

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 393**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.01.2012** **PCT/US2012/021185**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.07.2012** **WO12097213**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2012** **E 12702348 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018** **EP 2663653**

54 Título: **Métodos para diagnosticar y prescribir un protocolo de tratamiento para trastornos relacionados con la longitud ocular**

30 Prioridad:

14.01.2011 US 201161432984 P

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

19.07.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF WASHINGTON THROUGH ITS
CENTER FOR COMMERCIALIZATION (100.0%)
4311 11th Avenue NE. Suite 500
Seattle, WA 98105, US**

72 Inventor/es:

**NEITZ, JAY y
NEITZ, MAUREEN**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 676 393 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

Métodos para diagnosticar y prescribir un protocolo de tratamiento para trastornos relacionados con la longitud ocular

Declaración de apoyo del gobierno de los EE.UU.

El presente trabajo recibió el apoyo de las subvenciones de los National Institutes of Health R01EY09620, P30EY01931 y P30EY01730. El gobierno de los EE.UU. presenta determinados derechos en la invención.

Campo de la invención

La invención se refiere a métodos para detectar y tratar trastornos relacionados con la longitud ocular, incluyendo miopía. Además, la invención se refiere a determinados haplotipos asociados con trastornos relacionados con la longitud ocular.

Antecedentes

En un proceso denominado desarrollo de emetropía, el crecimiento de la longitud ocular se regula mediante experiencia visual para coincidir con la óptica del ojo y compensar la variación genética en la potencia y la curvatura de la córnea/cristalino. La visión fotópica de alta agudeza y, por tanto, las señales que guían el desarrollo de emetropía se inician mediante absorción de luz en fotopigmentos encontrados en los fotorreceptores de conos sensibles a longitud de onda larga (L) y a longitud de onda media (M). Los cambios en el patrón de luz y oscuridad en la imagen retiniana que caracterizan imágenes borrosas frente a nítidamente enfocadas se monitorizan mediante un proceso biológico para detener el crecimiento del ojo cuando se alcanza la longitud correcta para una óptica de plano coordinado (neutro). Sin embargo, en individuos miopes, la longitud axial relativa del ojo con respecto al tamaño global del ojo continúa creciendo durante el desarrollo, más allá de la longitud que proporciona un enfoque casi óptimo de objetos distantes, conduciendo a una miopía cada vez más pronunciada.

La tasa de incidencia de miopía está creciendo a tasas alarmantes en muchas regiones del mundo. Hasta hace poco, se creía que una lectura excesiva durante la infancia era el único factor ambiental o de comportamiento identificable relacionado con la aparición de miopía, aunque se sospechaban factores genéticos. Actualmente limitar la lectura (y motivar más actividad exterior) son las únicas técnicas prácticas para prevenir un alargamiento ocular excesivo en niños, y las lentes correctoras, incluyendo gafas y lentes de contacto, representan los medios primarios para mejorar trastornos relacionados con la longitud ocular, incluyendo la miopía. Aunque estas medidas corrigen de manera óptica los errores de refracción asociados con trastornos relacionados con la longitud ocular, no abordan la causa subyacente que es el crecimiento excesivo de la longitud ocular.

Por tanto, sigue existiendo una necesidad de métodos de detección de una propensión a un trastorno relacionado con la longitud ocular, y de tratamientos para tales individuos que impidan un alargamiento ocular excesivo.

Sumario de la invención

La invención proporciona un método para determinar el potencial de miopía de un paciente que comprende: someter a prueba una muestra biológica obtenida a partir del paciente para determinar el haplotipo de los genes de opsina L:M del paciente; determinar la razón de conos L:M en un ojo del paciente; correlacionar el haplotipo y la razón de conos L:M con una refracción equivalente esférica predicha, prescribir un protocolo de tratamiento proporcionando al paciente un dispositivo terapéutico que comprende un filtro dependiente de la longitud de onda; en el que el haplotipo de los genes de opsina L:M es uno de los haplotipos 1 a 13 tal como se exponen en la tabla 1. En otro aspecto, el método comprende además las etapas de: determinar la razón de conos L:M en un ojo del paciente; y correlacionar el haplotipo de los genes de opsina L:M y la razón de conos L:M con una refracción equivalente esférica predicha.

La invención también describe un método para diagnosticar la propensión de un paciente a un trastorno relacionado con la longitud ocular, comprendiendo el método: someter a prueba una muestra biológica obtenida a partir del paciente para determinar el haplotipo de los genes de opsina L:M del paciente; y correlacionar el haplotipo con una refracción equivalente esférica predicha; en el que el paciente es propenso a un trastorno relacionado con la longitud ocular si el error de refracción equivalente esférica predicha (medido en dioptrías) presenta una potencia negativa. En un aspecto, el método descrito comprende además las etapas de: determinar la razón de conos L:M en un ojo del paciente; y correlacionar el haplotipo de los genes de opsina L:M y la razón de conos L:M con una refracción equivalente esférica predicha.

La invención proporciona además un método para diagnosticar la propensión de un paciente a miopía, comprendiendo el método someter a prueba una muestra biológica obtenida a partir de un paciente para determinar una combinación particular de aminoácidos codificados por el gen de opsina L o el gen de opsina M del paciente, en el que el paciente es propenso a un trastorno relacionado con la longitud ocular si está presente una de las combinaciones de aminoácidos mostradas como haplotipos de los genes de opsina L:M tal como se exponen en la tabla 1. En una forma de realización preferida, el método comprende determinar el potencial de miopía de un paciente de la invención, en el que el paciente es propenso a miopía si la refracción equivalente esférica predicha es una dioptría negativa.

Además, la invención proporciona un método *in vitro* de prescribir un protocolo de tratamiento para reducir el potencial de miopía de un paciente identificado como que presenta un potencial de miopía asociado con una dioptría negativa que comprende: someter a prueba una muestra biológica obtenida a partir del paciente para determinar el haplotipo de los genes de opsina L:M del paciente; determinar la razón de conos L:M en un ojo del paciente; correlacionar el haplotipo y la razón de conos L:M con una refracción equivalente esférica predicha; prescribir un protocolo de tratamiento proporcionando al paciente un dispositivo terapéutico que comprende un filtro dependiente de la longitud de onda; en el que el haplotipo de los genes de opsina L:M es uno de los haplotipos 1 a 13 tal como se exponen en la tabla 1. La divulgación describe además proporcionar al paciente un dispositivo terapéutico que comprende un filtro dependiente de la longitud de onda si el error de refracción equivalente esférica predicha del paciente presenta una potencia negativa.

En un aspecto, las longitudes de onda filtradas por el filtro dependiente de la longitud de onda se seleccionan basándose en el haplotipo de los genes de opsina L:M y la razón de conos L:M del paciente.

En otro aspecto, un dispositivo terapéutico utilizado en un método descrito en la presente memoria es un par de gafas que comprenden lentes que inducen borrosidad. En determinados aspectos, las lentes que inducen borrosidad inducen una imagen borrosa mediante uno o más de: pequeñas protuberancias o depresiones en una o ambas superficies de las lentes; inclusiones dentro de las lentes de un material diferente del material de la lente; incorporación de aberraciones de nivel superior en las lentes; proporcionar una correlación aumentada entre las actividades de fotorreceptores de conos adyacentes por una o ambas lentes; y recubrimientos o películas aplicados a una o ambas superficies de las lentes para producir borrosidad por difusión o difracción.

En aún otro aspecto, un dispositivo terapéutico utilizado en un método descrito en la presente memoria comprende lentes de contacto que inducen borrosidad. En determinados aspectos, las lentes de contacto que inducen borrosidad inducen una imagen borrosa mediante uno o más de: inclusiones dentro de las lentes de un material diferente del material de la lente; incorporación de aberraciones de nivel superior en las lentes; y recubrimientos o películas aplicados a una o ambas superficies de las lentes que producen borrosidad mediante difusión, difracción o dispersión de la luz. El haplotipo de los genes de opsina L:M identificado en un método de la invención es uno de los haplotipos 1 a 13 tal como se exponen en la tabla 1.

La invención también proporciona la utilización de una micromatriz para determinar un haplotipo de L:M, en la que el haplotipo es uno de los haplotipos 1 a 13 tal como se exponen en la tabla 1, comprendiendo dicha micromatriz un conjunto de oligonucleótidos específicos de alelo que pueden identificar al menos uno de los haplotipos 1 a 13 tal como se exponen en la tabla 1.

La invención describe además kits para determinar si un paciente es propenso a un trastorno relacionado con la longitud ocular. En un aspecto, la invención proporciona la utilización de un kit para determinar un haplotipo de L:M, en la que dicho haplotipo es uno de los haplotipos 1 a 13 tal como se exponen en la tabla 1, comprendiendo dicho kit: al menos un par de oligonucleótidos que pueden identificar al menos uno de los haplotipos 1 a 13 tal como se exponen en la tabla 1; e instrucciones de utilización. En otro aspecto, un kit de la invención comprende un ensayo para detectar al menos uno de los haplotipos 1 a 13 tal como se exponen en la tabla 1.

Además se dan a conocer métodos para limitar la introducción de error de refracción en el ojo de un sujeto provocado por la exposición a pantallas de visualización, que comprende que el sujeto lleve puesto un dispositivo óptico terapéutico que comprende un filtro dependiente de la longitud de onda que puede bloquear de manera preferente luz roja que surge de la pantalla de visualización antes de que entre en el ojo del sujeto, limitando de ese modo la introducción de error de refracción en el ojo del sujeto.

Además se dan a conocer métodos para limitar el desarrollo de un trastorno relacionado con la longitud ocular en un sujeto, que comprende que el sujeto lleve puesto un dispositivo óptico terapéutico que comprende un filtro dependiente de la longitud de onda que puede bloquear de manera preferida luz roja que surge de una pantalla de visualización antes de que entre en el ojo del sujeto, limitando de ese modo el desarrollo de un trastorno relacionado con la longitud ocular en el sujeto. En una forma de realización, el trastorno relacionado con la longitud ocular comprende miopía.

Las formas de realización específicas preferidas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción más detallada de determinadas formas de realización preferidas y las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Promedio de imágenes retinianas de óptica adaptativa del mosaico de conos de participantes con variantes de LIAVA (B, C, D) en comparación con un control normal (A). Para sujetos mostrados en B, C y D, los conos que expresaban la variante LIAVA presentaban una baja reflectancia en comparación con conos normales y aparecen como una zona oscura en el mosaico. Hubo una gran variabilidad en la proporción de conos que expresaban la variante de LIAVA. B, C y D presentan proporciones baja, media y alta de conos que expresan la variante génica de miopía que se correlaciona con la longitud axial (E) y también con el error de refracción.

Figura 2. Asociación entre longitud axial y razón de conos para diferentes grupos étnicos. Hubo una alta correlación positiva entre la razón de conos L:M y la longitud axial (y la incidencia de miopía) a través de grupos étnicos.

Figura 3. (A) Potencial de miopía de 13 haplotipos de los fotopigmentos L/M diferentes de 159 hombres, dispuestos en orden de potencial de miopía creciente. A la derecha se facilita el número de individuos con cada haplotipo. Las designaciones de haplotipos utilizan el código de aminoácidos de una sola letra: M = metionina, I = isoleucina; S = serina, V = valina, A = alanina y L = leucina. SER promedio es la refracción equivalente esférica media calculada para la mitad más miope de los sujetos para cada haplotipo, ± 1 SEM. (B) Refracción equivalente esférica (SER) predicha frente a observada para 11 sujetos con haplotipos correspondientes a los descritos en (A). Se estimó la razón de conos L:M para cada sujeto y se expresa como porcentaje de los conos L más M que son L.

Figura 4. (A) Desplazamiento miope producido por la exposición a luz roja durante 2 horas al día. Se midieron las longitudes axiales para cada sujeto antes del inicio del procedimiento de experimentación. Posteriormente, cada sujeto jugó a un videojuego en blanco y negro durante 2 horas al día mientras llevaba puestas gafas con la lente derecha sin tintar y la lente izquierda tintada de modo que los conos L se activan mucho más que los conos M. (B) Mediciones de longitud axial normalizadas en función del tiempo para 20 ojos que llevaban puestas la lente de experimentación y (C) para 20 ojos contralaterales que sirvieron como controles para cada ojo de experimentación. Las líneas negras con barras de error representan los promedios para todos los ojos (barras de error ± 2 SEM). Las lentes de experimentación redujeron significativamente la tasa de crecimiento del ojo de niños miopes. (D) La tasa de crecimiento de ojos que llevaban puesta la lente de experimentación está a la izquierda, y para ojos que llevaban puesta la lente de control está a la derecha.

Descripción detallada de la invención

Los datos específicos mostrados en la presente memoria son únicamente a modo de ejemplo y con fines de discusión ilustrativa de las formas de realización preferidas de la presente invención y se presentan con el fin de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente comprensible de los principios y aspectos conceptuales de diversas formas de realización de la invención. Con respecto a esto, no se realiza ningún intento de mostrar detalles estructurales de la invención con más detalle que lo necesario para la comprensión fundamental de la invención, tomándose la descripción con los dibujos y/o ejemplos que hacen evidente para los expertos en la materia cómo pueden realizarse en la práctica diversas formas de la invención.

Se pretende y se tiene la intención de que las siguientes definiciones y explicaciones dominen en cualquier interpretación futura a menos que se modifiquen de manera clara e inequívoca en los siguientes ejemplos o cuando la aplicación del significado haga que cualquier interpretación carezca de sentido o carezca esencialmente de sentido. En casos en los que la interpretación del término haga que carezca de sentido o carezca esencialmente de sentido, se tomará la definición del Webster's Dictionary, 3ª edición o un diccionario conocido por los expertos en la materia, tal como el Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (Ed. Anthony Smith, Oxford University Press, Oxford, 2004).

Adicionalmente se dan a conocer métodos que pueden utilizarse para determinar el beneficio de un tratamiento preventivo para miopía y para determinar la prescripción apropiada de características de óptica preventiva para un paciente que se identifica como que presenta propensión a un trastorno relacionado con la longitud ocular. Tal como se comenta en la presente memoria, tal óptica preventiva incluye características espectrales y/o propiedades de dispersión que pueden prevenir el crecimiento de la longitud ocular, que si se deja sin controlar conducirá a un trastorno relacionado con la longitud ocular.

En una forma de realización, la invención proporciona un método para diagnosticar la propensión de un paciente a un trastorno relacionado con la longitud ocular, comprendiendo el método: someter a prueba una muestra biológica obtenida a partir del paciente para determinar el haplotipo de los genes de opsina L:M del paciente, y correlacionar el haplotipo con una refracción equivalente esférica predicha; en el que el paciente es propenso a un trastorno relacionado con la longitud ocular si la refracción equivalente esférica predicha es una dioptría negativa.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “correlacionar” se refiere a la etapa de utilizar la combinación de información sobre la razón de conos y el haplotipo de la opsina de un paciente con el fin de determinar la propensión del paciente a un trastorno relacionado con la longitud ocular tal como se muestra y se comenta en la presente memoria.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la frase “trastorno relacionado con la longitud ocular” incluye, pero no se limita a, miopía.

En una forma de realización descrita, el haplotipo de los genes de opsina L:M se determina identificando la secuencia de nucleótidos del ADN de un paciente para determinar el haplotipo del locus del gen de opsina Xq28 del paciente. El haplotipo puede determinarse identificando la secuencia de nucleótidos de los exones 2, 3 y 4 de los genes OPN1LW y OPN1MW. Tal como se expone en la presente memoria, los haplotipos se crean por los aminoácidos codificados por los codones 65, 111, 116, 153, 171, 178, 180, 230, 233 y 236 de los genes OPN1LW y OPN1MW. En una forma de realización descrita particular, el haplotipo se determina por los aminoácidos codificados por los codones 153, 171, 178 y 180 en el exón 3 y por el codón 236 en el exón 4. El haplotipo de los genes de opsina L:M es uno de los 13 haplotipos mostrados en la tabla 1, que se muestra en la presente memoria por primera vez que están asociados con la miopía (véanse los ejemplos y la figura 3A). Por tanto, si un paciente presenta uno de los 13 haplotipos identificados en la tabla 1, ese paciente se diagnostica como propenso a un trastorno relacionado con la longitud ocular. En particular, un paciente que presenta uno de los haplotipos mostrados en la tabla 1 se diagnostica como propenso a miopía. En una forma de realización descrita, un paciente se diagnostica como propenso a miopía si se identifica una de las combinaciones de aminoácidos variantes mostradas en la tabla 1 asociadas con el gen de opsina L en el paciente. En otra forma de realización, un paciente se diagnostica como propenso a miopía si se identifica una de las combinaciones de aminoácidos variantes mostradas en la tabla 1 asociadas con el gen de opsina M en el paciente.

TABLA 1

Haplotipos de miopía

	Codones de OPSINA L					Codones de OPSINA M			
	153	171	178	180	236	153	171	178	180
1	M	I	I	S	M	M	V	V	A
2	M	V	I	S	M	M	V	V	A
3	L	V	I	S	M	M	V	V	A
4	M	V	I	S	M	M	V	I	A
5	L	V	I	A	M	M	V	I	A
6	M	V	I	A	M	M	V	I	A
7	L	V	I	S	M	L/M	V	I	A
8	L	V	I	S	M	M	V	I	A
9	L	I	I	S	M	M	V	V	A
10	M	V	V	A	V	M	V	I	A
11	M	V	I	S	V	M	V	V	A
12	L	V	I	S	M	L	V	I	S
13	L	V	I	A	M	L/M	V	I	A

Adicionalmente se da a conocer un método para diagnosticar la propensión de un paciente a un trastorno relacionado con la longitud ocular, comprendiendo el método: someter a prueba una muestra biológica obtenida a partir del paciente para determinar el haplotipo de los genes de opsina L:M del paciente, determinar la razón de conos L:M en un ojo del paciente, y correlacionar el haplotipo de los genes de opsina L:M y la razón de conos L:M con una refracción equivalente esférica predicha, en el que el paciente es propenso a un trastorno relacionado con la longitud ocular si el error de refracción equivalente esférica predicha es una potencia negativa (en dioptrías).

La razón de conos L:M puede determinarse utilizando métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, puede utilizarse obtención de imágenes retinianas de óptica adaptativa tal como se describe en la presente memoria, o puede utilizarse un electroretinograma (ERG) (tal como un ERG fotométrico de parpadeo) y espectros de conos individualizados. La medición de la razón de conos L:M también implica datos genéticos, tal como se describe por ejemplo en Neitz y Neitz, J. Vis. 2:531-42, 2002. Otro ejemplo no limitativo de medición de la razón de conos L:M incluye ERG multifocal a color de campo amplio tal como se describe en Kuchenbecker *et al.*, Vis. Neurosci. 25(3):301-6, 2008. Otro ejemplo no limitativo de medición de la razón de conos L:M incluye medir la razón de luz roja con respecto a verde percibida para obtener el parpadeo mínimo utilizando fotometría de parpadeo heterocromática psicofísica tal como se describe en Gunther y Dobkins Vision Research 42:1367-1378, 2002.

Adicionalmente se da a conocer un método para determinar el potencial de miopía de un paciente que comprende someter a prueba una muestra biológica obtenida a partir del paciente para determinar el haplotipo de los genes de opsina L:M del paciente.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “potencial de miopía” se refiere a la refracción equivalente esférica predicha asociada con un haplotipo de la opsina L:M, que se correlaciona con el grado predicho de miopía que presenta o es probable que presente el paciente. En particular, el potencial de miopía se refiere a una determinada refracción equivalente esférica predicha basándose en el haplotipo de los genes de opsina L:M particular del paciente, tal como se muestra, por ejemplo, en la figura 3A.

10 En una forma de realización particular, el potencial de miopía puede determinarse más específicamente midiendo la razón de conos L:M del paciente, y correlacionando la razón con la refracción equivalente esférica predicha para el haplotipo de los genes de opsina L:M particular. Por ejemplo, tal como se comenta en los ejemplos a continuación, puede determinarse la razón de conos L:M para un paciente que presenta un determinado haplotipo de la opsina L:M, tal como un haplotipo mostrado en la tabla 1. Se determina la razón de conos L:M y se realiza un cálculo para obtener el potencial de miopía predicho más específico. Por ejemplo, si una persona presenta el haplotipo 8 (figura 3A), su potencial de miopía es de -4,5 dioptrías. Si esa persona presenta una razón de conos de 1:1 se esperará que presente la totalidad de las -4,5 dioptrías de error de refracción. Sin embargo, si presenta casi el 100 por cien de conos L se esperará que sea casi emétrope. El 75% de conos L se encuentra en un punto medio entre una razón de conos de 1:1 (el 50% de L) y el 100% de L, de modo que se predecirá una persona con el haplotipo 8 y el 75% de conos L presentará el 50% de la SER (o $-4,5/2 = -2,25$ dioptrías).

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, la frase “propensión a un trastorno relacionado con la longitud ocular” se refiere a la alta probabilidad de desarrollar un trastorno relacionado con la longitud ocular, tal como miopía, cuando está presente un determinado haplotipo de los genes de opsina L:M. En una forma de realización, se considera que un paciente es propenso a un trastorno relacionado con la longitud ocular si está presente uno de los haplotipos mostrados en la tabla 1, que se enumeran en orden de potencial de miopía creciente.

30 Tras identificar a un paciente que es propenso a un trastorno relacionado con la longitud ocular y/o presenta un potencial de miopía asociado con una dioptría negativa tal como se describe en la presente memoria, un oftalmólogo puede prescribir un protocolo de tratamiento y/o sugerir determinados comportamientos destinados a tratar o reducir el potencial de miopía del paciente. Por ejemplo, a un paciente se le puede tratar con un dispositivo terapéutico (tal como se describe en la presente memoria, por ejemplo) o se le puede proporcionar intervención farmacológica. Además o en lugar de tales tratamientos, a un paciente se le puede indicar que limite la exposición a luz roja o luz verde (dependiendo de las variantes de L:M particulares del paciente), limite la lectura a una edad temprana y pase más tiempo realizando actividades en el exterior.

40 El término “muestra biológica” tal como se utiliza en la presente memoria incluye, pero no se limita a, sangre, saliva, células obtenidas con hisopo bucal, biopsias de piel, líquido amniótico, diversos otros tejidos y similares. En la materia se conocen bien métodos para purificar o purificar parcialmente ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica para su utilización en ensayos de diagnóstico. El ácido nucleico puede ser, por ejemplo, ADN genómico, ARN o ADNc. Puede aislarse ADN genómico, por ejemplo, a partir de leucocitos de sangre periférica utilizando kits QIAamp DNA Blood Maxi (Qiagen, Valencia, CA).

Adicionalmente se da a conocer un método para diagnosticar la enfermedad ocular de Bornholm (BED) en un paciente, comprendiendo el método obtener una muestra biológica a partir del paciente e identificar la secuencia de nucleótidos de los genes de opsina L y M del paciente, en el que se diagnostica que el paciente presenta BED si el paciente presenta un gen de opsina normal y un gen de opsina variante. En una forma de realización descrita preferida, el gen de opsina variante comprende leucina en la posición de aminoácido 153 (L153), valina en la posición 171 (V171), alanina en 174 (A174), valina en 178 (V178) y alanina en 180 (A180) (“LVAVA”) o leucina en la posición de aminoácido 153 (L153), isoleucina en la posición 171 (I171), alanina en 174 (A174), valina en 178 (V178) y alanina en 180 (A180) (“LIAVA”) en el gen de opsina o bien L o bien M. En otra forma de realización descrita, el segundo gen presenta la combinación de metionina, valina, valina, valina y alanina en los aminoácidos en las posiciones 153, 171, 174, 178 y 180 (“MVVVA”).

Los métodos de diagnóstico de la invención implican la utilización de métodos de biología molecular convencionales, incluyendo en una forma de realización no limitativa la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para determinar el haplotipo de los genes de opsina L:M de un paciente. Actualmente hay una variedad de métodos de biología molecular disponibles que permiten el examen de las secuencias de ADN de los genes de opsina L y M. Por ejemplo, pueden amplificarse fragmentos génicos utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los genes pueden amplificarse por separado y de manera selectiva tal como se describió anteriormente (Neitz *et al.*, Vision Research 35: 2395-2407, 1995).

Los fragmentos génicos amplificados se someterán preferentemente a uno o más de los siguientes procedimientos que proporcionan información sobre la secuencia de ADN:

1) Secuenciación de ADN directa de los productos de PCR tal como se describió anteriormente (J. Neitz, M. Neitz y Grishok, citado anteriormente, 1995).

2) Análisis por digestión de restricción (descrito anteriormente en J. Neitz, M. Neitz y Grishok, citado anteriormente, 1995).

3) Polimorfismo en la conformación de cadenas sencillas u otros procedimientos similares. El fragmento de ADN amplificado se marca en los extremos de manera fluorescente o radiactiva, se desnaturaliza para dar cadenas sencillas, y se separan las cadenas de manera electroforética. Basándose en la movilidad de las cadenas en el campo eléctrico, puede deducirse información sobre la secuencia de ADN.

Adicionalmente se da a conocer un método de tratamiento de un trastorno relacionado con la longitud ocular que comprende: someter a prueba una muestra biológica obtenida a partir de un paciente para determinar el haplotipo de los genes de opsina L:M del paciente; determinar la razón de conos L:M en un ojo del paciente; correlacionar el haplotipo y la razón de conos L:M con una refracción equivalente esférica predicha; proporcionar al paciente un dispositivo terapéutico que comprende un filtro dependiente de la longitud de onda si la refracción equivalente esférica predicha del paciente es una dioptría negativa. En una forma de realización, el haplotipo de los genes de opsina L:M es uno de los haplotipos 1 a 13 tal como se exponen en la tabla 1.

Tal como se expone en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2010/075319, la variación genética en los genes de opsina afecta a las características de absorbancia de la proteína fotorreceptora opsina. Por tanto, el filtro dependiente de la longitud de onda utilizado en un método de la invención está destinado a filtrar luz antes de su entrada en el ojo con el fin de ajustar el espectro de absorbancia efectivo de proteínas fotorreceptoras opsina variantes. En pacientes que presentan una proteína receptora M defectuosa, provocada por un gen de opsina M variante, que absorbe menos luz que la proteína fotorreceptora M normal, el filtro dependiente de la longitud de onda puede bloquear de manera preferente luz roja. Por otro lado, en pacientes que presentan una proteína fotorreceptora L defectuosa, provocada por un gen de opsina M variante, que absorbe menos luz que la proteína fotorreceptora L normal, el filtro dependiente de la longitud de onda puede bloquear de manera preferente luz verde.

En determinadas formas de realización, el filtro dependiente de la longitud de onda particular utilizado en un método dado a conocer en la presente memoria puede seleccionarse basándose en el haplotipo de los genes de opsina L:M del paciente, que identifica las variantes de fotorreceptor específicas y/o la razón de conos L:M del paciente, que identifica el número de fotorreceptores L con respecto a fotorreceptores M presentes en el ojo del paciente. Basándose en el haplotipo de los genes de opsina L:M particular y/o la razón L:M, puede diseñarse un filtro para bloquear y/o transmitir longitudes de onda muy específicas para restaurar características de absorción relativa de las proteínas fotorreceptoras defectuosas. Por tanto, adicionalmente se dan a conocer métodos para personalizar un dispositivo terapéutico para un paciente particular basándose en el haplotipo de los genes de opsina L:M y/o la razón de conos L:M del paciente. Por ejemplo, si el paciente presenta variantes de opsina asociadas con conos rojos (M) más activos, el filtro puede diseñarse para bloquear luz roja; mientras que si el paciente presenta variantes de opsina asociadas con conos verdes (L) más activos, el filtro puede diseñarse para bloquear luz verde.

En determinadas formas de realización, el dispositivo terapéutico comprende lentes que inducen borrosidad, por ejemplo tal como se describe en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2010/075319. En una forma de realización, el dispositivo es un par de gafas que comprenden lentes que inducen borrosidad, en el que la borrosidad está diseñada para reducir las actividades relativas entre fotorreceptores de conos adyacentes en la retina, lo que se ha mostrado en la presente memoria que da como resultado señales que estimulan que el ojo crezca longitudinalmente de manera anómala. Puede hacerse que las lentes que inducen borrosidad induzcan una imagen borrosa, por ejemplo, mediante uno o más de: pequeñas protuberancias o depresiones en una o ambas superficies de las lentes; inclusiones dentro de las lentes de un material diferente del material de la lente; incorporación de aberraciones de nivel superior en las lentes; y recubrimientos o películas que inducen borrosidad mediante dispersión de la luz, difusión o difracción aplicados a una o ambas superficies de las lentes.

En aún otra forma de realización, el dispositivo terapéutico comprende lentes de contacto que inducen borrosidad. Puede hacerse que las lentes de contacto que inducen borrosidad induzcan una imagen borrosa, por ejemplo, mediante uno o más de: inclusiones dentro de las lentes de un material diferente del material de la lente; incorporación de aberraciones de nivel superior en las lentes; proporcionar correcciones negativas progresivas en una o ambas lentes desde el centro de la lente hasta la parte inferior de las lentes; y recubrimientos o películas que inducen borrosidad mediante dispersión de la luz, difusión o difracción aplicados a una o ambas superficies de las lentes. Adicionalmente se dan a conocer métodos para limitar la introducción de error de refracción en el ojo de un sujeto provocado por la exposición a pantallas de visualización, que comprenden que el sujeto lleve puesto un dispositivo óptico terapéutico que comprende un filtro dependiente de

la longitud de onda que puede bloquear de manera preferente luz roja que surge de la pantalla de visualización antes de que entre en el ojo del sujeto, limitando así la introducción de error de refracción en el ojo del sujeto. Adicionalmente se dan a conocer métodos para limitar el desarrollo de un trastorno relacionado con la longitud ocular en un sujeto, que comprenden que el sujeto lleve puesto un dispositivo óptico terapéutico que comprende un filtro dependiente de la longitud de onda que puede bloquear de manera preferente luz roja que surge de una pantalla de visualización antes de que entre en el ojo del sujeto, limitando así el desarrollo de un trastorno relacionado con la longitud ocular en el sujeto. En una forma de realización, el trastorno relacionado con la longitud ocular comprende miopía.

Estos métodos pueden utilizarse para limitar el daño al ojo provocado por una exposición excesiva a luz roja procedente de una pantalla de visualización. En diversas formas de realización dadas a conocer no limitativas, la visualización en pantalla puede ser un monitor de ordenador, un monitor de tableta, una pantalla de televisión, una pantalla de dispositivo portátil, una pantalla de videojuegos, una pantalla de visualización en forma de visor y una pantalla de cine.

Tal como se utiliza en la presente memoria, “limitar” significa uno o más de (a) reducir la incidencia de introducción de error de refracción en el ojo de un sujeto y/o reducir la incidencia de trastornos relacionados con la longitud ocular que se desarrollan en sujetos tratados; (b) reducir la gravedad del error de refracción posteriormente desarrollado en el ojo de un sujeto y/o reducir la gravedad de un trastorno relacionado con la longitud ocular posteriormente desarrollado en el sujeto; y/o (c) limitar o prevenir el desarrollo de síntomas característicos de error de refracción en el ojo de un sujeto y/o un trastorno relacionado con la longitud ocular.

En cada uno de estos aspectos adicionales, el dispositivo óptico terapéutico puede comprender además una lente que induce borrosidad, incluyendo, pero sin limitarse a, las dadas a conocer en el documento WO 2010/075319 y tal como se dio a conocer anteriormente. En una forma de realización dada a conocer, la lente que induce borrosidad comprende un difusor holográfico aplicado a la superficie de la lente, por ejemplo, tal como se describe en los ejemplos a continuación. El difusor holográfico puede utilizarse, por ejemplo, para propagar los rayos de luz incidentes procedentes de la visualización a lo largo de un ángulo deseado para producir una borrosidad ligera y por tanto reducir diferencias de actividad entre conos adyacentes. En cualquiera de estas formas de realización, el dispositivo óptico terapéutico puede ser de cualquier tipo, incluyendo, pero sin limitarse a, gafas y lentes de contacto.

Cualquier sujeto adecuado puede tratarse en estos aspectos, incluyendo niños de 21 años de edad o menos, preferentemente entre las edades de 3-21, 3-20, 3-19 ó 3-18 años. En otra forma de realización que puede combinarse con cualquiera de las formas de realización anteriores, en la que el sujeto es propenso a un trastorno relacionado con la longitud ocular, tal como miopía. Esta forma de realización puede comprender tratar a cualquier sujeto que corre riesgo tal como se comenta en cualquier parte de la divulgación anterior. En una forma de realización particular, el sujeto es propenso a un trastorno relacionado con la longitud ocular si el sujeto presenta un haplotipo de los genes de opsina L:M tal como se exponen en la tabla 1.

Adicionalmente se dan a conocer kits que pueden utilizarse, por ejemplo, para el diagnóstico de trastornos relacionados con la longitud ocular. En determinadas formas de realización, un kit dado a conocer en la presente memoria comprende un conjunto de oligonucleótidos específicos de haplotipo para identificar la presencia o ausencia de haplotipos de los genes de opsina L:M, tales como los identificados en la tabla 1. Por ejemplo, un kit descrito comprende: un conjunto de pares de cebadores para amplificar partes de los exones 3 y 4 asociadas con los haplotipos descritos en la presente memoria, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 de los haplotipos indicados en la tabla 1; un conjunto de sondas que pueden hibridarse con partes de los exones 3 y 4 asociadas con los haplotipos descritos en la presente memoria; y/o una micromatriz, tal como un chip de SNP. Los expertos en la materia pueden diseñar de manera sencilla y fácil los cebadores y las sondas mediante referencia a una secuencia asociada con las partes de los exones 3 y 4 asociadas con los haplotipos descritos en la presente memoria. También pueden diseñarse micromatrices de manera sencilla y fácil con oligonucleótidos de la invención que corresponden a las partes de los exones 3 y 4 asociadas con los haplotipos descritos en la presente memoria. Alternativamente, puede realizarse el análisis utilizando un instrumento de espectrometría de masas (por ejemplo, un instrumento MassArray™) que permite genotipar en sitios polimórficos conocidos utilizando cebadores de PCR especialmente diseñados seguido por espectrometría de masas. Esta técnica es adecuada para el diagnóstico de estados tales como trastornos de longitud axial descritos en la presente memoria cuyas bases genéticas se entienden bien. Un procedimiento de extensión de cebadores mediante MassArray™ detecta diferencias de secuencia a nivel de un único nucleótido. Una ronda inicial de PCR amplifica a partir de ADN genómico una longitud corta de ADN que rodea al SNP. Esto va seguido por extensiones de una única base de un cebador que se hibrida de manera directamente adyacente al SNP. El cebador se extiende dependiendo de la secuencia de molde, dando como resultado una diferencia de masa específica de alelo entre productos de extensión. Esta diferencia de masa permite la diferenciación entre alelos de SNP utilizando espectrometría de masas MALDI TOF.

Adicionalmente se da a conocer un modelo de ratón de un trastorno relacionado con la longitud ocular tal como se describe en los ejemplos en la presente memoria, que comprende una proteína de fotopigmento verde (L)

variante asociada con miopía. Adicionalmente se da a conocer un modelo de ratón que expresa proteínas de fotopigmento rojo (M) variante y verde (L) normal o variante, en el que una proteína variante presenta una secuencia de aminoácidos asociada con miopía. Tales ratones pueden generarse tal como se describe, por ejemplo, en los métodos proporcionados en la presente memoria. Tales ratones se han generado utilizando el método descrito en la presente memoria, en el que los ratones heterocigóticos del método comprenden las proteínas de fotopigmento rojo y verde. En determinadas formas de realización descritas, puede utilizarse un modelo de ratón de la invención para someter a prueba la intervención del trastorno relacionado con la longitud ocular, tal como intervención farmacológica o genética.

Adicionalmente se da a conocer un medio de almacenamiento legible por máquina, que comprende un conjunto de instrucciones para hacer que un dispositivo de diagnóstico mida la razón de conos L:M o el haplotipo de los genes de opsina L:M de un paciente. Adicionalmente se da a conocer un medio de almacenamiento legible por máquina que comprende instrucciones para hacer que un procesador ejecute etapas de método automatizadas para correlacionar el haplotipo de los genes de opsina L:M y la razón de conos L:M de un paciente para determinar una prescripción apropiada de características de óptica preventiva para un paciente que se identifica que presenta una propensión a un trastorno relacionado con la longitud ocular. Tal como se utiliza en la presente memoria el término “medio de almacenamiento legible por ordenador” incluye discos magnéticos, discos ópticos, memoria orgánica y cualquier otro sistema de almacenamiento en masa volátil (por ejemplo, memoria de acceso aleatorio (“RAM”)) o no volátil (por ejemplo, memoria de sólo lectura (“ROM”)) legible por la CPU. El medio legible por ordenador incluye medio legible por ordenador interconectado o que actúa conjuntamente, que existe exclusivamente en el sistema de procesamiento o que va a distribuirse entre múltiples sistemas de procesamiento interconectados que pueden ser locales o remotos con respecto al sistema de procesamiento. Tal como se utiliza en la presente memoria, “dispositivo de diagnóstico” significa un dispositivo que puede llevar a cabo las mediciones de la razón de conos L:M o la determinación del haplotipo de los genes de opsina L:M para llevar a cabo los métodos de la invención, incluyendo, pero sin limitarse a, un lector de micromatriz o un espectrómetro de masas.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos puestos en práctica y los resultados logrados, se proporcionan únicamente a título ilustrativo y no limitativo de la invención.

Ejemplo 1

Genes OPN1LW y OPN1MW mutantes en enfermedad ocular de Bornholm

El primer locus de miopía de alto grado identificado se localizó en el cromosoma Xq28 y se denominó MYP1 (M. Schwartz, M. Haim, D. Skarsholm, *Clinical Genetics* 38, 281 (octubre de 1990)). El fenotipo también se conoce como enfermedad ocular de Bornholm (BED), y es un síndrome de disfunción de conos ligado al cromosoma X con miopía, astigmatismo y cambios en el nervio óptico (T. L. Young *et al.*, *Archives of Ophthalmology* 122, 897 (junio de 2004); U. Radhakrishna *et al.*, *Investigative Ophthalmology & Visual Science supplement* (resumen n.º 3814) (2005); M. Michaelides *et al.*, *Ophthalmology* 112, 1448 (2005)). Parte del fenotipo de BED con síndrome de disfunción de conos ligado al cromosoma X es un electroretinograma (ERG) de conos anómalo. Los genes OPN1LW y OPN1MW residen en Xq28 y codifican para fotopigmentos de cono responsables de los acontecimientos iniciales que generan el ERG de conos.

Se evaluaron los genes de opsina de cono L y M como candidatos para el fenotipo de BED. Las dos familias de miopía/disfunción de conos ligado al cromosoma X no emparentadas descritas por Young *et al.* (T. L. Young *et al.*, *Archives of Ophthalmology* 122, 897 (junio de 2004)) presentan deficiencias en la visión de color que están provocadas por la ausencia de un gen OPN1MW en cualquiera de las dos primeras posiciones en la matriz de genes de opsina de cono en la familia con BED original (M. Schwartz, M. Haim, D. Skarsholm, *Clinical Genetics* 38, 281 (octubre de 1990)) y por la ausencia de un gen OPN1LW intacto en el caso de la familia de Minnesota (MN). En una tercera familia, que residía en la India, los hombres afectados (U. Radhakrishna *et al.*, *Investigative Ophthalmology & Visual Science supplement* (resumen n.º 3814) (2005)) presentaban una visión de color normal. Se amplificó selectivamente el primer gen en la matriz de opsina del cromosoma X y se secuenciaron directamente exones individuales de hombres afectados y no afectados en las familias de MN, BED1 y de la India. También se amplificaron selectivamente los genes de opsina en el sentido de 3' del primer gen y se secuenciaron directamente los exones. Para todos los hombres afectados en la familia de MN, el gen de opsina de la primera posición (más en el sentido de 5') en la matriz codificaba para una opsina M con una combinación no habitual de aminoácidos especificados por los codones dimórficos en el exón 3. Esta combinación era leucina en la posición de aminoácido 153 (L153), valina en la posición 171 (V171), alanina en 174 (A174), valina en 178 (V178) y alanina en 180 (A180), denominada a continuación en la presente memoria “LVAVA”. El segundo gen en la matriz codificaba para una combinación de aminoácidos en esas posiciones (“MVVVA”) normalmente encontrada en opsinas M en individuos sin anomalías en la visión.

También se encontró que los miembros afectados de la segunda familia con BED no emparentada (BED1) notificada por Young *et al.* (T. L. Young *et al.*, Archives of Ophthalmology 122, 897 (junio de 2004)) y la familia de la India (U. Radhakrishna *et al.*, Investigative Ophthalmology & Visual Science supplement (resumen n.º 3814) (2005)) presentaban la combinación LVAVA, pero en la opsina L. En ambas de estas últimas familias, los genes en el sentido de 3' en hombres afectados codificaban para variantes que son típicas de individuos con visión normal. Los hombres no afectados en las familias con BED no presentaban una variante LVAVA. Como experimento de control, se secuenciaron 261 genes OPN1MW y 320 OPN1LW de hombres sin ninguna anomalía de la visión grave. Ninguno de los genes especificaba la combinación LVAVA.

Se encontró que los hombres afectados en cinco familias adicionales (M. Michaelides *et al.*, Ophthalmology 112, 1448 (2005); M. McClements, M. Neitz, A. Moore, D. M. Hunt, Invest Ophthalmol Vis Sci, ARVO E (2010)) y otro individuo no emparentado con el fenotipo de BED presentaban o bien la combinación LVAVA o bien una combinación similar, en la que está presente isoleucina en la posición 171 (1171) en lugar de valina. Esta combinación se denomina "LIAVA" y se mostró anteriormente que provoca que los fotorreceptores no sean funcionales en adultos (J. Carroll, M. Neitz, H. Hofer, J. Neitz, D. R. Williams, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101, 8461 (2004); M. Neitz *et al.*, Visual Neuroscience 21, 205 (2004); M. A. Crognale *et al.*, Visual Neuroscience 21, 197 (2004)). Se encontró que los miembros afectados de una séptima familia que se notificó que presentaban síndrome de disfunción de conos ligado al cromosoma X presentaban una mutación que sustituye la cisteína normalmente encontrada en la posición 203 por arginina (C203R) en las opsinas tanto L como M (M. Michaelides *et al.*, Ophthalmology 112, 1448 (2005)), una mutación que se sabe que hace que la opsina no sea funcional (M. Michaelides *et al.*, Ophthalmology 112, 1448 (2005); J. Winderickx *et al.*, Nature Genetics 1, 251 (1992); J. Nathans *et al.*, Science 245, 831 (1989)).

Fenotipo de conos de mutación de opsina de BED en ratones con una sustitución génica dirigida

Aunque anteriormente se ha documentado que las mutaciones LIAVA y C203R encontradas en algunas de las familias provocan mal funcionamiento de fotorreceptores de conos, nunca se había identificado la combinación de aminoácidos LVAVA en muchas familias con BED y su impacto sobre la función y viabilidad de conos. Los individuos con LVAVA codificada en su único gen de pigmento de conos ligado al cromosoma X expresado presentan distrofia de conos, lo que indica que los conos que expresan este haplotipo funcionan de manera anómala y eventualmente se degeneran. Para verificar la función de conos anómala asociada con LVAVA, se creó una línea de ratón en la que se sustituyeron los exones 2 a 6 del gen de opsina M de ratón por un ADNc que contenía los exones 2-6 de un gen de opsina L humano que especificaba la combinación LVAVA. También se creó una línea de ratón de control que era idéntica en cuanto a la estructura de la sustitución de gen de opsina ligado a cromosoma X excepto por que especificaba la combinación LIAIS, que se encuentra comúnmente en individuos con visión normal. Se sometieron a prueba los ratones utilizando ERG activado-desactivado utilizando un estímulo de aislamiento de conos L. Las amplitudes de ERG eran reducidas en ratones con la mutación LVAVA en comparación con ratones de control, de manera que concuerda con los hallazgos de ERG anómalos en los pacientes con BED (T. L. Young *et al.*, Archives of Ophthalmology 122, 897 (junio de 2004)). La onda a de ERG, la componente más asociada con la función de fotorreceptores, presentaba una amplitud reducida a la mitad en el ratón LVAVA en comparación con el ratón de control.

Razón de conos y gravedad del fenotipo de BED

En el caso de individuos con la mutación LIAVA o C203R, ambas de las cuales hacen que los conos que las expresan no sean funcionales, queda un único tipo de cono que absorbe en las longitudes de onda de media a larga, lo que explica sus defectos en la visión de color. En el caso de individuos con las mutaciones LVAVA y un defecto en la visión de color, los conos que contienen la opsina LVAVA funcionan, pero los dos primeros genes en la matriz codifican para el mismo tipo de opsina, L para la familia BED1, y M para la familia de MN. En cambio, en la familia de la India, los conos L expresan los fotopigmentos LVAVA que funcionan de manera anómala, pero en una subpoblación de conos separada se expresa una opsina M normal y los individuos con miopía de BED en esta familia presentan una visión de color normal.

Habitualmente, sólo se expresan los dos primeros genes en la matriz de genes de opsina del cromosoma X. Sin embargo, los pacientes con BED/alta miopía ligada al cromosoma X presentan un gen de opsina ligado al cromosoma X con una mutación que provoca un mal funcionamiento de fotorreceptores de conos y un segundo gen normal. Cada uno de los dos primeros genes de opsina a partir de la matriz se expresa en su propio submosaico de conos entremezclándose ambos de manera aleatoria. Cada una de las mutaciones que se encuentra que están asociadas con BED/alta miopía ligada al cromosoma X produce un trastorno de la visión más debilitante (distrofia de conos en los casos de LVAVA) o uno en el que la función de conos L y M está totalmente ausente en adultos (monocromancia de conos azul en el caso de LIAVA y C203R) cuando es la única opsina L/M expresada en la retina de un individuo. Lo que parece rescatar a los pacientes con alta miopía del fenotipo retiniano más debilitante es la presencia de un gen de pigmento del cromosoma X normal expresado en un submosaico de conos. Sin embargo, presentar los conos normales y mutantes entremezclados parece ser responsable de la alta miopía.

Hay una variabilidad muy extendida en cuanto a la razón de conos L:M en la población normal. Se encontró una variación similar en la razón de conos entre los sujetos con BED LIAVA (figura 1). A partir de imágenes de óptica adaptativa (AO) queda claro que las mutaciones asociadas con BED alteran el mosaico de conos, afectando lo más probablemente a la capacidad del ojo para extraer información fiable sobre la presencia de imágenes nítidamente enfocadas, de grano fino, a partir de comparaciones de actividad entre conos adyacentes y por tanto interfiere con el desarrollo de emetropía. La obtención de imágenes de tres individuos mostró una ilustración drástica de cómo el grado de alteración del mosaico de conos se correlaciona con la longitud axial y la gravedad de miopía (figura 1E).

En los pacientes con BED LVAVA, los conos mutantes son funcionales, pero la diferencia en la respuesta entre conos normales y mutantes es mayor que lo que se produciría por dos conos normales, uno en el lado claro y uno en el lado oscuro de un borde de oscuridad-luz nítidamente enfocado en una imagen. En la edad adulta, los conos que contienen una opsina con la combinación LIAVA son completamente no funcionales (J. Carroll, M. Neitz, H. Hofer, J. Neitz, D. R. Williams, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 8461 (2004); M. Neitz *et al.*, *Visual Neuroscience* 21, 205 (2004); M. A. Crognale *et al.*, *Visual Neuroscience* 21, 197 (2004); sin embargo, existen evidencias de que funcionan hasta cierto grado en la infancia (L. Mizrahi-Meisssonier, S. Merin, E. Banin, D. Sharon, *Investigative Ophthalmology and Visual Science* (20 de marzo de 2010, 2010)).

En este documento se determinó, por primera vez, la etiología completa para una forma de miopía (es decir, enfermedad ocular de Bornholm).

Ejemplo 2

Mutaciones de opsina y haplotipos asociados con miopía

Entre seres humanos con visión de color normal, hay una tremenda variación en las secuencias de aminoácidos de las opsinas L y M que ha surgido a través de recombinación homóloga desigual (J. Nathans, T. P. Piantanida, R. L. Eddy, T. B. Shows, D. S. Hogness, *Science* 232, 203 (1986); M. Drummond-Borg, S. S. Deeb, A. G. Motulsky, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 983 (1989); B. C. Verrelli, S. A. Tishkoff, *American Journal of Human Genetics* 75, 363 (2004)). Por ejemplo, en la muestra de control descrita anteriormente, había 34 secuencias de opsina L diferentes en 320 sujetos, y 17 secuencias de opsina M diferentes en 261 sujetos. La razón de conos L con respecto a M también varía ampliamente entre seres humanos. Por ejemplo, entre hombres de raza blanca con visión de color normal, la razón de conos L:M oscila entre 1,1:1 y 19:1, con un promedio de 2,7:1 (J. Carroll, M. Neitz, J. Neitz, *Journal of Vision* 2, 531 (2002); H. Hofer, J. Carroll, J. Neitz, M. Neitz, D. R. Williams, *Journal of Neuroscience* 25, 9669 (octubre de 2005)).

Para determinar si una razón de conos L:M sesgada sería protectora frente a miopía, se representó gráficamente la longitud axial media frente a las razones de conos L:M medias para tres grupos étnicos. Las razones de conos L:M se estimaron previamente a partir de ERG y datos genéticos para hombres que notificaron por sí mismos ser de raza blanca (n = 86) (H. Hofer, J. Carroll, J. Neitz, M. Neitz, D. R. Williams, *Journal of Neuroscience* 25, 9669 (octubre de 2005); J. Carroll, C. McMahon, M. Neitz, J. Neitz, *Journal of the Optical Society of America A* 17, 499 (marzo de 2000)) y africanos (n = 28) (C. McMahon, J. Carroll, S. Awua, J. Neitz, M. Neitz, *Journal of Vision* 8, 1 (2008)). También se determinó la razón L:M para una muestra de 5 hombres japoneses no emparentados (n = 5). Los valores oscilaron entre el 48,13% de conos L y el 38% de conos M, con un promedio del 43,4% de conos L correspondiente a una razón media de 0,8 de L:1 de M. Incluso para esta muestra pequeña los resultados indicaron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,0001$; prueba de la U de Mann-Whitney) en la razón media de conos L:M para hombres de raza blanca frente a hombres japoneses (figura 2). Los datos de longitud axial media eran de Twelker *et al.* (J. D. Twelker *et al.*, *Optometry and Vision Science* 86, 918 (2009)) para niños de 12 años de edad en su último cumpleaños en las categorías étnicas de raza blanca, afroamericana y asiática. El sesgo de la razón de conos L:M estuvo fuertemente asociado de manera negativa con la longitud axial ($R^2 = 0,99$), y por tanto con la propensión a miopía.

Después se evaluó la variación en las secuencias codificantes de los genes OPN1LW y OPN1MW como candidatos para provocar miopía. Los sujetos eran 336 hombres que notificaron por sí mismos ser de raza blanca, de 21 años de edad o más, todos los cuales se confirmó que presentaban una visión de color normal. Se midieron las longitudes axiales y curvaturas de córnea utilizando el instrumento Zeiss IOL master sin ciclopejía, y se calculó su refracción equivalente esférica (SER) utilizando una ecuación descrita en los métodos a continuación. Se determinó un haplotipo de los genes de opsina para cada sujeto amplificando selectivamente y secuenciando los exones 2, 3 y 4 de los genes OPN1LW y OPN1MW. Se crearon haplotipos utilizando los aminoácidos codificados por los codones 65, 111, 116, 153, 171, 178, 180, 230, 233 y 236 de los genes OPN1LW y OPN1MW. Se obtuvieron haplotipos completos para 303 sujetos. Se identificaron haplotipos como la combinación de aminoácidos en las posiciones variantes codificadas por los exones 2, 3 y 4. Más del 50%, o 159 hombres, pertenecían a 13 grupos de haplotipos con al menos 3 sujetos por grupo (véase la figura 3A). Dentro de cada uno de los 13 grupos de haplotipos no había ninguna variación en los codones 65, 111, 116, 230 ó 233 en ningún gen o en el codón 236 en los genes OPN1MW.

Dentro de cada haplotipo, se esperaba que los sujetos presentaran variación en la razón de conos, y los sujetos con una razón de conos L:M altamente sesgada estarían protegidos frente a la acción de generación de miopía del haplotipo. Se calculó la SER promedio para cada haplotipo como la SER media para la mitad más miope de los sujetos dentro del haplotipo. Se consideró el 50% más miope de cada grupo, basándose en la premisa de que estos individuos presentarían razones de conos L:M más aproximadamente iguales y serían un reflejo más exacto del potencial para cada haplotipo de provocar miopía. Se dispusieron los haplotipos en orden de potencial de miopía presentando el haplotipo número 1 el menor potencial para provocar miopía, y presentando haplotipo número 13 el mayor, y el potencial de miopía aumentó desde una SER promedio de -1 hasta -9 dioptrías (figura 3A). Se utilizó un análisis de la varianza de un factor para realizar pruebas para determinar una asociación entre el haplotipo y la refracción equivalente esférica (SER); hubo una asociación altamente significativa ($p < 0,0001$).

Se estimó la razón de conos L:M de once de los sujetos a partir de la figura 3A utilizando ERG fotométrico de parpadeo y espectros de conos individualizados (J. Carroll, C. McMahon, M. Neitz, J. Neitz, Journal of the Optical Society of America A 17, 499 (marzo de 2000)). Para cada uno de los 11 sujetos, se calculó la SER predicha tomando la SER media para el grupo de haplotipo de la figura 3A, y ajustándola a escala según el porcentaje de los conos L más M que eran conos L para cada sujeto. Por ejemplo, si una persona presentaba el haplotipo 8 (figura 3A), su potencial de miopía era de -4,5 dioptrías. Si esa persona presentaba una razón de conos de 1:1 se esperará que presente la totalidad de las -4,5 dioptrías de error de refracción. Sin embargo, si presenta casi el 100 por ciento de conos L se esperará que sea casi emélope. El 75% de conos L se encuentra en un punto medio entre una razón de conos de 1:1 (50% de L) y el 100% de L, de modo que se predecirá que una persona con el haplotipo 8 y el 75% de conos L presentará el 50% de la SER ($0 - 4,5/2 = -2,25$ dioptrías).

Se comparó la SER para cada sujeto con la SER predicha por el haplotipo y los datos de razón de conos en combinación (figura 3B). El coeficiente de correlación (R^2) era de 0,86, lo que sugiere que el 86% de la SER puede predecirse conociendo el haplotipo del locus del gen de opsina Xq28 y las razones de conos L:M para cada sujeto en esta muestra. La razón de conos L:M también está codificada por la variación genética en la matriz de genes de opsina ligados al cromosoma X.

Ejemplo 3

El contenido en rojo de videojuegos provoca un error de refracción aumentado

Se evaluó el potencial de que el contenido en rojo de videojuegos contribuya a la miopía de la siguiente manera. Se obtuvieron mediciones de la longitud axial de nivel inicial para siete sujetos de 18 años de edad, y a 2 intervalos de semanas después de eso, durante 2 meses, tiempo durante el cual cada sujeto jugó a un videojuego durante 1 hora al día mientras llevaba puestas gafas especiales. El videojuego era en blanco y negro, y mientras jugaban al juego, los sujetos miraban al monitor del ordenador a través de un par de gafas en las que la lente derecha era transparente de modo que los conos L y M se activaban de manera casi igual, y la lente izquierda estaba tintada de modo que sólo se activaban los conos L pero no los M. Los datos representados gráficamente en la figura 4A muestran la línea de tendencia de un desplazamiento miope significativo ($p=0,0076$) en el ojo izquierdo que miraba a los videojuegos rojos con respecto al ojo de control derecho de los sujetos. La longitud axial aumentada del ojo expuesto al rojo con respecto al videojuego en blanco y negro corresponde a un aumento del error de refracción de 1/3 de una dioptría al año.

Ejemplo 4

Gafas que controlan la distribución espectral de la luz que alcanza la retina pueden prevenir la miopía

Se evaluó la capacidad de gafas modificadas para influir en el crecimiento de la longitud axial del ojo cuando las llevan puestas niños de manera habitual. Ambas lentes de las gafas del estudio presentaban la corrección óptima para cada sujeto según la determinó el oculista del participante. Una lente en cada par de gafas era la lente de experimentación, que estaba tintada y presentaba un difusor holográfico aplicado a la superficie. El tintado eliminaba la luz roja y el difusor propagaba los rayos de luz incidentes a lo largo de un ángulo de 0,5 grados para producir una ligera borrosidad para reducir diferencias de actividad entre conos adyacentes. La otra lente en cada par de gafas era una lente de control que estaba tintada con un filtro neutro que activaba por igual conos L y M, y se eligió de modo que ambos ojos estaban expuestos a la misma intensidad luminosa. Se identificó el ojo dominante para cada sujeto, y durante el primer periodo de 3 meses, todos los sujetos llevaron puesta la lente de experimentación en el ojo dominante. Se ofreció a los sujetos la posibilidad de volver a incluirse después de 3 meses, y aquellos que eligieron volver a incluirse llevaron puesta la lente de experimentación en el ojo no dominante durante el segundo periodo de 3 meses.

Antes de que los participantes comenzaran a llevar puestas las gafas de experimentación, se midieron las longitudes axiales de ambos ojos utilizando el instrumento Zeiss IOL Master, que se ha establecido anteriormente para producir mediciones exactas y reproducibles en niños, con una desviación estándar entre mediciones repetidas de longitud axial en niños de $\pm 0,019$ (A. Carkeet, S. M. Saw, G. Gazzard, W. Tang, D. T.

Tan, Optometry and Vision Science 81, 829 (2004); J. Gwiazda *et al.*, Investigative Ophthalmology & Visual Science 44, 1492 (2003)). Cada medición de longitud axial representada gráficamente en la figura 4 era el promedio de veinte mediciones para cada ojo. En la tabla 2 se facilitan características de nivel inicial generales de los trece sujetos incluidos en el estudio. Se determinó la refracción equivalente esférica (SER) para ambos ojos al comienzo del estudio, y se determinaron las mediciones de longitud axial para cada ojo el día en el que los niños recibieron sus gafas modificadas. Los valores facilitados eran el promedio de veinte mediciones para cada ojo. La última columna indica qué ojo presentaba la lente de experimentación frente a la de control (OS ojo izquierdo, OD ojo derecho).

Tabla 2

N.º de ID de sujeto	Sexo	Edad	SER (OD)	SER (OS)	Longitud axial (mm) (OD)	Longitud axial (mm) (OS)	Experimentación / control
001	M	12	-1,50	-1,50	25,18	25,27	OD/OS
002	M	13	-3,75	-3,25	24,76	24,95	OS/OD
003	M	14	-7,875	-8,125	27,53	27,84	OD/OS
004	H	11	-3,25	-3,25	23,96	23,93	OS/OD
005	M	9	-2,75	-3,00	24,80	24,86	OS/OD OD/OS
006	M	11	-1,50	-1,375	22,93	23,08	OS/OD OD/OS
007	H	8	-1,50	-1,50	25,25	25,17	OD/OS OS/OD
008	H	13	-1,75	-1,50	24,39	24,54	OD/OS OS/OD
009	M	10	-2,125	-2,125	25,88	25,98	OS/OD OD/OS
010	M	11	-1,375	-1,375	24,15	24,10	OS/OD
011	H	8	-1,50	-1,50	24,08	24,09	OD/OS
012	H	11	-1,125	-1,25	23,21	23,46	OS/OD OD/OS
013	H	12	-4,00	-3,75	25,85	25,77	OS/OD OD/OS

Todos los participantes completaron el estudio con el ojo dominante como ojo de experimentación y el otro ojo como control interno. Siete participantes volvieron a incluirse para completar el estudio una segunda vez, pero con la lente de experimentación en el ojo no dominante. En la tabla 2 se indica qué lente, y por tanto, qué ojo, presentaba la lente de experimentación frente a la de control. Se midió la refracción equivalente esférica (SER) inicial mediante autorrefracción por cicloplejía para determinar la elegibilidad para el estudio, y osciló entre un mínimo de -1,00 y un máximo de -8,50 dioptrías. Las longitudes axiales del nivel inicial oscilaron entre 22,93 y 27,53 milímetros (mm) para el ojo derecho (OD) y entre 23,08 y 27,84 mm para el ojo izquierdo (OS).

El crecimiento de la longitud axial fue la medida de desenlace primaria utilizada para evaluar el efecto de la lente de experimentación frente a la lente de control a lo largo del transcurso de tres meses. Se determinó el crecimiento relativo de la longitud axial para los veinte ojos que llevaron puesta la lente de experimentación y para los veinte ojos que llevaron puesta la lente de control. Curvas de crecimiento para cada uno de los veinte ensayos demostraron la drástica diferencia en el grupo de experimentación frente al grupo de control (figura 4B y C). Las curvas de crecimiento para los ojos que llevaban puesta la lente de experimentación se agruparon alrededor del nivel inicial representando una reducción en la elongación del ojo, mientras que las curvas de crecimiento para los ojos que llevaban puesta la lente de control se desviaron hacia un crecimiento positivo, representando una elongación continuada del ojo. Dieciséis de los veinte ensayos siguieron este patrón de crecimiento, en el que la lente de experimentación redujo el crecimiento y la lente de control presentó un crecimiento continuado. En conjunto, se evaluaron diferencias normalizadas de la longitud axial entre los ojos de control y de experimentación mediante una prueba de la *t* de 2 muestras para datos emparejados. La diferencia absoluta del crecimiento entre los dos ojos alcanzó significación estadística hacia el día 30, como grupo. De manera individual, la fecha en la que la diferencia de crecimiento entre los dos ojos alcanzó significación osciló entre el día 30 y el día 75.

También se evaluó la tasa de elongación axial para ojos que llevaban puestas lentes de experimentación frente a control (figura 4D). La tasa de crecimiento de la longitud axial promedio en los ojos que llevaban puesta la lente de experimentación fue de $0,063 \pm 0,33 \mu\text{m/día}$ (media $\pm$ DE), mientras que la tasa de crecimiento de la longitud axial promedio en los ojos que llevaban puesta la lente de control era de $1,43 \pm 0,24 \mu\text{m/día}$. De nuevo, dieciséis de los veinte ensayos dieron como resultado una tasa de elongación axial reducida para el ojo que llevaba puesta la lente de experimentación frente al ojo que llevaba puesta la lente de control. La reducción de la tasa de

crecimiento global en el grupo de experimentación con respecto al grupo de control era estadísticamente significativa ($p = 0,0019$, figura 4D).

En promedio, los ojos que llevaban puesta la lente de experimentación crecieron casi diez veces más despacio que los ojos que llevaban puesta la lente de control.

Métodos

Pruebas de visión de color: Se examinaron los participantes para determinar la presencia de una deficiencia de visión de color rojo-verde heredada utilizando el anomaloscopio de Nagel y la prueba de la placa pseudoisocromática de Richmond HRR, edición de 2004.

Determinación de la razón de conos L:M: Se estimaron las razones de conos L:M utilizando fotometría de parpadeo y datos genéticos tal como se describió anteriormente (H. Hofer, J. Carroll, J. Neitz, M. Neitz, D. R. Williams, *Journal of Neuroscience* 25, 9669 (octubre de 2005); J. Carroll, C. McMahon, M. Neitz, J. Neitz, *Journal of the Optical Society of America A* 17, 499 (marzo de 2000)).

Obtención de imágenes por óptica adaptativa: Se obtuvieron imágenes de retinas utilizando óptica adaptativa tal como se describió anteriormente (J. Carroll, M. Neitz, H. Hofer, J. Neitz, D. R. Williams, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 8461 (2004); J. Carroll *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 20948 (2009); J. Carroll *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* presentado (2010)).

Longitud axial, curvatura de la córnea y refracción equivalente esférica (SER): Se medirán las longitudes axiales y curvaturas de la córnea para ambos ojos para cada sujeto utilizando el instrumento Zeiss IOL Master, y se calculó la refracción equivalente esférica predicha (SER) utilizando una fórmula derivada de una regresión lineal de un conjunto de datos de SER, longitudes axiales (AL) y curvaturas de la córnea (CC) reales de un grupo de 400 sujetos varones. La fórmula es: $SER = -(AL * 2,03 + 0,94 * CC) + 88,58$, donde el valor para AL era el promedio de 20 mediciones por ojo, y CC era el promedio de dos métodos diferentes de medición de la curvatura de la córnea. Se realizaron mediciones para ambos ojos.

Análisis genético: Se aisló ADN a partir de sangre completa o a partir de hisopos bucales utilizando el kit PureGene. Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar selectivamente los genes OPN1LW y OPN1MW, y se secuenciaron directamente los exones 2, 3 y 4 tal como se describió anteriormente (M. Neitz *et al.*, *Visual Neuroscience* 21, 205 (2004)). Se realizó PCR en tiempo real cuantitativa con una muestra de ADN de cada sujeto para estimar el número relativo de genes OPN1LW y OPN1MW utilizando ensayos anteriormente descritos (M. Neitz, J. Neitz, *Color Research & Application* 26, S239 (2001)).

Investigación con sujetos humanos: Toda la investigación con sujetos humanos se llevó a cabo según protocolos aprobados por IRB en el Medical College of Wisconsin y siguieron los principios de la declaración de Helsinki.

Constructos de ratón con inserción/desactivación: El vector de direccionamiento se diseñó para sustituir al gen OPN1MW de ratón endógeno en el cromosoma X por un ADNc de opsina L humano. El brazo de homología en 5' presentaba 11.917 pb de longitud y se extiende desde la posición de nucleótido 71.366.218 que está en el sentido de 5' del gen OPN1MW en el cromosoma X de ratón hasta el codón 65 del exón 2 del gen OPN1MW de ratón (posición de nucleótido 71.378.135, versión de julio de 2007 del ensamblaje de genoma de ratón). Se utilizó mutagénesis dirigida al sitio (QuickChange Kit, Stratagene) para alterar los codones de ratón 58, 62 y 65 para codificar para los mismos aminoácidos que los codones correspondientes en OPN1LW humano. Los aminoácidos 58 y 62 no varían entre OPN1LW humanos, pero los codones 65 sí, y en este constructo este codón específica treonina (T65). Se cambió el codón de ratón 58 de ACC a GTC, se cambió el codón de ratón 62 de CTT a TTT y se cambió el codón de ratón 65 de GTT a ACT. Un segmento de ADNc humano del plásmido hs7 (M. Drummond-Borg, S. S. Deeb, A. G. Motulsky, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 983 (1989)) que se extiende desde el codón 66 hasta de la señal de poliadenilación (nucleótido 1679 en el plásmido hs7 más 142 pares de base del polilígador de hs7) se ligó en marco al brazo de homología en 5'. Un casete PGK-NEO flanqueado por sitios de lox P se ligó en el sentido de 3' del fragmento de ADNc humano, y en el sentido de 3' del mismo se ligó el brazo de homología en 3' que se extendía desde el nucleótido 71.389.460 hasta el 71.392.250 del cromosoma X de ratón. El brazo de homología en 3' corresponde a un segmento de 2823 pares de bases dentro del intrón 5 del gen OPN1MW de ratón. Todos los vectores se confirmaron mediante secuenciación directa del vector completo. La creación del vector final utilizado y de los ratones con inserción/desactivación se realizó por Ozgene Inc. Se sometieron los constructos de direccionamiento a electroporación en células madre embrionarias, y se examinaron células resistentes a neomicina mediante hibridación de tipo Southern para determinar acontecimientos correctamente dirigidos y se confirmaron mediante secuenciación. Se cruzaron ratones que mostraron transmisión en la línea germinal del locus correctamente seleccionado como diana con ratones Cre para eliminar el casete PGK Neo. Se examinaron los animales mediante PCR para determinar el locus alterado final, y se confirmó mediante secuenciación

directa. Tras recibir ratones fundadores de Ozgene, se secuenció ADN genómico de cada ratón para confirmar la presencia del locus correctamente seleccionado como diana.

5 Se controló la expresión génica en el locus seleccionado como diana mediante las secuencias de ADN reguladoras de ratón endógenas, y la cola N-terminal de la opsina codificada correspondía a la codificada por el exón de ratón 1. La parte del extremo N-terminal codificada por el exón 1 difería del ser humano ya que se eliminaron los aminoácidos 4 a 8 y la secuencia difería en otras 7 posiciones de la siguiente manera: treonina en lugar de alanina en la posición 11, ácido glutámico en lugar de arginina en la posición 13, glutamina en lugar de histidina en la posición 14, treonina en lugar de prolina en la posición 15, leucina en lugar de glutamina en la posición 16, histidina en lugar de serina en la posición 18 y lisina en lugar de arginina en la posición 37. Las opsinas L humanas varían en las posiciones de aminoácido 65, 111 y 116 codificadas por el exón 2, y 230, 233 y 236 codificadas por el exón 4. El locus seleccionado como diana especificaba T65, I116, S116, I230, A233 y M236. Se construyeron dos versiones del locus seleccionado como diana con respecto a la secuencia de aminoácidos especificada por el exón 3. El locus de control especificaba L153, I171, A174, I178, S180 (LIAIS) que corresponde a la secuencia encontrada en opsinas L de chimpancé, y el mutante en estudio especificaba L153, V171, A174, V178, A180 (LVAVA).

ERG de ratón: Se anestesiaron ratones con ketamina/xilazina y se mantuvieron sobre una mesa de calentamiento durante todo el experimento. Se colocó el electrodo de registro en la córnea, se colocó el electrodo de referencia bajo el párpado y el electrodo de tierra estaba tocando la lengua. Se realizaron ERG activado-desactivado (alternando 30 s activado, 30 s desactivado) utilizando estímulos de LED a 525 nm a 5 intensidades luminosas diferentes (escalones de intensidad de 0,3 log) controladas por modulación de anchura de impulsos. Las luces a 525 nm producen respuestas mediadas por la opsina de conos L humana codificada por los transgenes pero no por la opsina UV de ratón endógena. Se realizó el registro en condiciones adaptadas de iluminación en las que los bastones estaban saturados.

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar el potencial miópico de un paciente que comprende:
 - a. analizar una muestra biológica obtenida a partir del paciente para determinar el haplotipo de gen de opsina L:M del paciente; y
 - b. correlacionar el haplotipo con una refracción equivalente esférica predicha;en el que el haplotipo de gen de opsina L:M es uno de los haplotipos 1 a 13 como se expone en la tabla 1.
2. Método según la reivindicación 1, que comprende además las etapas de:
 - a. determinar la razón de conos L:M en un ojo del paciente; y
 - b. correlacionar el haplotipo de gen de opsina L:M y la razón de conos L:M con una refracción equivalente esférica predicha.
3. Método para diagnosticar la propensión de un paciente a la miopía, comprendiendo el método analizar una muestra biológica obtenida a partir de un paciente para una combinación particular de aminoácidos en el gen de opsina L y el gen de opsina M del paciente, en el que el paciente es propenso a la miopía si está presente una de las combinaciones de aminoácidos mostradas como haplotipos de gen de opsina L:M como se expone en la tabla 1.
4. Método según la reivindicación 3 que comprende:

determinar el potencial miópico de un paciente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2,

en el que el paciente es propenso a la miopía si la refracción equivalente esférica predicha es una dioptría negativa.
5. Método según la reivindicación 4, en el que el potencial miópico es dependiente del haplotipo de gen de opsina L:M y aumenta en el orden del haplotipo 1 al haplotipo 13 como se expone en la tabla 1.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el haplotipo de gen de opsina L:M del paciente se determina utilizando la espectrometría de masas.
7. Método *in vitro* de prescribir un protocolo de tratamiento para reducir el potencial miópico de un paciente identificado como que presenta un potencial miópico asociado con una dioptría negativa que comprende:
 - a. analizar una muestra biológica obtenida a partir de un paciente para determinar el haplotipo de gen de opsina L:M del paciente;
 - b. determinar la razón de conos L:M en un ojo del paciente;
 - c. correlacionar el haplotipo y la razón de conos L:M con una refracción equivalente esférica predicha;
 - d. prescribir un protocolo de tratamiento proporcionando al paciente un dispositivo terapéutico que comprende un filtro dependiente de la longitud de onda;en el que el haplotipo de gen de opsina L:M es uno de los haplotipos 1 a 13 como se expone en la tabla 1.
8. Método según la reivindicación 7, en el que el filtro dependiente de la longitud de onda bloquea la luz roja.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, en el que el filtro dependiente de la longitud de onda bloquea la luz verde.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que las longitudes de onda filtradas por el filtro dependiente de la longitud de onda se seleccionan basándose en el haplotipo de gen de opsina L:M y la razón de conos L:M del paciente.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que el dispositivo terapéutico es un par de gafas que comprenden unas lentes que inducen borrosidad.
12. Método según la reivindicación 11, en el que las lentes que inducen borrosidad inducen una imagen borrosa mediante uno o más de entre: pequeñas protuberancias o depresiones en una o ambas superficies de las lentes;

inclusiones dentro de las lentes de un material diferente del material de la lente; incorporación de aberraciones de nivel superior en las lentes; y revestimientos o películas aplicados a una o ambas superficies de las lentes que producen borrosidad mediante difracción dispersión o difusión.

- 5 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que el dispositivo terapéutico comprende unas lentes de contacto que inducen borrosidad.
- 10 14. Método según la reivindicación 13, en el que las lentes de contacto que inducen borrosidad inducen una imagen borrosa mediante uno o más de entre: inclusiones dentro de las lentes de un material diferente del material de la lente; incorporación de aberraciones de nivel superior en las lentes; y revestimientos o películas aplicados a una o ambas superficies de las lentes que producen borrosidad mediante difracción dispersión o difusión.
- 15 15. Utilización de una micromatriz para determinar un haplotipo de L:M, en la que dicho haplotipo es uno de los haplotipos 1 a 13 como se expone en la tabla 1, comprendiendo dicha micromatriz un conjunto de oligonucleótidos específicos de alelo que pueden identificar por lo menos uno de los haplotipos 1 a 13 como se expone en la tabla 1.
- 20 16. Utilización de un kit para determinar un haplotipo de L:M, en el que dicho haplotipo es uno de los haplotipos 1 a 13 como se expone en la tabla 1, comprendiendo dicho kit:
 - a. por lo menos un par de oligonucleótidos que pueden identificar por lo menos uno de los haplotipos 1 a 13 como se expone en la tabla 1; y
 - 25 b. unas instrucciones para su utilización.
- 30 17. Utilización de un kit para determinar un haplotipo de L:M, en el que dicho haplotipo es uno de los haplotipos 1 a 13 como se expone en la tabla 1, comprendiendo dicho kit un ensayo para detectar por lo menos uno de los haplotipos 1 a 13 como se expone en la tabla 1.

Fig. 1

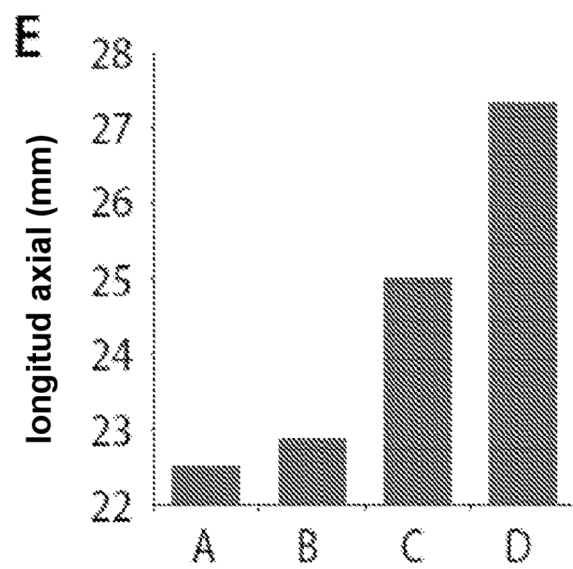
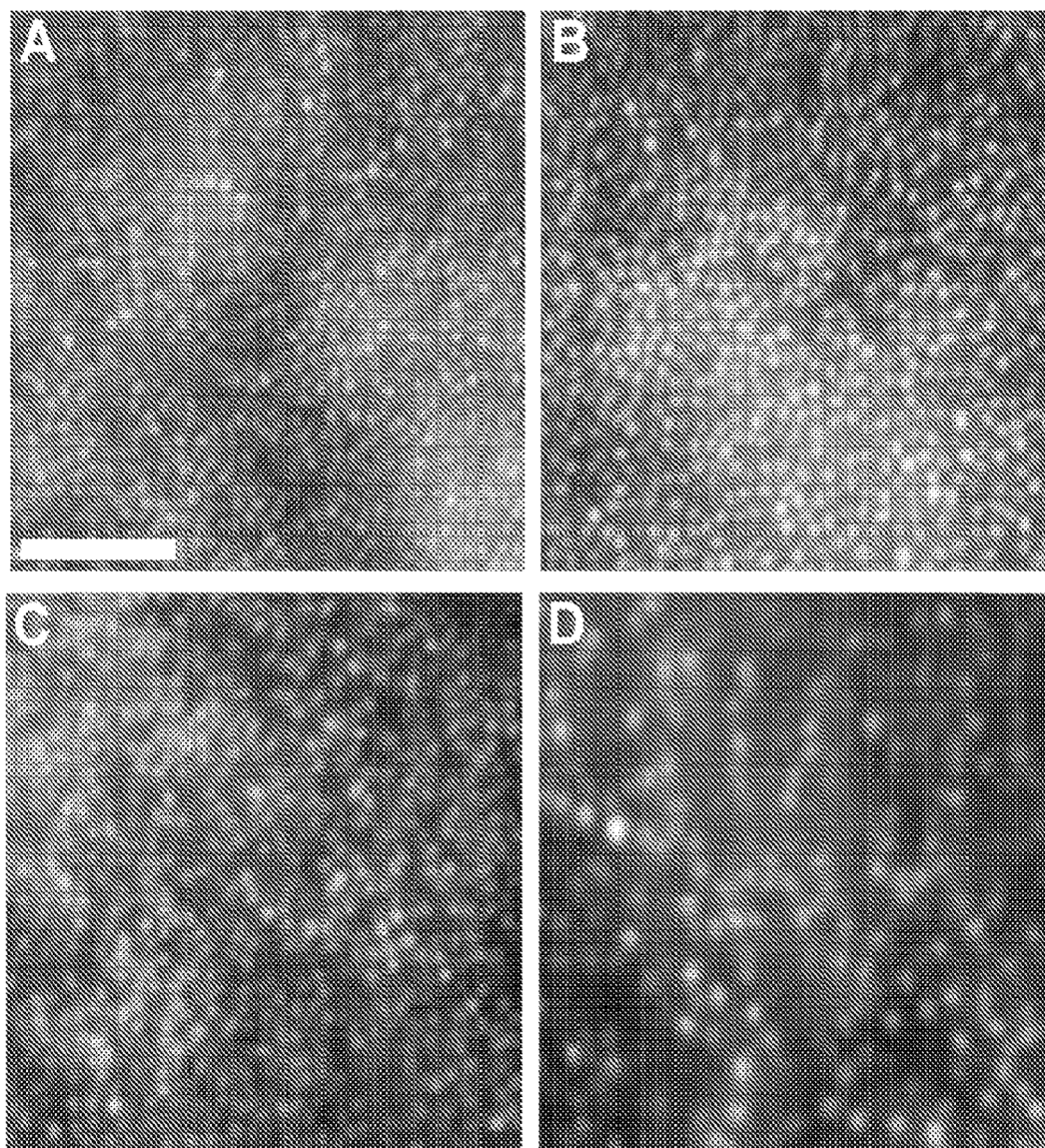


Fig. 2

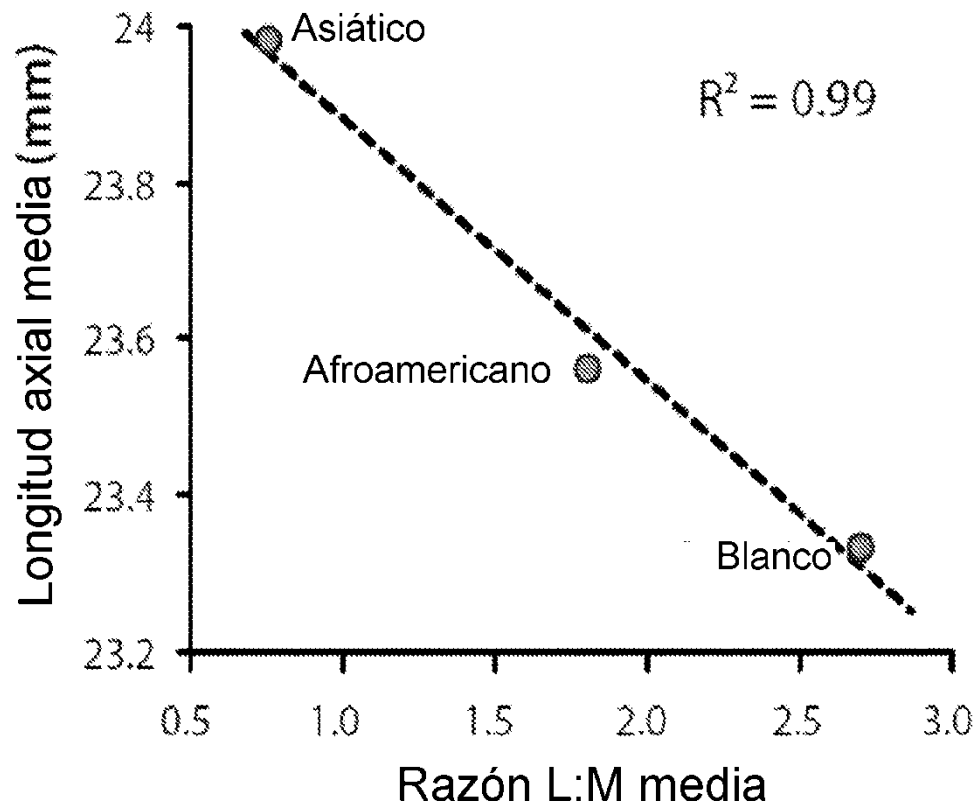
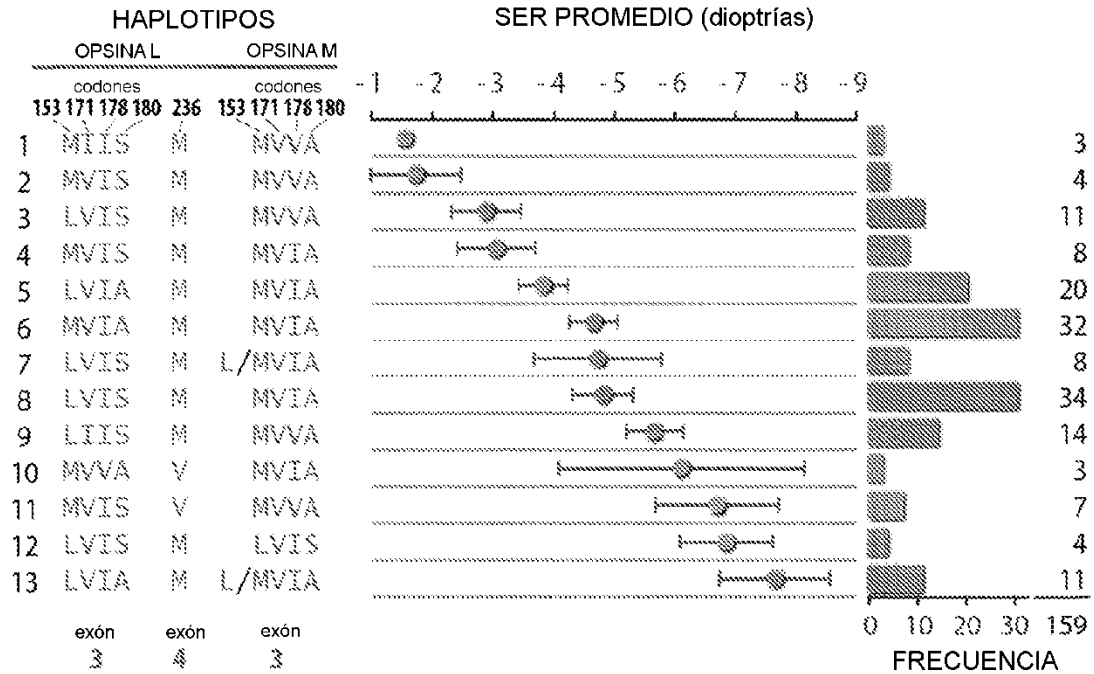


Fig. 3

A



B

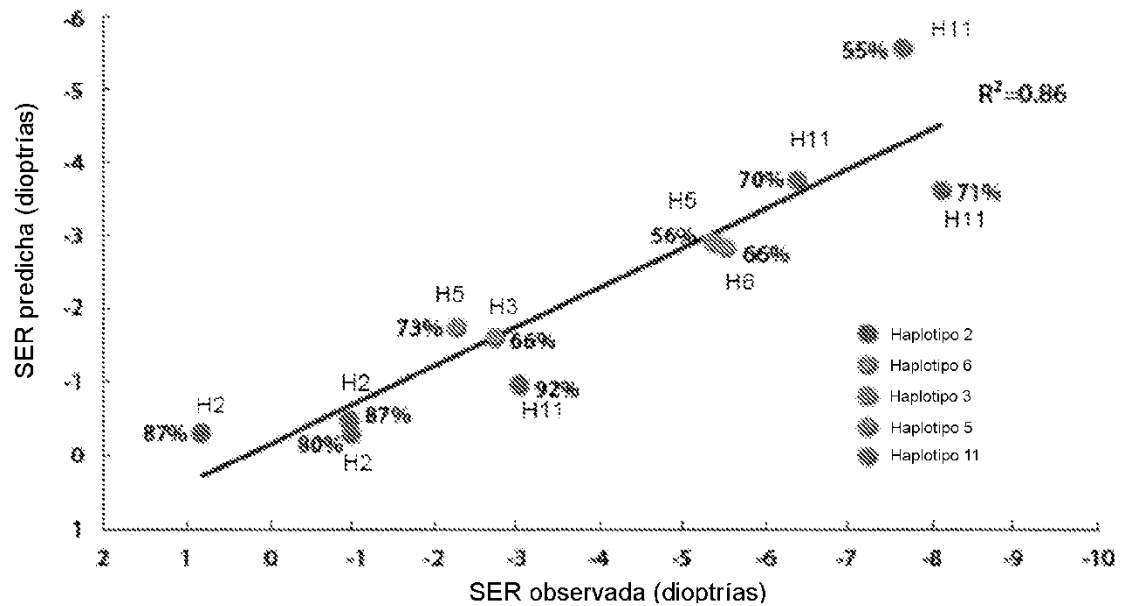


Fig. 4

