

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 625**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/075** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.11.2009 PCT/US2009/064355**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.05.2010 WO10056970**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2009 E 09826819 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 2356134**

54 Título: **Estimulación óptica de células diana y modificaciones a la misma**

30 Prioridad:

**14.11.2008 US 114781 P**

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

**29.03.2019**

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND  
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)  
Office of the General Counsel Building 170, 3rd  
Floor, Main Quad, P.O. Box 20386  
Stanford CA 94305-2038, US**

72 Inventor/es:

**DEISSEROTH, KARL;  
YIZHAR, OFER;  
GUNAYDIN, LISA;  
HEGEMANN, PETER y  
BERNDT, ANDRE**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 706 625 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**

Estimulación óptica de células diana y modificaciones a la misma

**5 Campo de la invención**

La presente invención en general se refiere a sistemas y planteamientos para estimular células diana, y más particularmente al uso de óptica para estimular las células diana.

**10 Antecedentes y compendio**

La estimulación de diversas células del cuerpo se ha usado para producir un número de efectos beneficiosos. Un método de estimulación implica el uso de electrodos para introducir una señal externamente generada en las células. Un problema enfrentado por las técnicas de estimulación de cerebro basadas en electrodo es la naturaleza distribuida de las neuronas responsables de un proceso mental dado. A la inversa, diferentes tipos de neuronas residen una cerca de la otra de modo que solamente se activan ciertas células en una región dada del cerebro mientras se realiza una tarea específica. Alternativamente indicado, no solamente hace que los tramos nerviosos heterólogos se muevan en paralelo a través de límites espaciales ajustados, sino que los propios cuerpos celulares pueden existir en configuraciones escasamente incrustadas, mezcladas. Esta manera distribuida de procesamiento parece definir los mejores intentos de entender el orden canónico dentro del sistema nervioso central (SNC), y hace a la neuromodulación un intento terapéutico difícil. Esta arquitectura del cerebro posee un problema para la estimulación basada en electrodos debido a que los electrodos son relativamente indiscriminados con respecto a la fisiología subyacente de las neuronas que estimulan. En lugar de eso, la proximidad física de los polos de electrodos a la neurona es con frecuencia el único factor determinante más grande en cuanto al cual las neuronas serán estimuladas. Por consiguiente, en general no es viable restringir absolutamente la estimulación a una clase única de neurona usando electrodos.

Otra cuestión con el uso de electrodos para la estimulación es que debido a que la colocación del electrodo dicta qué neuronas se estimularán, la estabilidad mecánica es frecuentemente inadecuada, y da como resultado la migración conducida de los electrodos desde el área dirigida. Además, después de un periodo de tiempo dentro del cuerpo, el electrodo con frecuencia llega a estar encapsulado con las células gliales, surgiendo la resistencia eléctrica eficaz de los electrodos y, por lo tanto, la administración de la energía eléctrica requerida para alcanzar las células dirigidas. Sin embargo, los incrementos compensatorios en voltaje, frecuencia o ancho de pulso, pueden propagar la corriente eléctrica e incrementar la estimulación involuntaria de las células adicionales.

Otro método del estímulo usa estructuras biomoleculares fotosensibles para estimular las células diana en respuesta a la luz. Por ejemplo, las proteínas activadas por luz se pueden usar para controlar el flujo de iones a través de las membranas celulares. Al facilitar o inhibir el flujo de iones positivos o negativos a través de las membranas celulares, la célula se puede despolarizar brevemente, despolarizar y mantener en ese estado, o hiperpolarizar. Las neuronas son un ejemplo de un tipo de célula que usa las corrientes eléctricas creadas por despolarización para generar señales de comunicación (es decir, impulsos nerviosos). Otras células eléctricamente excitables incluyen células de músculo esquelético, músculo cardíaco, y endocrinas. Las neuronas usan despolarización rápida para transmitir señales a través del cuerpo y para diversos fines, tales como control motor (por ejemplo, contracciones musculares), respuestas sensoriales (por ejemplo, tacto, oído, y otros sentidos) y funciones computacionales (por ejemplo, funciones cerebrales). Por tanto, el control de la despolarización de las células puede ser beneficioso para un número de diferentes fines, incluyendo (pero no limitado a) terapia psicológica, control muscular y funciones sensoriales.

Dependiendo de la aplicación, las características particulares de la sensibilidad del estímulo eléctrico y/o flujo de corriente pueden ser importantes. Características ejemplo incluyen que la duración de la corriente eléctrica continúa después de que el estímulo de luz se haya eliminado, retrasos entre el estímulo de luz y el comienzo del flujo de iones y la intensidad o longitud de onda de la luz necesaria para causar (o inhibir) el flujo iónico.

**55 Compendio**

Diversos aspectos de la presente invención están dirigidos a proteínas de canal iónico sensibles a la luz, ácidos nucleicos, sistemas, células mamíferas, proteínas de canal iónico sensibles a la luz para su uso, células mamíferas para su uso y composiciones, todo como se define en las reivindicaciones. Estos abordan retos que incluyen los descritos anteriormente.

Según una primera realización ejemplo, la presente invención está dirigida a opsinas de función escalón (SFO) que proporcionan tiempos de activación relativamente largos en respuesta a la luz a una primera longitud de onda. Estas SFO también pueden responder a la luz de una segunda longitud de onda desactivándose, de ese modo funcionando como un interruptor biestable.

65 Coherente con ciertas realizaciones, una o más SFO funcionan como canales de membrana abiertos por luz cuando

se expresan en una célula neuronal. La activación de las SFO mueve el voltaje de membrana/potencial en reposo de la célula neuronal hacia el umbral de potencial de acción de la célula (por ejemplo, despolariza la célula), de ese modo facilitando los potenciales de acción de la misma.

5 Según una realización específica, los aspectos de la presente invención están dirigidos hacia el uso de SFO para caracterizar o tratar las enfermedades asociadas con la neurología o el sistema nervioso central (SNC). Los aspectos particulares se refieren al uso de SFO para proporcionar excitación dirigida de poblaciones neurales para el tratamiento o la caracterización de enfermedades. Otros aspectos se refieren a caracterizaciones del circuito neural y, en algunos casos, a respuestas conductuales relacionadas.

10 Coherente con una realización, los aspectos de la presente invención están dirigidos hacia mutaciones/sustituciones de aminoácidos de las opsinas. Esto puede incluir moléculas que codifican la opsina mutante y/o la propia opsina mutante. En un ejemplo particular, las realizaciones incluyen sustituciones que afectan al tiempo de activación y/o la corriente de activación de las opsinas. Por ejemplo, las sustituciones se pueden realizar a ChR2 o VChR1. En una implementación particular esto puede incluir, usando ChR2 como ejemplo, sustituciones en C128 y D156. Se pueden realizar sustituciones homólogas en VChR1. Estas sustituciones se pueden usar solas o en combinaciones.

15 Según otra realización, los aspectos de la presente invención están dirigidos hacia un medicamento para el tratamiento de una enfermedad neurológica o basada en el SNC. El medicamento se diseña para introducir una opsina mutante a un paciente. A continuación, la opsina introducida se puede controlar a través de la aplicación de la luz al mismo como parte de un régimen de tratamiento.

20 Coherente con ciertas realizaciones, los aspectos de la presente invención están dirigidos hacia la expresión de múltiples tipos de opsina dentro de diferentes poblaciones neurales y/o dentro de la misma célula. En una implementación, los tipos de opsinas tienen respectivamente diferentes sensibilidades a la frecuencia/longitudes de onda de la luz, de ese modo permitiendo el control individual de cada tipo a través del control de la longitud de onda de la luz estimulante. En algunas implementaciones, los tipos de opsina tienen diferentes propiedades temporales, diferentes propiedades conductoras y/o se hiperpolarizan o despolarizan, respectivamente.

25 Otra realización se refiere a aspectos de la presente invención que están dirigidos para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno. El método usa tanto SFO como moléculas inhibitoras para fomentar o inhibir selectivamente las neuronas. El método dirige un grupo de neuronas asociadas con el trastorno; y en este grupo, el método incluye modificar por ingeniería una proteína/molécula inhibitora que usa un cofactor endógeno para responder a la luz produciendo una corriente inhibitora para disuadir la despolarización de las neuronas. El método también incluye la modificación por ingeniería de las SFO en neuronas, del mismo grupo y/o de un grupo diferente. A continuación, las neuronas modificadas por ingeniería se exponen a la luz, de ese modo disuadiendo y/o fomentando la despolarización de las neuronas.

30 El anterior compendio no tiene intención de describir cada realización o cada implementación de la presente descripción. Las figuras y la descripción detallada que siguen ilustran más particularmente diversas realizaciones.

### Breve descripción de los dibujos

35 La invención se puede entender más completamente en vista de la descripción detallada de diversas realizaciones de la invención que sigue en relación con los dibujos acompañantes, en los que:

La Figura 1a muestra el alineamiento de hélice 3 de varias canalrodopsinas en relación con bacteriorodopsina (BR) de *H. salinarum*. Los restos conservados se muestran por un fondo destacado, los aminoácidos que interactúan con el cromóforo están indicados por 102, y el C128 de ChR2 está marcado por un asterisco (\*). Los aminoácidos que sirven como donantes o aceptores de H<sup>+</sup> para la desprotonación y reprotonación de RSB están indicados por 104.

La Figura 1b muestra un modelo de cromóforo de ChR2, basado en la estructura por rayos X de BR (1KGB13), con E123, C128, y D156 de ChR2 reemplazando D85, T90, y D118 de BR.

La Figura 1c muestra fotocorrientes registradas de ChR2 tipo silvestre (wt), C128T, C128A y C128S expresadas en ovocitos de *Xenopus* a NaCl 100 mM, pH 7,4 y -50 mV en respuesta a pulsos de luz de 450 nm, 240 mW cm<sup>-2</sup>. Las constantes de tiempo mostradas son para el deterioro de la corriente después de la finalización de la estimulación por luz azul (media±eem; n=3 células para cada traza).

La Figura 1d muestra la dependencia de luz de las fotocorrientes en estado estable registradas a intensidades de luz bajas; las células que expresan C128A y S son aproximadamente 300 veces más sensibles que aquellas que expresan ChR2 wt. Las amplitudes se normalizaron a la respuesta a luz saturante (I/I<sub>Sat</sub>).

La Figura 1e muestra fotocorrientes registradas de mutantes C128A y C128S. Se aceleraron las cinéticas de desactivación cuando un segundo pulso de luz (off) con mayor longitud de onda siguió al pulso de excitación (on) (trazas: 530 nm; 546 nm; 570 nm; 600 nm).

La Figura 1f muestra las respuestas a pulsos de luz de 450 nm y 546 nm alternantes (pulso off) o pulsos de luz de 450 nm solamente (No pulso off) en ovocitos que expresan C128A y C128S. Las barras en la parte superior e inferior indican los protocolos de estimulación por luz para trazas de azul/verde (on/off) alternantes y solamente

azul (solamente on) respectivamente.

La Figura 2a muestra imágenes confocales de neuronas del hipocampo cultivadas que expresan ChR2 wt, C128S, C128A y C128T bajo el control del promotor  $\alpha$ CaMKII, con el tamaño de pixel y la escala de intensidad idénticos en todas las imágenes y la barra de escala de 25  $\mu$ m.

5 La Figura 2b muestra un resumen de fotocorrientes registradas de neuronas que expresan ChR2 wt y mutantes, mostrado como  $\text{media} \pm \text{eem}$  (n= 8, 11, 9 y 10 para wt, C128S, C128A y C128T, respectivamente). Las células se estimularon con un único pulso de 10 ms de luz azul de 470 nm.

10 La Figura 2c muestra la despolarización inducida por mutantes de ChR2. Los registros de voltaje se hicieron en neuronas que expresan C128S, A y T durante un protocolo de estimulación idéntico a en la Fig. 2b. Se hizo el promedio de los niveles de despolarización pico de 3, 7 y 7 células para C128S, C128A y C128T, respectivamente.

La Figura 2d muestra un resumen de despolarización en mutantes C128A y C128S en respuesta a pulsos de luz de 470 nm de longitudes variantes (los datos son los promedios de al menos 3 células para cada longitud de pulso).

15 La Figura 2e muestra una visión extendida de fotocorrientes provocadas por un pulso de 10 ms de luz azul de 470 nm en neuronas que expresan ChR2 wt, C128S, C128A, and C128T, mostrando cinéticas de activación más lentas de los mutantes.

La Figura 2f muestra un resumen de cinéticas de activación en respuesta a estimulación por 10 ms de luz azul. Se muestran las constantes de tiempo medio a partir de los ajustes exponenciales a trazas de corrientes; mientras que las cinéticas de aparición de C128S y C128A son similares en las trazas de la Figura 2e, C128S era generalmente más lenta que C128A como se resume en el presente documento.

20 La Figura 2g muestra constantes de tiempo de deterioro más lentas de las fotocorrientes en los mutantes C128. Las trazas se normalizan a la fotocorriente pico en cada mutante.

La Figura 2h muestra un resumen de cinéticas de desactivación en mutantes C128. Las constantes de tiempo medio se derivaron de los ajustes exponenciales.

25 La Figura 3a muestra el registro de la pinza de corriente de célula entera de una neurona de hipocampo de rata cultivada que expresa C128S bajo el promotor  $\alpha$ CaMKII. La despolarización subumbral se indujo por un único pulso de 10 ms de luz de 470 nm (traza superior; la raya no recuadrada indica el tiempo de estímulo) o por una serie de trenes de 100 Hz que consistían en 20 pulsos de 5 ms de luz de 470 nm (traza inferior, cada tren estaba indicado por una raya no recuadrada, las rayas recuadradas representan la luz verde).

30 La Figura 3b muestra el registro de la pinza de corriente de la célula entera de una neurona de hipocampo que expresa C128S estimulada con pares de estímulos de luz 470 nm y 535 nm. La traza superior muestra la respuesta a 10 ms de luz azul (rayas no recuadradas) y 10 ms de verde (rayas recuadradas), y la traza inferior muestra la respuesta a 10 ms de luz azul y 50 ms de verde. Los pares de estímulo se dieron a intervalos de 20 s, y el intervalo dentro de cada par de estímulo era de 5 s.

35 La Figura 3c muestra las trazas aumentadas del par de estímulo inferior en la Figura 3b que muestra la inactivación completa con 50 ms de luz verde. El potencial de membrana en reposo está indicado por la línea discontinua.

40 La Figura 3d muestra, a la izquierda, el registro de la pinza de corriente de la célula entera de una neurona de hipocampo que expresa C128A estimulada con una traza de PEPS previamente registrada.

La Figura 4a muestra los espectros de excitación para ChR2, ChR2 (C128A/H134R), VChR1 y VChR1 (C123S), y más particularmente, la Figura 4b muestra que ChR2 (C128A/H134R) conserva un espectro desplazado en relación con VChR1 (C123S).

45 La Figura 4b muestra los espectros de inactivación para ChR2 (C128A/H134R) y VChR1 (C123S), y más particularmente, la Figura 4b muestra que ChR2 (C128A/H134R) conserva un espectro desplazado en relación con VChR1 (C123S).

La Figura 4c muestra el tamaño de la corriente pico y las cinéticas de activación (on) y desactivación (off) (por ejemplo, el tiempo desde la luz inicial la correspondiente (des)activación de los canales) para SFO de VChR1 y SFO de ganancia de función (GF) de ChR2 (C128A/H134R).

50 La Figura 5a muestra el registro de corriente de una célula que expresa ChR2 (C128A/H134R) y particularmente una fotocorriente de 200 pA en respuesta a un pulso de luz on/azul de 10 ms, decayendo lentamente al valor inicial.

55 La Figura 5b muestra un registro de voltaje desde la misma célula que en la Figura 5a, mostrando la respuesta de la célula a la administración repetida de pares de 10 ms de luz de 470 nm (pulsos on/azules) y 100 ms de luz de 560 nm, (pulsos off/verdes).

La Figura 6 muestra un registro de corriente en una célula que expresa ChR2 (C128S/D156A) que muestra las cinéticas lentas en respuesta a un pulso on.

60 Mientras que la invención está dispuesta a diversas modificaciones y formas alternativas, se han mostrado detalles de la misma por medio del ejemplo en los dibujos y se describirán en detalle. Sin embargo, se debería entender que la intención no es limitar la invención a las realizaciones particulares descritas.

### Descripción detallada

65 Se cree que la presente invención es útil para facilitar la aplicación práctica de diversas estructuras biomoleculares fotosensibles, y se ha encontrado que la invención es particularmente adecuada para su uso en sistemas y métodos

que tratan el control y la estimulación del voltaje de la membrana celular. Aunque la presente invención no está necesariamente limitada a tales aplicaciones, diversos métodos de la invención se pueden apreciar a través de una discusión de diversos ejemplos usando este contexto.

5 Coherente con una realización ejemplo de la presente invención, se modifica por ingeniería en una célula una proteína/molécula sensible a la luz. La proteína afecta a un flujo de iones a través de la membrana celular en respuesta a la luz. Este cambio en el flujo iónico crea un cambio correspondiente en las propiedades eléctricas de la células incluyendo, por ejemplo, el voltaje y el flujo de corriente a través de la membrana celular. En un ejemplo, la proteína funciona *in vivo* usando un cofactor endógeno para modificar el flujo iónico a través de la membrana celular.  
 10 En otro ejemplo, la proteína cambia el voltaje a través de la membrana celular para disuadir el disparo del potencial de acción en la célula. En otro ejemplo más, la proteína es capaz de cambiar las propiedades eléctricas de la célula en varios milisegundos de la luz a introducir. Las realizaciones de la presente invención se refieren a mutaciones específicas de tales proteínas/moléculas activadas por la luz. Estas mutaciones incluyen sustituciones de aminoácidos dentro de la proteína de ese modo produciendo la supresión de resultados como se evidencia por los datos experimentales proporcionados en el presente documento. Estas sustituciones se pueden implementar modificando una secuencia de nucleótidos para codificar una proteína/molécula. Ciertas implementaciones se refieren a diseñar la secuencia de nucleótidos para la expresión en una célula neuronal mamífera.

20 Para detalles sobre la administración de tales proteínas, la referencia se puede realizar a la solicitud de patente americana N.º 11/459.636 presentada el 24 de julio, 2006 y titulada "Light-Activated Cation Channel and Uses Thereof".

Los aspectos de ciertas realizaciones de la presente invención están dirigidos hacia la identificación y modificación de partes específicas de los canales abiertos por luz. Estas modificaciones implican identificar las partes claves de los canales. Los canales se pueden identificar usando imágenes de alta resolución de la estructura terciaria del canal. Alternativamente, se puede usar el conocimiento de la estructura de canales similares. La siguiente descripción proporciona detalles de una implementación experimental y metodología específica. La presente invención no está limitada a una implementación cualquiera y se puede implementar para un número de diferentes modificaciones moleculares en diversas localizaciones coherentes con las enseñanzas del presente documento.

30 Aspectos específicos de la presente invención se refieren a genes de opsina microbiana adaptados para neurociencia, que permiten la transducción de los trenes de pulso de luz en cambios de potencial de membrana a escala de tiempo de milisegundos en tipos celulares específicos dentro del cerebro mamífero intacto (por ejemplo, canalrodopsina (ChR2), un ejemplo de la cual se proporciona como la SEQ ID NO:1, canalrodopsina de *Volvox* (VChR1), un ejemplo de la cual se proporciona como la SEQ ID NO:2, y halorodopsina (NpHR), un ejemplo de la cual se proporciona como la SEQ ID NO:3). ChR2 es una rodopsina derivada del alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*. El término "rodopsina" como se usa en el presente documento es una proteína que comprende al menos dos bloques de construcción, una proteína opsina, y un cofactor covalentemente unido, normalmente retinal (retinaldehído). La rodopsina ChR2 está derivada de la opsina Canalopsina-2 (Chop2), originalmente denominada Clamiopsina-4 (Cop4) en el genoma de *Chlamydomonas*. Las propiedades temporales de una canalrodopsina despolarizante, Ch2, incluyen cinéticas rápidas de activación y desactivación, proporcionando la generación de trenes de potencial de acción precisamente calculados. Para aplicaciones que buscan activación a larga escala de tiempo, se ha descubierto que se pueden frenar las cinéticas de desactivación normalmente rápidas de las canalrodopsinas. Por ejemplo, ciertas implementaciones de las canalrodopsinas aplican 1 mW/mm<sup>2</sup> de luz para virtualmente el tiempo completo en el que se desea la despolarización, el cual puede ser menos que el deseable.

Mucha de la discusión en el presente documento está dirigida a ChR2. A menos que se indique lo contrario, la invención incluye un número de variantes similares. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, Chop2, ChR2-310, Chop2-310, y canalrodopsina de *Volvox* (VChR1), un ejemplo de la cual se proporciona como la SEQ ID NO:2. Para más detalles sobre VChR1 la referencia se puede realizar a "Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*," *Nat. Neurosci.* junio de 2008, 11(6):631-3. Epub 23 de abril de 2008. En otras implementaciones se pueden realizar modificaciones similares a otras moléculas de opsina. Por ejemplo, se pueden realizar modificaciones/mutaciones a variantes de ChR2 o VChR1. Además se pueden usar variantes modificadas en combinación con bombas iónicas activadas por luz incluyendo, pero no limitado a, moléculas que corresponden a las secuencias SEQ ID NO:3-13.

Realizaciones de la presente invención incluye variantes de aminoácidos relativamente menores de las secuencias de origen natural. En un ejemplo, las variantes son más que aproximadamente 75 % homólogas a la secuencia de proteína de las secuencias de origen natural. En otras variantes, la homología es mayor que aproximadamente 80 %. Otras variantes más tienen homología mayor que aproximadamente 85 %, mayor que 90 %, o incluso tan alta como aproximadamente 93 % a aproximadamente 95 % o aproximadamente 98 %. La homología en este contexto significa similitud o identidad de secuencia, siendo preferida la identidad. Esta homología se puede determinar usando técnicas convencionales conocidas en la técnica. Las composiciones de las realizaciones descritas en el presente documento incluyen la proteína y las secuencias de ácidos nucleicos proporcionadas en el presente documento incluyendo las variantes que son más de aproximadamente 50 % homólogas a la secuencia

proporcionada, más de aproximadamente 55 % homólogas a la secuencia proporcionada, más de aproximadamente 60 % homólogas a la secuencia proporcionada, más de aproximadamente 65 % homólogas a la secuencia proporcionada, más de aproximadamente 70 % homólogas a la secuencia proporcionada, más de aproximadamente 75 % homólogas a la secuencia proporcionada, más de aproximadamente 80 % homólogas a la secuencia proporcionada, más de aproximadamente 85 % homólogas a la secuencia proporcionada, más de aproximadamente 90 % homólogas a la secuencia proporcionada, más de aproximadamente 95 % homólogas a la secuencia proporcionada.

Como se usa en el presente documento, la estimulación de una célula diana en general se usa para describir la modificación de propiedades de la célula. Por ejemplo, el estímulo de una célula diana puede dar como resultado un cambio en las propiedades de la membrana celular que puede conducir a la despolarización o polarización de la célula diana. En un ejemplo particular, la célula diana es una neurona y el estímulo afecta a la transmisión de impulsos facilitando o inhibiendo la generación de impulsos (potenciales de acción) por la neurona.

Una realización específica de la presente invención se refiere a la generación de canalrodopsinas biestables (por ejemplo, que tienen estados conductores y no conductores prolongados en ausencia de estímulos ópticos) que se abren dentro del estado activo con un único pulso breve de luz mientras que se mantiene activas durante una duración significativamente mayor que el pulso de luz. Tales canalrodopsinas procesan eficazmente la función delta de la luz en una función escalón del potencial de membrana. Estas y otras características pueden ser particularmente útiles para aplicaciones a larga escala de tiempo, neuromoduladoras, de desarrollo y preclínicas/clínicas incluyendo aquellas donde un cofactor químico exógeno no es deseable (por ejemplo, aplicaciones *in vivo*).

Aspectos de ciertas realizaciones de la presente invención están dirigidos hacia la finalización controlada de la despolarización estable resultante en un momento especificado, particularmente cuando la compensación de la finalización de la despolarización decae significativamente desde el final del pulso de luz desencadenante. Por ejemplo, la activación de las opsinas puede desplazar temporalmente el potencial en reposo de membrana de una neurona hacia el voltaje umbral del potencial de acción, de ese modo incrementando los potenciales de acción en la misma. La desactivación de las mismas opsinas restaura el potencial de acción al potencial en reposo "normal". Esta desactivación se puede implementar a través de la estimulación óptica de la frecuencia e intensidad apropiadas.

Las realizaciones de la presente invención se refieren a modificaciones de ChR2 para de ese modo afectar a los restos de proteína de manera que afectan a las cinéticas del canal. Las realizaciones de la presente invención proporcionan un mecanismo para generar un hospedador de las modificaciones a canales y bombas abiertos por luz. Las comparaciones de secuencia con canales/bombas similares, tales como la bacteriorodopsina (BR) de bomba de protones procariota, para la cual la estructura terciaria está disponible a alta resolución, se usan para identificar las localizaciones para la modificación. Por ejemplo, las interferencias estructurales de BR, de las siete hélices de transmembrana putativas en rodopsinas microbianas, indicaron que la hélice 3 es probablemente para contener la mayoría de los aminoácidos probablemente para interactuar con el cromóforo de la base de Schiff (RSB) retinal toda *trans* y así dirigir la apertura del canal. Muchos de estos aminoácidos están conservados en las canalrodopsinas (Fig. 1a), sugiriendo que el interruptor de RSB que dirige la interconversión de los estados no conductores y conductores está también altamente conservado. Por lo tanto, las mutaciones que interfieren con la RSB son candidatas potenciales, no solamente para el afinamiento del color sino también para las cinéticas alteradas y la acumulación del estado conductor. Entre los aminoácidos que interactúan con la RSB, la diferencia de secuencia más notable entre BR y ChR2 es el resto Cys128 de ChR2, correspondiente a Thr90 en BR. La cristalografía por rayos X de alta resolución ha mostrado que Thr90 en BR está localizado cerca de los carbonos C11/C12 de la RSB protonada (Fig. 1b). La mutación de Thr90 a Ala o Val en BR da como resultado un retraso de las cinéticas del canal y la acumulación de los estados de M y O del fotociclo. Por tanto, las realizaciones de la presente invención se refieren a una modificación de C128 para controlarlas cinéticas del canal.

En una implementación ejemplo, las canalrodopsinas se modificaron reemplazando C128 por Thr, Ala, o Ser. Se expresaron ChR2-C128T, ChR2-C128A, y ChR2-C128S en ovocitos de *Xenopus* y se registraron las fotocorrientes en respuesta a pulsos de luz azul de 470 nm. Sorprendentemente, estas modificaciones dieron como resultado retardo drástico (tres a cuatro órdenes de magnitud) en el cierre del canal después de que se terminara el estímulo de luz. Por consiguiente, más adelante en la presente invención, estos genes son referidos como genes de opsina de función escalón (SFO). En comparación con la constante de tiempo de cierre de  $11,9 \pm 0,3$  ms para ChR2 tipo silvestre (wt), la constante de tiempo para el cierre después de la eliminación de la luz se midió a  $2,0 \pm 0,5$  s,  $52 \pm 2$  s, y  $106 \pm 9$  s para mutantes C128T, C128A y C128S respectivamente, revelando tiempo de vida inmensamente prolongado del estado conductor (Fig. 1c). Ya que las amplitudes de la fotocorriente a una intensidad de luz dada están establecidas por un balance entre el reclutamiento de los nuevos estados abiertos y las transiciones al estado cerrado, la acumulación incrementada del estado abierto se ensayó para una sensibilidad eficazmente incrementada a niveles de luz inferiores. La dependencia de la intensidad de luz de las fotocorrientes estacionarias se determinó registrando las respuestas a pulsos de luz de intensidad creciente. Los resultados se normalizaron a la respuesta a energía luminosa saturante (Fig. 1d). Las células que expresan C128S y C128A eran sensibles a la luz al menos 300 veces menos en intensidad que aquellas que expresaban ChR2 wt, revelando otra propiedad sorprendente de estas SFO.

Los aspectos de la presente invención incluyen un método temporalmente preciso de corrientes de SFO de finalización. El intermediario espectral de ChR2 que refleja el estado abierto del canal absorbe de manera máxima cerca de 520 nm, (P520), que está desplazado hacia el rojo en relación con el estado oscuro P470. Este fotointermediario puede experimentar una fotorreacción; destellos breves de luz verde aplicados durante el estado  
 5 abierto cierran prematuramente el canal. Aunque este fotointermediario es normalmente de tan corta vida que la retro-reacción fotoquímica no se puede explotar eficazmente, el tiempo de vida prolongado de P520 en estos mutantes C128 permite el uso de luz verde para desactivar el interruptor biestable. De hecho, las dinámicas de inactivación de C128A y C128S se aceleraron mayormente cuando un segundo pulso de luz de mayor longitud de onda siguió al pulso de excitación (Fig. 1e,f). La luz de 530 nm mostró la mayor aceleración de las cinéticas “de  
 10 desactivación”, pero la corriente decayó a un nivel muy por encima de cero debido a la absorción significativa de esta longitud de onda por el estado oscuro (Fig. 1e). La luz de longitud de onda mayor mostró una inactivación más lenta pero más completa debido a la menor absorción por P480 (relación  $\sum_{P520}$  y  $\sum_{P480}$  mejorada), y los pulsos de luz de 546 nm se encontraron óptimos para la inactivación completa y rápida. La luz de 450 nm y 546 nm alternante permitió el cambio activación-desactivación reversible sin parada (Fig. 1f), de ese modo definiendo un mecanismo de  
 15 cambio biestable rápido para SFO.

Esta constelación de nuevas proteínas representa órdenes de progresos de magnitud en la evolución de las propiedades cuantitativas de estos canales a través de dimensiones múltiples. Muchas opsinas (por ejemplo, Canalopsina-1 o CHR1) no se expresan en neuronas; sorprendentemente, sin embargo, los tres genes de SFO  
 20 (C128T, C128A y C128S) se expresaron con éxito como fusiones de EYFP en neuronas de hipocampo usando vectores lentivirales conducidos por el promotor CaMKII $\alpha$ . Las neuronas que expresan los tres mutantes mostraron distribuciones subcelulares similares a las de ChR2-EYFP (Fig. 2a), con C128A y C128S que parecían expresarse a niveles cuantitativamente reducidos. Se registraron las fotocorrientes provocadas por pulsos de 10 ms de luz de 470 nm. Las fotocorrientes pico registradas en C128T eran similares a las de la ChR2 tipo silvestre ( $184\pm 34$  pA y  $240\pm 59$   
 25 pA respectivamente;  $n=10$  y  $8$  células, respectivamente; Fig. 2b), mientras que en realidad C128A y C128S mostraron amplitudes de fotocorriente más pequeñas ( $74\pm 17$  pA y  $61\pm 9$  pA respectivamente;  $n=11$  y  $9$  células, respectivamente; Fig. 2b). Sin embargo, breve destellos de hasta 10 ms provocaron corrientes cerca del máximo (Fig. 2b) y cambios de voltaje (Fig. 2c,d) para C128A/S, en todos los casos, sugiriendo que el equilibrio del estado oscuro y el estado conductor se alcanza en unos pocos milisegundos a una intensidad de luz dada. Las cinéticas de activación (el tiempo de respuesta de los canales después de una primera aplicación de luz) en todos los tres  
 30 mutantes permanecieron rápidas, solamente ligeramente más lentas que ChR2 wt ( $\tau_{on}=1,7\pm 0,1$  ms,  $11,6\pm 1,5$  ms,  $7,2\pm 0,8$  ms y  $20\pm 1,4$  ms para ChR2, C128T, C128A y C128S, respectivamente; Fig. 2f). Correspondiente a los datos de ovocito, las fotocorrientes mutantes decayeron con hasta 4 órdenes de magnitud de cinéticas más lentas después de la eliminación de la luz ( $\tau_{off}=10\pm 0,8$  ms,  $1,8\pm 0,3$  s,  $49\pm 3,5$  s y  $108\pm 42$  s, para ChR2 wt, C128T, C128A, y C128S, respectivamente; Fig. 2h). Estos resultados muestran que las propiedades de la función escalón se conservaban en  
 35 las neuronas.

Se ensayó la capacidad de los canales mutantes en las neuronas para suscitar despolarización de membrana prolongada y reversible en respuesta a pulsos de luz cortos y los resultados se representan en la Figura 3. En  
 40 neuronas que expresan C128S, un destello de 10 ms de luz azul (470 nm) era capaz de provocar despolarización subumbral notablemente prolongada (Fig. 3a, traza superior), y los protocolos de estimulación crónica que consisten en justo un pulso de luz de 10 ms cada 15 s posibilitaron la despolarización estable sostenida durante minutos que se podía finalizar rápidamente con un único pulso de luz de 535 nm (Fig. 3a, traza inferior). De hecho, las etapas precisas múltiples se podían administrar fácilmente y finalizar en las mismas neuronas usando pares de estímulos azul y verde (Fig. 3b). Se encontró que la inactivación óptima se da con un pulso de 50 ms de luz de 535 nm  
 45 (comparar las trazas superiores e inferiores en las Fig. 3b y 3c, coherente con una eficacia cuántica reducida para la transición P520 a P480). Juntos estos datos demuestran el comportamiento de cambio biestable en neuronas.

La despolarización subumbral estable provocada por la fotoestimulación de neuronas que expresan C128A y C128S  
 50 puede ser particularmente útil para conducir los trenes de espigas precisamente calculados (como con ChR2 wt), y también para administrar excitabilidad crónicamente incrementada, imitar los estados modulados o UP (despolarizaciones tipo escalón de 5-10 mV subumbral que modulan la excitabilidad y la producción de información), y para sensibilizar eficazmente neuronas genéticamente dirigidas a entradas sinápticas endógenas nativas. En ciertas implementaciones estas propiedades facilitan el ensayo de la significancia causal de un tipo de neurona,  
 55 cuando los neurocientíficos con frecuencia no conocen el código de la espiga para un tipo de célula particular en la ejecución de su función, pero podrían ensayar la suficiencia causal del tipo celular expresando un gen de SFO para establecer y aumentar reversiblemente los patrones naturales/intrínsecos del flujo de información a través de aquellas células, como se ilustra en la Fig. 3d.

La Fig. 3d muestra, a la izquierda, el registro de la pinza de corriente de la célula entera de una neurona de  
 60 hipocampo que expresa C128A. Los trenes de potencial postsináptico excitatorio (PEPS) nativo se recogieron con registros de la pinza de corriente en neuronas piramidales de hipocampo no sometidas a transducción, y los trenes de PEPS se repitieron en células que expresaban C128A o C128S antes, durante y después de 20s de “estados UP” suscitados por un pulso de luz azul (10 ms, 470 nm) y se terminados por un pulso de luz verde (50 ms, 535 nm; Fig. 3d). Antes o después de los estados UP, los trenes de PEPS produjeron poca formación de espigas ( $3\pm 1,1$  espigas  
 65 durante 20 s), mientras que dentro de los estados UP el mismo tren de PEPS suscitó formación de espigas

mayormente incrementada ( $17 \pm 3,5$  espigas durante el periodo de 20 s; 9/9 células incrementaron la formación de espigas,  $p=0,0006$  prueba t emparejada). Esto mostró que los genes de SFO se pueden usar para la fotoestimulación tipo estado UP o neuromoduladora que sensibiliza las neuronas para la actividad sináptica en curso durante largas escalas de tiempo que se pueden definir precisamente por un experimentador.

5 Más particularmente, la traza de PEPS registrada se administró en 5 bloques idénticos (las dos líneas más bajas). Durante los bloques 1, 3, y 5, pares de estímulos de luz de 470 nm (pulso on) y 535 (pulso off) nm (10 ms y 50 ms, respectivamente; indicados por rayas recuadradas y no recuadradas, respectivamente) se administraron para inducir la despolarización subumbral. Durante los bloques 2 y 4, no se administró luz. A la derecha, la Fig. 3d muestra un aumento de la repuesta a PEPS con y sin luz (superposición de recuadros oscuros con raya) muestra incremento  
10 inducido por luz en la formación de espigas a estímulos de PEPS (traza inferior).

Las sondas C128A y C128S proporcionan propiedades útiles para la manipulación de circuitos neuronales. Además de permitir las nuevas aplicaciones científicas básicas, requerimientos de luz reducida son particularmente útiles para  
15 respecto a los requerimientos del soporte óptico en experimentos preclínicos y clínicos, reduciendo el consumo de energía, el calentamiento, y los riesgos de fototoxicidad a largo plazo. Las mejoras adicionales incluyen versiones de VChR1 desplazadas al rojo para reclutar grandes volúmenes de tejido con fotones de menor energía, y modificaciones moleculares para incrementar el tráfico de la membrana como con eNpHR. Los órdenes múltiples de aumento de magnitud en tanto la estabilidad como la sensibilidad a la luz, acoplados con el interruptor de  
20 activación/desactivación (on/off) preciso y la independencia del cofactor químico de las canalrodopsinas, juntos ofrecen una constelación de propiedades claves para tanto la investigación básica como la preclínica/clínica en el circuito neuronal mamífero.

Las realizaciones de la presente invención incluyen modificaciones de otras partes de ChR2. La caracterización de  
25 las propiedades se pueden llevar a cabo como se discutió anteriormente. En el presente documento se describen modificaciones realizadas en la proximidad de C128. Otras posibilidades descritas incluyen modificaciones a, o en la proximidad de, E123 y H134 solas o en combinación con modificaciones en o cerca de C128.

Una implementación particular descrita en el presente documento se refiere a una mutación H134R con las  
30 mutaciones C128A o C128T. Se ha descubierto que estas mutaciones aumentan la conductancia, mientras que también proporciona constantes de tiempo coherentes con aquellos mutantes mencionados en el presente documento (42 segundos para C128A y 2,5 segundos para C128T). Como se muestra en la Fig. 4c, los tamaños de corriente son mayores y, por tanto, pueden ser particularmente útiles para que la despolarización de neuronas pase el umbral para la formación de espigas. En la Fig.4c también se representan los tiempos de activación (arriba a la  
35 derecha), los tiempos de desactivación sin luz (abajo a la izquierda), y los tiempos de activación en respuesta a la luz (abajo a la derecha).

La Fig. 5 muestra corrientes de muestra registradas a partir de células que expresan ChR2 (C128A/H134R), mostrando también la formación de espigas en respuesta a la activación de este mutante. La Fig. 5a muestra  
40 registro de corriente de una célula que expresa ChR2 (C128A/H134R) y particularmente una fotocorriente de 200 pA en respuesta a un pulso de luz on/azul de 10 ms, decayendo lentamente al valor inicial. La Fig. 5b muestra un registro de voltaje de la misma célula que en la Fig. 5a, mostrando la respuesta de la célula para la administración repetida de pares de 10 ms de luz de 470 nm (pulsos on/azul) y 100 ms de luz de 560 nm (pulsos off/verde).

45 Las realizaciones de la presente invención están dirigidas a modificaciones de ChR1 o VChR1. Como se muestra en la Fig. 1a, las modificaciones se pueden realizar a localizaciones que son homólogas a aquellas discutidas en relación con ChR2. Por ejemplo, se realiza una modificación a C123 de VChR1 que incluye la sustitución por uno de con Thr, Ala o Ser.

50 Coherente con otra realización de la presente invención, las modificaciones/sustituciones se realizan a ChR2 en D156. Por ejemplo, los resultados experimentales han mostrado que el mutante doble C128S/D156A tiene cinéticas de cierre lentas. En registros de células en cultivo, la corriente desencadenada por un único destello de 10 ms de luz azul solamente decayó a aproximadamente 90 % de su tamaño inicial después de 13 minutos de registro (Fig. 6). La sensibilidad a la luz de este mutante es superior a todas las SFO ensayadas previamente y puede responder con  
55 máxima fotocorriente hasta  $1 \mu\text{W}/\text{mm}^2$  de luz.

Otras realizaciones de la presente invención incluyen mutaciones similares a VChR1 para crear un canal, aún desplazado al rojo, igualmente lento (por ejemplo, C123S/D151A). Por ejemplo, una sustitución C123S en VChR1 da como resultado una opsina de función escalón sorprendente que tiene una constante de tiempo de cierre de canal  
60 después de la eliminación de la luz que está alrededor de 30 s (Fig. 4c) en relación con VChR1 no modificada, la cual es en el orden de 120 ms.

Aspectos de la presente invención en relación con el uso de la excitación desplazada al rojo (en relación con ChR2) de VChR1 (Fig. 4a). El desplazamiento al rojo puede ser particularmente útil para la penetración de tejido profundo  
65 en relación con la constante de tiempo relativamente larga. Por ejemplo, usando una versión de función escalón de VChR1, la luz se puede administrar a tanto una intensidad y tasa de repetición baja para alcanzar la activación

crónica de las células dirigidas. Otro aspecto se refiere a la separación espectral de ChR2 y las SFO basadas en ChR2 (Fig. 4a, 4b). Por ejemplo, VChR1 modificada se puede expresar en una primera población neuronal mientras que ChR2 modificada se puede expresar en otra población neuronal. De ese modo diferentes longitudes de onda de la luz estímulo pueden permitir el control del canal doble de la excitabilidad en las dos diferentes poblaciones neuronales.

La Fig. 6 muestra largo registro de corriente de mutante C128S/D156A de ChR2, coherente con una realización de la presente invención. Como se muestra en el presente documento, el mutante proporciona cinéticas de cierre lentas en relación con ChR2 no mutada y canales sensibles a la luz similares.

Las realizaciones de la presente invención se prestan ellas mismas a un amplio rango de aplicaciones. Unas pocas aplicaciones a modo de ejemplo se discuten más adelante en el presente documento, sin embargo, la invención no se limita a estos ejemplos específicos. En su lugar, los ejemplos presentan ejemplos de implementaciones y muestran que los aspectos de la presente invención se prestan ellos mismos a un amplio rango de aplicaciones.

Una de tales aplicaciones se refiere a la facilitación de la generación intrínseca del potencial de acción en células neurales durante periodos de tiempo prolongados y con alta precisión temporal. Como es apoyado por los diversos resultados experimentales, ciertas SFO permiten control de activación/desactivación rápido con características biestables. La estimulación neural intrínseca produce potenciales de acción en una neurona cuando la estimulación es suficiente para superar el potencial en reposo de la neurona. Una población neural modificada por ingeniería para expresar tales SFO proporciona control óptico de este potencial en reposo, de ese modo facilitando los potenciales de acción como un resultado de un estímulo de origen natural. Este control se puede facilitar mediante el reconocimiento de que ciertas SFO tienen sensibilidad temporal rápida que persiste durante un largo periodo de tiempo. Por ejemplo, la activación (respuesta conductora) de las SFO pueden estar en el orden de los milisegundos después de la aplicación de un estímulo óptico, mientras que las SFO también pueden permanecer activadas durante cientos de milisegundos o incluso cientos de segundos después de que el estímulo óptico se haya eliminado. Esto puede ser particularmente útil para el control preciso durante la activación de SFO mientras que reduce la cantidad del estímulo óptico potencialmente perjudicial (por ejemplo, salud celular, calor ópticamente generado y/o agotamiento de energía de la batería) necesario para mantener la activación de SFO. Además, diversas SFO han mostrado tiempos de desactivación temporales rápidos relativos cuando se exponen a luz de una longitud de onda particular. Por tanto, el control temporal preciso se puede conseguir con estimulación óptica mínima, mientras que facilita la actividad intrínseca de células o poblaciones neurales.

Coherente con una realización ejemplo más específica de la presente invención una molécula adicional, tal como NpHR de *Natronomonas pharaonis*, se puede usar para la inhibición óptica temporalmente precisa de la actividad neural. NpHR permite la inhibición selectiva de potenciales de acción únicos dentro de los trenes de espigas rápidos y bloqueo sostenido de la formación de espigas durante muchos minutos. El espectro de acción de NpHR está fuertemente desplazado al rojo en relación con la Canalrodopsina-2 (ChR2) (derivada de *Chlamydomonas reinhardtii*) pero funciona en energía luminosa similar, y funciones de NpHR en mamíferos sin cofactores exógenos. En un ejemplo, tanto NpHR como ChR2 se pueden expresar en las células diana. Igualmente, NpHR y ChR2 se pueden dirigir para el músculo de *C. elegans* y motoneuronas colinérgicas para controlar la locomoción bidireccionalmente. A este respecto, NpHR y ChR2 forman un sistema optogenético para la interrogación multimodal, de alta velocidad, genéticamente dirigida, toda óptica de circuitos neurales vivos.

Según las otras realizaciones ejemplos de la presente invención, los métodos para generar un flujo de corriente de neurona inhibitoria implica, en una neurona, modificar por ingeniería una proteína que responde a la luz produciendo una corriente inhibitoria para disuadir la despolarización de la neurona. En uno de tales métodos, la proteína está basada en halorodopsina y en otro método la proteína es una proteína inhibitoria que usa un cofactor endógeno.

En otra realización ejemplo, un método para controlar el potencial de acción de una neurona implica las siguientes etapas: modificar por ingeniería una primera proteína sensible a la luz en la neurona; producir, en respuesta a la luz, una corriente inhibitoria en la neurona y desde la primera proteína sensible a luz; modificar por ingeniería una segunda proteína sensible a luz en la neurona; y producir en respuesta a la luz, una corriente de excitación en la neurona desde la segunda proteína sensible a la luz.

Otra realización implica el método para controlar un nivel de voltaje a través de una membrana celular de una célula, el método incluye: modificar por ingeniería una primera proteína sensible a la luz en la célula; medir el nivel de voltaje a través de la membrana celular; y producir, en respuesta a la luz de una primera longitud de onda y usando la primera proteína sensible a la luz, una corriente a través de la membrana celular que es sensible al nivel de voltaje medido.

Otro aspecto de la presente invención está dirigido a un sistema para controlar un potencial de acción de una neurona *in vivo*. El sistema incluye un dispositivo de administración, una fuente luminosa, y un dispositivo de control. El dispositivo de administración introduce una proteína sensible a la luz a la neurona, produciendo la proteína sensible a la luz una corriente inhibitoria. La fuente luminosa genera luz para estimular la proteína sensible a la luz, y el dispositivo de control controla la generación de la luz por la fuente luminosa.

En más realizaciones detalladas, dicho sistema además está adaptado de modo que el dispositivo de administración introduce la proteína sensible a la luz por uno de transfección, transducción y microinyección, y/o de modo que la fuente luminosa introduce luz a la neurona por uno de un generador de luz implantable y fibras ópticas.

- 5 Los aspectos específicos de la presente invención están dirigidos hacia el uso de una bomba de cloruro conducida por luz de arquea, tal como halorodopsina (NpHR), de *Natronomonas pharaonis*, para la inhibición óptica temporalmente precisa de la actividad neural. Las bombas basadas en NpHR permiten tanto la inactivación (*Knockout*) de los potenciales de acción únicos dentro de los trenes de espigas rápidos como el bloqueo sostenido de la formación de espigas durante muchos minutos, y funcionan a energía luminosa similar en comparación con las SFO basadas en ChR2 o VChR1 pero con un espectro de acción fuertemente desplazado al rojo. La bomba de NpHR también funciona en mamíferos sin cofactores exógenos.

Más realizaciones detalladas se amplían sobre tales técnicas. Por ejemplo, otro aspecto de la presente invención coexpresa NpHR y SFO (por ejemplo, variantes ChR2 o VChR1) en las especies (por ejemplo, un ratón y *C. elegans*). También, NpHR y SFO se integran con la obtención de imágenes de calcio en lonchas de cerebro mamífero para la modulación óptica bidireccional y la lectura de la actividad neural. Igualmente, NpHR y SFO se pueden dirigir para el músculo de *C. elegans* y motoneuronas colinérgicas para proporcionar control bidireccional de la locomoción. NpHR y SFO juntas se pueden usar como un sistema optogenético completo y complementario para la interrogación multimodal, de alta velocidad, genéticamente dirigida, toda óptica de circuitos neurales vivos.

Además de las variantes de NpHR, ChR2 y VChR1, hay un número de canalrodopsinas, halorodopsinas, y opsinas microbianas que se pueden modificar por ingeniería para regular ópticamente el flujo de iones o segundos mensajeros dentro de las células. Diversas realizaciones de la invención incluyen proteínas de fusión, truncadas, mutadas, optimizadas por codón, versiones dirigidas, o si no versiones modificadas de tales reguladores ópticos iónicos. Por tanto, ChR2 y NpHR (por ejemplo, el número de acceso GenBank es EF474018 para la secuencia de NpHR "mamiferizada" y EF474017 para la secuencia de ChR2(1-315) "mamiferizada"), y variantes, se usan como representativas de un número de diferentes realizaciones. No quiere decir que las conclusiones que específicamente identifican SFOs, ChR2 y NpHR limitan la invención a tales ejemplos específicos de reguladores ópticos. Para más detalles con respecto a las anteriores secuencias mencionadas la referencia se puede realizar a "Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry" de Feng Zhang, y col, *Nature* (5 de abril, 2007) Vol. 446:633-639. Como se discute en el presente documento, por consiguiente, estas secuencias se pueden modificar para proporcionar las cinéticas de canal deseadas.

Coherente con una realización ejemplo de la presente invención, un método se implementa para estimular las células diana *in vivo* usando los vectores de transferencia génica (por ejemplo, virus) capaces de inducir el crecimiento del canal iónico fotosensible (por ejemplo, los canales iónicos basados en SFO/ChR2). Los vectores se pueden implantar en el cuerpo.

Coherente con una realización particular de la presente invención, se introduce una proteína a una o más células diana. Cuando se introducen en una célula, la proteína cambia el potencial de la célula en respuesta a la luz que tiene una cierta frecuencia. Esto puede dar como resultado un cambio en el potencial en reposo que se puede usar para controlar (disuadir) el disparo del potencial de acción. En un ejemplo específico, la proteína es una halorodopsina que actúa como una bomba de membrana para transferir la carga a través de la membrana celular en respuesta a la luz. Las bombas de membrana son transductores de energía que usan energía del enlace electromagnético o químico para la translocación de los iones específicos a través de la membrana. Para más información con respecto a las bombas de membrana de halorodopsina la referencia se puede realizar a "Halorhodopsin Is a Light-driven Chloride Pump" de Brigitte Schobert, y col, *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 257, N.º 17. 10 de septiembre, 1982, pp. 10.306-10.313.

La proteína disuade el disparo del potencial de acción moviendo el potencial de la célula lejos del nivel desencadenante del potencial de acción para la célula. En muchas neuronas, esto significa que la proteína incrementa el voltaje negativo visto a través de la membrana celular. En un ejemplo específico, la proteína actúa como una bomba iónica de cloruro que transfiere activamente iones de cloruro negativamente cargados dentro de la célula. De esta manera, la proteína genera una corriente inhibitoria a través de la membrana celular. Más específicamente, la proteína responde a la luz bajando el voltaje a través de la célula de ese modo disminuyendo la probabilidad de que ocurrirá un potencial de acción o despolarización.

Como se discutió anteriormente, una realización de la presente invención implica el uso de una bomba iónica ópticamente sensible que se expresa en una célula. En un ejemplo particular, la célula es o bien una célula neural o una célula madre. Una realización específica implica células animales *in vivo* que expresan la bomba iónica. Ciertos aspectos de la presente invención se basan en la identificación y el desarrollo de una bomba de cloruro conducida por luz de arquea, tal como halorodopsina derivada de *Natronomonas pharaonis* (NpHR), para la inhibición óptica temporalmente precisa de la actividad neural. La bomba permite tanto la inactivación de los potenciales de acción únicos dentro de los trenes de espigas y el bloqueo sostenido de la formación de espigas durante muchos minutos, y funciona a energía luminosa similar en comparación con variantes basadas en ChR2 pero con un espectro de acción fuertemente desplazado al rojo. La bomba de NpHR también funciona en mamíferos sin cofactores exógenos.

Según una realización ejemplo de la presente invención, una bomba iónica ópticamente sensible y/o canal se expresa en una o más células madre, células progenitoras, o progenie de células madre o progenitoras. La estimulación óptica se usa para activar bombas/canales expresados. La activación se puede usar para controlar las concentraciones iónicas (por ejemplo, cloruro, calcio, sodio, y potasio) en las células. Esto puede ser particularmente útil para afectar a la supervivencia, proliferación, diferenciación, desdiferenciación, o falta de diferenciación en las células. Por tanto, el estímulo óptico se implementa para proporcionar control durante la (maduración) de las células madre o progenitoras.

En una realización particular, los patrones de estímulo ópticamente controlados se aplican a las células madre o progenitoras durante un periodo de horas o días. Para más detalles con respecto a los efectos de los potenciales de membrana y concentraciones iónicas sobre tales células la referencia se puede realizar a "Excitation-Neurogenesis Coupling in Adult Neural Stem/Progenitor Cells" de Karl Deisseroth, y col, *Neuron* (27 de mayo, 2004) *Neuron*, Vol. 42, 535-552 y a la solicitud de patente americana N.º 20050267011 (Solicitud de Patente Americana N.º 11/134,720) titulada "Coupling of Excitation and Neurogenesis in Neural Stem/Progenitor Cells" de Deisseroth y col. y presentada el 19 de mayo, 2005.

En una realización particular, se implementa un método de conducción de la diferenciación en células. Se hace que las células expresen proteínas basadas en NpHR/ChR2 activadas por luz. Las células se exponen a la luz para activar la proteína basada en NpHR/ChR2. La activación conduce a la diferenciación de la célula expuesta o la progenie de la célula expuesta. En otra realización, las células comprenden células madre.

Otras realizaciones se refieren a aspectos de la presente invención que están dirigidos a un método para tratamiento/valoración de un trastorno o modelo de circuito. Uno de tales métodos usa SFO y (posiblemente) moléculas inhibitoras para fomentar o inhibir selectivamente las neuronas. El método dirige un grupo de neuronas asociadas con el trastorno, y en este grupo, el método incluye modificar por ingeniería una proteína/molécula inhibitora que usa un cofactor endógeno para responder a la luz produciendo una corriente inhibitora para disuadir la despolarización de las neuronas. El método también incluye modificación por ingeniería de SFO en neuronas, del mismo grupo y/o de un grupo diferente. A continuación, las neuronas modificadas por ingeniería se exponen a la luz, de ese modo disuadiendo y/o fomentado la despolarización de las neuronas. A continuación, se hace un seguimiento y valoración de los efectos putativos de esta estimulación. Diferentes perfiles de estimulación y/o localizaciones dirigidas se pueden implementar, ensayar y valorar. Las diversas propiedades (por ejemplo, naturaleza biestable y rápida sensibilidad) de SFO pueden ser particularmente útiles para tales aplicaciones, algunas de las cuales se discuten a más detalle más adelante en el presente documento.

Muchas aplicaciones humanas de la presente invención requieren aprobación gubernamental antes de su uso. Por ejemplo, el uso humano de la terapia génica puede requerir tal aprobación. Sin embargo, terapias génicas similares en neuronas (células no proliferativas que son no susceptibles a neoplasmas) se están desarrollando rápidamente, con ensayos clínicos aprobados por FDA, activos ya en progreso que implican la administración génica viral a cerebros humanos de ese modo facilitando el uso de diversas realizaciones de la presente invención para una gran variedad de aplicaciones. Lo siguiente es un listado no exhaustivo de unos pocos ejemplos de tales aplicaciones y realizaciones.

La adición está asociada con diversas funciones cerebrales, incluyendo la recompensa y la expectación. Además, la causa impulsora de la adición puede variar entre los individuos. Según una realización, la adición, por ejemplo, la adición de nicotina, se puede tratar con estabilización optogenética de áreas pequeñas de la ínsula. Opcionalmente, la obtención de imágenes del cerebro funcional – por ejemplo PET en estado señalado o fMRI - se puede usar para localizar un foco hipermetabólico para determinar un punto diana preciso para la intervención de la superficie de la ínsula.

La excitación optogenética del núcleo accumbens y el septum puede proporcionar recompensa y placer a un paciente sin la necesidad de recurrir el uso de sustancias, y por tanto pueden contener una clave para el tratamiento de la adición. A la inversa, la estabilización optogenética del núcleo accumbens y el septum se puede usar para disminuir las ansias de droga en el contexto de la adición. En una realización alternativa, la estabilización optogenética de la actividad hipermetabólica observada en el género del cíngulo anterior (BA32) se puede usar para disminuir el ansias de droga. La estabilización optogenética de las células dentro del núcleo arcuato del hipotálamo medio que contiene productos peptídicos de proopiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulador por cocaína y anfetamina (CART) también se puede usar para disminuir el comportamiento de la adición a droga. Para más información a este respecto, la referencia se puede realizar a: Naqvi N.H., Rudrauf D., Damasio H., Bechara A. "Damage to the insula disrupts addiction to cigarette smoking." *Science*. 26 de enero de 2007;315(5811):531-534.

Se puede usar la estimulación optogenética de las neuronas neuroendocrinas del núcleo periventricular hipotalámico que secreta la somatostatina para inhibir la secreción de la hormona del crecimiento a partir de la pituitaria anterior, por ejemplo, en acromegalia. Se puede usar la estabilización optogenética de las neuronas neuroendocrinas que secretan la somatostatina o la hormona del crecimiento para incrementar el crecimiento y el desarrollo físico. Entre los cambios que acompañan al envejecimiento "normal", es un descenso profundo en los niveles de la hormona del crecimiento en suero después de la 4ª y 5ª década. Por consiguiente, el deterioro físico asociado con el

envejecimiento se puede reducir a través de la estabilización optogenética del núcleo periventricular.

Se puede usar la estabilización optogenética del núcleo ventromedial del hipotálamo, particularmente la proopiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulador por cocaína y anfetamina (CART) del núcleo arcuato, para incrementar el apetito, y de ese modo tratar la anorexia nerviosa. Alternativamente, la estimulación optogenética de los núcleos laterales del hipotálamo se puede usar para incrementar el apetito y los comportamientos alimenticios.

La excitación optogenética en las células colinérgicas de las áreas afectadas incluyendo el lóbulo temporal, el NBM (Núcleo basal de Meynert) y el giro cingulado posterior (BA31) proporciona la estimulación, y por lo tanto neurotrófico conducen a áreas que deterioran. Debido a que las áreas afectadas se extienden dentro del cerebro, un tratamiento análogo con electrodos implantados puede ser menos viable que un planteamiento optogenético.

Los trastornos de ansiedad generalmente están asociados con la actividad incrementada en el córtex temporal izquierdo y frontal y amígdala, que tienden hacia normal cuando se resuelve la ansiedad. Por consiguiente, las regiones temporales izquierdas y frontales y amígdala se pueden tratar con estabilización optogenética, para apagar la actividad en estas regiones.

En la fisiología normal, las células neurales fotosensibles de la retina, las cuales se despolarizan en respuesta a la luz que reciben, crean un mapa visual del patrón de luz recibido. Se pueden usar canales iónicos optogenéticos para imitar este proceso en muchas partes del cuerpo, y los ojos no son la excepción. En el caso de deficiencia visual o ceguera debido a retina dañada, se puede cultivar una nueva retina de manera funcional, la cual usa luz ambiente natural en lugar de patrones de luz intermitente de un dispositivo implantado. El cultivo de retina artificial se puede colocar en la localización de la retina original (donde puede tomar ventaja del nervio óptico que sirve como un conducto de vuelta al córtex visual). Alternativamente, la retina artificial se pueden colocar en otra localización, tal como la frente, provista de un conducto para que las señales de despolarización se transmitan al tejido cortical capaz de descifrar la información codificada de la matriz del sensor optogenético. La ceguera cortical también se podría tratar simulando las rutas visuales hacia abajo del córtex visual. La estimulación se basaría en los datos visuales producidos hacia arriba del córtex o por un sensor de luz artificial.

El tratamiento de la taquicardia se puede conseguir con estimulación optogenética a las fibras del sistema nervioso parasimpático incluyendo X del NC o el nervio vago. Esto causa un descenso en la tasa del nodo SA, de ese modo disminuyendo el ritmo cardiaco y la fuerza de contracción. Igualmente, la estabilización optogenética de las fibras del sistema nervioso simpático dentro de los nervios espinales T1 a T4, sirve para frenar el corazón. Para el tratamiento de la bradicardia patológica, la estabilización optogenética del nervio vago, o la estimulación optogenética de las fibras simpáticas en T1 a T4 servirá para incrementar el ritmo cardiaco. Las disritmias cardiacas resultantes de los focos eléctricos aberrantes que dejan atrás el nodo sinoatrial se pueden suprimir tratando el foco eléctrico aberrante con estabilización optogenética moderada. Esto disminuye la tasa intrínseca de disparo dentro del tejido tratado, y permite que el nodo sinoatrial regenere su papel en el ritmo del sistema eléctrico del corazón. De una manera similar, se podría tratar cualquier tipo de arritmia cardiaca. La degeneración del tejido cardiaco que se da en la cardiomiopatía o insuficiencia cardiaca congestiva también se podía tratar usando esta invención; el tejido restante se podría excitar usando diversas realizaciones de la invención.

La estimulación de la excitación optogenética de las regiones cerebrales incluyendo el lóbulo frontal, lóbulos parietales e hipocampos, pueden incrementar la velocidad de procesamiento, mejorar la memoria, y estimular el crecimiento y la interconexión de las neuronas, incluyendo estimular el desarrollo de las células progenitoras neurales. Como ejemplo, una de tales aplicaciones de la presente invención está dirigida a la estimulación de la excitación optogenética de las neuronas dirigidas en el tálamo con el fin de sacar un paciente de un estado cerca del vegetativo (apenas conciencia). El crecimiento de los canales o bombas iónicos abiertos por luz en la membrana de las neuronas del tálamo dirigidas está afectado. Entonces, estas neuronas modificadas se estimulan, por ejemplo, por ópticas que también pueden ganar el acceso por el mismo pasillo, dirigiendo un destello de luz sobre las mismas para modular la función de las neuronas dirigidas y/o células circundantes. Para más información con respecto a las técnicas de modulación apropiadas (por tratamiento basado en electrodos) o más información con respecto a las regiones cerebrales asociadas para tales pacientes, la referencia se puede realizar a: Schiff N.D., Giacino J.T., Kalmar K., Victor J.D., Baker K., Gerber M., Fritz B., Eisenberg B., O'Connor J.O., Kobylarz E.J., Farris S., Machado A., McCagg C., Plum F., Fins J.J., Rezai A.R. "Behavioral improvements with thalamic stimulation after severe traumatic brain injury." *Nature*. Vol 448. 2 de agosto, 2007 pp 600-604.

En una realización alternativa, la excitación optogenética se puede usar para tratar el músculo cardiaco debilitado en afecciones tales como la insuficiencia cardiaca congestiva. La asistencia eléctrica al debilitamiento del músculo cardiaco de ICC en general no es práctica, debido al estado frágil, estirada fina de la pared cardiaca, y la dificultad en proporcionar un acoplamiento eléctrico uniformemente distribuido entre unos electrodos y el músculo. Por esta razón, los métodos preferidos hasta la fecha para incrementar la contractibilidad cardiaca han implicado cualquiera de los métodos farmacológicos tales como agonistas beta, y planteamientos mecánicos tales como dispositivos de asistencia ventricular. En esta realización de la presente invención, la excitación optogenética se administra a músculo cardiaco debilitado por elementos emisores de luz sobre la superficie interna de una funda alrededor del corazón o si no frente a la pared cardiaca afectada. La luz se puede difundir por medios bien conocidos en la

técnica, para cubrir sin problemas grandes áreas del músculo, dando lugar a la contracción con cada pulso de luz.

La estabilización optogenética en la porción subgenual del giro cingulado (Cg25), la luz amarilla se puede aplicar con un dispositivo implantado para tratar la depresión suprimiendo la actividad diana de manera análoga a la que se enseña por Mayberg H.S. y col., "Deep Brain Stimulation for Treatment-Resistant Depression." *Neuron*, Vol. 45, 651-660, 3 de marzo, 2005, 651-660. En una realización alternativa, un método de estimulación de la excitación optogenética es para incrementar la actividad en esa región de una manera análoga a la que es enseñada por Schlaepfer y col., "Deep Brain stimulation to Reward Circuitry Alleviates Anhedonia in Refractory Major Depression." *Neuropsychopharmacology* 2007 1-10. En otra realización más el córtex prefrontal dorsolateral izquierdo (CPFDLI) está dirigido con un método de estimulación de la excitación optogenética. Marcar el ritmo del CPFDLI a 5 a 20 Hz sirve para incrementar el nivel metabólico basal de esta estructura que, conectando el circuito, sirve para disminuir la actividad en Cg 25, mejorando la depresión en el proceso. La supresión del córtex prefrontal dorsolateral derecho (CPFDLR) también es una estrategia de tratamiento de la depresión eficaz. Esto se puede conseguir por estabilización optogenética sobre el CPFDLR, o la supresión también se puede conseguir usando la estimulación de la excitación optogenética, y pulsando a una tasa lenta 1 Hz o menos, mejorando la depresión en el proceso. La estimulación del nervio vago (ENV) se puede mejorar usando un planteamiento optogenético. El uso de la excitación optogenética se puede usar para estimular solamente los aferentes vagos al cerebro, tal como el ganglio nodoso y el ganglio yugular. Los eferentes del cerebro no recibirían la estimulación por este planteamiento, eliminando así alguno de los efectos laterales del ENV incluyendo el malestar en la garganta, tos, dificultad al tragar y voz ronca. En una realización alternativa, el hipocampo se puede excitar optogenéticamente, conduciendo a un brote dendrítico y axonal incrementado, y al crecimiento general del hipocampo. Otras regiones cerebrales implicadas en la depresión que se podrían tratar usando esta invención incluyen la amígdala, accumbens, córtex orbitofrontal y orbitomedial, hipocampo, córtex olfativo, y proyecciones dopaminérgicas, serotoninérgicas y noradrenérgicas. Se podrían usar planteamientos optogenéticos para controlar la propagación de la actividad a través de estructuras como el hipocampo para controlar los síntomas depresivos.

Siempre que haya poblaciones celulares alfa y beta viables en los islotes pancreáticos de Langerhans, los islotes pueden estar dirigidos para el tratamiento de la diabetes. Por ejemplo, cuando la glucosa en suero es alta (como se determina manualmente o por sistema de detección de glucosa en bucle cerrado), la excitación optogenética se puede usar para causar liberación de insulina de células beta de los islotes de Langerhans en el páncreas, mientras que la estabilización optogenética se usa para prevenir la liberación de glucagón de las células alfa de los islotes de Langerhans en el páncreas. A la inversa, cuando los azúcares en sangre son demasiados bajos (como se determina manualmente o por sistema de detección de glucosa por bucle cerrado), la estabilización optogenética se puede usar para parar la secreción de la célula beta de insulina, y la excitación optogenética se puede usar para incrementar la secreción de la célula alfa de glucagón.

Para el tratamiento de la epilepsia, la parada o el bloqueo de la actividad epileptogénica es susceptible de planteamientos optogenéticos. La mayoría de los pacientes de epilepsia tienen un patrón estereotipado de propagación de la actividad resultante desde un foco epileptogénico. La estabilización optogenética se podría usar para suprimir la actividad anormal antes de que se propague o trunca temprano en su transcurso. Alternativamente, la activación del tejido excitatorio por estimulación de la excitación optogenética se podría administrar en una serie de patrones deliberadamente asincrónicos para alterar la actividad de ataque emergente. Otra alternativa implica la activación de la estimulación de la excitación optogenética en neuronas GABAérgicas para proporcionar un resultado similar. Los repetidores talámicos se pueden dirigir con estabilización optogenética desencadenada cuando se detecta un patrón de EEG anormal.

Otra realización implica el tratamiento de trastornos gastrointestinales. El sistema digestivo tiene su propio sistema nervioso semiautónomo que contiene neuronas sensoriales, neuronas motoras e interneuronas. Estas neuronas controlan el movimiento del tracto GI, así como hacen funcionar las células específicas en el intestino para liberar ácido, enzimas digestivas y hormonas incluyendo gastrina, colecistoquinina y secretina. Los síndromes que incluyen la secreción inadecuada de cualquiera de estos productos celulares se pueden tratar con estimulación optogenética de la producción de tipos celulares, o neuronas que provocan su actividad. A la inversa, la estabilización optogenética se puede usar para tratar síndromes en los que se están creando productos endocrinos y exocrinos en exceso. Los trastornos de movilidad intestinal reducida, que van desde estreñimiento (particularmente en pacientes con lesión de la médula espinal) a megacolon se pueden tratar con excitación optogenética de neuronas motoras en los intestinos. Los trastornos de la hiperactividad intestinal, incluyendo algunas formas del síndrome del intestino irritable se pueden tratar con la estabilización optogenética de neuronas que controlan la movilidad. Las obstrucciones de la salida gástrica neurogénicas se pueden tratar con estabilización optogenética de neuronas y musculatura en el píloro. Un planteamiento alternativo para los síndromes de hipomovilidad sería proporcionar la excitación optogenética a neuronas sensibles al estiramiento en las paredes del intestino, incrementando la señal de que el intestino está lleno y necesita de vaciado.

En este mismo paradigma, un planteamiento para los síndromes de hiperactividad del intestino sería proporcionar estabilización optogenética para estirar las neuronas receptoras en el GI inferior, proporcionando así una "señal falsa" de que el intestino estaba vacío, y no necesita vaciado. En el caso de incontinencia fecal real, se puede preferir ganar control mejorado de los esfínteres internos y externos para reducir la movilidad del tracto entero.

5 Durante periodos de tiempo durante los que un paciente necesita contener las heces, la excitación optogenética del esfínter anal interno proporcionará retención. El proporcionar estimulación optogenética al esfínter externo se puede usar para proporcionar continencia adicional. Cuando el paciente requiere defecar, el esfínter anal interno, y, a continuación, el esfínter anal externo se deberían relajar, o bien pausando la estimulación optogenética, o añadiendo estabilización optogenética.

10 La pérdida de audición conductiva se puede tratar mediante el uso de implantes cocleares ópticos. Una vez que la cóclea se ha preparado para la estimulación optogenética, se puede usar un implante coclear que lanza destellos de luz. La pérdida de audición sensorineural se puede tratar a través de la estimulación óptica de dianas hacia abajo en la ruta auditiva.

15 Otra realización de la presente invención está dirigida hacia el tratamiento de trastornos de presión sanguínea, tales como hipertensión. Los barorreceptores y los quimiorreceptores en regiones tales como las arterias aorta (cuerpos aórticos y cuerpos paraaórticos) y carótida ("cuerpos caróticos") participan en la regulación de la presión sanguínea y la respiración mandando aferentes por el nervio vago (X de NC), y otras rutas a la médula y el puente de Varolio, particularmente el tracto solitario y el núcleo. La excitación optogenética de los cuerpos carotídeos, cuerpos aórticos, cuerpos paraaórticos, se pueden usar para mandar un mensaje falso de "hipertensión" al núcleo solitario y al tracto, haciéndolos que informen de que se debería disminuir la presión sanguínea. La excitación o estabilización optogenética directamente a partes apropiadas del bulbo raquídeo también se pueden usar para bajar la presión sanguínea. La modalidad opuesta hace que el planteamiento optogenético sirva como un presor, elevando la presión sanguínea. También se puede conseguir un efecto similar por excitación optogenética del nervio vago, o por estabilización optogenética de las fibras simpáticas dentro de los nervios espinales T1-T4. En una realización alternativa, la hipertensión se puede tratar con estabilización optogenética del corazón, dando como resultado producción cardiaca disminuida y presión sanguínea reducida. Según otra realización, la estabilización optogenética de las células productoras de aldosterona dentro del córtex adrenal se puede usar para disminuir la presión sanguínea. En otra realización alternativa más, la hipertensión se puede tratar por estabilización optogenética del músculo liso vascular. Se puede pasar la luz activante transcutáneamente al lecho vascular periférico.

30 Otra realización ejemplo está dirigida hacia el tratamiento de trastornos del eje hipotalámico-pituitario-adrenal. En el tratamiento del hipotiroidismo, la excitación optogenética de neuronas neuroendocrinas parvocelulares, en los núcleos hipotalámicos paraventriculares y anteriores se puede usar para incrementar la secreción de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH). La TRH, una por una, estimula la pituitaria anterior para secretar la hormona estimulante de tiroides (TSH). A la inversa, el hipertiroidismo se puede tratar con estabilización optogenética de las neuronas neuroendocrinas parvocelulares. Para el tratamiento de la insuficiencia adrenal, o de la enfermedad de Addison, la excitación optogenética de las neuronas neuroendocrinas parvocelulares en el núcleo supraóptico y los núcleos paraventriculares se puede usar para incrementar la secreción de la vasopresina, la cual, con la ayuda de la hormona liberadora de corticotropina (CRH), estimula la pituitaria anterior para secretar la hormona Adrenocorticotrópica (ACTH). El síndrome de Cushing, frecuentemente causado por secreción de ACTH en exceso, se puede tratar con la estabilización optogenética de las neuronas neuroendocrinas parvocelulares del núcleo supraóptico por la misma cadena fisiológica de los efectos anteriormente descritos. Las neuronas neuroendocrinas del núcleo arcuato producen dopamina, la cual inhibe la secreción de la prolactina de la pituitaria anterior. Por lo tanto, la hiperprolactinemia se puede tratar por excitación optogenética, mientras que la hiperprolactinemia se puede tratar con estabilización optogenética de las células neuroendocrinas del núcleo arcuato.

45 En el tratamiento de los estados hiperautónomos, por ejemplo los trastornos de ansiedad, la estabilización optogenética de la médula adrenal se puede usar para reducir la producción de norepinefrina. Igualmente, la estimulación optogenética de la médula adrenal se puede usar en personas con necesidad de oleadas de adrenalina, por ejemplo, aquellas con asma grave, o trastornos que se manifiestan como somnolencia crónica.

50 La estimulación optogenética del córtex adrenal provocará la liberación de compuestos químicos incluyendo cortisol, testosterona y aldosterona. A diferencia de la médula adrenal, el córtex adrenal recibe sus instrucciones de las hormonas neuroendocrinas secretadas de la pituitaria y el hipotálamo, los pulmones, y los riñones. A pesar de todo, el córtex adrenal es susceptible de estimulación optogenética. La estimulación optogenética de las células productoras de cortisol del córtex adrenal se puede usar para tratar la enfermedad de Addison. La estabilización optogenética de las células productoras de cortisol del córtex adrenal se puede usar para tratar la enfermedad de Cushing. La estimulación optogenética de las células productoras de testosterona se puede usar para tratar trastornos de interés sexual en mujeres: la estabilización optogenética de aquellas mismas células se puede usar para disminuir el pelo facial en mujeres. La estabilización optogenética de las células productoras de aldosterona dentro del córtex adrenal se puede usar para disminuir la presión sanguínea. La excitación optogenética de las células productoras de aldosterona dentro del córtex adrenal se puede usar para incrementar la presión sanguínea.

65 La estimulación de la excitación optogenética de las regiones cerebrales afectadas específicas se puede usar para incrementar la velocidad de procesamiento, y estimular el crecimiento y la interconexión de neuronas, incluyendo estimular la maduración de las células progenitoras neurales. Tales usos pueden ser particularmente útiles para el tratamiento del retardo mental.

Según otra realización de la presente invención, se pueden tratar diversas enfermedades y lesiones musculares. Las parálisis relacionadas con el daño muscular, el daño del nervio periférico y enfermedades distróficas se pueden tratar con la excitación optogenética para provocar la contracción, y la estabilización optogenética para provocar la relajación. Esta relajación por planteamiento de la estabilización optogenética también se puede usar para prevenir la debilitación muscular, mantener el tono, y permitir el movimiento coordinado ya que los grupos musculares opuestos están contraídos. Igualmente, la espasticidad real se puede tratar por estabilización optogenética.

En áreas tan diversas como el truncamiento del nervio periférico, apoplejía, lesión cerebral traumática y lesión de la médula espinal, hay una necesidad de favorecer el crecimiento de nuevas neuronas, y ayudar con su integración en una red funcional con otras neuronas y con su tejido diana. El recrecimiento de nuevos tractos neuronales se pueden fomentar por excitación optogenética, la cual sirve para señalar células madre para crecer rápidamente axones y dendritas, y para integrarlos con la red. El uso de una técnica optogenética (opuesta a electrodos) previene la recepción de señales por el tejido intacto, y sirve para asegurar que el nuevo tejido diana crezca gracias a una comunicación establecida con las neuronas en desarrollo, y no con una señal artificial como la corriente que surge de un electrodo.

La obesidad se puede tratar con excitación optogenética al núcleo ventromedial del hipotálamo, particularmente la proopiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulador por cocaína y anfetamina (CART) del núcleo arcuato. En una realización alternativa, la obesidad se puede tratar por estabilización optogenética de los núcleos laterales del hipotálamo. En otra realización, la estimulación optogenética a las células productoras de leptina, o a las células con receptores de leptina dentro del hipotálamo, se pueden usar para disminuir el apetito y, por consiguiente, tratar la obesidad.

Las lesiones destructivas a la cápsula anterior, y DBS análogo a esa región, son medios establecidos de tratamiento del trastorno 48 obsesivo-compulsivo (TOC48) intratable grave. Tales planteamientos se pueden emular usando estabilización optogenética al limbo anterior de la cápsula interna, o a las regiones tales como BA32 y Cg24 que muestran disminución metabólica cuando remite el TOC.

El Dolor Crónico se puede tratar usando otra realización de la presente invención. Métodos de estimulación eléctrica incluyen estimulación del nervio periférico local, estimulación del nervio craneal local y estimulación del córtex motor "subumbral". Planteamientos optogenéticos razonables incluyen la estabilización optogenética en sitios dolorosos locales. La atención para promover la selección aseguraría que otras fibras sensoriales y motoras no estuvieran afectadas. La excitación optogenética selectiva de las interneuronas en el córtex motor primario también puede proporcionar alivio eficaz del dolor. También, la estabilización optogenética en el tálamo sensorial, (particularmente los núcleos talámicos medios), materia gris paraventricular, y los núcleos del rafé ventrales, se pueden usar para producir alivio del dolor. En una realización alternativa, la estabilización optogenética de las células que expresan parvalbúmina que dirigen como estrategia de manipulación dirigida, se puede usar para tratar el dolor disminuyendo la producción de la sustancia P. La liberación de opioides endógenos se puede conseguir usando excitación optogenética para incrementar la actividad en el núcleo accumbens. En una realización alternativa, cuando las neuronas POMC del núcleo arcuato del hipotálamo medio se excitan optogenéticamente, se incrementa la endorfina beta, proporcionando planteamientos de tratamiento viables para la depresión y para el dolor crónico.

La enfermedad de Parkinson se puede tratar expresando la estabilización optogenética en las neuronas glutamatérgicas en o bien el núcleo subtalámico (NST) o el globo pálido interno (GPi) usando un promotor específico excitatorio tal como CaMKII $\alpha$ , y aplicar estabilización optogenética. A diferencia de la modulación eléctrica en la que todos los tipos celulares están afectados, solamente se suprimirían las neuronas del NST glutamatérgico.

Ciertos trastornos de personalidad, incluyendo los tipos límite y antisociales, demuestran déficits focales en trastornos cerebrales incluyendo "hipofrontalidad". La excitación optogenética directa o indirecta de estas regiones se anticipa para producir mejora de los síntomas. También se sabe que estallidos anormales de actividad en la amígdala precipitan luchas espontáneas repentinas dentro del rango: un síntoma de trastorno de personalidad límite, así como otras afecciones, que pueden beneficiarse de la estabilización optogenética de la amígdala. Los planteamientos optogenéticos podrían mejorar la comunicación y la sincronización entre diferentes partes del cerebro, incluyendo la amígdala, el estriado, y el córtex frontal, que podría ayudar en la reducción de la impulsividad y mejorar la perspicacia.

El modelo amígdalo-céntrico del trastorno del estrés postraumático (TEPT) propone que está asociado con la hiperarousal de la amígdala y el control vertical insuficiente por el córtex prefrontal medio y el hipocampo. Por consiguiente, el TEPT se puede tratar con estabilización optogenética de la amígdala o el hipocampo.

La esquizofrenia se caracteriza por anomalías incluyendo alucinaciones auditivas. Estas se podrían tratar por supresión del córtex auditivo usando estabilización optogenética. La hipofrontalidad asociada con la esquizofrenia se podría tratar con excitación optogenética en las regiones frontales afectadas. Los planteamientos optogenéticos podrían mejorar la comunicación y la sincronización entre diferentes partes del cerebro que podrían ayudar en la reducción de la mala atribución de los estímulos autogenerados como extraños.

- La estabilización optogenética de las células dentro del núcleo arcuato del hipotálamo medio, el cual contiene productos peptídicos de la proopiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulador por cocaína y anfetamina (CART), se puede usar para reducir el comportamiento sexual compulsivo. La excitación optogenética de las células dentro del núcleo arcuato del hipotálamo medio que contiene productos peptídicos de la proopiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulador por cocaína y anfetamina (CART) se puede usar para incrementar el interés sexual en el tratamiento de casos de trastornos del deseo sexual. En el tratamiento de los trastornos del deseo sexual hipoactivo, la producción de testosterona por los testículos y las glándulas adrenales se puede incrementar a través de la excitación optogenética de la glándula pituitaria. La excitación optogenética del núcleo accumbens se puede usar para el tratamiento de anorgasmia.
- El núcleo supraquiasmático secreta melatonina, la cual sirve para regular los ciclos de dormir/despertar. La excitación optogenética al núcleo supraquiasmático se puede usar para incrementar la producción de melatonina, induciendo el sueño y, de ese modo, tratar el insomnio. Las neuronas orexina (hipocretina) excitan fuertemente numerosos núcleos cerebrales para promover el desvelo. La excitación optogenética de las poblaciones celulares productoras de orexina se puede usar para tratar la narcolepsia, y la somnolencia diurna crónica.
- La estimulación optogenética del núcleo supraóptico se puede usar para inducir la secreción de oxitocina, se puede usar para promover el parto durante el alumbramiento, y se puede usar para tratar trastornos de adhesión social.
- Como los espasmos musculares, las funciones motoras que se han sometido a desaferenciación por una lesión de la médula espinal se pueden tratar con excitación optogenética para provocar la contracción, y estabilización optogenética para provocar la relajación. Esta relajación por planteamiento de la estabilización optogenética también se puede usar para prevenir la debilitación muscular, mantener el tono, y permitir el movimiento coordinado cuando los grupos musculares opuestos se contraen. Igualmente, la espasticidad real se puede tratar por estabilización optogenética. El recrecimiento de los nuevos tractos neuronales espinales se pueden fomentar por la excitación optogenética, la cual sirve para señalar las células madre para crecer rápidamente axones y dendritas, y para integrarlos con la red.
- Los déficits de la apoplejía incluyen cambio de personalidad, déficits motores, déficits sensoriales, pérdida cognitiva, y estabilidad emocional. Una estrategia para el tratamiento de los déficits de la apoplejía es proporcionar la estimulación optogenética al cerebro y las estructuras corporales que se han sometido a desaferenciación de las conexiones excitatorias. Igualmente, las capacidades de la estabilización optogenética se pueden impartir sobre el cerebro y las estructuras corporales que se han sometido a desaferenciación de las conexiones inhibitorias.
- La investigación indica que la patobiología subyacente en el síndrome de Tourette es una disfunción física de la transmisión de dopamina en las regiones corticales y subcorticales, el tálamo, los ganglios basales y el córtex frontal. Para proporcionar terapia, las áreas afectadas principalmente primero se identifican usando técnicas que incluyen la obtención de imágenes del cerebro funcional y magnetoencefalografía (MEG). Si se identifica específicamente o no, la estabilización optogenética de los tractos candidatos se puede usar para suprimir los tics motores. El ensayo empírico después de la implantación de los parámetros del dispositivo revela qué sitios de la estabilización optogenética, y cuales son innecesarios para continuar.
- Para tratar los trastornos de incontinencia urinaria o fecal se puede usar la estabilización optogenética a los esfínteres, por ejemplo, por estabilización optogenética del músculo liso del destrusor de la vejiga o las innervaciones de ese músculo. Cuando es necesaria la micción, se paran estos procesos optogenéticos, o alternativamente se pueden revertir, con estabilización optogenética al esfínter urinario (externo), y excitación optogenética del músculo destrusor de la vejiga o sus innervaciones. Cuando una vejiga se ha sometido a desaferenciación, por ejemplo, cuando las raíces dorsales sacras están cortadas o destruidas por enfermedades de las raíces dorsales tales como el tabes dorsal en humanos, se abolen todas las contracciones reflejas de la vejiga, y la vejiga se llega a estar dilatada. La excitación optogenética del músculo directamente se puede usar para restaurar el tono al destrusor, prevenir el daño del riñón, y ayudar con el proceso de micción. Ya que la vejiga llega a estar “descentralizada” e hipersensible al movimiento, y por tanto es propensa a la incontinencia, la estabilización optogenética al músculo de la vejiga se puede usar para minimizar esta reactividad del órgano.
- Para excitar/inhibir selectivamente una población dada de neuronas, por ejemplo, aquellas implicadas en el malestar de una enfermedad, se pueden usar varias estrategias para dirigir las proteínas/moléculas optogenéticas para poblaciones específicas.
- Para diversas realizaciones de la presente invención, la manipulación genética dirigida se puede usar para expresar diversas proteínas o moléculas optogenéticas. Tal manipulación dirigida implica la expresión dirigida de las proteínas/moléculas optogenéticas por elementos de control genético tales como promotores (por ejemplo, Parvalbúmina, Somastotina, Colecistoquinina, GFAP), potenciadores/silenciadores (por ejemplo, potenciador temprano inmediato de Citomegaloviurs), y otros elementos reguladores transcripcionales o de traducción (por ejemplo, elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota). Las permutaciones de la combinación del elemento promotor+potenciador+regulador se pueden usar para restringir la expresión de las sondas optogenéticas a poblaciones genéticamente definidas.

Diversas realizaciones de la presente invención se pueden implementar usando la manipulación dirigida espacial/anatómica. Tal manipulación dirigida toma ventaja del hecho de que los patrones de proyección de neuronas, virus u otros reactivos que llevan la información genética (plásmidos de ADN, fragmentos, etc.), se pueden administrar focalmente a un área a donde se proyecta una población dada de neuronas. A continuación, el material genético se transportará de nuevo a los cuerpos de las neuronas para mediar la expresión de las sondas optogenéticas. Alternativamente, si se desea marcar células en una región focal, virus o material genético se puede administrar focalmente a la región interesada para mediar la expresión localizada.

Diversos sistemas de administración génica son útiles en la implementación de una o más realizaciones de la presente invención. Uno de tales sistemas de administración es el virus adenoasociado (VAA). VAA se puede usar para administrar un casete promotor+sonda optogenética a una región específica de interés. La elección del promotor conducirá a la expresión en una población específica de neuronas. Por ejemplo, usar el promotor CaMKIIa conducirá la expresión específica a neurona excitatoria de las sondas optogenéticas. VAA mediará la expresión a largo plazo de la sonda optogenética durante al menos 1 año o más. Para conseguir más especificidad, VAA se puede pseudotipificar con serotipos específicos 1 a 8, teniendo cada uno tropismo diferente para diferentes tipos celulares. Por ejemplo, se sabe que el serotipo 2 y 5 tiene buen tropismo neuroespecífico.

Otro mecanismo de administración génica es el uso de un retrovirus. Se pueden usar VIH u otros vectores retrovirales basados en lentivirus para administrar un casete promotor+sonda optogenética a una región específica de interés. Los retrovirus también se pueden pseudotipificar con la glucoproteína de la envoltura del virus de la rabia para alcanzar el transporte retrogrado para marcar células basadas en sus patrones de proyección axonal. Los retrovirus se integran dentro del genoma de la célula hospedadora, por lo tanto, son capaces de mediar la expresión permanente de las sondas optogenéticas. Se pueden usar vectores retrovirales no basados en lentivirus para marcar selectivamente células que se dividen.

El adenovirus Gutless y el virus del herpes simple (VHS) son dos virus basados en ADN que se pueden usar para administrar también el casete promotor+sonda optogenética en regiones específicas del cerebro. El VHS y el adenovirus tienen capacidades de empaquetamiento muchas más grandes y, por lo tanto, pueden acomodar elementos promotor mucho más grandes y también se pueden usar para administrar sondas optogenéticas múltiples u otros genes terapéuticos junto con sondas optogenéticas.

También se pueden usar electroporación focal para someter a transfección transitoriamente neuronas. Se pueden administrar focalmente plásmidos de ADN o fragmentos en una región específica del cerebro. Al aplicar corriente eléctrica moderada, las células locales circundantes recibirán el material de ADN y la expresión de las sondas optogenéticas.

En otro ejemplo, la lipofección se puede usar mezclando material genético con reactivos lipídicos y, a continuación, inyectar posteriormente en el cerebro para mediar la transfección de las células locales.

Diversas realizaciones implican el uso de diversos elementos control. Además de los elementos de control genético, otros elementos control (particularmente promotores y potenciadores cuyas actividades son sensibles a la estimulación magnética, química o a la radiación infrarroja) se pueden usar para mediar la expresión temporalmente controlada de las sondas optogenéticas. Por ejemplo, un promotor cuya actividad transcripcional se somete a radiación infrarroja permite usar radiación centrada para afinar bien la expresión de las sondas optogenéticas en una región focal en solamente el tiempo deseado.

Según una realización de la presente invención, la invención se puede usar en modelos animales de DBS, por ejemplo, en ratones con Parkinson, para identificar los tipos de célula diana responsables de los efectos terapéuticos (un área de debate intenso e importancia clínica inmensa). Por ejemplo, la estimulación puede estar dirigida a poblaciones neurales específicas/pequeñas dentro de las poblaciones mayores conocidas para proporcionar efectos terapéuticos en respuesta al estímulo. A continuación, estas poblaciones dirigidas se pueden estimular para cuantificar la fuente de los efectos terapéuticos. La manipulación dirigida se puede implementar usando aplicación espacialmente controlada de las proteínas dentro del cerebro y/o adaptando las proteínas a la expresión en tipos celulares neurales específicos. La manipulación dirigida también se puede implementar controlando la administración de luz en términos de localización espacial, longitud de onda, intensidad y/o propiedades de estimulación temporal. El conocimiento ganado a partir de tal caracterización a continuación se puede usar en el desarrollo de estrategias farmacológicas y quirúrgicas para tratar la enfermedad humana. Tal modelado y caracterización no se limitan al Parkinson y se pueden aplicar a una gran selección de enfermedades y modelado de circuito.

Según otra realización de la presente invención, se pueden unir tipos celulares genéticamente definidos con comportamientos a nivel de sistemas complejos, para permitir la elucidación de la contribución precisa de los diferentes tipos celulares en muchas regiones cerebrales diferentes para el funcionamiento del organismo de alto nivel.

Otros aspectos y realizaciones están dirigidos a sistemas, métodos, kits, composiciones de materia y las moléculas

para bombas iónicas o para controlar las corrientes inhibitoras en una célula (por ejemplo, para ambientes *in vivo* e *in vitro*). Como se describe por esta descripción, incluyendo las realizaciones, tales sistemas, métodos, kits, composiciones de materia se realizan de maneras coherentes con el presente documento. Por ejemplo, en una realización, la presente invención está dirigida a una reunión o kit de partes, que tienen un producto que contiene una variante molecular basada en NpHR y otra molécula basada en opsina (SFO/VChR1/basada en ChR2 y o basada en NpHR) como una preparación combinada para su uso en el tratamiento de la enfermedad de un trastorno neurológico o del SNC (como una categoría de tipos de trastorno o un trastorno específico como se ilustra en el presente documento), en donde al menos la variante molecular basada en NpHR es útil para expresar una molécula basada en NpHR activada por luz que responde a la luz para producir una corriente inhibitora para disuadir la despolarización de una célula, y en donde una expresión alta de la molécula manifiesta un nivel de toxicidad que es menos de aproximadamente 75 % (por ejemplo, una o más de las SEQ ID NO:4-13).

Las realizaciones de la presente invención emplean sistemas implantables para su uso *in vivo*. Estos sistemas pueden incluir un generador de luz, tal como un diodo emisor de luz, láser o fuente luminosa similar y una parte biológica que modifica las células diana para facilitar la estimulación de las células diana en respuesta a la luz generada por el generador de luz.

En una realización de la presente invención, una parte biológica puede estar compuesta de células diana que se han modificado para ser fotosensibles. En otra realización de la presente invención, una parte biológica puede contener elementos biológicos tales como vectores de transferencia génica, los cuales provocan que las células diana lleguen a ser sensibles a la luz. Un ejemplo de esto es el lentivirus que lleva el gen para la expresión de SFO (mutantes ChR2/VChR1). De esta manera, la estimulación de las células diana se puede controlar mediante un dispositivo implantable. Por ejemplo, un circuito control que se puede disponer para responder a una señal externa activando, o desactivando una fuente luminosa, o cargando una batería que hace funcionar la fuente luminosa. En un ejemplo, la señal externa es radiación electromagnética que se recibe mediante un circuito control. Por ejemplo, señales de radio frecuencia (RF) se pueden transmitir por una transmisor de RF externo y ser recibidas por un circuito control. En otro ejemplo, se puede usar un campo magnético para activar y/o hacer funcionar el circuito control.

Los circuitos control se pueden implementar usando grados variantes de complejidad. En un ejemplo, el circuito es una espiral única que cuando se expone a un campo magnético genera una corriente. A continuación, la corriente se usa para hacer funcionar una fuente luminosa. Tal implementación puede ser particularmente útil para limitar el tamaño y la complejidad así como incrementar la longevidad del dispositivo. En otro ejemplo, un circuito control puede incluir una antena de RF. Opcionalmente, una batería o fuente de energía similar, tal como un elemento capacitivo, se puede usar mediante el circuito control. Mientras se carga, la fuente de energía permite que el circuito continúe funcionando sin necesidad de administrar energía concurrente desde fuera del cuerpo. Esto puede ser particularmente útil para proporcionar control preciso durante la luz emitida por una fuente luminosa y para intensidad incrementada de la luz emitida.

En una realización de la presente invención, una fuente luminosa se implementa usando un diodo emisor de luz (LED). Se ha probado que los LED son útiles para aplicaciones de baja energía y también tienen una respuesta relativamente baja a las señales eléctricas.

En otra realización de la presente invención, la parte biológica incluye una gelatina o sustancia similar que contiene vectores de transferencia génica que codifican genéticamente las células diana para la fotosensibilidad. En un ejemplo, los vectores se liberan una vez implantados en el cuerpo. Esto se puede conseguir, por ejemplo, usando un material de contención que permite que los vectores se liberen en solución acuosa (por ejemplo, usando materiales deshidratados o solubles en agua tales como gelatinas). La liberación de los vectores da como resultado que las células diana estén siendo modificadas de modo que se estimulan en respuesta a la luz de una fuente luminosa.

En otra realización de la presente invención, la parte biológica incluye una malla sintética que contiene las células fotosensibles. En un ejemplo, las células son neuronas que se han modificado para ser fotosensibles. La malla sintética se puede construir para permitir que las dendritas y los axones pasen a través de la malla sin permitir que la neurona entera (por ejemplo, el cuerpo celular) pase. Un ejemplo de tal malla tiene poros que son del orden de 3 a 7 micras de diámetro y están hechas de tereftalato de polietileno. En otra realización ejemplo, la parte biológica incluye un mecanismo de inyección para la administración dirigida.

En diversas implementaciones, se adapta un sistema de modo que el dispositivo de administración introduce la proteína de respuesta a la luz mediante uno de transfección, transducción o microinyección, y/o de tal modo que la fuente luminosa introduce luz a una neurona que expresa SFO por uno de un generador de luz implantable y fibras ópticas.

Las diversas realizaciones anteriormente descritas se proporcionan a modo de ilustración solamente y no se deberían considerar que limitan la invención. Basándose en la discusión anterior y las ilustraciones, los expertos en la técnica reconocerán fácilmente que se pueden realizar diversas modificaciones y cambios a la presente invención sin seguir estrictamente las realizaciones a modo de ejemplo y las aplicaciones ilustradas y descritas en el presente documento. Por ejemplo, tales cambios pueden incluir modificaciones adicionales distintas a las enumeradas en el

presente documento.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY Deisseroth, Karl Yizhar, Ofer Gunaydin, Lisa Hegeman, Peter Berndt, Andre
- <120> Estimulación ópticamente basada de células diana y modificaciones a las mismas
- 10 <130> STFD.225PCT (S08-348)
- <150> US 61/114.781
- <151> 14-11-2008
- 15 <160> 13
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 20 <211> 354
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 25 <223> ChR2
- <400> 1

```

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

```



ES 2 706 625 T3

<210> 2  
 <211> 300  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5

<220>  
 <223> Proteina VChR1

10

<400> 2

Met Asp Tyr Pro Val Ala Arg Ser Leu Ile Val Arg Tyr Pro Thr Asp  
 1 5 10 15

Leu Gly Asn Gly Thr Val Cys Met Pro Arg Gly Gln Cys Tyr Cys Glu  
 20 25 30

Gly Trp Leu Arg Ser Arg Gly Thr Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ala Ile  
 35 40 45

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

Tyr Ala Tyr Gln Ala Trp Arg Ala Thr Cys Gly Trp Glu Glu Val Tyr  
 65 70 75 80

Val Ala Leu Ile Glu Met Met Lys Ser Ile Ile Glu Ala Phe His Glu  
 85 90 95

Phe Asp Ser Pro Ala Thr Leu Trp Leu Ser Ser Gly Asn Gly Val Val  
 100 105 110

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

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

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

Ser Ala Met Cys Thr Gly Trp Thr Lys Ile Leu Phe Phe Leu Ile Ser  
 165 170 175

Leu Ser Tyr Gly Met Tyr Thr Tyr Phe His Ala Ala Lys Val Tyr Ile  
 180 185 190

Glu Ala Phe His Thr Val Pro Lys Gly Ile Cys Arg Glu Leu Val Arg

ES 2 706 625 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     | 195 |     | 200 |     | 205 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Val | Met | Ala | Trp | Thr | Phe | Phe | Val | Ala | Trp | Gly | Met | Phe | Pro | Val | Leu |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Phe | Leu | Leu | Gly | Thr | Glu | Gly | Phe | Gly | His | Ile | Ser | Pro | Tyr | Gly | Ser |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Ala | Ile | Gly | His | Ser | Ile | Leu | Asp | Leu | Ile | Ala | Lys | Asn | Met | Trp | Gly |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     |     | 255 |
| Val | Leu | Gly | Asn | Tyr | Leu | Arg | Val | Lys | Ile | His | Glu | His | Ile | Leu | Leu |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Tyr | Gly | Asp | Ile | Arg | Lys | Lys | Gln | Lys | Ile | Thr | Ile | Ala | Gly | Gln | Glu |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Met | Glu | Val | Glu | Thr | Leu | Val | Ala | Glu | Glu | Glu | Asp |     |     |     |     |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |

<210> 3  
 <211> 291  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Construcción sintética derivada de *Natronomonas pharaonis*

10

<400> 3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Thr | Glu | Thr | Leu | Pro | Pro | Val | Thr | Glu | Ser | Ala | Val | Ala | Leu | Gln |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |
| Ala | Glu | Val | Thr | Gln | Arg | Glu | Leu | Phe | Glu | Phe | Val | Leu | Asn | Asp | Pro |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Leu | Leu | Ala | Ser | Ser | Leu | Tyr | Ile | Asn | Ile | Ala | Leu | Ala | Gly | Leu | Ser |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Ile | Leu | Leu | Phe | Val | Phe | Met | Thr | Arg | Gly | Leu | Asp | Asp | Pro | Arg | Ala |
| 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Lys | Leu | Ile | Ala | Val | Ser | Thr | Ile | Leu | Val | Pro | Val | Val | Ser | Ile | Ala |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |
| Ser | Tyr | Thr | Gly | Leu | Ala | Ser | Gly | Leu | Thr | Ile | Ser | Val | Leu | Glu | Met |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |

ES 2 706 625 T3

Pro Ala Gly His Phe Ala Glu Gly Ser Ser Val Met Leu Gly Gly Glu  
 100 105 110

Glu Val Asp Gly Val Val Thr Met Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Trp Ala  
 115 120 125

Leu Ser Thr Pro Met Ile Leu Leu Ala Leu Gly Leu Leu Ala Gly Ser  
 130 135 140

Asn Ala Thr Lys Leu Phe Thr Ala Ile Thr Phe Asp Ile Ala Met Cys  
 145 150 155 160

Val Thr Gly Leu Ala Ala Ala Leu Thr Thr Ser Ser His Leu Met Arg  
 165 170 175

Trp Phe Trp Tyr Ala Ile Ser Cys Ala Cys Phe Leu Val Val Leu Tyr  
 180 185 190

Ile Leu Leu Val Glu Trp Ala Gln Asp Ala Lys Ala Ala Gly Thr Ala  
 195 200 205

Asp Met Phe Asn Thr Leu Lys Leu Leu Thr Val Val Met Trp Leu Gly  
 210 215 220

Tyr Pro Ile Val Trp Ala Leu Gly Val Glu Gly Ile Ala Val Leu Pro  
 225 230 235 240

Val Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Ser Phe Leu Asp Ile Val Ala Lys  
 245 250 255

Tyr Ile Phe Ala Phe Leu Leu Leu Asn Tyr Leu Thr Ser Asn Glu Ser  
 260 265 270

Val Val Ser Gly Ser Ile Leu Asp Val Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro  
 275 280 285

Ala Asp Asp  
 290

<210> 4  
 <211> 1599  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> NpHR humanizada: los primeros 873 pb; EYFP: los últimos 717 pb

<400> 4

5

10

## ES 2 706 625 T3

```

atgacagaga ccctgcctcc cgtgaccgag agtgccgtgg cccttcaagc cgaggttacc      60
caaagggagt tgttcgagtt cgtgctgaac gaccctttgc ttgcaagcag tctctataatc    120
aacatcgcac ttgcaggact gagtatactg ctgttcgttt ttatgacccg aggactcgat      180
gatccacggg caaaacttat tgctgtgtca accatccttg tgctgtcgt cagcattgcc      240
tcctacactg gattggcgag cggcctgaca atttccgttc ttgaaatgcc agcgggcat      300
tttgcagaag gcagctcagt gatgctggga ggagaagagg tagatggtgt agtcaccatg      360
tggggacggt atctcacctg ggcactttcc acgcccataa ttctcctcgc tctgggtctc    420
ctggccggaa gcaatgctac aaagctcttc acagctatca ctttcgatat cgctatgtgc      480
gtgactggcc ttgccgcggc cctgactacc tcctcccacc tcatgagatg gttctggtac      540
gctatcagtt gtgcatgctt tctggtggtc ttgtatatcc tgctggtgga gtgggcacag      600
gacgccaaag ccgcgggaac cgctgacatg ttcaatacc tgaagctgtt gacagtagtg      660
atgtggctgg ggtatccaat tgtgtgggct cttggagtcg agggtatcgc ggtgttgccc      720
gttgggggtga cgagctgggg atattctttc ctggatatcg tggcaaagta cattttcgca      780
ttcttgctcc tgaactatct gacgtcaaac gaatctgtcg tgtccggcag cattttggat      840
gttccatctg cttctgggac cccggctgat gatgcggccg ccgtgagcaa gggcgaggag      900
ctgttcaccg gggtggtgcc catcctggtc gagctggacg gcgacgtaa cggccacaag      960
ttcagcgtgt ccggcgaggg cgagggcgat gccacctacg gcaagctgac cctgaagtcc    1020
atctgcacca ccggcaagct gcccggtgcc tggcccaccc tcgtgaccac cttcggctac    1080
ggcctgcagt gcttcgcccg ctaccccgac cacatgaagc agcacgactt cttcaagtcc    1140
gcoatgcccg aaggctacgt ccaggagcgc accatcttct tcaaggacga cggcaactac    1200
aagaccgcg ccgaggtgaa gttcgagggc gacaccctgg tgaaccgcat cgagctgaag    1260
ggcatcgact tcaaggagga cggcaacatc ctggggcaca agctggagta caactacaac    1320
agccacaacg tctatatcat ggccgacaag cagaagaacg gcatcaaggt gaacttcaag    1380
atccgccaca acatcgagga cggcagcgtg cagctcgccg accactacca gcagaacacc    1440
cccacggcg acggccccgt gctgctgccc gacaaccact acctgagcta ccagtccgcc    1500
ctgagcaaag accccaacga gaagcgcgat cacatggtcc tgctggagtt cgtgaccgcc    1560
gocgggatca ctctcggcat ggacgagctg tacaagtaa                                1599

```

5 <210> 5  
 <211> 1599  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 706 625 T3

<220>

<223> NpHRnh no humanizada- EYFP

<400> 5

5

```

atgactgaga cattgccacc ggtaacggaa tcggctgttg cgctacaggc ggaggtgacc      60
cagagggagc tgttcgagtt cgttctcaac gacccccctcc tcgccagttc gctgtatatt    120
aatatcgcac tggcagggct gtcgatactg cttttcgtgt tcatgacgcg cggactcgac     180
gacccacggg cgaaaactcat cgccgtttcg acgattttgg tgccgggtgg ctctatcgcg     240
agctacaccg gccttgcatc ggggctcacc atcagcgtcc tcgagatgcc agccggccac     300
ttcgccgagg ggtcctcggg gatgctcggc ggcgaaagagg tagacggcgt cgtgacgatg     360
tggggccgct atctgacgtg ggccctttcg acaccgatga tactgctggc gcttgggctg     420
cttgctggct ctaacgccac gaagctcttt accgccatca ccttcgacat cgcgatgtgt     480
gtcaccggcc tcgcagccgc gctgacgacc tcttcgcacc tgatgcggtg gttctgggtac     540
gccatcagtt gtgcgtgttt cctcgtcgtc ctctacatcc tgctcgtcga gtgggcacag     600
gacgccaagg ctgccggtac tgccgatatg ttcaatacgc tgaagctgct gaccgttgtc     660
atgtggctcg gctaccccat cgtgtgggca ctccggcgtg agggcatcgc cgttcttccg     720
gtcggagtca cgtcgtgggg atacagcttc ctcgacatcg tcgcgaagta catcttcgcg     780
ttcctgctgc tcaactacct cacgtcgaac gagagcgtcg tctccggctc gatactcgac     840
gtgcgctccg cgtcggggac tcccgtgac gacgcggccg ccgtgagcaa gggcgaggag     900
ctgttcaccg ggttgggtgcc catcctggtc gagctggacg gcgacgtaa cggccacaag     960
ttcagcgtgt ccggcgaggg cgagggcgat gccacctacg gcaagctgac cctgaagttc    1020
atctgcacca ccggcaagct gcccgtgccc tggcccaccc tcgtgaccac cttcggctac    1080
ggcctgcagt gcttcgcccg ctaccccgac cacatgaagc agcacgactt cttcaagtcc    1140
gccatgcccg aaggctacgt ccaggagcgc accatcttet tcaaggacga cggcaactac    1200
aagaccgcg ccgaggtgaa gttcgagggc gacaccctgg tgaaccgcat cgagctgaag    1260
ggcatcgact tcaaggagga cggcaacatc ctggggcaca agctggagta caactacaac    1320
agccacaacg tctatatcat ggccgacaag cagaagaacg gcatcaaggt gaacttcaag    1380
atccgccaca acatcgagga cggcagcgtg cagctcggcg accactacca gcagaacacc    1440
cccatcggcg acggccccgt gctgctgccc gacaaccact acctgagcta ccagtccgcc    1500
ctgagcaaag accccaacga gaagcgcgat cacatggtcc tgctggagtt cgtgaccgcc    1560
gccgggatca ctctcggcat ggacgagctg tacaagtaa                               1599

```

<210> 6

<211> 1641

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

ES 2 706 625 T3

<220>

<223> SP(nAChR-S) - NpHRh - EYFP

<400> 6

5

```

atgaggggta cgcccctgct cctcgtcgtc tctctgttct ctctgcttca ggacacagag      60
accctgcctc ccgtgaccga gagtgcctgt gcccttcaag ccgaggttac ccaaagggag      120
ttgttogagt tcgtgctgaa cgaccctttg cttgcaagca gtctctatat caacatcgca      180
cttgccaggac tgagtatact gctgttcggt tttatgacct gaggactcga tgatccacgg      240
gcaaaactta ttgctgtgtc aaccatcctt gtgcctgtcg tcagcattgc ctctacact      300
ggattggcga gggcctgac aatttcggt cttgaaatgc cagcgggcca ttttgcagaa      360
ggcagctcag tgatgctggg aggagaagag gtagatggtg tagtcacat gtggggacgg      420
tatctcaact gggcactttc cacgccatg attctcctcg ctctgggtct cctggccgga      480
agcaatgcta caaagctctt cacagctatc actttcgata tcgctatgtg cgtgactggc      540
cttgccgggg ccctgactac ctctcccac ctcatgagat ggttctggta cgctatcagt      600
tgtgcatgct ttctggtggt cttgtatata ctgctggtgg agtgggcaca ggacgcaaaa      660
gccgcgggaa ccgctgacat gttcaatacc ctgaagctgt tgacagtagt gatgtggctg      720
gggtatocaa ttgtgtgggc tcttggagtc gagggtatcg cgggtgttgc cgttgggggtg      780
acgagctggg gatattcttt cctggatata gtggcaaagt acattttcgc attcttgctc      840
ctgaactata tgacgtcaaa cgaatctgtc gtgtccggca gcattttgga tgttccatct      900
gcttctggga ccccggtgta tgatgtgagc aagggcgagg agctgttcac cggggtggtg      960
cccacctcgg tcgagctgga cggcgacgta aacggccaca agttcagcgt gtccggcgag      1020
ggcgagggcg atgccaccta cggcaagctg acctgaagt tcatctgcac caccggcaag      1080
ctgcccgtgc cctggcccac cctcgtgacc accttcggt acggcctgca gtgcttcgcc      1140
cgctaccccg accacatgaa gcagcacgac ttcttcaagt ccgccatgcc cgaaggctac      1200
gtccaggagc gcaccatctt cttcaaggac gacggcaact acaagaccg cgccgaggtg      1260
aagttoagag gcgacaccct ggtgaaccgc atcgagctga agggcatcga cttcaaggag      1320
gacggcaaca tcctggggca caagctggag tacaactaca acagccaca cgtctatata      1380
atggccgaca agcagaagaa cggcatcaag gtgaacttca agatccgcca caacatcgag      1440
gacggcagcg tgcagctcgc cgaccactac cagcagaaca ccccatcgg cgacggcccc      1500
gtgctgctgc ccgacaacca ctacctgagc taccagtccg ccctgagcaa agaccccaac      1560
gagaagcgcg atcacatggt cctgctggag ttcgtgaccg ccgccgggat cactctcggc      1620
atggacgagc tgtacaagta a                                     1641

```

<210> 7

<211> 1605

ES 2 706 625 T3

<212> ADN  
<213> artificial

5 <220>  
<223> NpHRh - EYFP - ETQV

<400> 7

```

atgacagaga cctgcctcc cgtgaccgag agtgccgtgg cccttcaagc cgaggttacc      60
caaagggagt tgttcgagtt cgtgctgaac gaccctttgc ttgcaagcag tctctatata      120
aacatcgcac ttgcaggact gagtatactg ctgttcgttt ttatgacccg aggactcgat      180
gatccacggg caaaacttat tgctgtgtca accatccttg tgcoctgtcgt cagcattgcc      240
tctactactg gattggcgag cggcctgaca atttcogttc ttgaaatgcc agcggggccat      300
tttgcagaag gcagctcagt gatgctggga ggagaagagg tagatggtgt agtcaccatg      360
tggggacggt atctcacctg ggcactttcc acgcccataa ttctcctcgc tctgggtctc      420
ctggccggaa gcaatgctac aaagctcttc acagctatca ctttcgatata cgctatgtgc      480
gtgactggcc ttgccgcggc cctgactacc tctcccacc tcatgagatg gttctggtac      540
gctatcagtt gtgcatgctt tctggtggtc ttgtatatcc tgctggtgga gtgggcacag      600
gacgccaaag cgcggggaac cgctgacatg ttcaataccc tgaagctggt gacagtagtg      660
atgtggctgg ggtatccaat tgtgtgggct cttggagtcg agggtatcgc ggtgttgccc      720
gttgggggtga cgagctgggg atattctttc ctggatatcg tggcaaagta cattttcgca      780
ttcttgctcc tgaactatct gacgtcaaac gaatctgtcg tgtccggcag cattttggat      840
gttccatctg cttctgggac cccggctgat gatatggtga gcaagggcga ggagctgttc      900
accgggggtg tgcccatcct ggtcgagctg gacggcgacg taaacggcca caagttcagc      960
gtgtccggcg agggcgaggg cgatgccacc tacggcaagc tgaccctgaa gttcatctgc     1020
accaccggca agctgcccggt gccctggccc accctcgtga ccaccttcgg ctacggcctg     1080
cagtgcttcg cccgctaccc cgaccacatg aagcagcacg acttcttcaa gtccgccatg     1140
cccgaaggct acgtccagga gcgcaccatc ttcttcaagg acgacggcaa ctacaagacc     1200
cgcgccgagg tgaagttcga gggcgacacc ctggtgaacc gcatcgagct gaagggcatc     1260
gacttcaagg aggacggcaa catcctgggg cacaagctgg agtacaacta caacagccac     1320
aacgtctata tcatggccga caagcagaag aacggcatca aggtgaactt caagatccgc     1380
cacaacatcg aggacggcag cgtgcagctc gccgaccact accagcagaa ccccccatc     1440
ggcgacggcc ccgtgctgct gcccgacaac cactacctga gctaccagtc cgccctgagc     1500

aaagacccca acgagaagcg cgatcacatg gtctgtctgg agttcgtgac cgccgccggg     1560
atcactctcg gcatggacga gctgtacaag gagaccagg tgtaa                          1605

```

10

ES 2 706 625 T3

<210> 8  
 <211> 1611  
 <212> ADN  
 <213> artificial

5

<220>  
 <223> NpHRh - EYFP - actina

10

<400> 8

```

atgacagaga ccctgcctcc cgtgaccgag agtgccgtgg cccttcaagc cgaggttacc      60
caaagggagt tgttcgagtt cgtgctgaac gaccctttgc ttgcaagcag tctctatatac      120
aacatcgcac ttgcaggact gagtatactg ctgttcgttt ttatgaccgc aggactcgat      180
gatccacggg caaaacttat tgctgtgtca accatccttg tgccctgtcgt cagcattgcc      240
tcctacactg gattggcgag cggcctgaca atttccgctt ttgaaatgcc agcggggccat      300
tttgcagaag gcagctcagt gatgctggga ggagaagagg tagatggtgt agtcaccatg      360
tggggacggg atctcacctg ggcactttcc acgcccataa ttctcctcgc tctgggtctc      420
ctggccggaa gcaatgctac aaagctcttc acagctatca ctttcgatat cgctatgtgc      480
gtgactggcc ttgcccgggc cctgactacc tcctcccacc tcatgagatg gttctggtac      540
gctatcagtt gtgcatgctt tctgggtggc ttgtatatcc tgctggtgga gtgggacacag      600
gacgccaaag ccgcgggaac cgctgacatg ttcaataccc tgaagctgtt gacagtagtg      660
atgtggctgg ggtatccaat tgtgtgggct cttggagtcg agggtatcgc ggtggtgccc      720
gttgggggtg cgagctgggg atattctttc ctggatatcg tggcaaagta cattttcgca      780
ttcttgctcc tgaactatct gacgtcaaac gaatctgtcg tgtccggcag cattttggat      840
gttccatctg cttctgggac cccggctgat gatgcggccg ccgtgagcaa gggcgaggag      900
ctgttcaccg ggggtgtgcc catcctggtc gagctggacg gcgacgtaa cggccacaag      960
ttcagcgtgt ccggcgaggg cgagggcgat gccacctacg gcaagctgac cctgaagtcc     1020
atctgcacca ccggcaagct gcccggtgcc tggcccaccc tcgtgaccac cttcggctac     1080
ggcctgcagt gtttcgcccg ctaccccgac cacatgaagc agcacgactt cttcaagtcc     1140
gccatgcccg aaggctacgt ccaggagcgc accatcttct tcaaggacga cggcaactac     1200
aagaccgcg ccgaggtgaa gttcgagggc gacaccctgg tgaaccgcat cgagctgaag     1260
ggcatcgact tcaaggagga cggcaacatc ctggggcaca agctggagta caactacaac     1320
agccacaacg tctatatcat ggccgacaag cagaagaacg gcatcaaggt gaacttcaag     1380
atccgccaca acatcgagga cggcagcgtg cagctcgcgc accactacca gcagaacacc     1440
cccatcggcg acggccccgt gctgctgccc gacaaccact acctgagcta ccagtccgcc     1500
ctgagcaaag accccaacga gaagcgcgat cacatggtcc tgctggagtt cgtgaccgcc     1560
gccgggatca ctctcggcat ggacgagctg tacaagccga ccccgccgta a              1611
    
```

# ES 2 706 625 T3

<210> 9  
 <211> 1605  
 <212> ADN  
 <213> artificial

5

<220>  
 <223> NpHRh - EYFP – exportación RE

10

<400> 9

|  |      |
|--|------|
| atgacagaga ccctgcctcc cgtgaccgag agtgccgtgg cccttcaagc cgaggttacc  | 60   |
| caaagggagt tgttcgagtt cgtgctgaac gaccctttgc ttgcaagcag tctctatatac | 120  |
| aacatcgcac ttgcaggact gagtatactg ctgttcgttt ttatgaccog aggactegat  | 180  |
| gatccacggg caaaacttat tgctgtgtca accatccttg tgcctgtcgt cagcattgcc  | 240  |
| tcctacactg gattggcgag cggcctgaca atttccgttc ttgaaatgcc agcggggccat | 300  |
| tttgcagaag gcagctcagt gatgctggga ggagaagagg tagatggtgt agtcacatg   | 360  |
| tggggacggg atctcacctg ggcactttcc acgcccata ttctcctcgc tctgggtctc   | 420  |
| ctggccggaa gcaatgctac aaagctcttc acagctatca ctttcgatata cgctatgtgc | 480  |
| gtgactggcc ttgcccgggc cctgactacc tcctcccacc tcatgagatg gttcttgttac | 540  |
| gctatcagtt gtgcatgctt tctggtggtc ttgtatatcc tgctggtgga gtgggcacag  | 600  |
| gacgccaaag ccgcccggaa cgctgacatg ttcaataccc tgaagctggt gacagtagtg  | 660  |
| atgtggctgg ggtatccaat tgtgtgggct cttggagtcg agggatcgc ggtgttgccc   | 720  |
| gttgggggta cgagctgggg atattctttc ctggatatcg tggcaaagta cattttcgca  | 780  |
| ttcttgctcc tgaactatct gacgtcaaac gaatctgtcg tgtccggcag cattttggat  | 840  |
| gttccatctg cttctgggac cccggctgat gatgtgagca agggcgagga gctgttcacc  | 900  |
| gggggtggtg ccatcctggt cgagctggac ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg  | 960  |
| tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc  | 1020 |
| accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc ctctgaccca ccttcggcta cggcctgcag  | 1080 |
| tgcttcgccc gctaccccga ccacatgaag cagcacgact tcttcaagtc cgccatgcc   | 1140 |
| gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc ttcaaggacg acggcaacta caagaccgac  | 1200 |
| gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg gtgaaccgca tccgagctgaa gggcatcgac | 1260 |
| ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac aagctggagt acaactacaa cagccacaac  | 1320 |
| gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac  | 1380 |
| aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc gaccactacc agcagaacac ccccatcgcc  | 1440 |
| gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac tacctgagct accagtccgc cctgagcaaa  | 1500 |
| gaccccaacg agaagcgca tcaatggtc ctgctggagt tctgtaccgc cgccgggatc    | 1560 |
| actctcgga tggacgagct gtacaagggt ctgggcagcc tgtaa                   | 1605 |

# ES 2 706 625 T3

<210> 10  
 <211> 1644  
 <212> ADN  
 <213> artificial

5

<220>  
 <223> SP(ChR2) - NpHRh - EYFP

<400> 10

10

```

atggattatg gagggcgccct gagtgccggtt gggcgcgagc tgctatTTac agagaccctg      60
cctcccgtga ccgagagtgc cgtggccctt caagccgagg ttacccaaag ggagttgttc      120
gagttcgtgc tgaacgacct tttgcttgca agcagtctct atatcaacat cgcacttgca      180
ggactgagta tactgctggt cgtttttatg acccgaggac tcgatgatcc acgggcaaaa      240
cttattgctg tgtcaacct ccttgtgcct gtogtcagca ttgcctcta cactggattg      300
gcgagcggcc tgacaatttc cgttcttgaa atgccagcgg gccattttgc agaaggcagc      360
tcagtgatgc tgggaggaga agaggtagat ggtgtagtca ccatgtgggg acggtatctc      420
acctgggcac tttccagcc catgattctc ctogctctgg gtctcctggc cggaagcaat      480
gctacaaagc tcttcacagc taccactttc gatatcgcta tgtgcgtgac tggccttgcc      540
gcgccctga ctacctctc ccacctcatg agatggttct ggtacgctat cagttgtgca      600
tgctttctgg tggctctgta taccctgctg gtggagtggg cacaggacgc caaagccgcg      660
ggaaccgctg acatgttcaa tacctgaag ctggtgacag tagtgatgtg gctggggtat      720
ccaattgtgt gggctcttgg agtcgagggg atogcgggtg tgcccgttgg ggtgacgagc      780
tggggatatt ctttcttggg taccgtggca aagtacattt tcgattctt gctcctgaac      840
tatctgacgt caaacgaatc tgtcgtgtcc ggcagcattt tggatgttcc atctgcttct      900
gggaccccg gctgatgatg gcccgccgtg agcaaggcgc aggagctgtt caccggggtg      960
gtgccatcc tggctgagct ggacggcgac gtaaaccgcc acaagttcag cgtgtccggc     1020
gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag ctgacctga agttcatctg caccaccggc     1080
aagctgcccg tgccctggcc caccctcgtg accacctcog gctacggcct gcagtgtctc     1140
gcccgtacc ccgaccacat gaagcagcac gacttcttca agtccgcat gcccgaggc     1200
tacgtccagg agcgcaccat cttcttcaag gacgacggca actacaagac ccgcccagag     1260

gtgaagttcg agggcgacac cctggtgaac cgcacgagc tgaagggcat cgacttcaag     1320
gaggacggca acatcctggg gcacaagctg gactacaact acaacagcca caactctat     1380
atcatggccg acaagcagaa gaacggcatc aaggtgaact tcaagatccg ccacaacatc     1440
gaggacggca gcggtgcagc cggcgaccac taccagcaga acaccccat cggcgacggc     1500
cccgctgctg tgcccgaaa ccactacctg agctaccagt ccgcccgtgag caaagacccc     1560
aacgagaagc gcgatcacat ggtcctgctg gagttcgtga ccgcccggcg gatcactctc     1620
ggcatggacg agctgtacaa gtaa                                             1644
  
```

## ES 2 706 625 T3

<210> 11  
<211> 1665  
<212> ADN  
<213> artificial

5

<220>  
<223> SP(nAChR-L) - NpHRh - EYFP

10

<400> 11

## ES 2 706 625 T3

```

atgggtcttc gtgctcttat gctttggctt cttgctgctg ctggctcttgt tcgtgaatct      60
cttcaaggta cagagacctt gcctcccgtg accgagagtg ccgtggccct tcaagccgag      120
gttaccctaaa gggagttggt cgagttcgtg ctgaacgacc ctttgcttgc aagcagtctc      180
tatatcaaca tcgcacttgc aggactgagt atactgctgt tcgtttttat gacccgagga      240
ctcgatgatc cacgggcaaa acttattgct gtgtcaacca tccttgtgcc tgtcgtcagc      300
attgcctcct aactgggatt ggcgagcggc ctgacaattt ccgttcttga aatgccagcg      360
ggcattttg cagaaggcag ctcagtgatg ctgggaggag aagaggtaga tgggtgtagtc      420
accatgtggg gacggtatct cacctgggca ctttccacgc ccatgattct cctcgtctctg      480
ggtctcctgg ccggaagcaa tgctacaaag ctcttcacag ctatcacttt cgatatcgct      540
atgtgcgtga ctggccttgc cgcggccctg actacctcct cccacctcat gagatggttc      600
tggtacgcta tcagttgtgc atgctttctg gtggcttctg atatcctgct ggtggagtgg      660
gcacaggacg ccaaagccgc gggaaaccgt gacatgttca ataccctgaa gctgttgaca      720
gtagtgatgt ggctggggta tccaattgtg tgggctcttg gagtcgaggg tatcgcggtg      780
ttgcccgttg ggtgacgag ctggggatat tctttcctgg atatcgtggc aaagtacatt      840
ttcgcattct tgctcctgaa ctatctgacg tcaaacgaat ctgtcgtgtc cggcagcatt      900
ttgatgttc catctgcttc tgggaccccg gctgatgatg cggccgccgt gagcaagggc      960
gaggagctgt tcaccggggt ggtgcccata ctggtcgagc tggacggcga cgtaaaccggc     1020
cacaagttca gcgtgtccgg cgagggcgag ggcgatgcca cctacggcaa gctgaccctg     1080

aagttcatct gcaccaccgg caagctgccc gtgccctggc ccaccctcgt gaccaccttc     1140
ggctacggcc tgcaagtctt cgcctgctac cccgaccaca tgaagcagca cgacttcttc     1200
aagtcgcca tgcccgaagg ctacgtccag gagcgcacca tcttcttcaa ggacgacggc     1260
aactacaaga cccgcgccga ggtgaagttc gagggcgaca ccctggtgaa ccgcatcgag     1320
ctgaagggca tcgacttcaa ggaggacggc aacatcctgg ggcacaagct ggagtacaac     1380
tacaacagcc acaacgtcta tatcatggcc gacaagcaga agaacggcat caaggtgaac     1440
ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc agcgtgcagc tcgccgacca ctaccagcag     1500
aacacccccca tcggcgacgg ccccgtgctg ctgcccgaca accactacct gagctaccag     1560
tccgccctga gcaaagacc caacgagaag cgcgatcaca tggctctgct ggagttcgtg     1620
accgccgccg ggatcactct cggcatggac gagctgtaca agtaa                               1665

```

5 <210> 12  
 <211> 1605  
 <212> ADN  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> NpHRh-EYFP-VSNL

ES 2 706 625 T3

<400> 12

|             |            |            |            |             |             |      |
|-------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|------|
| atgacagaga  | ccctgcctcc | cgtgaccgag | agtgccgtgg | cccttcaagc  | cgaggttacc  | 60   |
| caaagggagt  | tgttcgagtt | cgtgctgaac | gaccctttgc | ttgcaagcag  | tctctatatac | 120  |
| aacatcgcac  | ttgcaggact | gagtatactg | ctgttcgttt | ttatgaccgg  | aggactcgat  | 180  |
| gatccacggg  | caaaacttat | tgctgtgtca | accatccttg | tgctgtcgt   | cagcattgcc  | 240  |
| tctactactg  | gattggcgag | cggcctgaca | atttccgttc | ttgaaatgcc  | agcggggccat | 300  |
| tttgcagaag  | gcagctcagt | gatgctggga | ggagaagagg | tagatgggtg  | agtcaccatg  | 360  |
| tggggacggg  | atctcacctg | ggcactttcc | acgcccatga | ttctcctcgc  | tctgggtctc  | 420  |
| ctggccggaa  | gcaatgctac | aaagctcttc | acagctatca | ctttcgatat  | cgctatgtgc  | 480  |
| gtgactggcc  | ttgccgcggc | cctgactacc | tcctcccacc | tcatgagatg  | gttctggtac  | 540  |
| gctatcagtt  | gtgcatgctt | tctgggtggc | ttgtatatcc | tgctgggtgga | gtgggcacag  | 600  |
| gacgccaaag  | ccgcgggaac | cgctgacatg | ttcaataccc | tgaagctggt  | gacagtagtg  | 660  |
| atgtggctgg  | ggatccaat  | tgtgtgggct | cttggagtgc | agggtatcgc  | ggtgttgccc  | 720  |
| gttggggatga | cgagctgggg | atattctttc | ctggatatcg | tgggcaaagta | cattttcgca  | 780  |
| ttcttgctcc  | tgaactatct | gacgtcaaac | gaatctgtcg | tgtccggcag  | cattttggat  | 840  |
| gttccatctg  | cttctgggac | cccggctgat | gatatggtga | gcaagggcga  | ggagctgttc  | 900  |
| accgggggtg  | tgcccatcct | ggtcgagctg | gacggcgacg | taaacggcca  | caagttcagc  | 960  |
| gtgtccggcg  | agggcgaggg | cgatgccacc | tacggcaagc | tgaccctgaa  | gttcatctgc  | 1020 |
| accaccggca  | agctgcccgt | gccctggccc | accctcgtga | ccaccttcgg  | ctacggcctg  | 1080 |
| cagtgtctcg  | cccgtacccc | cgaccacatg | aagcagcagc | acttcttcaa  | gtccgccatg  | 1140 |
| cccgaaggct  | acgtccagga | gcgaccatc  | ttcttcaagg | acgacggcaa  | ctacaagacc  | 1200 |
| cgcgccgagg  | tgaagttcga | gggcgacacc | ctggtgaacc | gcatcgagct  | gaagggcatc  | 1260 |
| gacttcaagg  | aggacggcaa | catcctgggg | cacaagctgg | agtacaacta  | caacagccac  | 1320 |
| aacgtctata  | tcatggccga | caagcagaag | aacggcatca | aggtgaactt  | caagatccgc  | 1380 |
| cacaacatcg  | aggacggcag | cgtgcagctc | gccgaccact | accagcagaa  | cacccccatc  | 1440 |
| ggcgacggcc  | ccgtgctgct | gcccgacaac | cactacctga | gctaccagtc  | cgccctgagc  | 1500 |
| aaagacccca  | acgagaagcg | cgatcacatg | gtcctgctgg | agttcgtgac  | cgccgccggg  | 1560 |
| atcactctcg  | gcatggacga | gctgtacaag | gtgagcaacc | tgtaa       |             | 1605 |

5

<210> 13  
 <211> 1599  
 <212> ADN  
 <213> artificial

10

# ES 2 706 625 T3

<220>

<223> SP(nAChR-S) - NpHRh - EYFP – exportación RE

<400> 13

5

```

atgacagaga ccctgcctcc cgtgaccgag agtgccgtgg cccttcaagc cgaggttacc      60
caaagggagt tgttcgagtt cgtgctgaac gaccctttgc ttgcaagcag tctctatatac      120
aacatcgcac ttgcaggact gagtatactg ctgttcgttt ttatgaccgc aggactcgat      180
gatccacggg caaaacttat tgctgtgtca accatccttg tgctgtcgt cagcattgcc      240
tcctacactg gattggcgag cggcctgaca atttccgttc ttgaaatgcc agcgggcat      300
tttgcagaag gcagctcagt gatgctggga ggagaagagg tagatggtgt agtcaccatg      360
tggggacggg atctcacctg ggcactttcc acgccatga ttctcctcgc tctgggtctc      420
ctggccggaa gcaatgctac aaagctcttc acagctatca ctttcgatat cgctatgtgc      480
gtgactggcc ttgcccgggc cctgactacc tcctcccacc tcatgagatg gttctggtac      540
gctatcagtt gtgcatgctt tctggtggtc ttgtatatcc tgctggtgga gtgggcacag      600
gacgccaaag ccgcgggaac cgctgacatg ttcaataccc tgaagctggt gacagtagtg      660
atgtggctgg ggtatccaat tgtgtgggct cttggagtcg agggtatcgc ggtgttgccc      720
gttgggggta cgagctgggg atattctttc ctggatatcg tggcaaagta cattttcgca      780
ttcttgctcc tgaactatct gacgtcaaac gaatctgtcg tgtccggcag cattttggat      840

gttccatctg cttctgggac cccggctgat gatgcggccg ccgtgagcaa gggcgaggag      900
ctgttcaccg ggtggtgccc catcctggtc gagctggacg ggcacgtaa cggccacaag      960
ttcagcgtgt ccggcgaggg cgaggcgat gccacctacg gcaagctgac cctgaagttc     1020
atctgcacca ccggcaagct gcccgtgccc tggcccacc tcgtgaccac cttcggctac     1080
ggcctgcagt gcttcgccc ctaccccgac cacatgaagc agcacgactt cttcaagtcc     1140
gccatgcccg aaggtacgt ccaggagcgc accatcttct tcaaggacga cggaactac     1200
aagaccgcg ccgaggtgaa gttcgagggc gacacctgg tgaaccgat cgagctgaag     1260
ggcatcgact tcaaggagga cggcaacatc ctggggcaca agctggagta caactacaac     1320
agccacaacg tctatatcat ggccgacaag cagaagaacg gcatcaaggt gaacttcaag     1380
atccgccaca acatcgagga cggcagcgtg cagctcgccg accactacca gcagaacacc     1440
cccatcggcg acggccccgt gctgctgccc gacaaccact acctgagcta ccagtcggcc     1500
ctgagcaaag accccaacga gaagcgcgat cacatggtcc tgctggagtt cgtgaccgcc     1560
gccgggatca ctctcggcat ggacgagctg tacaagtaa                               1599

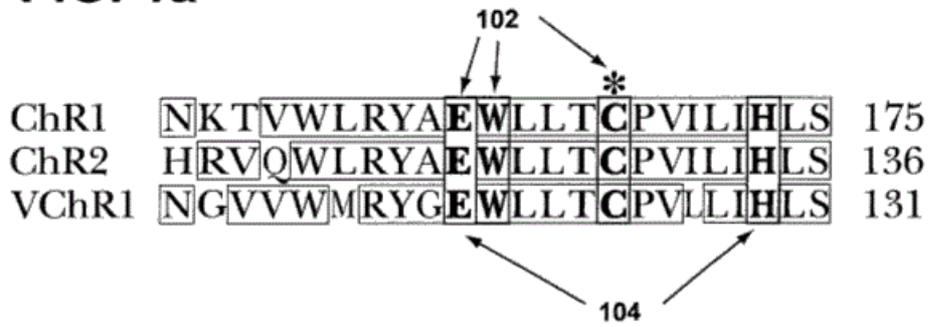
```

**REIVINDICACIONES**

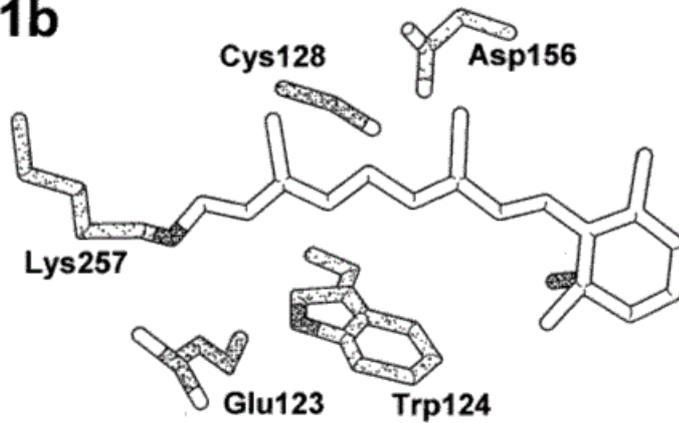
- 5 1. Una proteína de canal iónico sensible a la luz que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO: 2,  
 en donde el canal iónico presenta un estado conductor prolongado después de la exposición a un pulso de luz;  
 y en donde la proteína comprende una sustitución Cys→Thr, una Cys→Ala o una Cys→Ser en una posición que corresponde al aminoácido 128 de la SEQ ID NO:1/aminoácido 123 de la SEQ ID NO:2, y una sustitución Asp→Ala, o una Asp→Asn en una posición que corresponde al aminoácido 156 de la SEQ ID NO:1/aminoácido 151 de la SEQ ID NO:2.
- 15 2. El canal iónico sensible a la luz de la reivindicación 1, en donde la proteína comprende una sustitución Cys→Ser en una posición que corresponde al aminoácido 128 de la SEQ ID NO:1/aminoácido 123 de la SEQ ID NO:2, y una sustitución Asp→Ala en una posición que corresponde al aminoácido 156 de la SEQ ID NO:1/aminoácido 123 de la SEQ ID NO:2.
- 20 3. El canal iónico sensible a la luz de la reivindicación 1, en donde la proteína comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:1.
- 25 4. El canal iónico sensible a la luz de la reivindicación 1, que comprende además una sustitución de aminoácido de Glu en una posición que corresponde al aminoácido 123 de la SEQ ID NO:1, o una sustitución de aminoácido de His en una posición que corresponde al aminoácido 134 de la SEQ ID NO:1.
- 30 5. El canal iónico sensible a la luz de la reivindicación 1 abierto en el estado activo con un único pulso breve de luz mientras que se mantiene activo durante una duración significativamente mayor que el pulso de luz.
- 35 6. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un canal iónico sensible a la luz de la reivindicación 1.
- 40 7. El ácido nucleico de la reivindicación 6, en donde el ácido nucleico es un vector de expresión.
- 45 8. El ácido nucleico de la reivindicación 6, en donde el vector de expresión es un vector de lentivirus o un vector de virus adenoasociado.
- 50 9. El ácido nucleico de la reivindicación 6, en donde la secuencia de nucleótidos está ligada de manera operativa a un elemento control.
- 55 10. Un sistema para controlar el potencial de acción de una neurona, comprendiendo el sistema un dispositivo de administración, una fuente luminosa y un dispositivo de control, en donde dicho dispositivo de administración comprende una proteína según la reivindicación 1 o un ácido nucleico según la reivindicación 6 para la administración de una proteína del canal iónico sensible a la luz a una neurona por uno de transfección, transducción y microinyección.
- 60 11. El sistema de la reivindicación 10, en donde el generador de luz es un diodo emisor de luz o un láser.
- 65 12. El sistema de la reivindicación 10, en donde el ácido nucleico es un vector de transferencia génica.
13. El sistema de la reivindicación 12, en donde el vector de transferencia génica es un vector de lentivirus.
14. El sistema de la reivindicación 10, en donde el dispositivo es implantable.
15. El sistema de la reivindicación 10, en donde el ácido nucleico se proporciona en un material deshidratado o soluble en agua en la parte biológica.
16. Un canal iónico sensible a la luz según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad del sistema nervioso central o un trastorno neurológico estimulando *in vivo* una célula neuronal diana, comprendiendo el método exponer una célula diana que expresa el canal iónico sensible a la luz a un estímulo óptico para de ese modo estimular la célula neuronal diana.
17. Un canal iónico sensible a la luz para su uso según la reivindicación 16, en donde la célula diana es una neurona.
18. Un canal iónico sensible a la luz para su uso según la reivindicación 16, en donde dicha estimulación comprende controlar el potencial de acción de una neurona.

19. Un ácido nucleico que codifica un canal iónico sensible a la luz según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad del sistema nervioso central o un trastorno neurológico estimulando *in vivo* una célula neuronal diana, comprendiendo el método exponer una célula diana que expresa el canal iónico sensible a la luz a un estímulo óptico para de ese modo estimular la célula neuronal diana.
- 5 20. El ácido nucleico para su uso según la reivindicación 19, en donde dicha estimulación comprende controlar el potencial de acción de una neurona.
- 10 21. Una célula neuronal mamífera que comprende un ácido nucleico que codifica un canal iónico sensible a la luz según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9.
22. La célula mamífera de la reivindicación 21 para su uso en un método de tratamiento.
- 15 23. La célula mamífera de la reivindicación 21 para su uso en un método de tratamiento de un trastorno neurológico.
24. Una composición que comprende el canal iónico sensible a la luz de la reivindicación 1 en combinación con una segunda bomba iónica activada por luz.

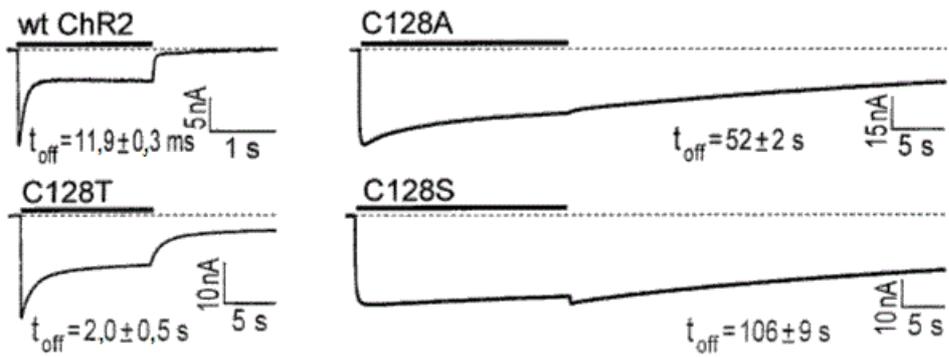
**FIG. 1a**

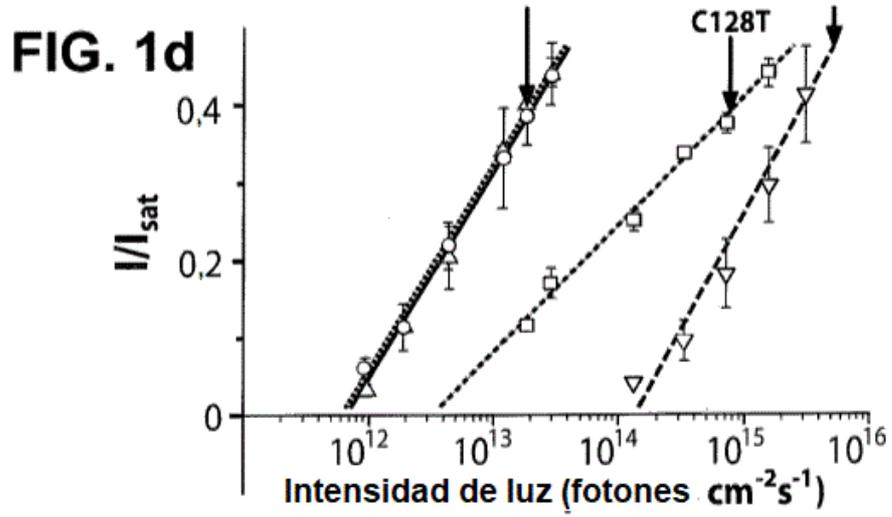


**FIG. 1b**

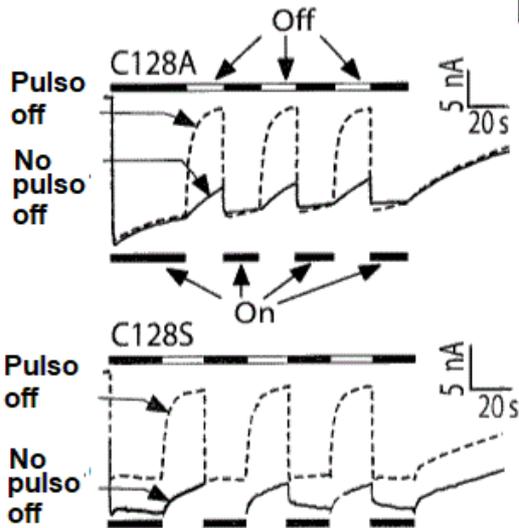
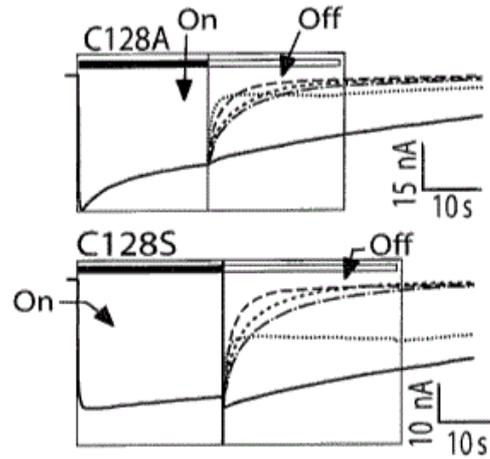


**FIG. 1c**



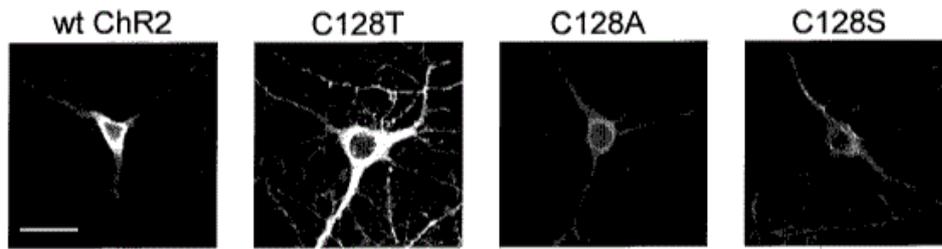


**FIG. 1e**

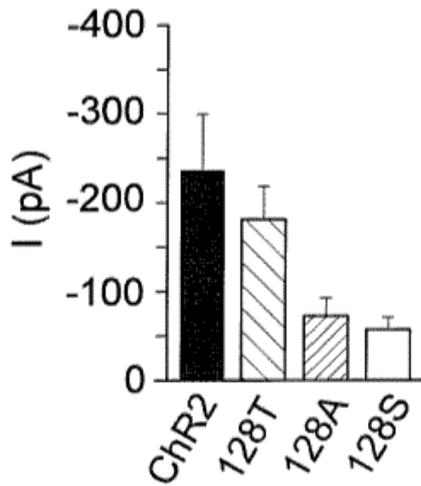


**FIG. 1f**

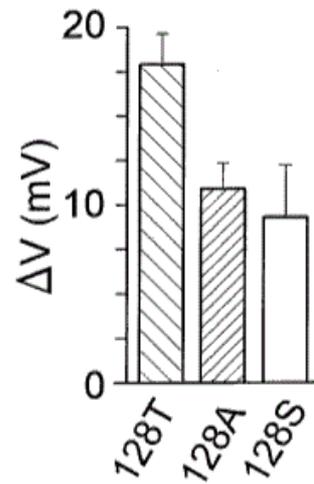
**FIG. 2a**



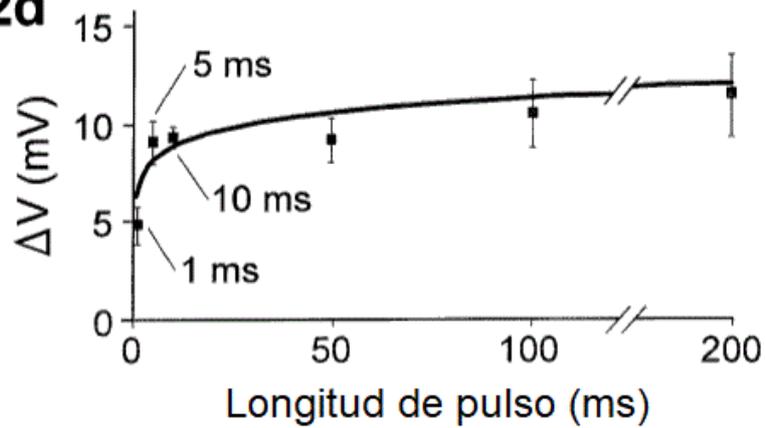
**FIG. 2b**



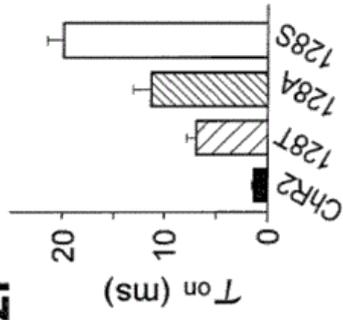
**FIG. 2c**



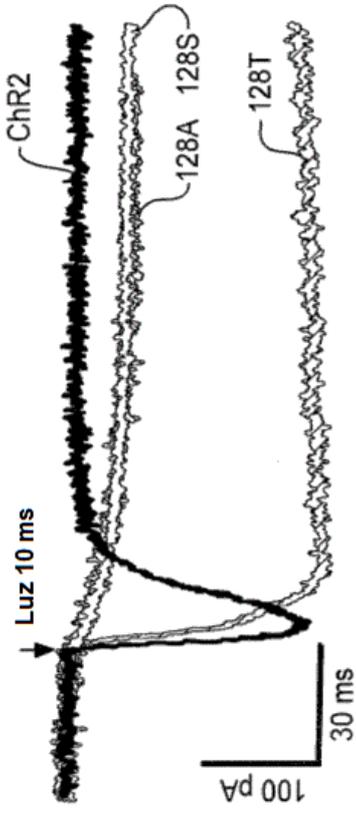
**FIG. 2d**



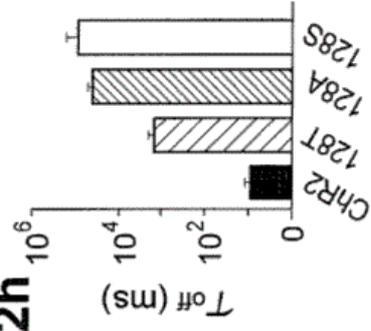
**FIG. 2f**



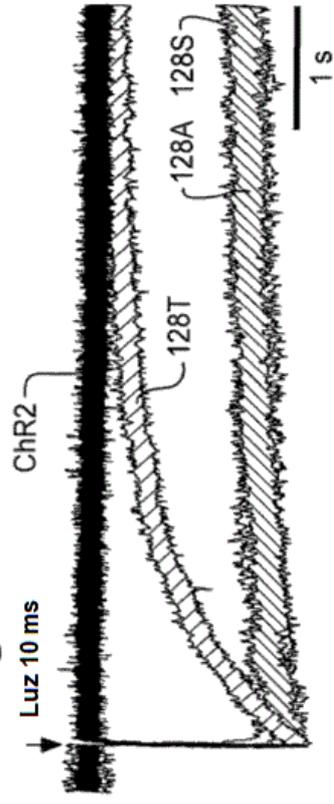
**FIG. 2e**



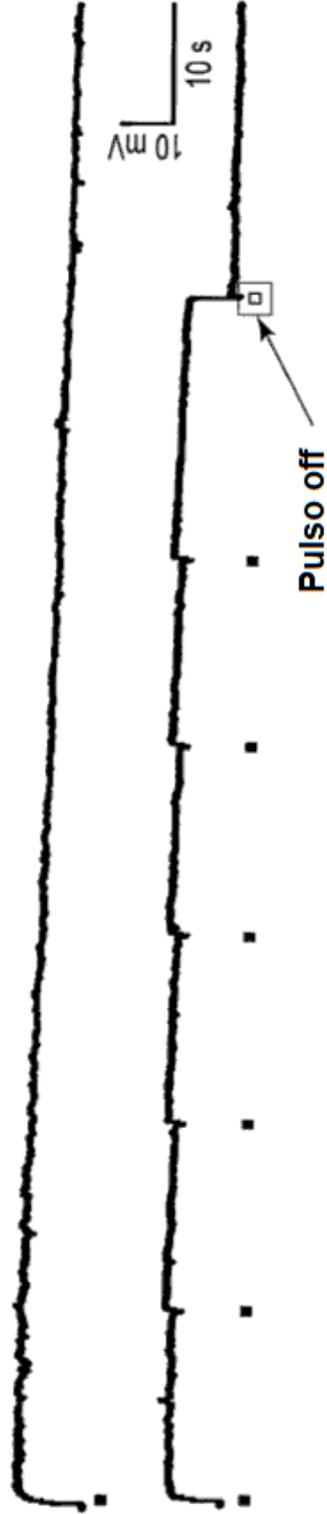
**FIG. 2h**



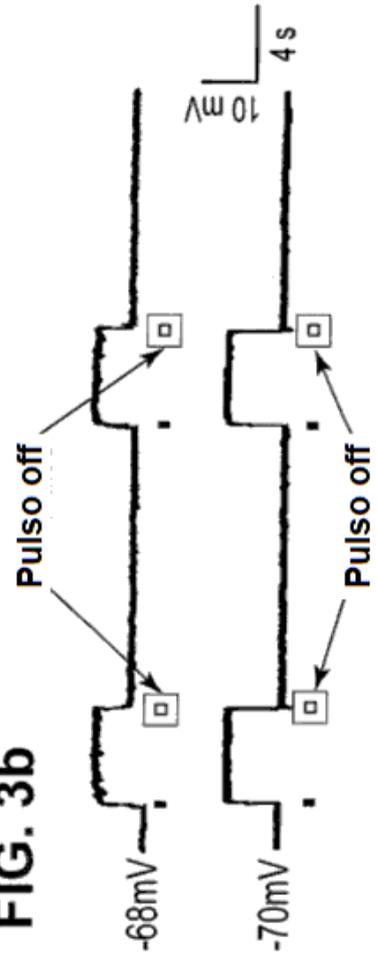
**FIG. 2g**



**FIG. 3a**



**FIG. 3b**



**FIG. 3c**

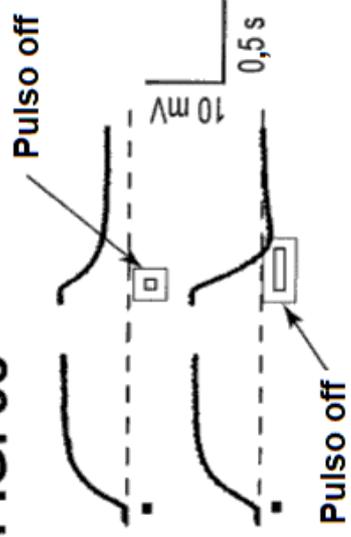
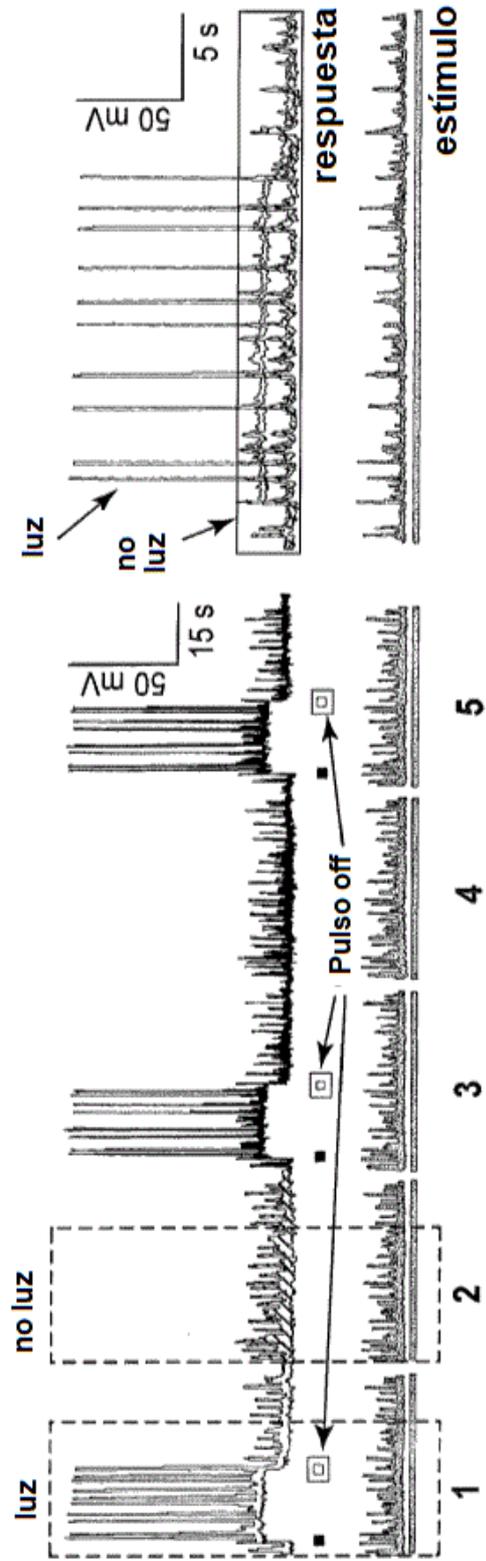
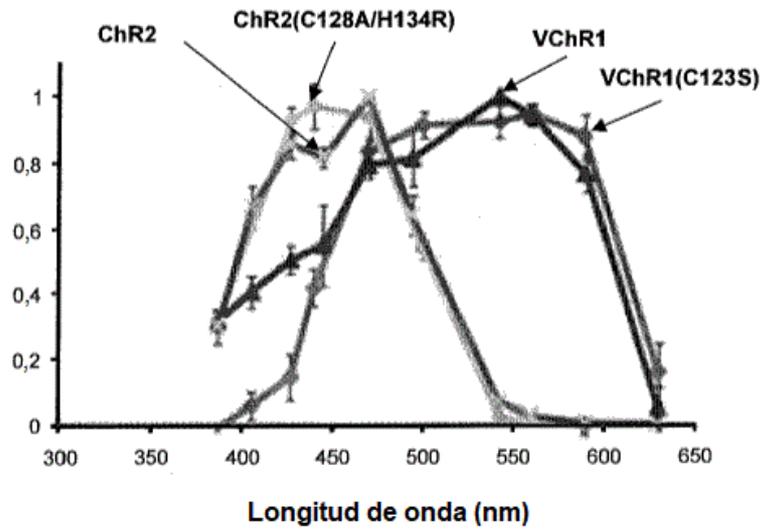
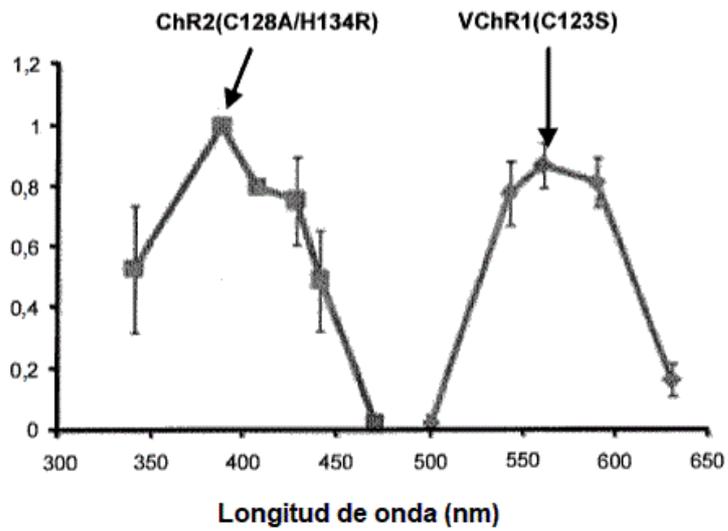


FIG. 3d

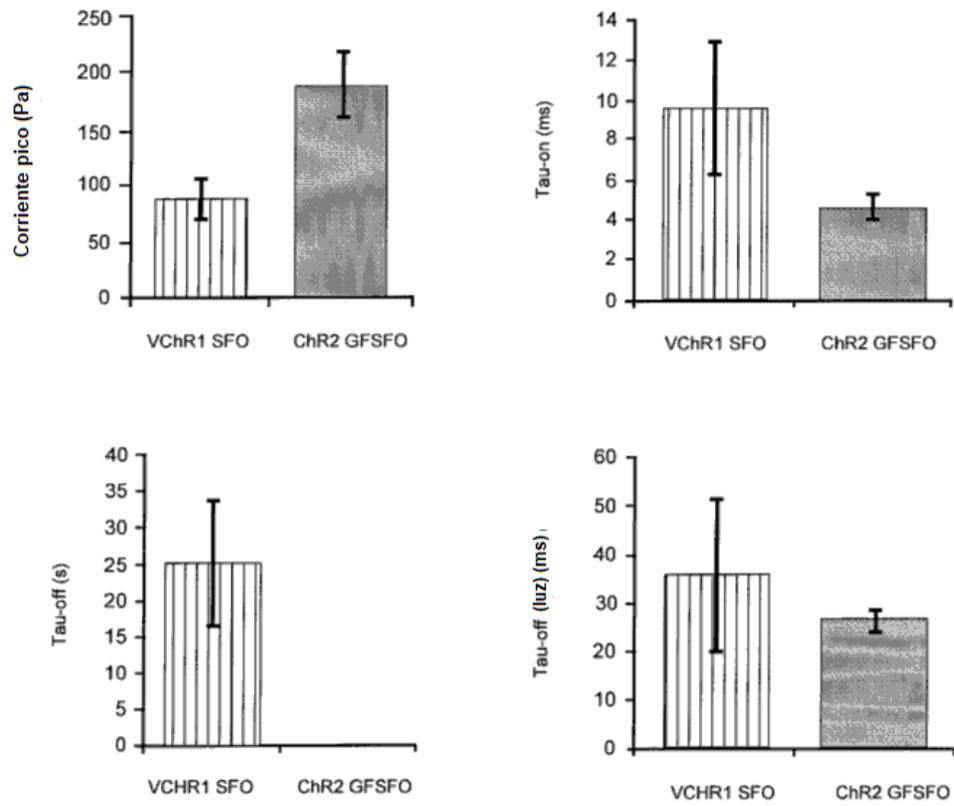




**FIG. 4a**



**FIG. 4b**



**FIG. 4c**

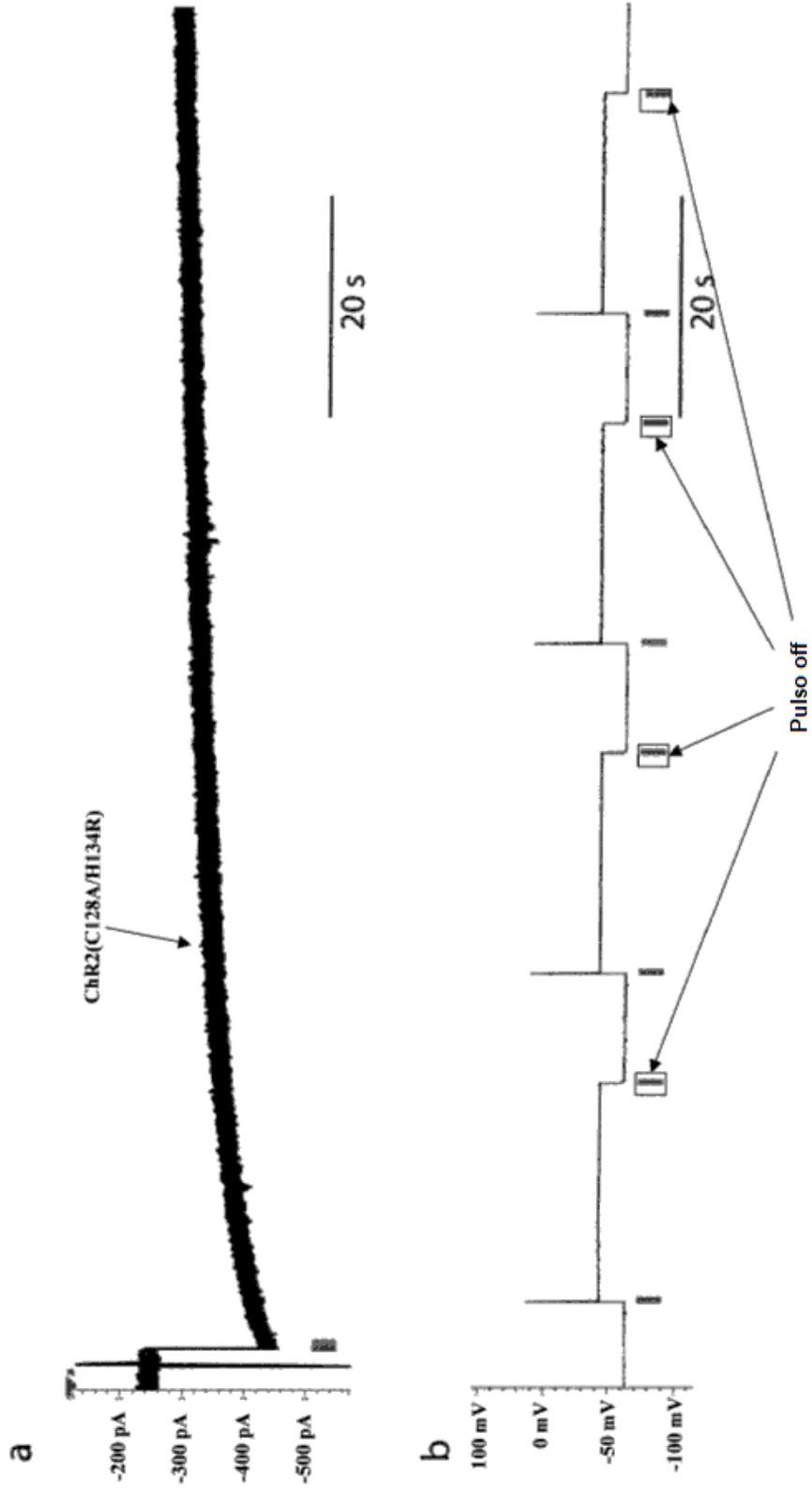
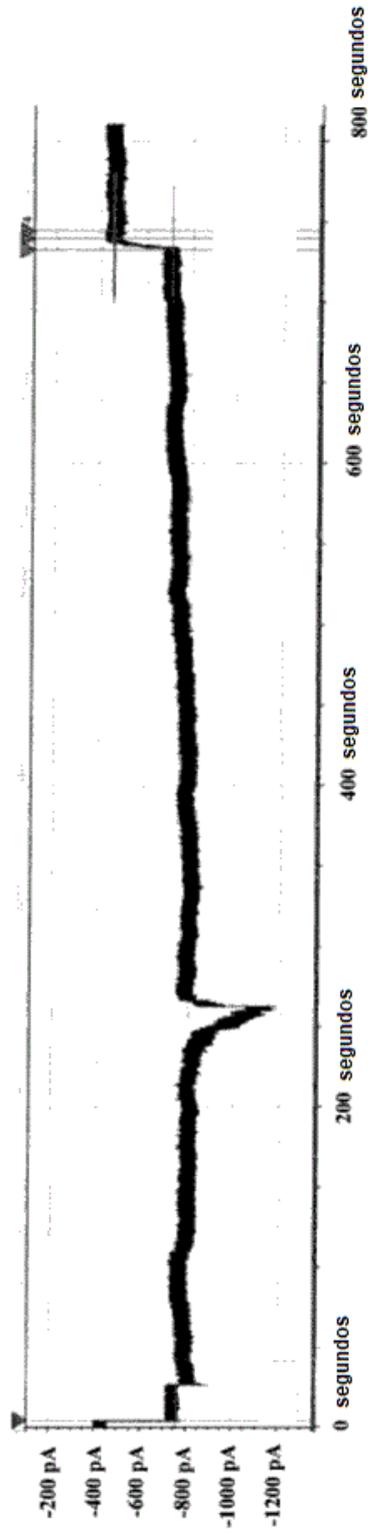


FIG. 5



**FIG. 6**