

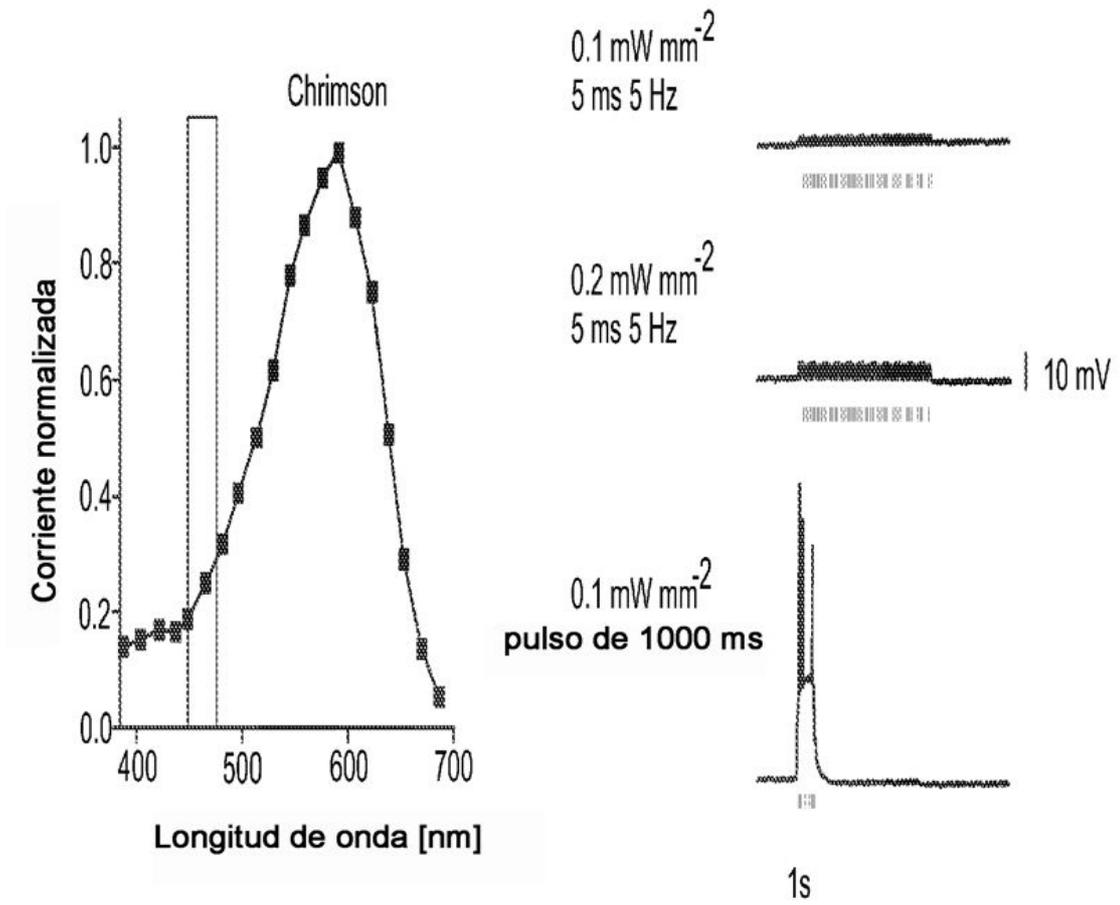
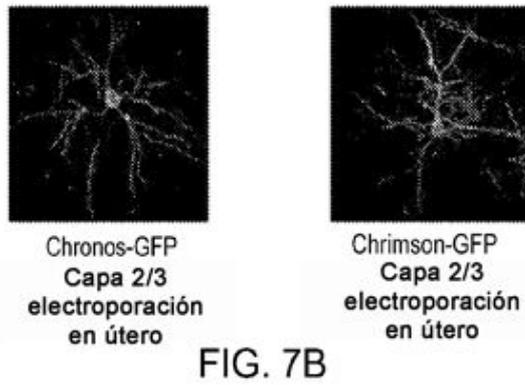
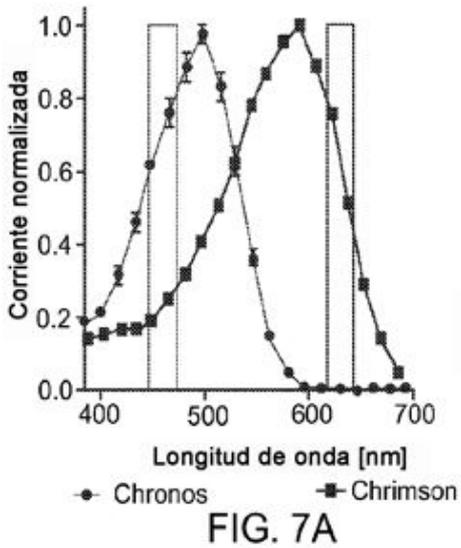
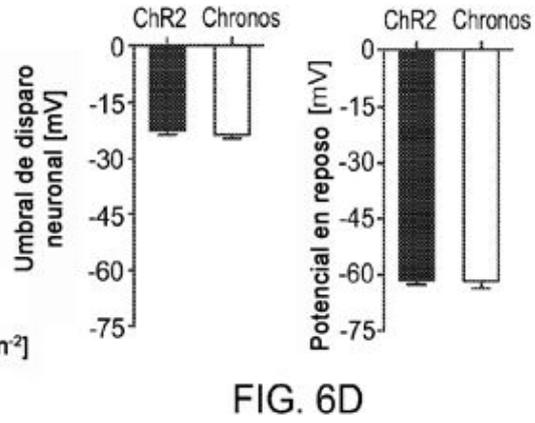
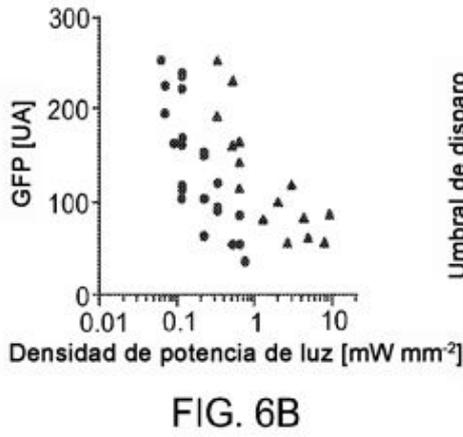
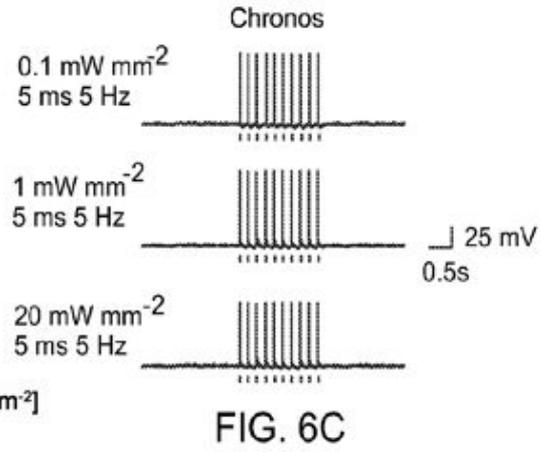
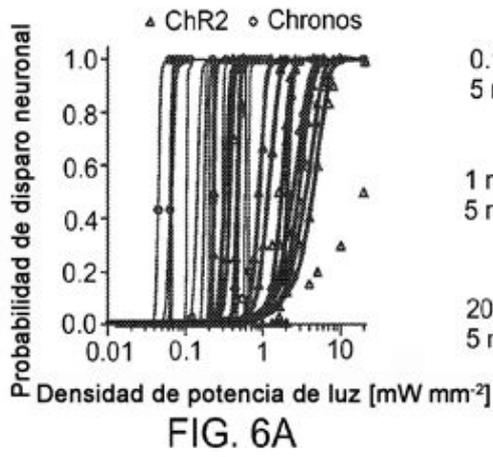


FIG. 5A

FIG. 5B



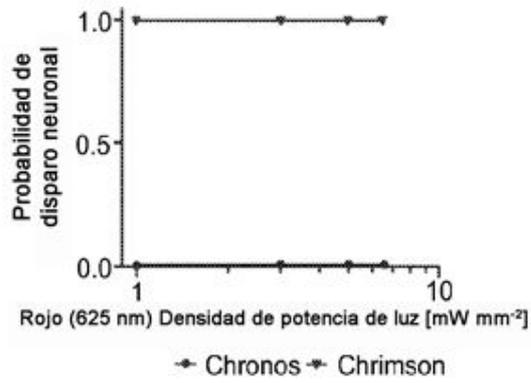


FIG.8A

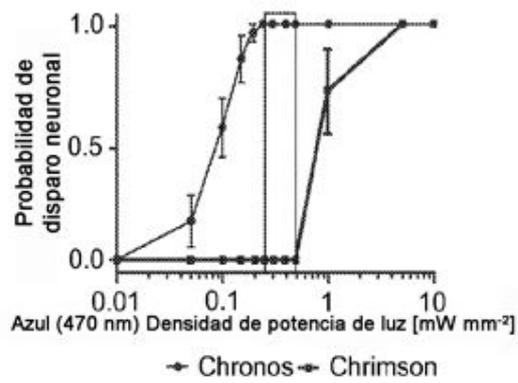


FIG.8B

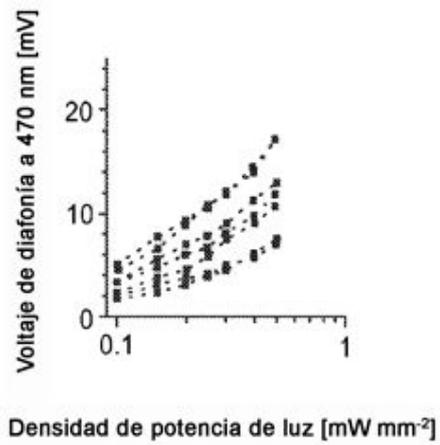


FIG.8C

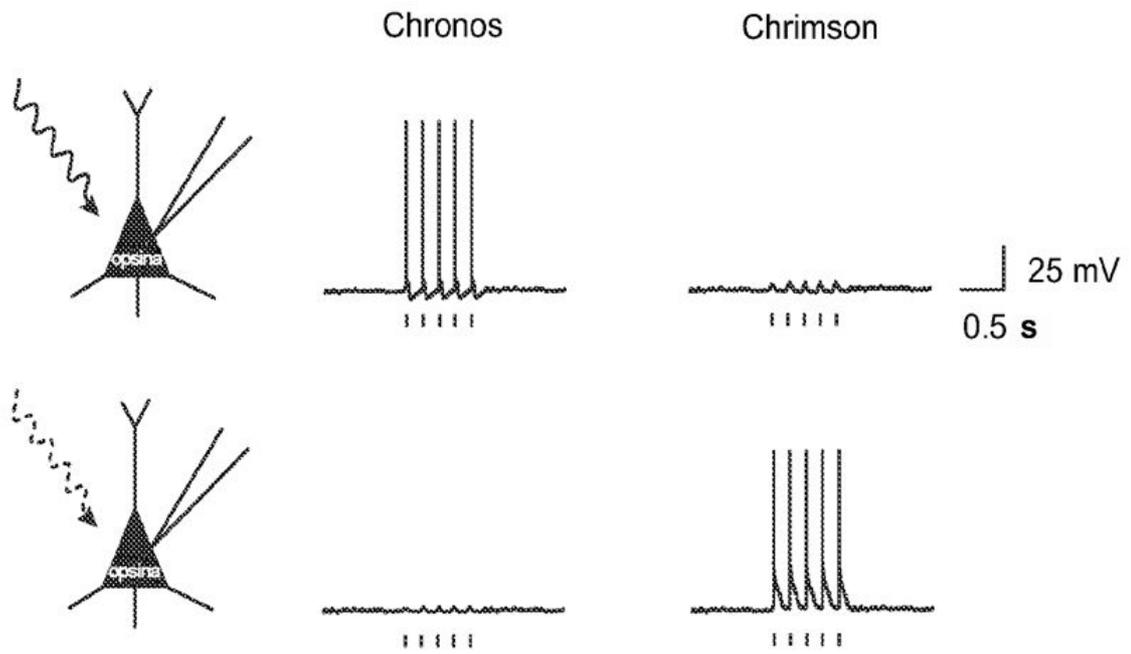


FIG. 9

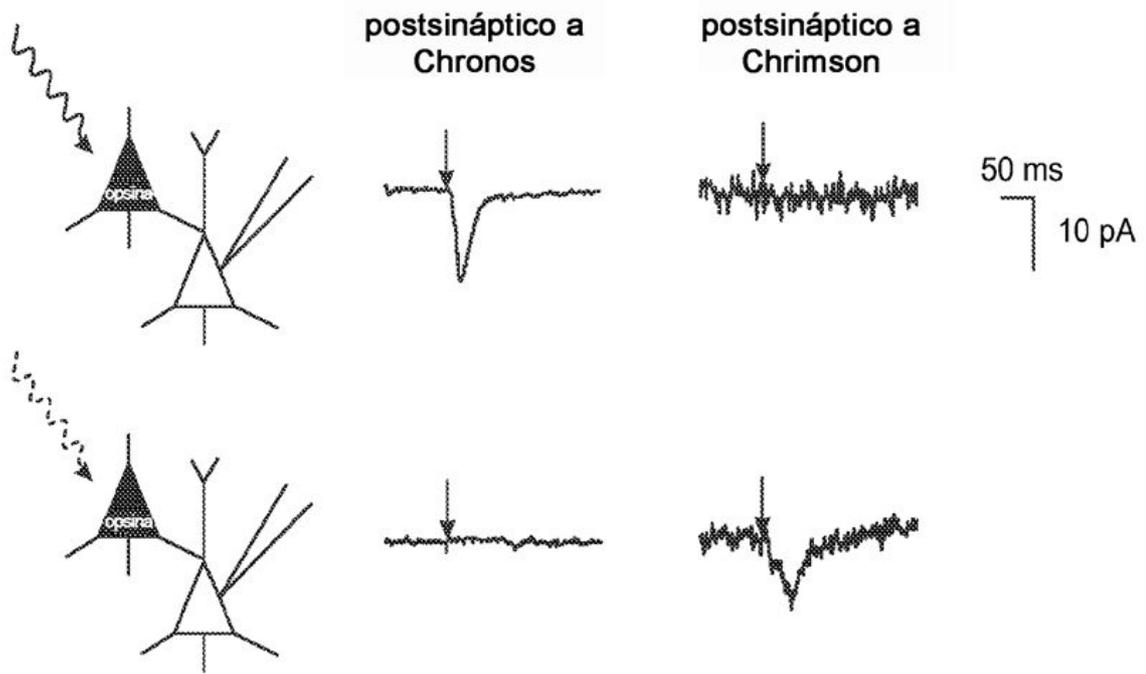


FIG. 10

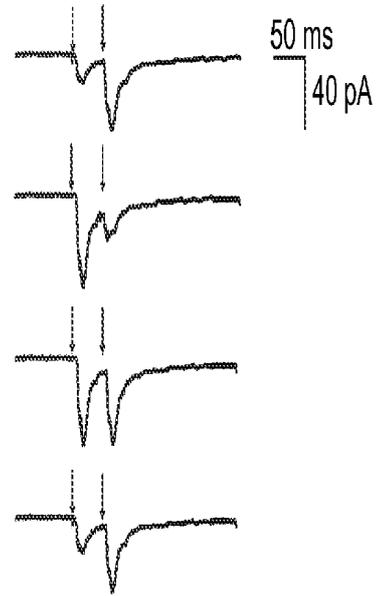
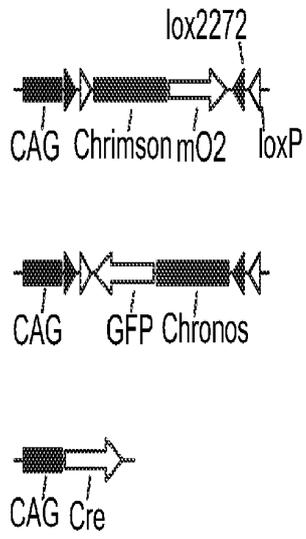


FIG. 11A

FIG. 11B

FIG. 11C

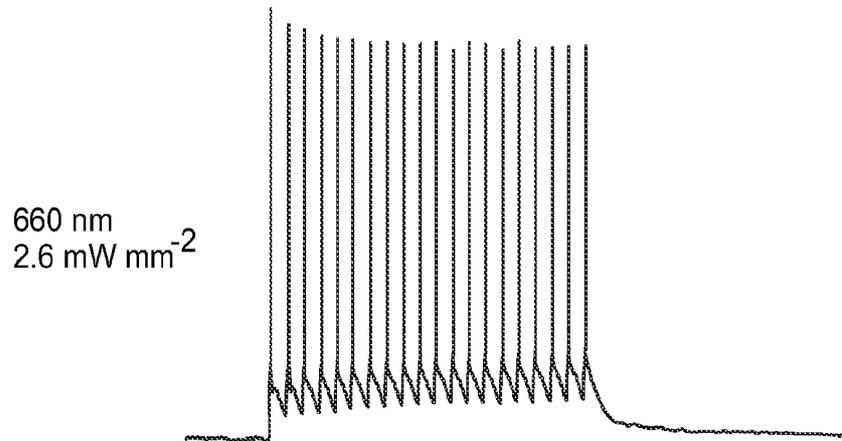


FIG. 12

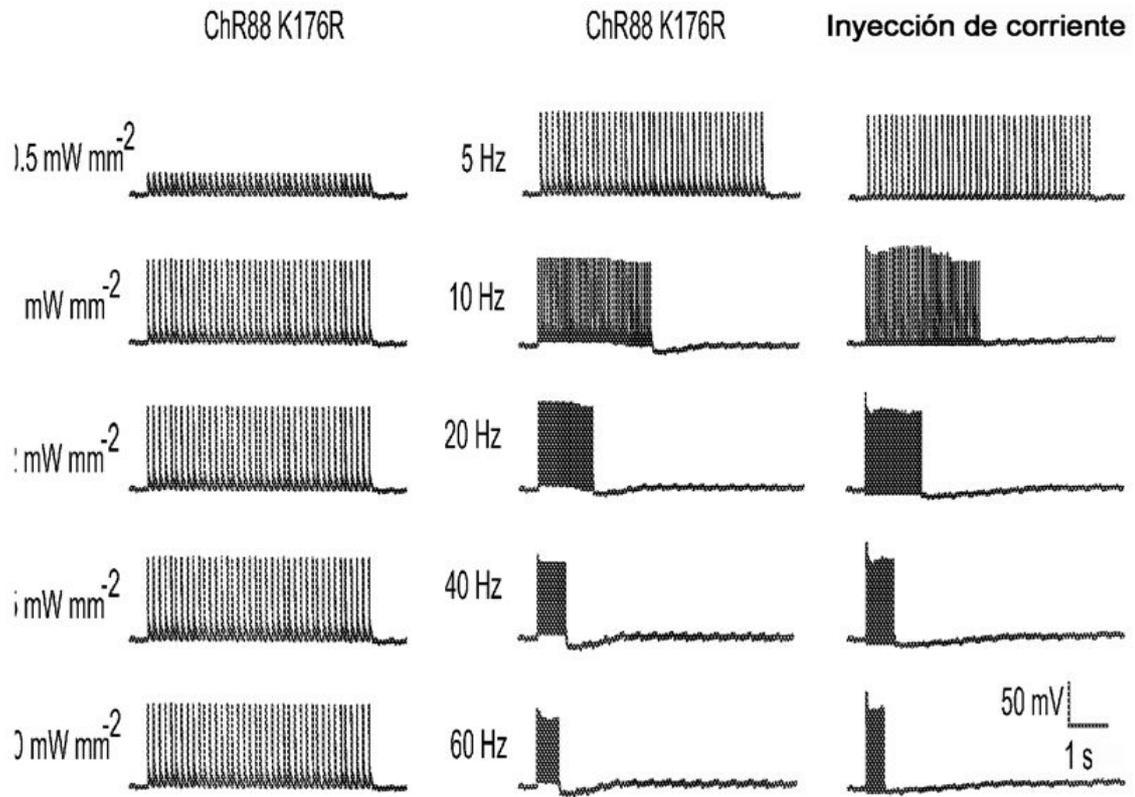


FIG. 13A

FIG. 13B

FIG. 13C

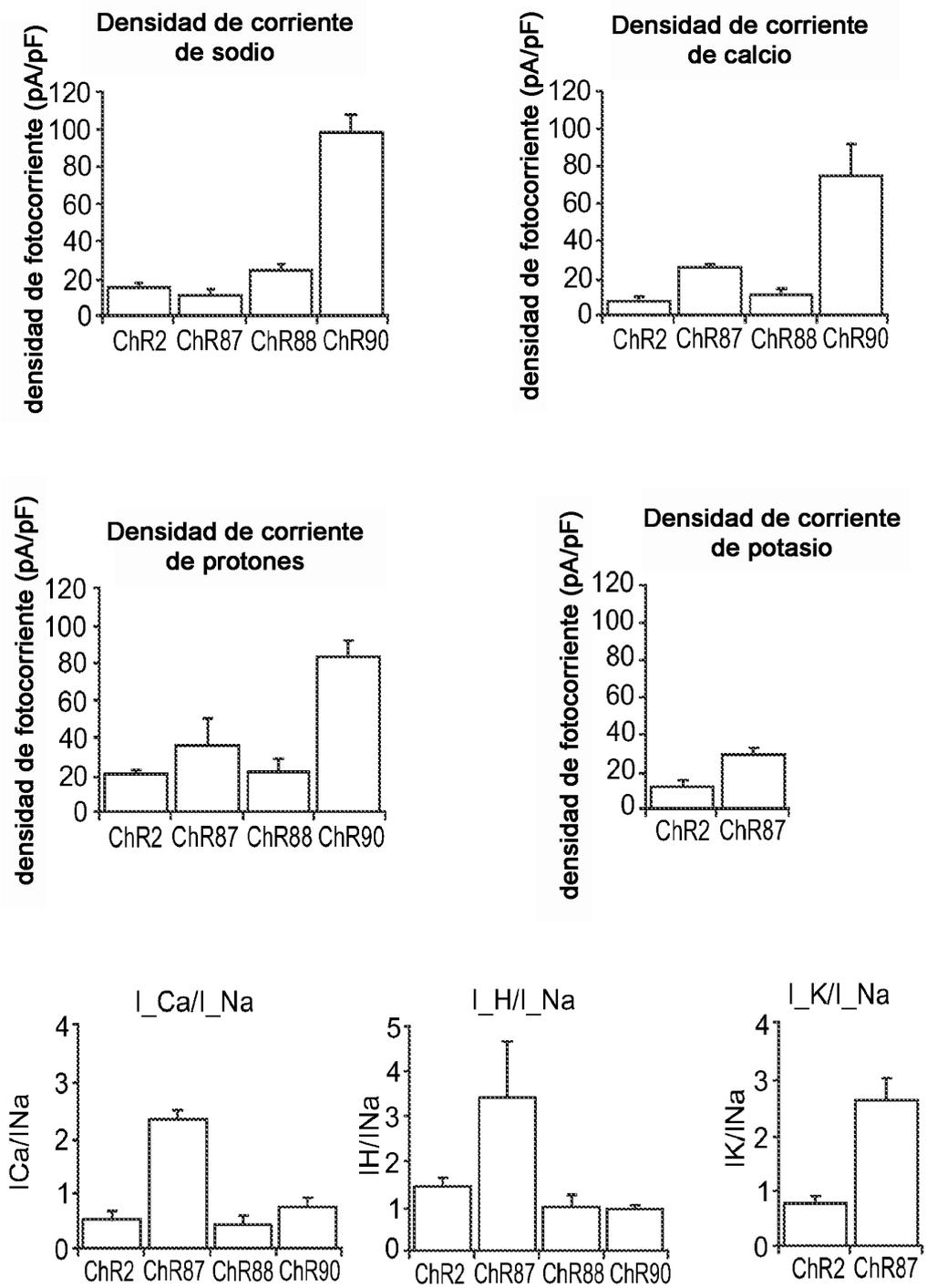


FIG. 14