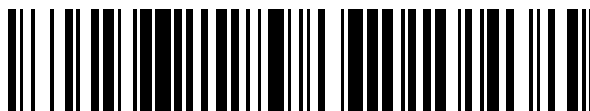


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 639**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/55** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 25/08** (2006.01)

**C12N 15/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.03.2015 PCT/GB2015/050657**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15136247**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2015 E 15709326 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2020 EP 3116508**

54 Título: **Uso combinado de un vector que codifica un receptor modificado y su agonista exógeno en el tratamiento de convulsiones**

30 Prioridad:

**13.03.2014 GB 201404470**

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

**29.09.2020**

73 Titular/es:

**UCL BUSINESS PLC (100.0%)  
The Network Building 97 Tottenham Court Road  
London W1T 4TP, GB**

72 Inventor/es:

**KAETZEL, DENNIS;  
WALKER, MATTHEW, CHARLES;  
SCHORGE, STEPHANIE y  
KULLMANN, DIMITRI, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 784 639 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

5      Uso combinado de un vector que codifica un receptor modificado y su agonista exógeno en el tratamiento de convulsiones

### 6      **Campo técnico**

10     La presente invención se refiere en general a métodos basados en terapia genética y materiales para su uso para tratar epilepsia y trastornos neurológicos similares.

### 10     **Antecedentes de la técnica**

15     La epilepsia se define mediante episodios recurrentes de convulsiones, que son breves alteraciones de comportamiento involuntarias provocadas por descargas eléctricas intensas paroxísticas en el cerebro.

20     La epilepsia afecta hasta el 1 % de la población (más de 50 millones de personas) (1) y es resistente a la terapia farmacológica en al menos el 20 % de los casos (2). Representa una grave carga para la sociedad y para los individuos afectados. Incluso con el mejor de los mejores tratamientos actuales, más del 25 % de los pacientes siguen teniendo convulsiones que son gravemente perjudiciales para sus vidas.

25     La epilepsia puede ser focal (surgiendo de un área cerebral específica) o generalizada (surgiendo de ambos hemisferios). Las personas con epilepsia de presentación focal son especialmente propensas a la farmacorresistencia (3). La zona epileptógena en tales casos está con frecuencia restringida a una región pequeña que con frecuencia puede estar localizada con técnicas de obtención de imágenes y electrofisiológicas (4). Sin embargo, la extirpación quirúrgica del foco de convulsiones puede tratar con éxito solo aproximadamente al 5 % de los pacientes farmacorresistentes, y es con frecuencia inapropiada en la epilepsia neocortical focal debido a la proximidad a la corteza elocuente (5, 6).

30     El documento WO00/18903 describe un sistema para la terapia de la epilepsia y dolor intratable, así como para arritmias cardíacas, en las que los denominados genes de "silenciamiento eléctrico" se transfieren a células con control sensible de la expresión transgénica. Son ejemplos dados un promotor inducible por ecdisona que impulsa la expresión que rectifica por dentro los canales de potasio en vectores adenovirales policistrónicos. Se notifica que mientras no se ve afectada la actividad eléctrica normal, después de la inducción de la expresión génica se suprime la excitabilidad.

35     Además, se ha mostrado que la terapia génica dirigida a la zona epileptógena es eficaz en modelos de epilepsia de roedor incluyendo epilepsia neocortical focal (7).

40     Sin embargo, la administración viral de transgenes que alteran la excitabilidad permanentemente puede deteriorar la función esencial de circuitos cerca del foco de convulsiones. Una estrategia atractiva sería suprimir la excitabilidad de circuitos "a demanda" con la detección de una convulsión. Recientemente el progreso en la supresión de convulsiones optogenéticas en roedores ha mostrado que esto es, en principio, viable (7-9). Una de las limitaciones principales en la transducción clínica es la necesidad de administrar luz de la longitud de onda, intensidad y duración apropiadas a la región de neuronas transducidas. Esto necesita la implantación de dispositivos ópticos y padece la atenuación fuerte de la luz en el tejido cerebral.

45     Puede verse por lo tanto que métodos novedosos de tratamiento de la epilepsia, tal como epilepsia focal, proporcionarían una contribución a la técnica.

50     Farrell, Martialis S., y Bryan L. Roth. "Pharmacosynthetics: reimagining the pharmacogenetic approach". Brain research 1511 (2013): 6-20, trata en general la neurosicofarmacología, y el impacto de parejas de ligando sintético-GPCR en este tipo de farmacología.

55     Kreitzer, Anatol C., y Joshua D. Berke. "Investigating striatal function through cell-type-specific manipulations". Neuroscience 198 (2011): 19-26, se refiere al cuerpo estriado, que observa que nuevas metodologías para perturbar la actividad y señalización en diferentes tipos celulares *in vivo* ha comenzado a permitir pruebas directas de los papeles causantes de neuronas estriatales en el comportamiento.

### 60     **Divulgación de la invención**

60     Los presentes inventores han desarrollado un sistema terapéutico novedoso que usa vectores para expresar un receptor modificado que puede alterar la excitabilidad de un subconjunto restringido de neuronas en el foco de convulsiones, pero donde el receptor se activa solamente cuando se administra también un ligando exógeno específico.

65     El receptor que ha sido mutado para hacerlo insensible a los neurotransmisores endógenos pero sensibles a una

sustancia que normalmente no tiene ningún efecto sobre la función cerebral.

Los receptores modificados de esta manera son conocidos *per se* (10,11, 24 por ejemplo) y se han denominado DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (receptores de diseño activados exclusivamente por fármacos de diseño) y RASSL (Receptors Activated Solely by Synthetic Ligands (receptores activados únicamente por ligandos sintéticos) en la bibliografía. Sin embargo, tales receptores modificados no se han sugerido previamente para su uso en el tratamiento de la epilepsia. Parte de la tecnología descrita en el presente documento se publicó después de la fecha de prioridad reivindicados en el presente documento (26).

Como ejemplo, los inventores han demostrado que expresar un DREADD GPCR inhibidor, denominado hM4Di, en un modelo *in vivo* de epilepsia focal puede reducir las convulsiones cuando se administrarse de manera sistémica un ligando específico CNO (clozapina-N-óxido). Probaron esto en dos modelos de convulsiones agudas y también en un modelo de epilepsia resistente a fármacos crónica, y aplicaron varios métodos complementarios para analizar la actividad eléctrica en el cerebro (electroencefalograma - EEG). El tratamiento era bien tolerado y las convulsiones se suprimieron solo durante la duración en la que CNO estaba presente en el cerebro, aproximadamente 45-60 minutos después de una única inyección intraperitoneal.

Los tratamientos de la invención pueden dirigirse tanto a la región cerebral en la que se inyecta el vector viral como al tipo de célula dentro de esa región y así el efecto cuando el ligando se administra puede localizarse de manera eficaz, y en ausencia del ligando no se esperaría que hubiera ningún efecto sobre la función cerebral.

Por lo tanto, la terapia es tanto dirigida como temporalmente limitada. El modelo preclínico de epilepsia usado en los ejemplos en el presente documento es aquel que no responde a fármacos sistémicos que sugieren que la invención puede tener utilidad en pacientes que no se tratan eficazmente en la actualidad.

La invención puede ponerse en práctica en relación con un mamífero que puede ser un mamífero no humano, por ejemplo, un animal de prueba tal como un roedor (por ejemplo, ratón, rata) o primate. El mamífero puede ser un mamífero transgénico. Dichos animales de prueba forman aspectos adicionales de la invención.

En aspectos relacionados puede administrarse previamente al paciente o mamífero un vector, antes de realizarse el método.

La invención proporciona un vector que codifica un receptor modificado, y un agonista exógeno para dicho receptor, para su uso en un método de tratamiento de un trastorno convulsivo que es epilepsia focal en un paciente que padece dicho trastorno, tratamiento que comprende:

(a) administrar a dicho paciente dicho vector, en el que el receptor modificado es el receptor acoplado a proteína G (GPCR) receptor de acetilcolina muscarínico humano M<sub>4</sub> que se acopla a través de una proteína Gi con un canal de potasio de rectificación interna acoplado a proteína G (GIRK)

estando el receptor caracterizado por (i) una sensibilidad disminuida con respecto a su ligando de activación endógeno (ii) una sensibilidad conservada o potenciada con respecto al agonista exógeno, en cualquier caso en el que el receptor modificado se codifica por un ácido nucleico operativamente unido a un promotor específico de tipo de célula neuronal de modo que dicho receptor modificado se expresa en neuronas de un foco de convulsiones en el cerebro del paciente; (b) administrar a dicho paciente dicho agonista exógeno, mediante lo cual la presencia de dicho agonista en el cerebro del paciente activa dicho receptor modificado, mediante lo cual la activación de dicho receptor modificado inhibe de manera reversible la excitabilidad de, y neurotransmisión mediante, las neuronas en el foco de convulsiones.

La invención proporciona también un vector que codifica un receptor modificado para su uso en un método de tratamiento de un trastorno convulsivo que es epilepsia focal en un paciente que padece dicho trastorno, tratamiento que comprende:

(a) administrar a dicho paciente dicho vector, en el que el receptor modificado es el receptor acoplado a proteína G (GPCR) receptor de acetilcolina muscarínico humano M<sub>4</sub> que se acopla a través de una proteína Gi con un canal de potasio de rectificación interna acoplado a proteína G (GIRK)

estando el receptor caracterizado por (i) una sensibilidad disminuida con respecto a su ligando de activación endógeno (ii) una sensibilidad conservada o potenciada con respecto a un agonista exógeno, en cualquier caso en el que el receptor modificado se codifica por un ácido nucleico operativamente unido a un promotor específico de tipo de célula neuronal de modo que dicho receptor modificado se expresa en neuronas de un foco de convulsiones en el cerebro del paciente;

(b) administrar a dicho paciente dicho agonista exógeno, mediante lo cual la presencia de dicho agonista en el cerebro del paciente activa dicho receptor modificado, mediante lo cual la activación de dicho receptor modificado inhibe de manera reversible la excitabilidad de, y neurotransmisión mediante, las neuronas en el foco de convulsiones.

La invención proporciona también un agonista exógeno para su uso en un método de tratamiento de un trastorno convulsivo que es epilepsia focal en un paciente que padece dicho trastorno, tratamiento que comprende:

- 5 (a) administrar a dicho paciente un vector que codifica un receptor modificado, siendo el receptor modificado el receptor acoplado a proteína G (GPCR) receptor de acetilcolina muscarínico humano M<sub>4</sub> que se acopla a través de una proteína Gi con un canal de potasio de rectificación interna acoplado a proteína G (GIRK) estando el receptor caracterizado por (i) una sensibilidad disminuida con respecto a su ligando de activación endógeno (ii) una sensibilidad conservada o potenciada con respecto a un agonista exógeno,  
 10 en cualquier caso en el que el receptor modificado se codifica por un ácido nucleico operativamente unido a un promotor específico de tipo de célula neuronal de modo que dicho receptor modificado se expresa en neuronas de un foco de convulsiones en el cerebro del paciente;  
 (b) administrar a dicho paciente dicho agonista exógeno,  
 mediante lo cual la presencia de dicho agonista en el cerebro del paciente activa dicho receptor modificado,  
 mediante lo cual la activación de dicho receptor modificado inhibe de manera reversible la excitabilidad de, y  
 15 neurotransmisión mediante, las neuronas en el foco de convulsiones.

La invención proporciona también un agonista exógeno para su uso en un método de tratamiento de un trastorno convulsivo que es epilepsia focal en un paciente que padece dicho trastorno,  
 en el que a dicho paciente se ha administrado previamente un vector que codifica un receptor modificado, siendo el receptor modificado el receptor acoplado a proteína G (GPCR) receptor de acetilcolina muscarínico humano M<sub>4</sub> que se acopla a través de una proteína Gi con un canal de potasio de rectificación interna acoplado a proteína G (GIRK) que se caracteriza por (i) una sensibilidad disminuida con respecto a su ligando de activación endógeno (ii) una sensibilidad conservada o potenciada con respecto al agonista exógeno, en cualquier caso en el que el receptor modificado se codifica por un ácido nucleico operativamente unido a un promotor específico de tipo de célula neuronal de modo que dicho receptor modificado se expresa en neuronas de un foco de convulsiones en el cerebro del paciente;  
 20 tratamiento que comprende administrar a dicho paciente dicho agonista exógeno,  
 mediante lo cual la presencia de dicho agonista en el cerebro del paciente activa dicho receptor modificado,  
 mediante lo cual la activación de dicho receptor modificado inhibe de manera reversible la excitabilidad de, y  
 25 neurotransmisión mediante, las neuronas en el foco de convulsiones.  
 30

Los métodos de tratamiento o terapia se describen en más detalle a continuación en el presente documento.

35 Se describe también en el presente documento el uso de un vector y/o agonista como se define en el presente documento en la preparación de un medicamento para su uso en un método de tratamiento o terapia tal como se describe en el presente documento.

Algunos aspectos particulares de la invención se tratarán ahora en más detalle:

#### 40 *Receptores*

Tal como se indica anteriormente, los receptores modificados para activarse únicamente por agonistas artificiales han sido conocidos en la técnica durante muchos años, y en ocasiones se denominan DREADD o RASSL. Los expertos en la técnica pueden proporcionar tales receptores usando métodos conocidos y, a la luz de la presente divulgación, los aplican en la presente invención. Las expresiones "receptor modificado" o similares, DREADD y RASSL se usan indistintamente en el presente documento, a menos que el contexto exija lo contrario.

Por ejemplo el documento WO97/35478 describe la preparación de RASSL. El contenido de esa solicitud, con respecto a su descripción de la preparación y características de RASSL se incorpora específicamente al presente documento como referencia. El documento WO97/35478 enseña cómo pueden prepararse RASSL a partir de receptores acoplados a proteína G, incluyendo receptores muscarínicos de acetilcolina acoplados a Gi. El contenido incluye una descripción de la "Construction of RASSLs" páginas 20-30 del documento WO97/35478. Adicionalmente, determinadas definiciones que se refieren a RASSL del documento WO97/35478 se usan en el presente documento por consistencia con su sentido reconocido en la técnica. Un RASSL tal como se describe en ese documento es un receptor modificado acoplado a proteína G que tiene afinidad de unión disminuida por un ligando natural seleccionado (es decir, endógeno) del GPCR (con respecto a la unión del ligando seleccionado por un receptor acoplado a proteína G natural), pero que tiene afinidad de unión normal, casi normal, o preferentemente potenciada por una molécula pequeña exógena, normalmente sintética. Por lo tanto, la activación mediada por RASSL de células que expresan RASSL no se produce en una medida significativa *in vivo* en presencia del ligando natural, pero responde significativamente tras la exposición a una molécula pequeña introducida de manera exógena. En otras palabras, el RASSL se activa de manera superior mediante el ligando exógeno en comparación con el ligando natural (es decir, activado en una medida mayor o más significativa mediante la unión del ligando de molécula pequeña que mediante la unión a un ligando natural seleccionado a una concentración similar).

#### 65 *GPCR*

Receptores preferidos para su uso en la presente invención son receptores acoplados a la proteína G modificados (GPCR) que se unen a moléculas pequeñas sintéticas no presentes normalmente en el cerebro.

Los métodos descritos en el presente documento pueden tener el fin de afectar o provocar la respuesta celular mediada por proteína G de una célula eucariota, particularmente en una neurona en el cerebro de un mamífero. La neurona será normalmente una célula neuronal dentro de una población neuronal que se ha transformado con el vector que codifica el GPCR modificado.

"Receptor acoplado a proteína G" como se usa en el presente documento significa un receptor que, tras la unión de su ligando natural y activación del receptor, transduce una señal(es) mediada(s) por proteína G que da como resultado una respuesta celular. Los receptores acoplados a proteína G forman una gran familia de proteínas relacionadas evolutivamente (véase el documento WO97/35478). Proteínas que son miembros de la familia de receptores acoplados a proteína G se componen generalmente de siete posibles dominios transmembrana. Los receptores acoplados a proteína G se conocen en la técnica como "receptores de siete segmentos transmembrana (7TM)" y como "receptores heptahelicoidales" (véase, por ejemplo, Schwartz, 1994, Curr. Opin. Biotechnol. 5:434-444)

Los GPCR interactúan con un complejo de proteínas de unión al nucleótido guanina heterotriméricas (proteínas G) y por lo tanto regulan una amplia variedad de rutas de señalización intracelular incluyendo canales iónicos. Por lo tanto, en el presente documento una "respuesta celular acoplada a proteína G" significa una respuesta celular o ruta de señalización que se produce con la unión de ligando mediante un receptor acoplado a proteína G. Dichas respuestas celulares acopladas a proteína G relevantes para la presente invención son aquellas que modifican la excitabilidad neuronal y por lo tanto la neurotransmisión, más específicamente, que provocan una respuesta inhibitoria mediante lo cual la activación del receptor con el ligando provoca la inhibición o el silenciamiento sináptico.

Un mecanismo mediante el que un GPCR puede modificar la excitabilidad neuronal y por lo tanto la neurotransmisión es a través de la inhibición de la liberación de neurotransmisores, por ejemplo, a través de un efecto sobre canales de calcio presinápticos.

Otro mecanismo por el que un GPCR puede modificar la excitabilidad neuronal y por lo tanto la neurotransmisión es a través del acoplamiento a través de proteínas G con canales de potasio de rectificación interna acoplados a proteína G (GIRK). La respuesta celular acoplada a proteína G es en este caso por lo tanto la hiperpolarización de membrana e inhibición neuronal (11).

Una amplia variedad de receptores acoplados a proteína G activan GIRK, incluyendo los receptores muscarínicos  $M_2$ , de adenosina  $A_1$ ,  $\alpha_2$ -adrenérgicos, de dopamina  $D_2$ , de opiodes  $\mu$ ,  $\delta$  y  $K$ , de serotonina  $5-HT_{1A}$ , de somatostatina, de galanina, de m-Glu, de GABA<sub>B</sub>, y de esfingosina-1-fosfato (Yamada M, Inanobe A, Kurachi Y (diciembre de 1998). "G protein regulation of potassium ion channels". Pharmacological Reviews 50 (4): 723-60).

En la presente invención el GPCR que activa GIRKS es el receptor de acetilcolina muscarínico  $M_4$ , también conocido como el receptor colinérgico. Este receptor es una proteína que, en seres humanos, se codifica por el gen *CHRM4*, y se denomina hM4 en el presente documento. Este se acopla a la subunidad alfa de  $G_i$  (o proteína  $G_i/G_0$  o  $G_i$ ). Se cree que la activación de hM4Di inhibe también la liberación de neurotransmisores, lo más probablemente mediada por un efecto sobre canales de calcio presinápticos. Esta actividad concuerda con la evidencia de una distribución presináptica y acción de receptores muscarínicos de  $M_4$ , previamente notificados por Levey et al. J Neurosci 15: 4077-4092, 1995; y Shirey JK, et al. Nat Chem Biol 4: 42-50, 2008).

El receptor modificado (RASSL) usado en el presente documento se modifica con respecto a su receptor acoplado a proteína G nativo correspondiente por que el RASSL presenta unión por un ligando natural seleccionado que es se disminuye, preferentemente se disminuye sustancialmente, más preferentemente se elimina sustancialmente, con respecto a la unión del ligando mediante su receptor acoplado a proteína G nativo correspondiente.

Por lo tanto, la actividad de RASSL no se ve relativamente afectada por fluctuaciones naturales del ligando natural seleccionado (por ejemplo, acetilcolina). Preferentemente la unión de RASSL del ligando natural seleccionado se disminuye en al menos 5 veces, preferentemente 10 veces, más preferentemente 50 veces, aún más preferentemente 75 veces, y puede disminuirse 100 veces o más con respecto a la unión mediante el receptor acoplado a proteína G nativo correspondiente de RASSL.

Los RASSL pueden caracterizarse por la relación de afinidad de unión de ligando sintético con respecto a la afinidad de unión de un ligando natural seleccionado. Preferentemente, los RASSL de la invención muestran una alta relación de unión de ligando de molécula pequeña con respecto a unión de ligando natural seleccionado, y muestran relaciones de unión de ligando de molécula pequeña:ligando natural seleccionado de al menos 0,8, preferentemente al menos 1,0, más preferentemente al menos 5, aún más preferentemente 10, todavía más preferentemente 100 o superior.

Preferentemente, los RASSL muestran relaciones de unión que son 2 veces mayores, preferentemente 5 veces mayores, más preferentemente 10 veces mayores, todavía más preferentemente de 50 a 100 veces mayores que la relación de unión de ligando de molécula pequeña:ligando natural seleccionado de un receptor acoplado a proteína G nativo.

5 Los RASSL pueden caracterizarse también por las relaciones del nivel de activación mediante la exposición a ligando sintético con respecto al nivel de activación mediante la exposición a un ligando natural seleccionado ("relación de activación"). Los niveles de activación pueden medirse tal como se describe a continuación. Preferentemente, los ASSL de la invención muestran una alta relación de activación de ligando de molécula pequeña con respecto a la activación de ligando natural seleccionado, y muestran relaciones de ligando de molécula pequeña:ligando natural seleccionado de al menos 0,8, preferentemente al menos 1,0, más preferentemente al menos 5, aún más preferentemente 10, todavía más preferentemente 100 o superior. Preferentemente, Los RASSL muestran relaciones de activación que son 2 veces mayores, preferentemente 5 veces mayores, más preferentemente 10 veces mayores, todavía más preferentemente de 50 a 100 veces mayores que la relación de activación de ligando de molécula pequeña:ligando natural seleccionado de un receptor acoplado a proteína G nativo.

La electrofisiología de los canales puede realizarse tal como se describe en (11, materiales suplementarios y métodos). En resumen, los receptores se transfectan de manera transitoria en células HEK (células tsA201) en una relación molar de 2:1:1 (2 GPCR: 1 GIRK1: 1 GIRK2) usando el reactivo de transfección Quantum Prep Cytofectene (Bio-Rad). La expresión postransfección (12-24 h) de corrientes  $K^+$  mediadas por canales GIRK se verifican en rampas de voltaje de 50 ms desde -100 hasta + 50 mV desde 0 mV mediante sus propiedades de rectificación interna. Se usan las siguientes soluciones de registro extracelular e intracelular; extracelular (NaCl 20 mM/KCl 120 mM/CaCl<sub>2</sub> 2 mM/MgCl<sub>2</sub> 1 mM/Hepes-NaOH 10 mM, pH 7,3 con KOH), intracelular (aspartato de K 100 mM/KCl 40 mM/MgATP 5 mM/Hepes-KOH 10 mM/NaCl 5 mM/EGTA 2 mM/MgCl<sub>2</sub> 2 mM/GTP 10 mM, pH 7,3 con KOH). Una vez se identifican las corrientes, Células HEK se fijaron con voltaje a -60 mV durante 15-60 s y o bien CCh 10 mM o se aplica CNO directamente sobre las células durante 2 s usando un sistema de perfusión de flujo rápido (ALA Scientific Instruments, Westbury, NY).

30 Como alternativa podrían utilizarse métodos basados en los de Tomlinson SE, Rajakulendran S, Tan SV, et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2013;84: 1107-1112. ADNc que codifica las subunidades de GPCR, GIRK y proteína fluorescente verde (GFP) contenida dentro del plásmido pMT2LF se transfectan de manera transitoria en células de riñón embrionario humano (HEK) en una relación molar de 2:1:1:1 (2 GPCR: 1 GIRK1: 1 GIRK2: 1 GFP) usando lipofectamine2000 (Invitrogen). Se realizan registros 36-72 h después de la transfección. Se realizan registros de zona de célula completa a temperatura ambiente. La solución externa contiene (en mM): NaCl 135; KCl 4; MgCl<sub>2</sub> 1; CaCl<sub>2</sub> 2; HEPES 10. La solución de pipeta contiene (en mM): NaCl 135; KCl 2,5; EGTA 2; HEPES 10. La resistencia de pipeta es 2-4 MΩ cuando se llena con solución intracelular. Células que expresan GFP se mantienen a -80 mV, y no se compensa la resistencia en serie. Células con resistencia en serie por encima de 10 MΩ se desechan. Se usa el protocolo A-P/4 para restar corrientes de fuga. Se registran corrientes usando un amplificador Axopatch 200B o Axoclamp 700B (Molecular Devices). Se adquieren datos y se analizan usando el software LabView (National Instruments).

45 Para monitorizar el potencial de membrana de neuronas hipocámpicas cultivadas, cachorros de rata Sprague-Dawley (Zivic Miller Inc., Pittsburgh, PA) se sacrifican en el día 1 después de nacer y se disocian neuronas hipocámpicas y se cultivan sobre cubreobjetos. Se infectan neuronas (10-14 días de edad) con virus Sindbis y 12-24 h tras la infección se usaron para registros. Como alternativa, y preferentemente, puede usarse lentivirus. En resumen, lentivirus que expresa el GPCR y GFP se añade un día después de sembrar en placa las neuronas, y se obtienen registros tras 14 días *in vitro* (Heeroma JH, Henneberger C, Rajakulendran S, Hanna MG, Schorge S, Kullmann DM, Disease Models & Mechanisms 2, 612-619, 2009). Se registran neuronas hipocámpicas en tampón extracelular (NaCl 172 mM/KCl 2,4 mM/Hepes 10 mM/glucosa 10 mM/CaCl<sub>2</sub> 4 mM/MgCl<sub>2</sub> 4 mM, pH 7,3) y tampón intracelular (gluconato de  $K^+$  145 mM/Hepes 15 mM/ $K^+$ -EGTA 1 mM/Na-ATP 4 mM/Na-GTP 0,4 mM, pH 7,3). Cambios en el potencial de membrana de neuronas hipocámpicas se realizan en el modo de fijación con corriente y o bien CCh o bien CNO se aplicaron directamente sobre la célula tal como se describe anteriormente. Para registrar la activación del potencial de acción se añade bicuculina 10  $\mu$ M (Sigma) a la solución de registro extracelular para bloquear la aferencia inhibitoria en neuronas hipocámpicas. Se realizan registros de zona con un amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices). Se digitalizaron corrientes a 10 kHz y se filtraron con el filtro Bessel de tres polos 10 kHz de interno (filtro 1) en serie con un filtro Bessel de 4 polos de 2,9 kHz (filtro 2).

60 Para caracterizar el efecto de GPCR sobre la transmisión sináptica se inyecta 1  $\mu$ l de serotipo de virus adenoasociado 5 (AAV5) que expresa el GPCR y la proteína indicadora fluorescente mCitrina se inyecta en el subcampo CA3 del hipocampo dorsal de ratas Sprague-Dawley macho (4 semanas de edad) a 3,6 mm lateral (derecha), 2,8 mm posterior y 2,9 mm ventral con respecto al bregma a 100 nl/min (Akam T, Oren I, Mantoan L, Ferenczi E, Kullmann DM. Nat Neurosci mayo de 2012;15(5):763-8). 4-6 Semanas más tarde, se perfunden los animales transcardialmente con solución a temperatura ambiente que contiene (en mM): N-metil-D-glucamina, 92; KCl, 2,5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,25; taurina, 2; ácido ascórbico, 5; piruvato de Na, 3; MgCl<sub>2</sub>, 10; D-glucosa, 25; NaHCO<sub>3</sub>, 30; CaCl<sub>2</sub>, 0,5; sacarosa, 1, y se preparan cortes hipocámpicos horizontales. La solución de perfusión extracelular

contiene (en mM): NaCl, 119; KCl, 2,5; CaCl<sub>2</sub>, 0,5; MgSO<sub>4</sub>, 1,3; MgCl, 2; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,25; NaHCO<sub>3</sub>, 25; Glucosa, 10. Un potencial excitador postsináptico de campo (fEPSP) se provoca cada 30 segundos mediante estimulación extracelular (20-320  $\mu$ A 100  $\mu$ s) en el estrato radiado de CA1, antes, durante y después de la perfusión de baño de CNO (10  $\mu$ M).

Un receptor muscarínico humano acoplado a Gi preferido es "hM4Di", que se ha sensibilizado al metabolito oralmente biodisponible y normalmente inerte de clozapina, clozapina-N-óxido (CNO) (11, 12). Este GPCR modificado incluye las siguientes mutaciones: Y113C/A203G. Preferentemente el receptor modificado se codifica por SEQ ID NO: 1.

Cabe destacar que, hM4Di es relativamente insensible a acetilcolina, el agonista endógeno del receptor original.

El receptor modificado hM4Di se describió originalmente en la referencia 11 (B. N. Armbruster, X. Li, M. H. Pausch, S. Herlitze, B. L. Roth, "Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. 104, 5163-5168 (2007)). Aquellos autores describen un enfoque general, validado y no sesgado para generar GPCR con especificidades de ligando definidas, que se utilizó para crear una familia de DREADD de receptor de ACh muscarínico (mAChR). El contenido de esa publicación, con respecto a su descripción de la preparación y características de estos DREADD, se incorpora específicamente en el presente documento como referencia.

La preparación de un DREADD de M4 humano se describe también en Nawaratne, V., Leach, K., Suratman, N., Loiacono, R. E., Felder, C. C., Armbruster, B. N., & Christopoulos, A. (2008). "New insights into the function of M4 muscarinic acetylcholine receptors gained using a novel allosteric modulator and a DREADD (designer receptor exclusively activated by a designer drug)". Molecular pharmacology, 74(4), 1119-1131.

Un plásmido que codifica hM4Di se encuentra comercialmente disponible como plásmido 45548: pcDNA5/FRT-HA-hM4D(Gi) de Ad-dgene, Cambridge, MA 02139 (<http://www.addgene.org/45548/>) y se describe en el anexo de secuencias y figuras en adelante en el presente documento.

#### 30 *Vectores y administración de los mismos*

Cualquiera de varios vectores puede usarse de acuerdo con la invención para producir células que expresan RASSL.

Un vector para su uso en las terapias de la presente invención será adecuado para protocolos de terapia génica *in vivo*. El vector puede ser un vector de integración estable o un vector de no integración estable. Un vector preferido es un vector viral, tal como un vector lentiviral o de AAV (virus adenoasociado).

El uso de estos dos tipos de vector viral es bien conocido en la técnica para terapia génica. Únicamente a modo de ejemplo, el documento WO2008011381 describe el uso de estos y otros vectores para expresar receptores en un sujeto. El contenido de esa solicitud, con respecto a su descripción de la preparación y características de AAV y vectores lentivirales se incorpora específicamente en el presente documento como referencia.

En resumen, tal como se describe en el documento WO2008011381, AAV es un parvovirus defectuoso y es un vector preferido porque puede infectar muchos tipos de células y no es patogénico para seres humanos. Los vectores de tipo AAV pueden transportar aproximadamente de 4 a 5 kb y se conoce que AAV natural se inserta de manera estable en el cromosoma 19. Se prefieren vectores que contienen esta propiedad de integración específica de sitio. Una realización especialmente preferida de este tipo de vector es el vector de P4.1 C producido por Avigen, San Francisco, CA. En otro tipo de vector de AAV, el AAV contiene una pareja de repeticiones terminales invertidas (ITR) que flanquean al menos un casete que contiene un promotor que dirige la expresión específica de célula operativamente unido a un gen heterólogo (en este caso: un RASSL). Información adicional puede encontrarse en la patente de los Estados Unidos n.º 6.261.834.

Los vectores lentivirales son un tipo especial de vector retroviral que se caracterizan normalmente por tener un largo periodo de incubación para la infección. Además, los vectores lentivirales pueden infectar células no divisorias. Los vectores lentivirales se basan en la cadena principal de ácido nucleico de un virus de la familia lentiviral de virus. Normalmente, un vector lentiviral contiene las regiones 5' y 3' LTR de un lentivirus, tal como SIV y HIV. Los vectores lentivirales contienen también normalmente el elemento sensible Rev (RRE) de un lentivirus, tal como SIV y HIV. Ejemplos de vectores lentivirales incluyen aquellos de Dull, T. et al., "A Third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system" J. Virol 72(11):8463-71 (1998);

Los vectores descritos en el presente documento pueden administrarse localmente a las células diana en varios métodos de acceso conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, "Stereotactic and Functional Neurosurgery" Editores: Nikkhah & Pinsky; suplemento de Acta Neurochirurgica volumen 117, 2013. En particular la administración puede ser a través de inyección directa en el cerebro usando metodologías conocidas, tal como craneotomía con orificio de trepanación e inyección estereotáctica. La inyección se dirigirá a un foco de convulsiones donde se ha

definido (por ejemplo, en epilepsia focal) o más en general en áreas del cerebro que se sospecha que tienen hiperactividad en otras enfermedades convulsivas.

5 Pueden usarse vectores para efectuar una transformación permanente, o pueden expresarse únicamente de manera transitoria en el cerebro.

10 Hablando en general, los expertos en la técnica pueden construir vectores y diseñar protocolos para la expresión génica recombinante. Se pueden elegir o construir vectores adecuados, que contienen, además de los elementos de la invención descritos anteriormente, secuencias reguladoras adecuadas, que incluyen secuencias promotoras, fragmentos terminadores, secuencias de poliadenilación, genes marcadores y otras secuencias según sea adecuado. Para detalles adicionales, véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: 2ª edición, Sambrook et al, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press o *Current Protocols in Molecular Biology*, Segunda edición, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, (1995, y suplementos periódicos).

15 El constructo de ADN contiene un promotor para facilitar la expresión del ADN que codifica RASSL dentro de la célula diana. Puede conseguirse especificidad mediante expresión regional y específica de tipo de célula del receptor exclusivamente, por ejemplo, usando un promotor específico de tejido o región. En la invención se usa un promotor específico de tipo de célula neuronal.

20 Un ejemplo es el promotor de Camk2a (gen alfa CaM quinasa II), que activa la expresión de manera relativamente específica en el prosencéfalo, véase por ejemplo Sakurada et al (2005) "Neuronal cell type-specific promoter of the alpha CaM kinase II gene is activated by Zic2, a Zic family zinc finger protein". *Neurosci Res.* noviembre de 2005; 53(3):323-30. Publicación en línea 12 de septiembre de 2005.

25 Otros promotores específicos de tipo de célula neuronal incluyen el promotor de NSE (Liu H. et al., *Journal of Neuroscience.* 23(18):7143-54, 2003); promotor de tirosina hidroxilasa (Kessler MA. et al., *Brain Research. Molecular Brain Research.* 112(I-2):8-23, 2003); promotor de proteína básica de mielina (Kessler MA. et al *Biochemical & Biophysical Research Communications.* 288(4):809-18, 2001); promotor de proteína ácida fibrilar glial (Nolte C. et al., *GLIA.* 33(I):72-86, 2001); promotores de gen de neurofilamento (pesado, medio, ligero) (Yaworsky PJ. et al., *Journal of Biological Chemistry.* 272(40):25112-20, 1997) (todos los que se incorporan en el presente documento por referencia para la secuencia de los promotores y secuencias relacionadas.) El promotor de NSE se divulga en Peel AL. et al., *Gene Therapy.* 4(1): 16-24, 1997) (SEQ ID NO:69) (pTR-NT3myc; Powell Gene Therapy Center, Universidad de Florida, Gainesville FL). Un promotor adecuado adicional es el promotor de sinapsina 1 (véase Kugler et al "Human synapsin 1 gene promoter confers highly neuron-specific long-term transgene expression from an adenoviral vector in the adult rat brain depending on the transduced area". *Gene Ther.* febrero de 2003;10(4):337-47).

*Agonistas y administración de los mismos*

40 En la presente invención, el receptor modificado se activa mediante la presencia de un agonista exógeno. El agonista exógeno (o ligando, o molécula pequeña, los términos se usan indistintamente en el presente documento) es uno que puede administrarse por vía oral o parenteral (por ejemplo, administrarse de manera sistémica) y penetran en la barrera hematoencefálica. El ligando es exógeno por que está generalmente ausente en el cerebro, o presente en concentraciones basales suficientemente bajas que no activan el receptor modificado.

45 Preferentemente la semivida en el cerebro del ligando es inferior a 120, 60 o 30 minutos. Esto tiene la ventaja de que se minimiza cualquier efecto adverso sobre la función cerebral normal provocada por la interacción del ligando y receptor.

50 Preferentemente, el ligando es sintético, es decir, no se produce de manera natural.

Ligando(s) preferido(s) son aquellos que tienen actividad biológica mínima o ninguna actividad biológica distinta de la activación de RASSL.

55 Cualquier molécula pequeña, preferentemente una molécula pequeña sintética, que puede unirse dentro de los dominios transmembrana de un RASSL y facilita la activación mediada por RASSL de una familia deseada de proteínas G, es adecuada para su uso en el método de activación dirigida de la invención. Al contrario de los ligandos de péptido naturales de receptores acoplados a proteína G que normalmente tienen pesos moleculares de 2000-6000 Da, los ligandos de molécula pequeña de receptores acoplados a proteína G tendrán generalmente pesos moleculares de 100-1000 Da.

60 Moléculas pequeñas sintéticas en la presente invención incluyen moléculas pequeñas sintéticas generadas mediante o bien un medio natural (por ejemplo, aisladas de una línea celular recombinante) o medio químico (por ejemplo, usando procesos químicos orgánicos o inorgánicos).

65 El ligando tendrá generalmente un peso molecular y una carga iónica neta que permite que atraviese la barrera



hemoencefálica tras administración oral o parenteral (por ejemplo, intravenosa). Normalmente las moléculas que atraviesan la barrera hemoencefálica están menos cargadas que las moléculas de péptido. Pueden prepararse fármacos sintéticos que atraviesan o no atraviesan la barrera hemoencefálica dependiendo del número de grupos cargados en la molécula (véase, por ejemplo, Freidinger, 1993, Prog. Drug Res. 40:33-98). Moléculas más pequeñas, por ejemplo, menos de 4000 Da, tienen mayor probabilidad de atravesar la barrera hemoencefálica.

Varias moléculas pequeñas sintéticas que se unen a y activan receptores acoplados a proteína G nativa son conocidas en la técnica y son útiles en la presente invención. Moléculas pequeñas sintéticas adicionales adecuadas para su uso en la presente invención pueden identificarse mediante la selección de compuestos candidatos para la unión a receptores acoplados a proteína G nativa o a RASSL. Por ejemplo, evaluando la electrofisiología de canal y midiendo potenciales de membrana de neuronas cultivadas, como se ha descrito anteriormente. En particular, una línea celular que expresa (o transfectada con) un RASSL y canales de potasio asociados de interés, y se expone a concentraciones variables de un compuesto que va a someterse a prueba para determinar la unión de RASSL. La unión de RASSL se detecta mediante inducción de hiperpolarización de membrana e inhibición neuronal (11) con la exposición al compuesto de prueba, pero no en presencia de un compuesto de control que no se une al RASSL y/o no induce activación celular.

En una realización preferida el ligando es clozapina-N-óxido (CNO), que es un metabolito de clozapina. Este puede administrarse mediante varias vías, como se describe en el presente documento, incluyendo por vía bucal o intranasal.

Otro ligando preferido es perlapina, que se une a hM3Dq (27). Puesto que los sitios de unión de hM3Dq y hM4Di son altamente similares, puede esperarse igualmente que se una a hM4Di.

## Trastornos

La invención se usa en el tratamiento de un trastorno convulsivo que es epilepsia focal, por ejemplo, epilepsia idiopática, sintomática y criptogénica. Los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para extinguir o bloquear la actividad epileptógena. Los métodos pueden usarse para elevar el umbral de convulsiones en el cerebro o tejido neuronal de un paciente que lo necesita, o reducir el estallido epiléptico en las células cerebrales del paciente.

Los métodos químicos-genéticos combinados (también conocidos como quimiogenéticos) de la presente invención son particularmente adecuados para el tratamiento de epilepsia focal humana, para la supresión de convulsiones de manera específica de la región y del tiempo.

El paciente puede ser aquel que ha sido diagnosticado con epilepsia focal bien definida que afecta a una única área de la neocorteza del cerebro. La epilepsia focal puede surgir, por ejemplo, de anomalías del desarrollo o tras accidentes cerebrovasculares, tumores, lesiones o infecciones cerebrales penetrantes.

Sin embargo, la invención puede usarse también para tratar múltiples focos epilépticos simultáneamente mediante inyección directamente en los múltiples locus identificados.

El paciente puede ser aquel que ha sido diagnosticado con epilepsia resistente a fármacos o resistente al tratamiento farmacológico, lo que significa que las convulsiones epilépticas continúan a pesar de una administración adecuada de fármacos antiepilépticos.

El paciente puede ser aquel que está bajo un tratamiento existente con fármacos antiepilépticos, teniendo el método el fin de permitir que se interrumpa el tratamiento existente o que se reduzca el régimen farmacológico.

El paciente puede ser aquel que ha sido diagnosticado con epilepsia parcial continua.

Los tratamientos de la presente invención tienen particular utilidad cuando es indeseable una reducción permanente en la excitabilidad neuronal (como podría conseguirse con la sobreexpresión de canales de potasio, por ejemplo), por ejemplo debido a que representa un riesgo demasiado grande para una función cerebral normal. Aunque la zona epileptógena es responsable en las regiones corticales de la función del lenguaje o motora, no se produciría ningún efecto sobre estas funciones excepto cuando se administrara el ligando. Es probable que pacientes con epilepsia focal intratable consideren esto un efecto adverso aceptable.

Aunque la invención tiene una utilidad particular para trastornos convulsivos caracterizados por aparición focal, tal como epilepsia del lóbulo temporal y epilepsia neocortical focal, puede aplicarse a formas más generalizadas de epilepsia, en particular como indicación de segunda línea. En estos casos la diana para la administración se elegirá según sea apropiado para la afección, por ejemplo, la administración puede ser bilateral en el tálamo. Por lo tanto, otros trastornos en los que puede aplicarse la invención incluyen espasmos infantiles, convulsiones mioclónicas y "motoras menores", así como convulsiones tónico-clónicas y convulsiones parciales complejas.

Además, en principio, la invención podría usarse de manera profiláctica provocando la alteración continua de la excitabilidad neuronal durante un periodo fijo con el fin de "reiniciar" circuitos epileptógenos en algunas circunstancias, provocando una reducción persistente en las convulsiones que dure más que la administración del ligando.

5 *Administración y dosificación*

10 La mayoría de los pacientes con epilepsia tienen un patrón estereotipado de actividad extendido como resultado de un foco epileptógeno. La invención puede aplicarse por lo tanto de manera profiláctica (por ejemplo, hasta 30 minutos antes) para suprimir la actividad anómala antes de que se extienda, o para truncarla de manera temprana en su evolución. Además, debido a que con frecuencia se producen convulsiones en racimos, los pacientes pueden tomar, si se desea, el ligando cuando comienza un racimo.

15 El ligando podría administrarse por un cuidador.

20 El ligando podría administrarse automáticamente mediante un dispositivo que se acopló con un mecanismo de detección de convulsiones automatizado. Por ejemplo, administración a demanda podría usarse con bombas subcutáneas (tal como se usa para administrar insulina (23; 25)). La evidencia reciente de que las convulsiones pueden predecirse mediante análisis de EEG automatizado (22) proporciona la opción de usar un dispositivo de bucle cerrado para administrar el ligando.

25 El término "tratamiento", como se usa en el contexto del tratamiento de una afección, se refiere en general al tratamiento y la terapia de un ser humano, en el que se consigue algún efecto terapéutico deseado, por ejemplo, la inhibición del progreso de la afección, e incluye una reducción en la velocidad de progreso, un alto en la velocidad de progreso, la regresión de la afección, la mejora de la afección y la cura de la afección. El tratamiento como medida profiláctica (es decir, profilaxis, prevención) también se incluye.

El ligando puede administrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz.

30 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad del receptor o ligando que es eficaz para producir algún efecto terapéutico deseado, proporcionado con una relación beneficio/riesgo razonable, cuando se administra de acuerdo con un régimen de tratamiento deseado.

35 De manera similar, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad del receptor o ligando que es eficaz para producir algún efecto profiláctico deseado, proporcionado con una relación beneficio/riesgo razonable, cuando se administra de acuerdo con un régimen de tratamiento deseado.

40 "Profilaxis" en el contexto de la presente memoria descriptiva no se entenderá que circunscribe un éxito completo, es decir, protección completa o prevención completa. Más bien, profilaxis en el presente contexto se refiere a una medida que se administra antes de la detección de una afección sintomática con el fin de preservar la salud ayudando a retrasar, mitigar o evitar esa afección particular.

45 Si bien es posible que el ligando se use (por ejemplo, se administre) solo, es con frecuencia preferible presentarlo como composición o formulación, por ejemplo, con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

50 El término "farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos, ingredientes, materiales, composiciones, formas farmacéuticas, etc., que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos del sujeto en cuestión (por ejemplo, un ser humano) sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acordes con una relación beneficio/riesgo razonable. Cada vehículo, diluyente, excipiente, etc. también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación.

55 En algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica (por ejemplo, formulación, preparación, medicamento) que comprende, o que consiste esencialmente en, o que consiste en un único principio activo, un ligando como se describe en el presente documento, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

60 Como se describe en el documento WO2008096268, en realizaciones de terapia génica que emplean administración viral del receptor modificado, la dosis unitaria puede calcularse en cuanto a la dosis de partículas virales que se administran. Dosis virales incluyen un número particular de partículas de virus o unidades formadoras de placas (ufp). Para realizaciones que implican adenovirus, dosis unitarias particulares incluyen  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$  o  $10^{14}$  ufp. Las dosis de partículas pueden ser algo mayores (de 10 a 100 veces) debido a la presencia de partículas defectuosas de la infección.

65 En algunas realizaciones los métodos o tratamientos descritos en el presente documento pueden combinarse con

otras terapias, ya sean sintomáticas o de modificación de la enfermedad.

El término "tratamiento" incluye tratamientos combinados y terapias, en las que se combinan dos o más tratamientos o terapias, por ejemplo, de forma secuencial o simultánea.

5 Por ejemplo, puede ser beneficioso combinar el tratamiento con un compuesto tal como se describe en el presente documento con uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4) agentes o terapias distintos.

10 Ejemplos apropiados de agentes coterapéuticos serán conocidos por los expertos en la materia basándose en la divulgación en el presente documento. Normalmente, el agente coterapéutico puede ser cualquiera conocido en la técnica que se cree que puede proporcionar efecto terapéutico en el tratamiento de enfermedades que se describen en el presente documento, objeto para el diagnóstico del individuo que se está tratando. Por ejemplo, la epilepsia puede algunas veces mejorarse mediante tratamiento directo de la etiología subyacente, pero fármacos anticonvulsivos, tales como fenitoína, gabapentina, lamotrigina, levetiracetam, carbamazepina y clobazam, y topiramato y otros que suprimen las descargas eléctricas anómalas y convulsiones, son el pilar del tratamiento convencional (Rho & Sankar, 1999, *Epilepsia* 40: 1471-1483).

20 La combinación particular sería a criterio del médico que seleccionaría también dosificaciones usando su conocimiento general común y regímenes de dosificación conocidos por un facultativo experto.

25 Los agentes (es decir, el receptor modificado y ligando, más uno o más agentes distintos) puede administrarse de manera simultánea o secuencial, y puede administrarse en programas de dosis variables individualmente y a través de diferentes vías. Por ejemplo, cuando se administra secuencialmente, los agentes pueden administrarse a intervalos estrechamente espaciales (por ejemplo, durante un periodo de 5-10 minutos) o a intervalos más largos (separados por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más horas, o periodos incluso más largos cuando se requiere), siendo el régimen de dosificación preciso acorde a las propiedades del/de los agente(s) terapéutico(s).

#### *Definiciones seleccionadas*

30 "Unión de receptor-ligando", "unión de ligando", y "unión" se usan indistintamente en el presente documento para expresar la interacción física entre un receptor (por ejemplo, un receptor acoplado a proteína G) y un ligando (por ejemplo, un ligando natural, (por ejemplo, ligando de péptido) o ligando sintético (por ejemplo, ligando de molécula pequeña sintético)). La unión de ligando puede medirse mediante varios métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, detección de asociación con un ligando marcado de manera radioactiva).

35 "Señalización" significa la generación de una respuesta bioquímica o fisiológica como resultado de una unión de ligando (por ejemplo, como resultado de unión de ligando sintético a un receptor acoplado a proteína G).

40 "Activación de receptor", "activación de RASSL", y "activación de receptor acoplado a proteína G" se usan indistintamente en el presente documento para expresar la unión de un ligando (por ejemplo, ligando natural o sintético) a un receptor de manera que provoca señalización mediada por proteína G, y una respuesta fisiológica o bioquímica asociada con la señalización mediada por proteína G. La activación puede medirse midiendo una señal biológica asociada con señales relacionadas con proteína G (por ejemplo usando electrofisiología).

45 "Activación celular dirigida" y "activación de células diana" se usan indistintamente en el presente documento para expresar activación mediada por RASSL de una respuesta fisiológica mediada por proteína G específica en una célula diana, donde la activación mediada por RASSL se produce mediante la unión de una molécula pequeña sintética al RASSL. Como se usa en el presente documento, la activación celular incluye respuestas *inhibidoras* tales como silenciamiento sináptico o inhibición.

50 "Ligando natural" y "ligando que se produce de manera natural" y "ligando endógeno" de un receptor acoplado a proteína G nativo se usan indistintamente en el presente documento para expresar una biomolécula endógena para un hospedador mamífero, biomolécula que se une a un receptor acoplado a proteína G nativo para provocar una respuesta celular acoplada a proteína G. Un ejemplo es acetilcolina.

55 "Molécula pequeña sintética", "ligando de molécula pequeña sintética", "ligando sintético", y "agonista sintético" y similares se usan indistintamente en el presente documento para expresar cualquier compuesto preparado de manera exógena por medios naturales o químicos que pueden unirse dentro de los dominios transmembrana de un receptor acoplado a proteína G o receptor acoplado a proteína G modificado (es decir, RASSL) y facilitan la activación del receptor y activación concomitante de una familia deseada de proteínas G.

60 "Transformación" significa un cambio genético transitorio o permanente inducido en una célula tras la incorporación de nuevo ADN (es decir, ADN exógeno para la célula). Cuando la célula es una célula de mamífero, un cambio genético permanente se consigue generalmente mediante la introducción del ADN en el genoma de la célula.

65 "Promotor" significa una secuencia de ADN mínima suficiente para dirigir la transcripción de una secuencia de ADN

a la que está operativamente unida. "Promotor" pretende abarcar también aquellos elementos promotores suficientes para la expresión génica dependiente de promotor controlable para agentes específicos de tipo celular, específicos de tejido o inducibles por señales externas o agentes; dichos elementos pueden estar ubicados en las regiones 5' o 3' del gen natural.

5

#### *Variantes de ácidos nucleicos*

Los expertos en la materia entenderán que variantes funcionales derivadas de las secuencias comentadas en el presente documento (véase la SEQ ID 1 en el anexo de secuencias) anteriormente pueden emplearse igualmente en la presente invención.

10

Derivados funcionales preferidos del agente incluyen proteínas que pueden comprender mutaciones (con respecto al tipo natural) que no obstante no alteran la actividad del agente. De acuerdo con la presente invención, cambios adicionales preferidos en el agente se conocen comúnmente como sustituciones "conservadoras" o "seguras". Las sustituciones de aminoácidos conservadoras son aquellas con aminoácidos que tienen propiedades químicas suficientemente similares, con el fin de conservar la estructura y la función biológica del agente. Es evidente que inserciones y deleciones de aminoácidos pueden realizarse también en las secuencias definidas anteriormente sin alterar su función, en particular si las inserciones o deleciones implican solamente unos pocos aminoácidos, por ejemplo menos de diez y preferentemente menos de cinco, y no eliminan o desplazan aminoácidos que son críticos para la confirmación funcional del agente. La bibliografía proporciona muchos modelos en los que la selección de sustituciones de aminoácidos conservadoras pueden realizarse basándose en estudios estadísticos y fisicoquímicos sobre la secuencia y/o la estructura de una proteína natural.

15

20

Se apreciará por el técnico experto que derivados funcionales del aminoácido, y secuencias de ácido nucleico, desvelados en el presente documento, pueden tener una secuencia que tiene al menos el 30 %, preferentemente el 40 %, más preferentemente el 50 %, e incluso más preferentemente, el 60 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos/polipéptido/ácido nucleico de cualquiera de las secuencias a las que se hace referencia en el presente documento. Una secuencia de aminoácidos/polipéptido/ácido nucleico con una identidad superior a preferentemente el 65 %, más preferentemente el 75 %, incluso más preferentemente el 85 %, e incluso más preferentemente el 90 % con cualquiera de las secuencias a las que se hace referencia, también se prevé. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos/polipéptido/ácido nucleico tiene el 92 % de identidad, incluso más preferentemente el 95 % de identidad, incluso más preferentemente el 97 % de identidad, incluso más preferentemente el 98 % de identidad y, lo más preferentemente, el 99 % de identidad con cualquiera de las secuencias a las que se hace referencia.

25

30

35

En cada caso, el receptor modificado conservará las propiedades en los términos definidos anteriormente por ejemplo actividad celular dirigida en presencia del agonista, pero no el ligando natural.

40

45

50

El cálculo de identidades en porcentaje entre diferentes secuencias de aminoácidos/polipéptido/ácido nucleico puede llevarse a cabo tal como sigue. Un alineamiento múltiple se genera en primer lugar por el programa ClustalX (parámetros por parejas: abertura de hueco 10,0, extensión de hueco 0,1, matriz de proteína Gonnet 250, matriz de ADN IUB; parámetros múltiples: abertura de hueco 10,0, extensión de hueco 0,2, secuencias divergentes de retardo 30 %, peso de transición de ADN 0,5, matriz negativa desactivado, matriz de proteína serie Gonnet, peso de ADN IUB; parámetros de hueco de proteína, penalizaciones específicas de residuo activado, penalizaciones hidrófilas activado, residuos hidrófilos GPSNDQERK, distancia de separación de huecos 4, separación de huecos final desactivado). La identidad en porcentaje se calcula entonces a partir del alineamiento múltiple como  $(N/T) \times 100$ , donde N es el número de posiciones en las que las dos secuencias comparten un residuo idéntico, y T es el número total de posiciones comparadas. Como alternativa, la identidad en porcentaje puede calcularse como  $(N/S) \times 100$  donde S es la longitud de la secuencia más corta que se está comparando. Las secuencias de aminoácidos/polipéptido/ácido nucleico pueden sintetizarse *denovo*, o puede ser una secuencia de aminoácidos/polipéptido/ácido nucleico natural, o un derivado de las mismas.

55

60

65

Debido a la degeneración del código genético, es evidente que cualquier secuencia de ácido nucleico podría variarse o cambiarse sin afectar sustancialmente la secuencia de la proteína de agente codificada de ese modo, para proporcionar una variante funcional de la misma. Variantes de nucleótido adecuadas son aquellas que tienen una secuencia alterada por la sustitución de diferentes codones que codifican el mismo aminoácido dentro de la secuencia, produciendo así un cambio silencioso. Otras variantes adecuadas son aquellas que tienen secuencias de nucleótidos homólogas pero que comprenden todas, o partes de, las secuencias que se alteran mediante la sustitución de diferentes codones que codifican un aminoácido con una cadena lateral de propiedades biofísicas similares con respecto al aminoácido que sustituye, para producir un cambio conservador. Por ejemplo, aminoácidos hidrófobos, no polares pequeños incluyen glicina, alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina y metionina. Aminoácidos hidrófobos, no polares grandes incluyen fenilalanina, triptófano y tirosina. Los aminoácidos neutros polares incluyen serina, treonina, cisteína, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen lisina, arginina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

Todos los subtítulos en el presente documento se incluyen solo por comodidad, y no deben interpretarse como que limitan la divulgación de ninguna manera.

La invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a las siguientes Figuras y Ejemplos no limitantes.  
5 Otras realizaciones de la invención se les ocurrirán a los expertos en la técnica a la luz de estas.

### **Figuras (de ref. 26)**

10 **Fig. 1. Silenciamiento químico-genético de convulsiones inducidas por pilocarpina. (a)** Espectros de EEG de ondículas de Morlet de una rata a la que se ha administrado pilocarpina intracortical (tiempo 0), o bien con vehículo intraperitoneal (parte superior) o CNO (parte inferior). **(b)** Segmento de EEG de (a, parte superior), que muestra picos simples (SS), picos complejos (CS) y pases de actividad de frecuencia intermedia (IF) (expandido a continuación). **(c)** Convulsiones de comportamiento correlacionadas con EEG. La actividad de SS se asoció con convulsiones no motoras (puntuación de gravedad 0) o espasmos de extremidad, cabeza o cuerpo (puntuación 1), mientras que la IF se asoció con sacudidas de cabeza o cuerpo repetitivas (puntuación 2) o encabritamiento, locomoción retrógrada y convulsiones generalizadas (3). Seiscientos intervalos de 4 s consecutivos por rata se evaluaron en tres ratas (enumeradas 1-3). **(d)** Detección de actividad de frecuencia intermedia (IF) mediante transformación de Fourier: Transformada de Fourier (derecha) de segmentos de EEG en una rata que muestra o bien actividad de SS (negro) o bien IF (rojo) (dos periodos de 5 s mostrados a la izquierda) inducida por pilocarpina. La transformada de Fourier de IF muestra un pico alrededor de 7 Hz (y un armónico a 14 Hz). **(e)** Evolución temporal de la frecuencia de pico (izquierda), potencia 4-14 Hz (centro), y número de pases de IF (derecha), en ensayos en vehículo (rojo) y CNO (azul) (intervalos de 10 min consecutivos antes (-10-0 min) y después de inyección de pilocarpina y vehículo/CNO). N=6 ratas (10 parejas de ensayos, promediadas entre ratas cuando se repite, los datos se muestran como  $\text{media} \pm \text{e.e.m.}$ ). **(f)** Mismos datos que en e, pero representados como parámetros de convulsiones electrográficas acumulativos (frecuencia, potencia, número de acontecimientos de IF), comparando vehículo frente a CNO para cada animal (indicado por color). Los símbolos indican parámetros acumulativos consecutivos a intervalos de 10 min. La línea de 45 grados (gris) indica la equivalencia de CNO y vehículo.

30 **Fig. 2. Silenciamiento químico-genético de convulsiones inducidas por picrotoxina. (a)** Espectros de potencia de ondículas de Morlet de EEG en un animal al que se ha inyectado picrotoxina en el tiempo 0 (1 mm por debajo de pia, 10 mM, 300 nl), junto con vehículo intraperitoneal (parte superior) o 1 mg ml<sup>-1</sup> de CNO en vehículo (parte inferior) en días consecutivos. **(b)** Actividad de EEG. Parte inferior, secciones expandidas de los tiempos indicados (duración 2 s) que muestran actividad de SS, CS y IF. **(c)** Las convulsiones motoras fueron más graves en asociación con la actividad de IF que con la actividad de SS, e intermedias con la actividad de CS (escala de gravedad tal como en la Fig. 2c). Seiscientos intervalos de 4 s consecutivos por rata se evaluaron en tres ratas (enumeradas 1-3). **(d)** Transformada de Fourier (derecha) de trazados de 5 s visualizados (izquierda, centro) que contienen actividad de SS (negro) y de IF (4-14 Hz, pico alrededor de 11,5 Hz; rojo) inducida por picrotoxina. **(e)** Evolución temporal de la frecuencia de pico (izquierda), potencia 4-14 Hz (centro), y número de pases de IF (derecha), en ensayos en vehículo (rojo) y CNO (azul) (intervalos de 10 min consecutivos antes (-10-0 min) y después de inyección de picrotoxina y vehículo/CNO). N=5 ratas (12 parejas de ensayos, promediadas entre ratas cuando se repite,  $\text{media} \pm \text{e.e.m.}$ ). **(f)** Mismos datos que en e, pero representados como parámetros de convulsiones electrográficas acumulativos para cada animal como en la Fig. 2e.

45 **Fig 3. Silenciamiento químico-genético de epilepsia neocortical focal inducida por toxina tetánica. (a)** Trazados de EEG de muestras de un animal inyectado con toxina tetánica, que muestra la actividad inicial (1) y cuatro tipos de actividad epileptiforme: "acontecimientos largos de baja amplitud" (2), "acontecimientos cortos de alta amplitud" (3), "acontecimiento largo de alta amplitud" (4), y "alta amplitud más picos intermitentes" (5). **(b-d)** Comparación por parejas de la frecuencia de acontecimientos epileptiformes (b), línea de costa (c) y potencia de alta frecuencia (d) entre ensayos con vehículo y CNO. N=6 ratas; 15 parejas de ensayos, promediado dentro del animal cuando se repitió. Las barras naranjas indican la disminución (%; eje derecho), cuando era significativo (prueba de Wilcoxon;  $P < 0,05$ ).

55 **Fig. 4. | Expresión y tolerabilidad de HA-hM4Di-mCitrina. (a)** Expresión de HA-hM4Di-mCitrina en capas más profundas de la corteza motora primaria derecha (M1), visualizado con anticuerpo anti-HA. Escala, 100  $\mu\text{m}$ . **(b)** Colocalización de CamKII  $\alpha$ -HA-hM4Di-mCitrina, visualizado con anticuerpos anti-HA (izquierda) y anticuerpos anti-CamKIIa (centro), y ambos anticuerpos (derecha). Escala, 20  $\mu\text{m}$ . **(c)** Coordinación motora con (derecha) y sin (izquierda) inyección intraperitoneal de CNO en ratas que reciben inyección de placebo (barra izquierda) o HA-hM4Di-mCitrina en M1 derecha (barras centrales y derechas). Fallos de pie para la extremidad superior izquierda (contralateral con respecto a HA-hM4Di-mCitrina) se compararon con la extremidad superior derecha (ipsilateral) (prueba de la t para datos emparejados) y con fallos de pie de la extremidad superior izquierda de animales inyectados con placebo (prueba de la t no emparejados;  $\text{media} \pm \text{e.e.m.}$ , n=5 operadas con placebo y 7 ratas inyectadas con hM4). NS:  $P > 0,05$ .

65 **Fig 5. Mapa de vector viral (AAV) en (plásmido: 5421-8155 pb) usado para administrar hM4Di, como se explica en los ejemplos a continuación.**

## Ejemplos

### Ejemplo 1 - demostración de terapia química-genética en un modelo de epilepsia

5

#### *Introducción y visión de conjunto*

Se ha demostrado un enfoque químico-genético combinado para conseguir la supresión localizada de excitabilidad neuronal en un foco de convulsiones, usando expresión viral de un DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs). Neuronas transducidas con un DREADD no se ven afectadas en principio en ausencia del ligando selectivo, y neuronas no transducidas se ven afectadas solamente cuando el ligando está presente, evitando de este modo la alteración permanente de sus propiedades (10).

Se seleccionó el receptor muscarínico humano acoplado a Gi modificado por ingeniería genética hM4Di, que se ha sensibilizado al metabolito oralmente biodisponible y normalmente inerte de clozapina, clozapina-N-óxido (CNO) (11, 12). Cabe destacar que, hM4Di es relativamente insensible a acetilcolina, el agonista endógeno del receptor original. La activación de hM4Di conduce a la apertura de los canales de potasio de rectificación interna abiertos por proteína G, dando como resultado la hiperpolarización de membrana e inhibición neuronal (11).

La administración sistémica de CNO suprimió convulsiones focales provocadas por dos quimioconvulsivos diferentes, pilocarpina y picrotoxina. CNO tuvo también un efecto anticonvulsivo robusto en un modelo crónico de epilepsia neocortical focal. La atenuación de convulsiones químico-genéticas proporciona un enfoque novedoso para tratar epilepsia focal intratable mientras se minimiza el trastorno de la función de circuito normal en regiones cerebrales no transducidas o en ausencia del ligando específico.

25

#### **Materiales y métodos**

**Virus adenoasociado** de serotipo 5 que contiene un casete de Camk2 $\alpha$ -HA-hM4D(Gi)-IRES-mCitrina proporcionado por Dr. Bryan Roth (Universidad de Carolina del Norte) 12 se obtuvieron del UNC Vector Core a una concentración de 8x10 unidades infecciosas (UI)/ml. Para experimentos de control se inyectó un virus similar que expresaba el silenciador optogenético ArchT en lugar del silenciador químico-genético hM4Di (AAV5-Camk2 $\alpha$ -ArchT-GFP).

**Cirugía estereotáctica.** Los experimentos con animales se realizaron de conformidad con la Ley de 1986 (Métodos Científicos con Animales). Ratas Sprague-Dawley macho (6 -12 semanas de edad, 263-325 g) se anestesiaron usando isoflurano y se colocaron en un marco estereotáctico (Kopf, CA). Se inyectaron 1,5  $\mu$ l de virus AAV5 que expresa hM4Di a una velocidad de 100 nl/min en la capa 5 del área de extremidad superior de corteza motora primaria derecha (coordenadas, 2,2 - 2,4 mm lateral y 1,0 mm anterior del bregma a una profundidad de 1,0 mm con respecto a la pia; en algunas ratas la mitad del volumen en cada caso se depositó a 1,1 y a 0,7 mm desde la pia). Un transmisor de EEG (A3019D, Open Source Instruments (13)) se implantó por vía subcutánea con un electrodo de registro intracraneal subdural situado por encima del sitio de inyección. Un electrodo de referencia se implantó en el cráneo contralateral. Para inyecciones secuenciales de quimioconvulsivos se implantó una guía de cánula de teflón (C313GT/SP, PlasticsOne) por encima del sitio de inyección. Para experimentos de epilepsia crónica, se inyectaron 12 - 16 ng de toxina tetánica (obsequio de Dr G. Schiavo) junto con virus AAV5 que expresa hM4Di en un volumen final de 1,6 - 1,8  $\mu$ l. Los animales se alojaron por separado en jaulas Faraday y se registraron EEG continuamente durante hasta 8 semanas después de la cirugía.

**Modelos de convulsiones.** Pilocarpina (5 M es salino estéril) o picrotoxina (10 mM en DMSO 10 %/salino estéril) se inyectaron a través de la guía de cánula de teflón implantada previamente 17 - 52 días después de la inyección de hM4Di AAV. El volumen inyectado se ajustó entre 200 y 900 nl para pilocarpina y 100 - 600 nl para picrotoxina, guiado por la gravedad de las convulsiones resultantes en cada animal, y se mantuvieron constantes entre ensayos con CNO y vehículo emparejados. CNO (1 mg/kg, diluido 1 mg/ml en DMSO al 1 %/vehículo de salino) o vehículo solo se inyectaron por vía intraperitoneal inmediatamente después de la infusión convulsiva. Las puntas-ondas se desarrollaron en el plazo de 5 minutos de inyección quimioconvulsiva.

**Modelo de epilepsia.** TeTx (12 - 16 ng) inyectado en una suspensión con el virus que expresa hM4Di (véase anteriormente), provocó acontecimientos de alta frecuencia (70 - 160 Hz) que duraban normalmente menos de 1 segundo, que comenzaban en el plazo de 4 días. Tales acontecimientos se produjeron durante al menos 8 semanas después de la inyección, pero su frecuencia varió de día en día, y también dependiendo de la hora del día. Por lo tanto, se emparejaron ensayos de CNO/vehículo de acuerdo con la hora del día, y se fijó un criterio de que al menos 2 acontecimientos por hora se hubieran producido en promedio durante las 4 horas anteriores a las primeras inyecciones de CNO o vehículo para que el ensayo se incluyera en el conjunto de datos. El orden de ensayos de CNO y de vehículo emparejados se aleatorizó. Vehículo (1 % de DMSO/salino) o CNO (1 mg/kg en DMSO/salino) se inyectó dos veces en intervalos de 2 horas, y se analizaron periodos que duraban 3,5 horas después de la primera inyección.

65

**Análisis de EEG.** Se registraron EEG y se procesaron usando la herramienta Neuroarchiver (Open Source

Instruments) e IgorPro (Wavemetrics, Inc). El trazado se centró alrededor de 0 V restando el promedio. Artefactos cortos (< 100 ms), de amplitud alta ("problemas técnicos") detectados por el umbral y periodos con fallo de transmisión se eliminaron. La secuencia de comandos Igor "UnipolarPeakAreas.ipf" se usó para detectar desviaciones negativas individuales (puntas-ondas), y secuencias de comandos adaptadas en Igor extrajeron su frecuencia así como la línea de costa y la potencia del trazado. La línea de costa se determinó como la suma de la diferencia absoluta entre puntos sucesivos. Las épocas de EEG se exportaron también en Labview (National Instruments) para calcular los espectros de potencia de ondículas de Morlet.

Para establecer una correlación entre diferentes tipos de patrones de EEG y comportamiento, se compararon registros de vídeo continuos con trazados de EEG. Puntas-ondas sencillas o complejas se contaron individualmente (mediante desviación), pero los episodios de frecuencia intermedia continua y coherente y actividad se contaron como un acontecimiento por episodio. Se clasificaron las convulsiones motoras en una escala de gravedad tal como sigue: 0 (sin convulsión motora obvia), 1 (espasmos de articulación superior contralateral), 2 (sacudidas repetidas de extremidad superior, cabeza o cuerpo), 3 (sacudidas de todo el cuerpo, arqueos y encabritamiento a veces acompañados de caminar hacia atrás).

**Recuento automatizado de acontecimientos epileptiformes.** Para acontecimientos epilépticos inducidos por toxina tetánica, el acortamiento de acontecimiento se explica en la ref. (7). Una descripción más completa del algoritmo de detección de convulsiones con código fuente se encuentra disponible en: [http://www.open-sourceinstruments.com/Electronics/A3018/Seizure\\_Detection.html#Similarity%20of%20Events](http://www.open-sourceinstruments.com/Electronics/A3018/Seizure_Detection.html#Similarity%20of%20Events). Oscilaciones de frecuencia intermedia (IF) provocadas por picrotoxina o pilocarpina se detectaron usando la transformada de Fourier rápida de segmentos de EEG de 3 segundos en el intervalo de 5 - 14 Hz (véase también la Fig. 1d). La ventana de 3 segundos se movió a lo largo del trazado en etapas de 1 segundo. Los acontecimientos de IF se definieron como periodos en los que la magnitud de pico entre 5 - 14 Hz superaba un umbral de 20 - 45 mV, dependiendo de la intensidad global de la actividad. Los umbrales se mantuvieron constantes dentro de cada pareja emparejada de ensayos de CNO/vehículo.

**Análisis estadístico** Pruebas de la t para datos emparejados o pruebas de Wilcoxon se realizaron según fue apropiado usando SPSS 20 (IBM). Para modelos de convulsiones, el tiempo experimental se dividió hasta en p periodos de 10 minutos incluyendo los 10 minutos antes de la inyección así como siete periodos de 10 minutos consecutivos tras la inyección.

**Análisis de fluorescencia e inmunohistoquímicos.** Se extirparon los cerebros y se dejaron en 4 % de PFA/PBS durante 3-7 días a 4 °C y entonces se lavaron en PBS. Se realizaron cortes frontales (50 y 100 µm de espesor) en un cortador vibratorio y se examinaron para determinar la expresión de mCitrina natural justo después de cortar para cada rata, contribuyendo al conjunto de datos. Algunos de los cortes de 50 µm se procesaron adicionalmente: Se permeabilizaron en PBS, 0,15 % de Triton X-100 durante 20 minutos, se bloquearon con 10 % de suero de caballo (Vector Labs) durante una 1 hora en un agitador, y se incubaron durante 2 días en anticuerpos primarios frente a CaMKIIα (conejo, 1:500, Epitomics/Abcam), y hemaglutinina (HA; ratón, 1:1000, Covance). Después de tres lavados adicionales en PBS (10 min), las secciones se incubaron en anticuerpos secundarios (1:500, Invitrogen, se marcaron con Alexa-488, y Alexa-546) durante la noche a 4 °C, se lavaron en PBS de nuevo (4 veces, 10 min) y se montaron en Vectashield (Vector Labs). Se obtuvieron imágenes con un microscopio confocal a un aumento de 25x del objetivo y amplificación digital 3x.

## Resultados

### *Silenciamiento químico-genético de convulsiones agudas inducidas por pilocarpina*

Para someter a prueba la capacidad del DREADD para modificar la actividad convulsiva, se inyectó un virus adenoasociado que codifica hM4Di bajo el promotor de *CaMk2A* (AAV5-CaMKIIa-HA-hM4D(Gi)IRES-mCitrina) en el área de extremidad superior de la corteza motora primaria (M1) de ratas de 263 - 325 g con anestesia con isoflurano. Al mismo tiempo se implantó una guía de cánula de teflón (Plastics1) por encima del sitio de inyección para permitir la administración de quimioconvulsivos, y un transmisor subcutáneo (Open Source Instruments, Inc.) con el conductor activo superpuesto a M1 para el registro inalámbrico de EEG. El transmisor muestrea el EEG a 512 Hz continuamente durante varias semanas (13). La expresión de hM4Di (fig. 4) no tuvo efectos perceptibles sobre el comportamiento o uso de extremidades, y se confirmó mediante microscopía de fluorescencia para todas las ratas sacrificadas después de 3-20 semanas.

En primer lugar se examinaron convulsiones provocadas de forma aguda mediante inyección de quimioconvulsivo en la capa 5 de la corteza motora 17 - 52 días tras inyección de hM4Di AAV. Pilocarpina (200 - 900 nl, 5 M) inyectada a través de la guía de cánula implantada (1,6 -2,0 mm desde la pia) provocó desviaciones de punta-onda de amplitud grande a una frecuencia entre 0,5 y 2 Hz, empezando en el plazo de 5 minutos de inyección y durando entre 45 y 90 minutos (Fig. 1a,b). Los complejos punta-onda o bien tenían un único pico negativo (puntas "simples", SS) o presentaban uno o más hombros (poli-punta-ondas o puntas "complejas", CS; Fig. 1b). Se intercalaron con pases de descargas de frecuencia intermedia (IF) (5 - 12 Hz) que duraban 0,2 - 12 segundos, que normalmente tenían una amplitud más pequeña (Fig. 1b). Las descargas de IF estaban correlacionadas con convulsiones motoras en el

extremo más alto de una escala de gravedad. Esta oscilaba desde convulsiones motoras breves (puntuación de gravedad 0), hasta espasmos de cabeza o cuerpo (puntuación 1), sacudidas repetidas de cabeza o cuerpo (puntuación 2), hasta encabritamiento, locomoción retrógrada y convulsiones generalizadas (puntuación 3) (Fig. 1c). Se usó por lo tanto la potencia de EEG en una banda de frecuencia solapante (4 - 14 Hz) como marcador sustituto para evaluar el efecto anticonvulsivo de la activación de hM4Di.

Se intercalaron aleatoriamente experimentos en días alternos en los que se administró o bien CNO (1 mg/kg en DMSO/vehículo de salino) (12), o vehículo solo, mediante inyección intraperitoneal inmediatamente después de infusión de pilocarpina neocortical focal. En ensayos de CNO, se redujeron sustancialmente las convulsiones tanto electrográficas como motoras (14 parejas de ensayos en 6 ratas). Pruebas de la t de datos emparejados que comparaban o bien la frecuencia media de desviaciones negativas en el EEG, la potencia media 4 - 14 Hz, o el número de pases de IF que se correlacionan con convulsiones motoras graves (Fig. 1c), revelaron una disminución significativa para una mayoría de los depósitos de 10 min consecutivos usados para analizar datos (Fig. 1e, f).

#### 15 *Silenciamiento químico-genético de convulsiones agudas inducidas por picrotoxina*

CNO suprimió profundamente las convulsiones desencadenadas por pilocarpina. Sin embargo, la interpretación de este efecto anticonvulsivo se confunde potencialmente por un solapamiento de cascadas de señalización aguas abajo de pilocarpina que actúan sobre receptores muscarínicos y CNO que actúa sobre hM4Di (14). Se sometió a prueba por lo tanto un segundo anticonvulsivo, el bloqueador de receptores de GABAA picrotoxina. La inyección de picrotoxina en la corteza motora primaria (100 - 600 nl, 10 mM) provocó también convulsiones electrográficas y motoras. Aquellas fueron similares en la duración global, composición de punta-onda y complejos de IF, y equivalentes de comportamiento (Fig. 2a-c) con las convulsiones provocadas por pilocarpina. Entrás las diferencias minoritarias, el estallido electrográfico se activó y desactivó más bruscamente y las "puntas complejas" podrían presentar múltiples (2-6) puntas que se suceden a alta frecuencia (Fig. 2b). Cuando CNO se administró mediante inyección intraperitoneal inmediatamente después de picrotoxina focal, las descargas electrográficas se atenuaron de nuevo (Fig. 2e, f; 12 parejas de ensayos en 5 ratas). Esto fue marcado especialmente por la actividad de IF (Fig. 2f), que se correlacionaba con convulsiones motoras más graves (Fig. 2c).

Se cuestionó si los efectos fuera de objetivo de CNO independiente de hM4Di podrían explicar su efecto anticonvulsivo. Las ratas a las que se inyectó un virus análogo que expresaba el actuador optogenético ArchT en lugar de hM4Di experimentaron el mismo protocolo experimental que se describe anteriormente, usando inyección intracortical local de o bien pilocarpina (12 parejas de ensayos, 6 ratas) o bien picrotoxina (9 parejas de ensayos, 5 ratas). No se observaron diferencias significativas entre ensayos con vehículo y CNO en ninguna de las tres mediciones de gravedad de convulsiones.

#### *Silenciamiento químico-genético de epilepsia neocortical focal inducida por toxina tetánica*

La activación de hM4Di con CNO es por lo tanto eficaz en dos modelos quimioconvulsivos. ¿Suprime también convulsiones espontáneas en epilepsia establecida? Se regresó al modelo de toxina tetánica de epilepsia crónica (15, 16), que responde escasamente a fármacos antiepilépticos y se asemeja a la epilepsia humana parcial continua (17). Este modelo se caracteriza mediante varias características de EEG, incluyendo potencia de alta frecuencia aumentada (120 - 160 Hz), línea de costa aumentada (diferencia acumulativa entre puntos sucesivos sobre el EEG), y la aparición de breves estallidos de actividad de EEG de alta frecuencia que puede detectarse mediante un clasificador de acontecimientos automatizado (7) (Fig. 3a). (Se limitó la dosis de toxina tetánica por consideraciones de bienestar animal, y de este modo convulsiones motoras se produjeron raramente durante el experimento agudo).

Aunque la semivida de CNO en ratas no se ha medido de manera sistémica, afecta a neuronas transducidas con hM4Di o su análogo excitador hM4Dq durante al menos 90 minutos (12, 18, 19), y se aclara totalmente en el plazo de 12 horas de administración de su precursor clozapina (20). Se evaluaron por lo tanto marcadores electrográficos de epilepsia durante una ventana de 3,5 horas comenzando con la primera de dos inyecciones intraperitoneales de o bien CNO o bien vehículo, con la segunda inyección a las 2 horas. La evaluación se repitió entonces 24 horas más tardes, cambiando el vehículo y CNO, para permitir la depuración del agonista, y para controlar la variabilidad diurna en la frecuencia de convulsiones (Fig. 3b - d, 15 parejas de ensayos en 6 ratas). Las tres mediciones de epilepsia (frecuencia de estallidos epileptiformes, línea de costa, y potencia de alta frecuencia) se atenuaron significativamente mediante CNO en comparación con vehículo ( $P = 0,028$ , prueba de Wilcoxon;  $n = 6$ ).

#### **Análisis**

Este estudio muestra que la química-genética puede usarse para atenuar las convulsiones a demanda. La transducción con hM4Di no tiene efecto sobre la excitabilidad neuronal en ausencia de su ligando específico CNO (10-12), y así, este enfoque evita el riesgo teórico de terapias génicas diseñadas alrededor de la sobreexpresión permanente de canales de iones, receptores de neurotransmisores o neuropéptidos. Su especificidad temporal no coincide con la de la optogenética (ref. (7-9)) porque la duración del efecto está dictada por la semivida de CNO, que se ha estimado en seres humanos a las 7 - 8 horas (21). Sin embargo, la química-genética evita la necesidad de dispositivos invasivos y biocompatibles para administrar luz al área cerebral transducida próxima al foco de



convulsiones. Por otra parte, puede seleccionarse como objetivo un área relativamente grande, que no está limitada por la absorción de luz. En cambio, CNO puede administrarse sistémicamente.

5 Se observó una reducción significativa en la gravedad de las convulsiones en el plazo de 10 minutos de la administración de CNO (Fig. 1e, 2e), muy por debajo del instante de 30 minutos que habitualmente define el estado epiléptico. Muchos pacientes con epilepsia resistente a fármacos tienen convulsiones que van precedidas de auras premonitorias, racimo o se producen durante momentos predecibles (por ejemplo epilepsia catamenial), y de hecho pueden beneficiarse de tal silenciamiento químico-genético.

10 Una aplicación potencial adicional de la química-genética para la epilepsia es someter a prueba la hipótesis de que la alteración continuada de excitabilidad neuronal durante un periodo fijo pueda "reiniciar" los circuitos epileptógenos en algunas circunstancias, provocando una reducción persistente en las convulsiones que dure más que la administración del ligando. La reversibilidad, junto con la especificidad regional y de tipo de célula de la genética química, distingue este enfoque de moléculas pequeñas disponibles o terapias génicas basadas en la expresión de canales de iones u otras moléculas de señalización.

En conclusión, se ha mostrado que la química genética puede conseguir atenuación específica de región y de tipo celular de excitabilidad neuronal con el fin de suprimir convulsiones.

20 Anexo de secuencias

**Archivo del banco de genes correspondiente a  
Figura 5 (mapa de vector viral (AAV) en (plásmido: 5421-8155 pb) usado para administrar hM4Di):**

25 LOCUS pAAV\_CaMKIIa\_HA\_ 8157 pb ADN-bc circular 28-  
COMENTARIO ApEinfo:metilado:1  
CARACTERÍSTICAS Ubicación/Modificadores  
misc-feature 4286..4873  
/vntifkey="21"  
30 /etiqueta=WPRE  
misc-feature 4902..5380  
/vntifkey="21"  
/etiqueta=hGH\PolIA  
misc-feature 156..1448  
35 /vntifkey="21"  
/etiqueta=CAMKIIa\ (3.1)  
misc-feature 1..141  
/vntifkey="21"  
/etiqueta=L-ITR  
40 misc-feature 5420..5560  
/vntifkey="21"  
/etiqueta=R-ITR  
misc-feature 5652..5958  
/vntifkey="21"  
45 /etiqueta=Fl\Origen  
misc-feature 6477..7334  
/vntifkey="21"  
/etiqueta=AmpR  
50 misc-feature 7485..8155  
/vntifkey="21"  
/etiqueta=pUC\Ori  
misc-feature 1469..4259  
/vntifkey="21"  
/etiqueta=HA-hM4D-IRES-mCitrina

55 **ORIGEN**

```

1 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgetca ctgagggcgc ccgggcaaag cccggggcgtc
61 gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc ggcagagag ggagtggcca
121 actccateac taggggttcc tgcggcgcca cgcgtttaac attatggcct taggtcactt
181 catctccatg gggttcttct tctgattttc tagaaaatga gatgggggtg cagagagcct
241 cctcagtgac ctgcccaggg tcacatcaga aatgtcagag ctagaacttg aactcagatt
301 actlaactta aatcccatgc cllgggggca lgcaaglacg atalacagaa ggaglgaacl

```

ES 2 784 639 T3

361 caLLagggca galgaccaal gagLLlagga aagaagagLc cagggcaggg lacalclaca  
 421 ceccccgccc agccctgggt gagtccagcc acgttccact cattatagtt gcctctctcc  
 481 agtccctacct tgacgggaag cacaagcaga aactgggaca ggagccccag gagaccaaat  
 541 ctccatggtc cctctgggag gatgggtggg gagagctgtg gcagagccct caggaggggc  
 601 cctgctgctc agtggtgaca gataggggtg agaaagcaga cagagtcatt ccgtcagcat  
 661 tctgggtctg tttggtactt cttctccagc taaggtggcg gtgtgatatg cacaatggct  
 721 aaaaagcagg gagagctgga aagaaacaag gacagagaca gaggccaagt caaccagacc  
 781 aattcccaga ggaagcaaa gaaaccattac agagactaca agggggaagg gaaggagaga  
 841 tgaattagct tcccctgtaa acctagaaac ccagctgttg ccagggcaac ggggcaatac  
 901 ctgtctcttc agaggagatg aagttgccag gtaactaca tctgtcttt ctcaaggacc  
 961 alcccagaal glggcaccca clagccglla ccalagcaac lgcccllllg ccccacLLaa  
 1021 tcccctcccg tctgttaaaa gggccctata gttggaggtg ggggaggtag gaagagcgat  
 1081 gateactttg ggaactaagt tgttcgcatc ccttctcca accccctcag tacatcacc  
 1141 tgggggaaca ggttccactt gctcctgggc ccacacagtc ctgcagtatt gtgtatataa  
 1201 ggccagggca aagaggagca ggttttaaa tgaaaggcag gcaggtgttg gggaggcagt  
 1261 tacoggggca acgggaacag ggcgtttcgg aggtggttgc catggggacc tggatgctga  
 1321 cgaaggclcg cgaggclglg agcagccaca glgccclglc cagaagcccc aagclcgLca  
 1381 glcaagccgg lLclccglll gcaclccagga gcacgggcag gcaglgggc cclagllclg  
 1441 ggggcagclc tagagcggla ccggalccgc caccalglac ccalacagal lLccagalla  
 1501 cgclalggcc aacLLccacac clglcaalgg cagclcgggc aalcagLccg LgcgclggL  
 1561 cacgtccatc tcccacaatc gctatgagac ggtggaaatg gtcttcattg ccacagtga  
 1621 aggtccctg agcctgggtg ctgtcgtggg caacatcctg gtgatgctgt ccacaaagt  
 1681 caacaggcag clgcagacag LcaacaacLa clLccclLlc agcclggcgl glglglalcl  
 1741 cateatagge gccttctcca tgaaccteta cacogtgcac atcatcaagg gctactggcc  
 1801 cctgggcgce gtgggtctgag acctgtggct ggcctggac tgcgtggtga gcaacgctc  
 1861 cgtcatqaac cttctccatc taagctttga ccgctaactc tgcgtacca agcctctcac  
 1921 clacccclgce cggegcacca ccaagalggc aggccLcalg allglclglg cclggglact  
 1981 gtccttcgtg ctctgggcgc ctgccatctt gttctggcag tttgtggtgg gtaagcggac  
 2041 ggtgcccgac aaccagtgtt tcatccagtt cctgtccaac ccagcagtga cctttggcac  
 2101 agccattgct ggcctctacc tgcctgtggt catcatgacg gtgctgtaca tccacatctc  
 2161 cctggccagt cgcagccgag tccacaagca ccggcccgag ggcccgaagg agaagaaagc  
 2221 caagacgctg gccttctcca agagccact aatgaagcag agcgtcaaga agccccgc  
 2281 cggggaggcc gccccggagg agclgcgcaa lggcaagclg gaggaggccc ccccgccagc  
 2341 gctgccaccg ccaccgcgcc ccgtggctga taaggacact tccaatgagt ccagctcagg  
 2401 caglgccacc cagaacacca aggaacgccc agccacagag clglccacca cagaggccac  
 2461 cacgcccgcc algcccccgc clcccclgca gccgcgggcc clcaaccccag cclccagalg  
 2521 glccaagalc cagalLglga cgaagcagac aggcaalgag lglglgacag ccallgagal  
 2581 tgtgectgce acgcccgtg gcatgogccc tggggccaac gtggcccga agttcgccag  
 2641 calcgcclcg aaccaggLgc gcaagaagcg gcagalggcg gccgggagc gcaaglgac  
 2701 acgaacgalc lllgccccll Lgcllgcccl calccLcacc lggacgcccL acaacglcal  
 2761 ggtcctggtg aacacctctt gccagagctg catccctgac acggtgtggt ccattggcta  
 2821 ctggctctgc tacgtcaaca gcaaccataa cctgcccgc tatgctctgt gcaacgccac  
 2881 ctttaaaaag accttccggc acctgctgct gtgccagtat cggaacatcg gcaactgccag  
 2941 gtagggggcc gcgatatcgc cctctccct ccccccccc taactttact ggccgaagcc  
 3001 gclLggaala aggecggLgl gcglllgLcl alalglLlaLL lLccaccala lLgcgclclL  
 3061 ttggcaatgt gagggcccg aaacctggcc ctgtctctctt gacgagcatt cctaggggtc  
 3121 tttcccctct cgcacaagga atgcaaggtc tgttgaatgt cgtgaaggaa gcagttcctc  
 3181 tggaaagctt ttgaagacaa acaacgtctg tagcgacct ttgcaggcag cggaaacccc  
 3241 cacctggcga caggtgectc tgcggccaaa agccacgtgt ataagataca cctgcaaagg  
 3301 cggcacaacc ccagtgccac gttgtgagtt ggatagttgt ggaaagagtc aaatgctct  
 3361 cctcaagcgt attcaacaag gggctgaagg atgccagaa ggtaccccat tgtatgggat  
 3421 ctgatctggg gcctcggtc acatgcttta catgtcttta gtcgaqgta aaaaaacgtc

ES 2 784 639 T3

3481 taggcccccc gaaccacggg gacgtggttt tcctttgaaa aacacgatga taagccacca  
 3541 tggtagagcaa gggcgaggag ctgttcacog gggtaggtgcc catcctggte gagctggacg  
 3601 ggcagctaaa cggccacaag ttcagcgtgt ccggcgaggg cgagggcgat gccacctacg  
 3661 gcaagclgac cclgaagllc alclgcacca ccggcaagcl gccclgccc lggcccaccc  
 3721 tcgtgaccac cttcggctac ggctgatgt gcttcgccc ctaccccgac cacatgaagc  
 3781 agcacgactl cllcaaglcc gccalgcocg aaggclacgl ccaggagocg accalcclcl  
 3841 tcaaggacga cggcaactac aagaccocg ccgaggtgaa gttcaggggc gacaccctgg  
 3901 tgaaccgcat cgagctgaag ggcacogact tcaaggagga cggcaacatc ctggggcaca  
 3961 aqclqqagla caaclacaac agccacaacg lclalalcal ggcgacaaq caqaaqaacg  
 4021 gcatcaagggt gaacttcaag atccgccaca acatcagagga cggcagcgtg cagctcgcg  
 4081 accactacca gcagaacacc cccatcggcg acggccccgt gctgctgccc gacaaccact  
 4141 acctgagcta ccagtccaaa ctgagcaaaag accccaacga gaagcgcgat cacatggtcc  
 4201 lgclggagll cglgaccgoc gccgggalca clclcggeal ggcagagclg lacaaglgag  
 4261 aattcgatat caagcttatc gataatcaac ctctggatta caaaatttgt gaaagattga  
 4321 ctggtattct taactatggt gctcctttta cgtatgtgg atacgctgct ttaatgectt  
 4381 tgtatcatgc tattgcttcc cgtatggctt tcattttctc ctcttgtat aaatcctggt  
 4441 tgtctctctt ttatgaggag ttgtggeccg ttgtcaggea acgtggcgtg gtgtgcactg  
 4501 lglllgclga cgaaccccc acclggllggg gcallgccac caccclgclag clccllccg  
 4561 ggactttcgc tttccccctc cctattgcca cggcggaaact catcgcgcgc tgccttccc  
 4621 gctgctggac aggggctcgg ctgttgggca ctgacaattc cgtggtgttg tggggaaat  
 4681 calcglcccl lccclggclg clcgccclg llgccacccl gallclgocg gggacglcc  
 4741 tctgctacgt ccttcggcc ctcaatccag cggaccctcc tccccgggc ctgctgcgg  
 4801 ctctgcggcc tcttcgcgct ctctgccttc gccctcagac gagtcggate tccccctggg  
 4861 ccgctcccc gcacogatac cgagcgtcgc tcgagagatc tacgggtggc atccctgtga  
 4921 cccclcccca glgcccclcc lggcccclga agllggcacl ccaglgccc ccagccclgl  
 4981 cctaataaaa ttaagttgca tcattttgtc tgactaggtg tcctctata atattatggg  
 5041 glggaggggg glgglalggg gcaaggggca agllgggaag acaaccclga gggccclgocg  
 5101 ggtctattgg gaaccaagct ggagtgcagt ggcacaatct tggctcactg caatctccg  
 5161 ctctggggtt caagcgatc tctgctca gectccgag ttgttgggat tccaggeatg  
 5221 catgaccagg ctcaactcct ttttqtttt ttqgtagaga cggggttca ccatattgoc  
 5281 caggctggte tccaactcct aatctcaggt gatctacca ccttggcctc ccaaattgct  
 5341 gggallacag gcglgaacca clgclcccll cccclgclcl clgallllg lagglaaccac  
 5401 glgocgaccg agcggcgcga ggaaccccll glgalggagl lggccacloc clclclgocg  
 5461 gctcgtcgc tcaactgaggc cggcgacca aaggctcgc gacgcocggg ctttgcocgg  
 5521 gcggcctcag tgagcagcgc agcgcgcagc tgectgcagg ggcgcctgat gcggtatctt  
 5581 ctcttacgc atctgtcgg tatttcaac cgcatacgtc aaagcaacca tagtacgcgc  
 5641 cclglagcgg cgcallaagc gcggcggglg lggllgllac gcgcagcglg accglacac  
 5701 ttgccagcgc cctagcgcct gctcctttcg cttttctcc ttcctttctc gccacgttgc  
 5761 ccggclllcc ccglcaagcl claaaclggg ggclccclll agggllccga llllaglcll  
 5821 tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt tgggtgatgg ttcacgtagt gggccatcgc  
 5881 cctgatagac ggtttttcgc cctttgacgt tggagtccac gttctttaat agtggactct  
 5941 tgttccaaac tggacaaca ctcaacccta tctcgggcta tcttttgat ttataagggg  
 6001 ttttgcgat ttcggcctat tggttaaaa atgagctgat ttaacaaaa ttaacgcga  
 6061 allllaacaa aalallaacg llacaalll lalgglgcac lclcaglaca alclgclclg  
 6121 algccgcala gllaagccag cccgcacacc cggcaacacc cglgacgcg cccclgacggg  
 6181 cttgtctgct cccggcatcc gcttacagac aagctgtgac cgtctccggg agctgcatgt  
 6241 gtcagagggt ttcaccgtea tcaccgaaac gcgcgagacg aaaggcctc gtgatacgc  
 6301 tatttttata ggttaatgct atgataataa tggttttctta gacgtcaggt ggcactttc  
 6361 ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttgtt tatttttcta aatacattca aatatgtatc  
 6421 cgtcatgag acaataacc tgataaatgc tcaataata ttgaaaagg aagagtatga  
 6481 glallcaaca llccclglc gccclallc ccllllllgc ggcallllgc clccclglll  
 6541 ttgctcacc ccgaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag

6601 tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag  
6661 aacgllllcc aalgalgagc actllllaaag llclglclalG lggcgcggLa llalcccglLa  
6721 ttgacgcgg gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg  
6781 agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca  
6841 glglclgccal aaccalglagL galaacacclG cggccaacLL acLLclgaca acgalcggag  
6901 gaccgaagga gclaaocgel Llllllgaca acalggggga lcalglaacl cgccllgale  
6961 gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gogtgacacc acgatgcctg  
7021 tagcaatggc aacaacggtg cgcaaactat taactggcga actacttact cttagcttccc  
7081 ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagtTgc aggaccactt ctgcgctcgg  
7141 cccllccggc lggclgglll allglclgala aalclggagc cgglgagcgl gggllclcgcg  
7201 gtatcattgc agcaactggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga  
7261 cggggagTca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgtgagata ggtgcctcac  
7321 tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag tttactcata tatactttag attgatttaa  
7381 aacllcalll LLaaLLlLaaa aggalclagL lgaagalccL llllgalaal clcalgacca  
7441 aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaaag  
7501 gatcttcttg agatcccttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaaca aaaaaaccac  
7561 cgtaccacgc ggtggtttTgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa  
7621 clggcllccag cagagcgcag alaccaaaala clglcccllcl aglglagccg lagllagcc  
7681 accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaate ctgttaccag  
7741 tggtgctgc cagtggcgat aagtgcgtgc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac  
7801 cggataaaggc gcagcggteg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggage  
7861 gaacgacctL caccgaactg agalacctac agcglgagcl algagaaagc gccacgcLLc  
7921 ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaaca ggagagcga  
7981 cgaggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag tctgtcggg tttcgcaccc  
8041 tctgacttga gogtcgattt ttgtgatgct cgtcagggg gcgagccta tggaaaaacg  
8101 ccagcaacgc ggccttttLta cggttcctgg ccttttTgct gccttttTgct  
cacatgt

//

5 **Referencias**

1 A. K. Ngugi, C. Bottomley, I. Kleinschmidt, J. W. Sander, C. R. Newton, Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach, *Epilepsia* 51, 883-890 (2010).  
2 P. Kwan, S. C. Schachter, M. J. Brodie, Drug-resistant epilepsy, *N. Engl. J. Med.* 365, 919-926 (2011).  
10 3 J. F. Annegers, W. A. Hauser, L. R. Elveback, Remission of seizures and relapse in patients with epilepsy, *Epilepsia* 20, 729-737 (1979).  
4 F. Rosenow, H. Luders, Presurgical evaluation of epilepsy, *Brain J. Neurol.* 124, 1683-1700 (2001).  
5 S. U. Schuele, H. O. Luders, Intractable epilepsy: management and therapeutic alternatives, *Lancet Neurol.* 7, 514-524 (2008).  
15 6 J. de Tisi et al., The long-term outcome of adult epilepsy surgery, patterns of seizure remission, and relapse: a cohort study, *Lancet* 378, 1388-1395 (2011).  
7 R. C. Wykes et al., Optogenetic and potassium channel gene therapy in a rodent model of focal neocortical epilepsy, *Sci. Transl. Med.* 4, 161ra152 (2012).  
8 J. T. Paz et al., Closed-loop optogenetic control of thalamus as a tool for interrupting seizures after cortical injury, *Nat. Neurosci.* 16, 64-70 (2013).  
20 9 E. Krook-Magnuson, C. Armstrong, M. Oijala, I. Soltesz, On-demand optogenetic control of spontaneous seizures in temporal lobe epilepsy, *Nat. Commun.* 4, 1376 (2013).  
10 Y. Pei, S. C. Rogan, F. Yan, B. L. Roth, Engineered GPCRs as tools to modulate signal transduction, *Physiol. Bethesda Md* 23, 313-321 (2008).  
25 11 B. N. Armbruster, X. Li, M. H. Pausch, S. Herlitze, B. L. Roth, Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 104, 5163-5168 (2007).  
12 S. M. Ferguson et al., Transient neuronal inhibition reveals opposing roles of indirect and direct pathways in sensitization, *Nat. Neurosci.* 14, 22-24 (2011).  
30 13 P. Chang, K. S. Hashemi, M. C. Walker, A novel telemetry system for recording EEG in small animals, *J. Neurosci. Methods* 201, 106-115 (2011).  
14 P. Wulff, B. R. Arenkiel, Chemical genetics: receptor-ligand pairs for rapid manipulation of neuronal activity, *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 54-60 (2012).

- 15 E. D. Louis, P. D. Williamson, T. M. Darcey, Chronic focal epilepsy induced by microinjection of tetanus toxin into the cat motor cortex, *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 75, 548-557 (1990).
- 16 K. E. Nilsen, M. C. Walker, H. R. Cock, Characterization of the tetanus toxin model of refractory focal neocortical epilepsy in the rat, *Epilepsia* 46, 179-187 (2005).
- 5 17 O. C. Cockerell, J. Rothwell, P. D. Thompson, C. D. Marsden, S. D. Shorvon, Clinical and physiological features of epilepsy partialis continua. Cases ascertained in the UK, *Brain J. Neurol.* 119 (Pt 2), 393-407 (1996).
- 18 A. R. Garner et al., Generation of a synthetic memory trace, *Science* 335, 1513-1516 (2012).
- 19 G. M. Alexander et al., Remote control of neuronal activity in transgenic mice expressing evolved G protein-coupled receptors, *Neuron* 63, 27-39 (2009).
- 10 20 R. J. Baldessarini et al., Tissue Concentrations of Clozapine and its Metabolites in the Rat, *Neuropsychopharmacology* 9, 117-124 (1993).
- 21 C. Guitton, M. Abbar, J. M. Kinowski, P. Chabrand, F. Bressolle, Multiple-dose pharmacokinetics of clozapine in patients with chronic schizophrenia, *J. Clin. Psychopharmacol.* 18, 470-476 (1998).
- 15 22 M. J. Cook et al., Prediction of seizure likelihood with a long-term, implanted seizure advisory system in patients with drug-resistant epilepsy: a first-in-man study, *Lancet Neurol.* 12, 563-571 (2013).
- 23 R. Hovorka, Closed-loop insulin delivery: from bench to clinical practice, *Nat. Rev. Endocrinol.* 7, 385-395 (2011).
- 24 Majeed ZR, Nichols CD, Cooper RL. 5-HT stimulation of heart rate in *Drosophila* does not act through cAMP as revealed by pharmacogenetics. *J Appl Physiol.* Dec;115(11):1656-65 (2013).
- 20 25 Shah VN, Shoskes A, Tawfik B, Garg SK. Closed-loop system in the management of diabetes: past, present, and future. *Diabetes Technol Ther.* agosto;16(8):477-90 (2014).
- 26 Kätzel D, Nicholson E, Schorge S, Walker MC, Kullmann DM. Chemical-genetic attenuation of focal neocortical seizures. *Nat Commun.* 27 de mayo;5:3847. doi: 10.1038/ncomms4847 (2014).
- 25 27 Chen et al "The First Structure-Activity Relationship Studies for Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs". *ACS Chem Neurosci.* 27 de enero de 2015

REIVINDICACIONES

1. Un vector que codifica un receptor modificado, y un agonista exógeno para dicho receptor, para su uso en un método de tratamiento de un trastorno convulsivo que es epilepsia focal en un paciente que padece dicho trastorno, tratamiento que comprende:

(a) administrar a dicho paciente dicho vector, en donde el receptor modificado es el receptor acoplado a proteína G (GPCR) receptor de acetilcolina muscarínico humano M<sub>4</sub>, que se acopla a través de una proteína Gi con un canal de potasio de rectificación interna acoplado a proteína G (GIRK)

estando el receptor **caracterizado por** (i) una sensibilidad disminuida con respecto a su ligando de activación endógeno (ii) una sensibilidad conservada o potenciada con respecto al agonista exógeno, en cualquier caso en el que el receptor modificado está codificado por un ácido nucleico operativamente unido a un promotor específico de tipo de célula neuronal de modo que dicho receptor modificado se expresa en neuronas de un foco de convulsiones en el cerebro del paciente;

(b) administrar a dicho paciente dicho agonista exógeno,

mediante lo cual la presencia de dicho agonista en el cerebro del paciente activa dicho receptor modificado, mediante lo cual la activación de dicho receptor modificado inhibe de manera reversible la excitabilidad de las neuronas en el foco de convulsiones y la neurotransmisión mediante las mismas.

2. Un vector que codifica un receptor modificado para su uso en un método de tratamiento de un trastorno convulsivo que es epilepsia focal en un paciente que padece dicho trastorno, tratamiento que comprende:

(a) administrar a dicho paciente dicho vector, en donde el receptor modificado es el receptor acoplado a proteína G (GPCR) receptor de acetilcolina muscarínico humano M<sub>4</sub> que se acopla a través de una proteína Gi con un canal de potasio de rectificación interna acoplado a proteína G (GIRK)

estando el receptor **caracterizado por** (i) una sensibilidad disminuida con respecto a su ligando de activación endógeno (ii) una sensibilidad conservada o potenciada con respecto a un agonista exógeno, en cualquier caso en el que el receptor modificado es codificado por un ácido nucleico operativamente unido a un promotor específico de tipo de célula neuronal de modo que dicho receptor modificado se expresa en neuronas de un foco de convulsiones en el cerebro del paciente;

(b) administrar a dicho paciente dicho agonista exógeno,

mediante lo cual la presencia de dicho agonista en el cerebro del paciente activa dicho receptor modificado, mediante lo cual la activación de dicho receptor modificado inhibe de manera reversible la excitabilidad de las neuronas en el foco de convulsiones y la neurotransmisión mediante las mismas,

3. Un agonista exógeno para su uso en un método de tratamiento de un trastorno convulsivo que es epilepsia focal en un paciente que padece dicho trastorno, tratamiento que comprende:

(a) administrar a dicho paciente un vector que codifica un receptor modificado, siendo el receptor modificado el receptor acoplado a proteína G (GPCR) receptor de acetilcolina muscarínico humano M<sub>4</sub> que se acopla a través de una proteína Gi con un canal de potasio de rectificación interna acoplado a proteína G (GIRK)

estando el receptor **caracterizado por** (i) una sensibilidad disminuida con respecto a su ligando de activación endógeno (ii) una sensibilidad conservada o potenciada con respecto a un agonista exógeno, en cualquier caso en el que el receptor modificado es codificado por un ácido nucleico operativamente unido a un promotor específico de tipo de célula neuronal de modo que dicho receptor modificado se expresa en neuronas de un foco de convulsiones en el cerebro del paciente;

(b) administrar a dicho paciente dicho agonista exógeno,

mediante lo cual la presencia de dicho agonista en el cerebro del paciente activa dicho receptor modificado, mediante lo cual la activación de dicho receptor modificado inhibe de manera reversible la excitabilidad de las neuronas en el foco de convulsiones y la neurotransmisión mediante las mismas.

4. Un agonista exógeno para su uso en un método de tratamiento de un trastorno convulsivo que es epilepsia focal en un paciente que padece dicho trastorno,

en donde a dicho paciente se le ha administrado previamente un vector que codifica un receptor modificado, siendo el receptor modificado el receptor acoplado a proteína G (GPCR) receptor de acetilcolina muscarínico humano M<sub>4</sub> que se acopla a través de una proteína Gi con un canal de potasio de rectificación interna acoplado a proteína G (GIRK) que se caracteriza por (i) una sensibilidad disminuida con respecto a su ligando de activación endógeno (ii) una sensibilidad conservada o potenciada con respecto al agonista exógeno, en cualquier caso en el que el receptor modificado es codificado por un ácido nucleico operativamente unido a un promotor específico de tipo de célula neuronal de modo que dicho receptor modificado se expresa en neuronas de un foco de convulsiones en el cerebro del paciente;

tratamiento que comprende administrar a dicho paciente dicho agonista exógeno, mediante lo cual la presencia de dicho agonista en el cerebro del paciente activa dicho receptor modificado,

mediante lo cual la activación de dicho receptor modificado inhibe de manera reversible la excitabilidad de las neuronas en el foco de convulsiones y la neurotransmisión mediante las mismas.

5 5. Un vector para su uso o un agonista para su uso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde el agonista exógeno se administra en el plazo de 30 minutos antes o 24 horas después de que el ser humano tiene una convulsión epiléptica.

10 6. Un vector para su uso o agonista para su uso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde el agonista exógeno se administra automáticamente o bien (i) mediante un dispositivo que está o bien acoplado con un mecanismo de detección de convulsiones automatizado, o bien (ii) en respuesta a una convulsión predicha mediante análisis de EEG.

15 7. Un método para inhibir selectivamente la excitabilidad de neuronas en el cerebro de un mamífero transgénico que es un modelo de enfermedad no humano de manera específica de la región y del tiempo, comprendiendo el método las etapas de:

20 (a) administrar a dicho mamífero un vector que codifica un receptor modificado, siendo el receptor modificado el receptor acoplado a proteína G (GPCR) receptor de acetilcolina muscarínico humano M<sub>4</sub> que se acopla a través de una proteína Gi con un canal de potasio de rectificación interna acoplado a proteína G (GIRK) estando el receptor **caracterizado por** (i) una sensibilidad disminuida con respecto a su ligando de activación endógeno (ii) una sensibilidad conservada o potenciada con respecto a un agonista exógeno, en cualquier caso en el que el receptor modificado es codificado por un ácido nucleico operativamente unido a un promotor específico de tipo de célula neuronal de modo que  
25 (b) administrar a dicho mamífero dicho agonista exógeno,

mediante lo cual la presencia de dicho agonista en el cerebro del paciente activa dicho receptor modificado, mediante lo cual la activación de dicho receptor modificado inhibe la excitabilidad de las neuronas y la neurotransmisión mediante las mismas.

30 8. Un vector para su uso, o un agonista para su uso o un método según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde el GPCR modificado incluye al menos modificaciones en las posiciones 113 y/o 204, más preferentemente Y113C/A203G.

35 9. Un vector para su uso, o un agonista para su uso o un método según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde el vector es un vector viral que se selecciona opcionalmente de la lista que consiste en: un vector de adenovirus; un vector adenoasociado; un vector de virus del herpes; un vector de retrovirus; un vector de lentivirus.

40 10. Un vector para su uso, o un agonista para su uso o un método según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en donde el promotor específico de tipo de célula neuronal es el promotor de CaMk2A.

45 11. Un vector para su uso, o un agonista para su uso o un método según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en donde el agonista exógeno es una molécula sintética o un metabolito de la misma, que opcionalmente tiene un peso molecular de entre 100-1000 Da.

50 12. Un vector para su uso, o un agonista para su uso o un método según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en donde el agonista exógeno es clozapina-N-óxido, que se administra opcionalmente como clozapina o el agonista exógeno es perlapina.

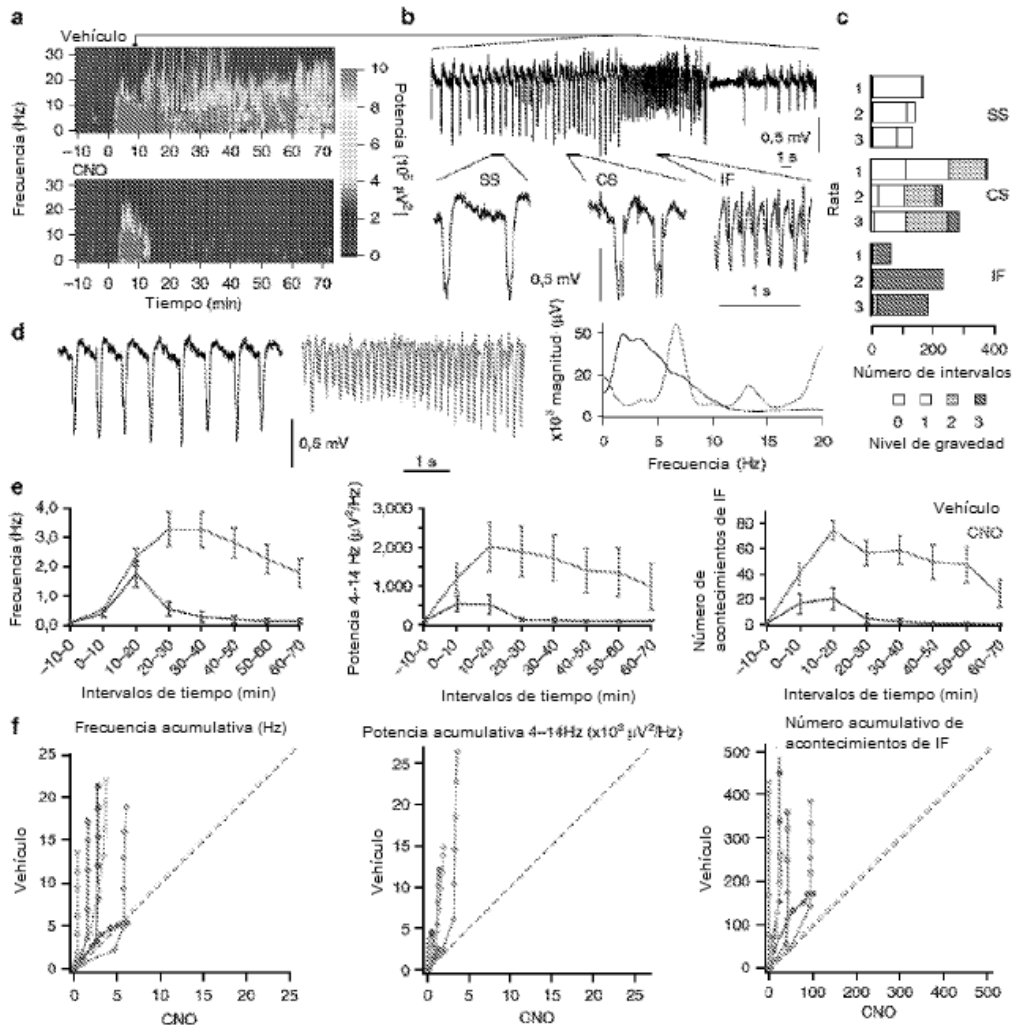


Figura 1



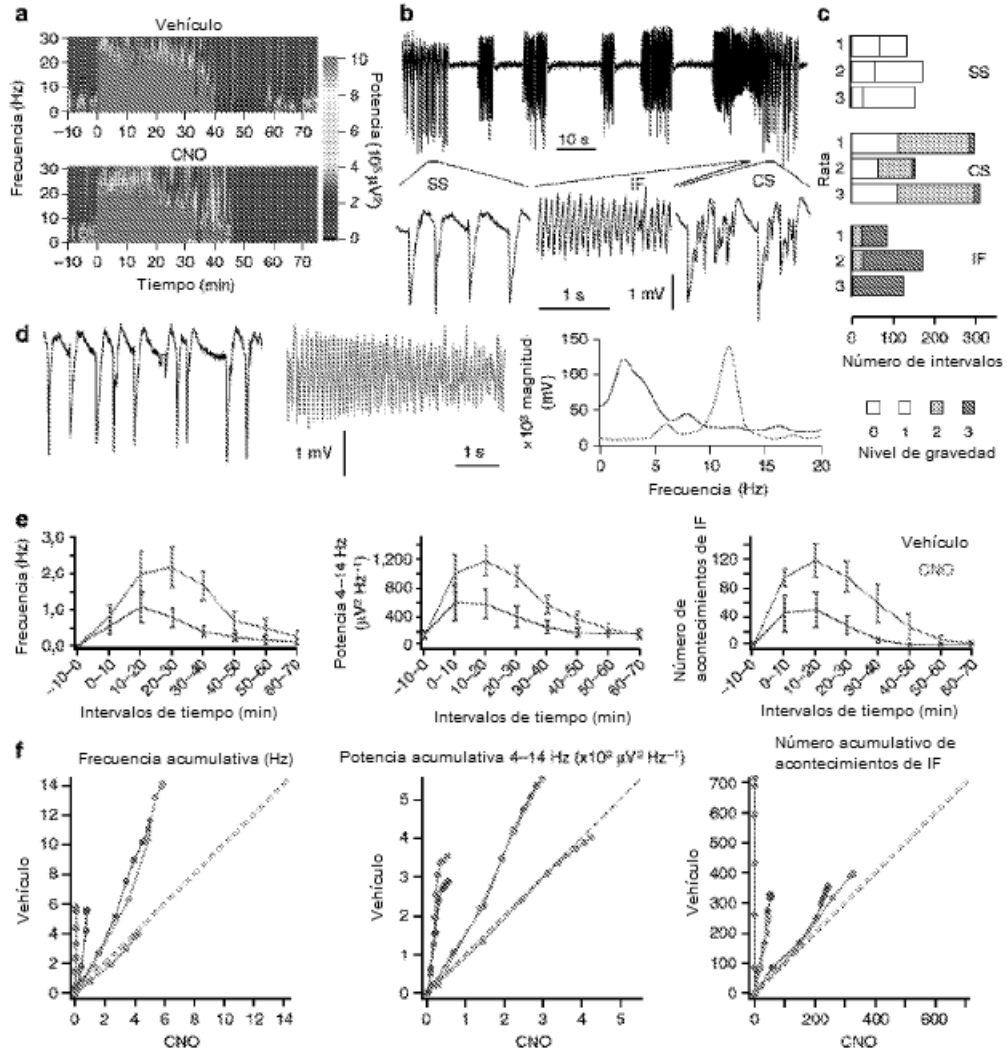


Figura 2

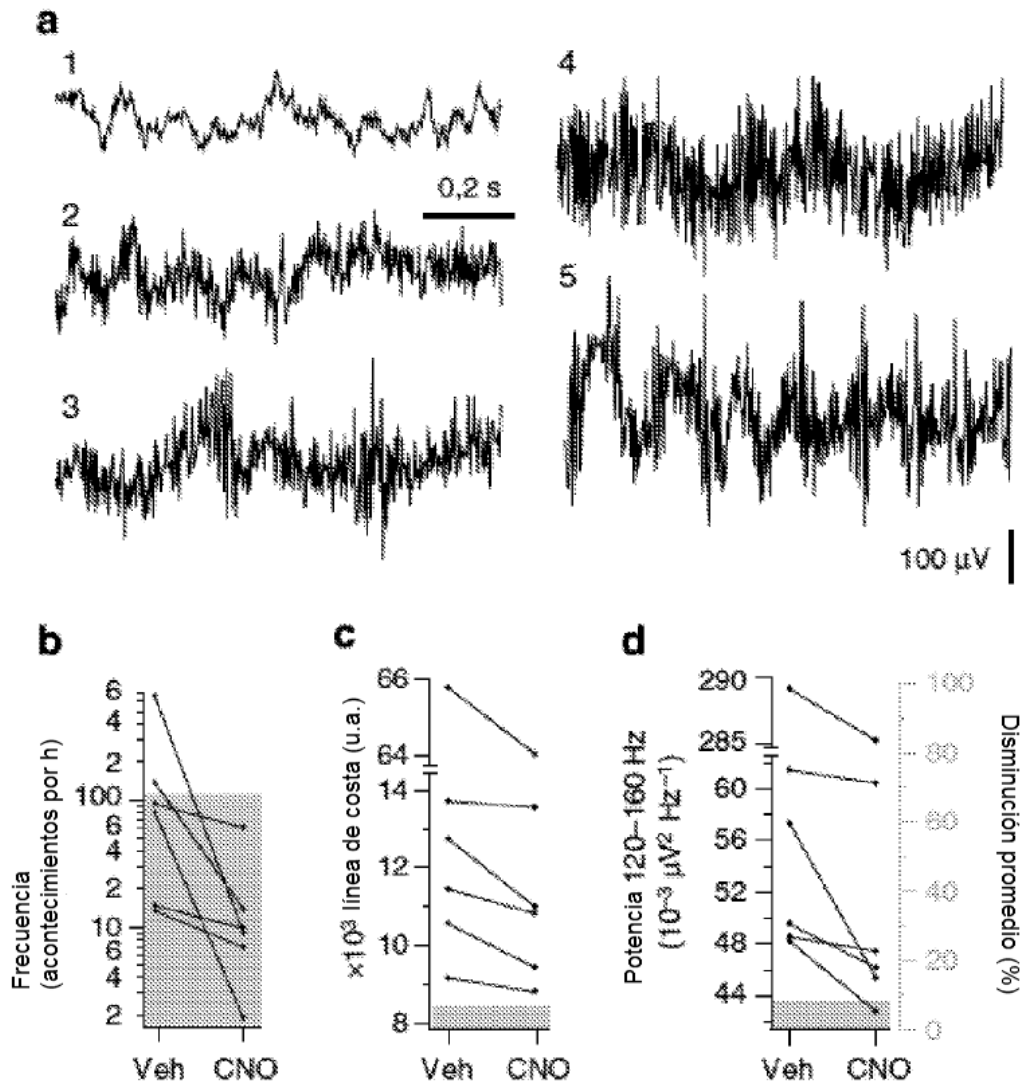


Figura 3

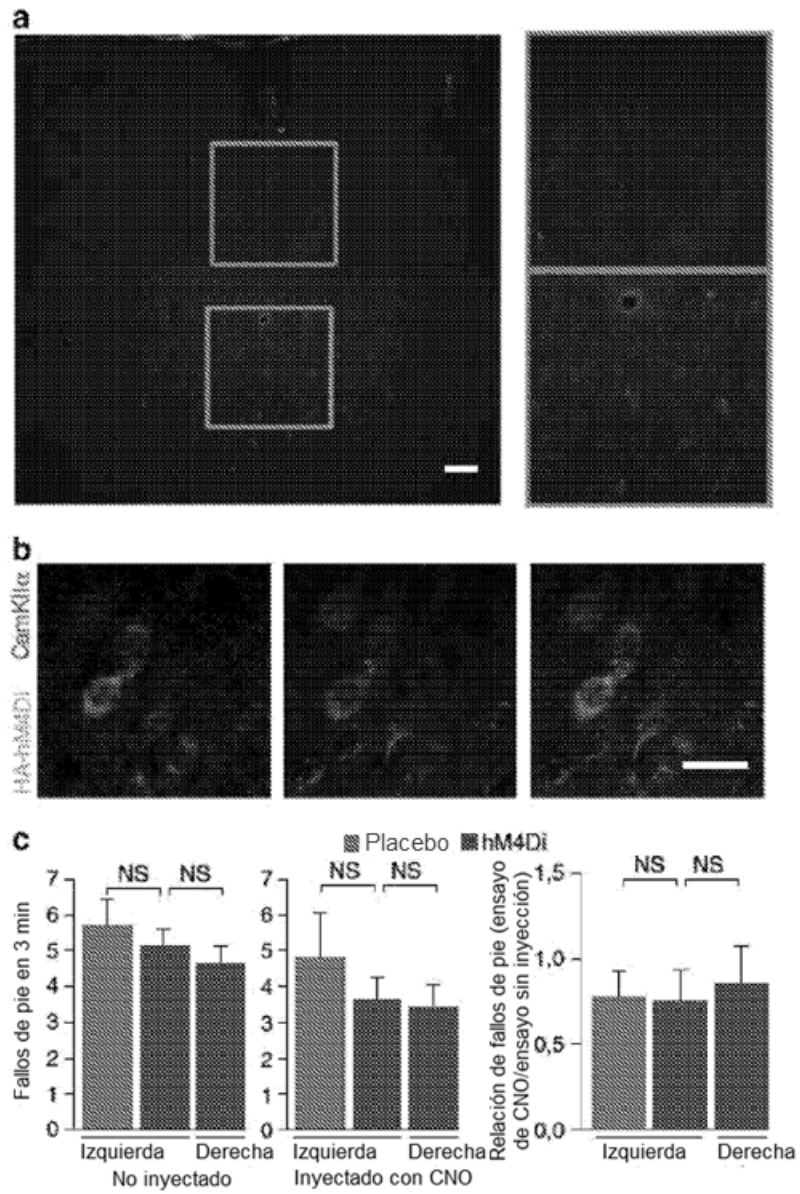


Figura 4

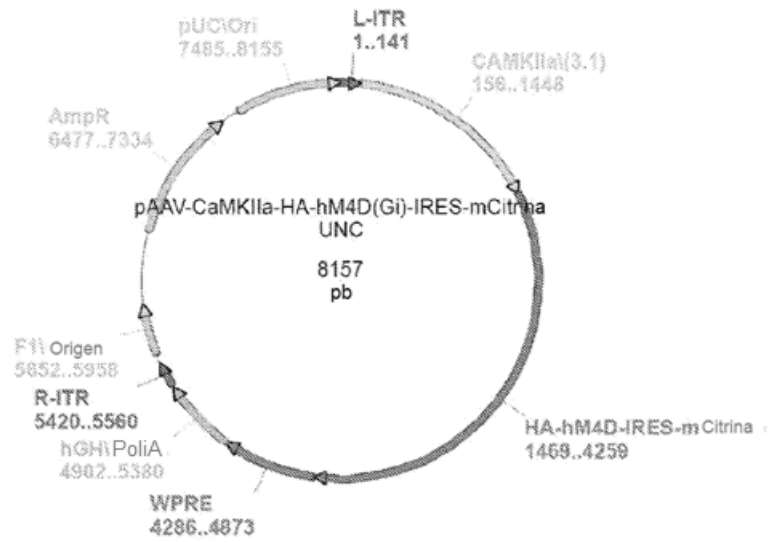


Figura 5