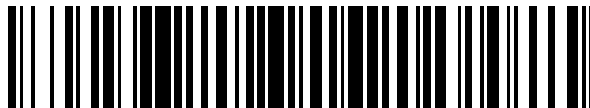


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 172**

51 Int. Cl.:

A61M 37/00	(2006.01)
A61N 5/06	(2006.01)
A61K 41/00	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01)
B82Y 5/00	(2011.01)
A61K 38/17	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2011 PCT/US2011/059287**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2012 WO12061684**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2011 E 11838859 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2635341**

54 Título: **Conversión ascendente de la luz para su uso en métodos optogenéticos**

30 Prioridad:

05.11.2010 US 410729 P

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

19.11.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DEISSEROTH, KARL y
ANIKEEVA, POLINA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 690 172 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

Conversión ascendente de la luz para su uso en métodos optogenéticos

5 **Campo de la invención**

La presente solicitud se refiere a composiciones que comprenden nanopartículas dopadas con lantánidos que convierten de manera ascendente la radiación electromagnética de las longitudes de onda infrarrojas o cerca de infrarrojas en el espectro de luz visible y métodos de utilización de nanopartículas dopadas con lantánidos para suministrar luz a opsinas proteicas sensibles a la luz que se expresan en neuronas y alteran selectivamente el estado de polarización de membrana de las neuronas, como se define en las reivindicaciones.

Antecedentes

15 La optogenética es la combinación de métodos genéticos y ópticos que se utilizan para controlar eventos específicos en células diana de tejido vivo, incluso en mamíferos y otros animales de movimiento libre, con la precisión temporal (en escala temporal de milisegundos) necesaria para mantener el ritmo con el funcionamiento de los sistemas biológicos intactos. La marca de la optogenética es la introducción de un canal de opsina de respuesta rápida a la luz o bomba de proteínas hacia las membranas plasmáticas de células neuronales que permite la manipulación precisa del potencial de membrana neuronal mientras que se mantiene la resolución del tipo celular mediante el uso de mecanismos de direccionamiento específicos. Entre las opsinas microbianas que se pueden utilizar para investigar la función de sistemas neurales son las halorrodopsinas (NpHR), que se utilizan para promover la hiperpolarización de membrana cuando se iluminan, y las rodopsinas de canal, se utilizan para despolarizar membranas al exponerse a la luz. En solo unos pocos años, el campo de la optogenética ha impulsado el conocimiento científico fundamental de como tipos celulares específicos contribuyen a la función de los tejidos biológicos tales como los circuitos neurales *in vivo*. Además, en el aspecto clínico, la investigación dirigida por optogenética ha dado lugar a perspectivas de los mecanismos neurológicos en que se basan comportamientos complejos de mamíferos tales como la ansiedad, memoria, miedo y adicción.

30 A pesar de estos avances, el uso de métodos optogenéticos en animales sufre el inconveniente significativo de necesitar que el animal esté atado a la fuente de luz o tener una fuente de luz implantada quirúrgicamente en el animal. Además, cuando los métodos optogenéticos se utilizan para alterar la función de las neuronas del cerebro, se debe posicionar una fuente de luz en proximidad a las neuronas. Esto necesita la perforación de un agujero en el cráneo del animal, y también presenta dificultades prácticas cuando la región cerebral de interés se localiza profundamente en el propio cerebro. Como la luz pasa difícilmente a través del tejido neural, se necesita insertar una fuente de luz de fibra óptica en el cerebro, que puede dar como resultado un daño inintencionado al tejido cerebral circundante.

Véase, por ejemplo, el documento WO-A-2009/072123, que desvela un método de estimulación de neuronas de manera que la luz se dirige a la localización diana que expresa una proteína de un canal iónico activado por la luz.

40 Los que se necesita, por lo tanto, es un método de suministro no invasivo de luz a las neuronas localizadas en el cerebro y el sistema nervioso periférico de animales que expresan opsinas proteicas sensibles a la luz en las membranas plasmáticas de las células neurales.

45 El documento WO-A-2010/123993 desvela un método para modificar una estructura diana que media o se asocia con una actividad biológica, que comprende la colocación de una nanopartícula en la vecindad de una estructura diana en un sujeto que necesita tratamiento, en el que la nanopartícula se configura para que, al exponerse a una primera longitud de onda, genere una segunda longitud de onda de radiación que tiene una energía mayor que la primera longitud de onda, y la administración al sujeto de un agente farmacéutico activable que es capaz de efectuar un cambio predeterminado en la estructura diana cuando se activa. El agente farmacéutico activable puede comprender una proteína sensible a la luz que al exponerse a dicha fuente de energía de inicio modula un evento de señalización en el cerebro.

Sumario de la invención

55 La invención se define por las reivindicaciones. Cualquier materia objeto que se encuentre fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solamente con fines de información. Cualquiera de las referencias de la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal para la terapia.

60 Se proporcionan en el presente documento composiciones y métodos para el suministro no invasivo de luz a las neuronas que expresan opsinas proteicas sensibles a la luz en las membranas plasmáticas neurales mediante el uso de nanopartículas capaces de cambiar de manera ascendente la radiación electromagnética de las longitudes de onda asociada con el espectro infrarrojo (IR) o cerca del infrarrojo (NIR) en longitudes asociadas con la luz visible.

65 En consecuencia, se proporciona en el presente documento un producto que comprende una pluralidad de nanopartículas dopadas con lantánidos para su uso en un método de tratamiento de un individuo para despolarizar o hiperpolarizar la membrana plasmática de una célula neural de un individuo, en el que dicho método comprende: (a)

colocar la pluralidad de nanopartículas dopadas con lantánidos en la proximidad de la célula neural; y (b) exponer la pluralidad de nanopartículas a una radiación electromagnética en el espectro infrarrojo (IR) o cerca del infrarrojo (NIR), en el que la radiación electromagnética en el espectro IR o NIR se convierte de manera ascendente en luz en el espectro visible por las nanopartículas, y en el que la opsina sensible a la luz se expresa en la membrana plasmática de las células neurales y la activación de la opsina por la luz en el espectro visible induce la despolarización o hiperpolarización de la membrana plasmática. En otros aspectos, se proporciona en el presente documento un producto que comprende un polinucleótido que codifica la opsina sensible a la luz para su uso en un método de tratamiento de un individuo para despolarizar o hiperpolarizar la membrana plasmática de una célula neural en un individuo, en el que dicho método comprende: (a) administrar el polinucleótido que codifica la opsina sensible a la luz al individuo, en el que la proteína sensible a la luz se expresa en la membrana plasmática de la célula neural del individuo y la opsina es capaz de inducir la despolarización o hiperpolarización de la membrana de la célula neural cuando se ilumina con luz; (b) administrar una pluralidad de nanopartículas dopadas con lantánidos en la proximidad de la célula neural; y (c) exponer la pluralidad de nanopartículas a una radiación electromagnética en el espectro infrarrojo (IR) o cerca del infrarrojo (NIR), en el que la radiación en el espectro IR o NIR se convierte de manera ascendente en luz en el espectro visible y la activación de la opsina por la luz del espectro visible induce la despolarización o hiperpolarización de la membrana plasmática. La presente divulgación se refiere a aparatos y métodos que implican la conversión ascendente para el suministro profundo de luz *in vivo*. Los aspectos de la presente divulgación se refieren en general al suministro de luz al tejido *in vivo* utilizando la conversión ascendente del espectro de luz infrarroja o cerca de la luz infrarroja a la luz visible y los métodos relacionados con las aplicaciones expuestas en el presente documento.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren a una fuente de luz que se implanta en el tejido vivo. Las nanopartículas de la solución de nanopartículas se anclan a una población de células diana que incluyen las células que expresan canales/opsinas sensibles a la luz. Las nanopartículas se configuran para responder a la recepción de luz de una primera longitud de onda emitiendo luz de una segunda longitud de onda, diferente. Por ejemplo, las nanopartículas pueden convertir de manera ascendente la luz recibida y de esta manera emitir luz a una frecuencia más alta.

Las realizaciones de la presente divulgación se refieren a la inyección en el sitio de interés con un virus, que lleva un gen de opsina y una solución de nanopartículas. El virus produce una población de células diana en el sitio de interés para expresar el gen de opsina. Son posibles distintas fuentes de luz diferentes. El uso de diferentes longitudes de onda puede ser particularmente útil para facilitar el uso de diferentes fuentes de luz (externas), por ejemplo, ciertas longitudes de onda presentan disminuciones correspondientes en la absorción por el tejido del cerebro o de otra manera.

En consistencia con una realización particular de la presente divulgación, se coloca un diodo emisor de luz ("LED") en una parte del cráneo que se ha hecho más fina. El LED se coloca bajo la piel cerca de la parte que se ha hecho más fina del cráneo, y se elige la localización y/u orientación del LED, al menos en parte, basándose en la localización de la población de células diana. Por ejemplo, el LED se puede colocar para reducir la distancia entre el LED y la población de células diana y se orienta en consecuencia.

En ciertos aspectos más específicos de la presente divulgación, la luz del LED viaja a través del tejido circundante hacia las nanopartículas. Cuando la luz (cerca de) infrarroja incide en las nanopartículas, las nanopartículas absorben los fotones infrarrojos (IR) y emiten fotones visibles. Los fotones visibles se absorben entonces por las opsinas que se expresan en la población de células diana produciendo una respuesta en ellas (por ejemplo, desencadenando una excitación o inhibición neural).

El LED se puede alimentar mediante una batería similar a las que se utilizan para los marcapasos. El LED puede emitir luz en el espectro infrarrojo, y particularmente entre 700 nm- 1000 nm, que puede viajar a través del cráneo y que interviene en el tejido. La luz emitida por las nanopartículas tiene un espectro centrado entre 450-550 nm. La longitud de onda de la luz emitida depende de las características de la nanopartícula.

Breve descripción de los dibujos

Las distintas realizaciones a modo de ejemplo se pueden comprender más completamente considerando la siguiente descripción y los dibujos adjuntos, en los que:

La FIG. 1 muestra una sección transversal de un cráneo, consistente con una realización de la presente divulgación.

La FIG. 2 muestra el suministro de luz a las neuronas diana, consistente con una realización de la presente divulgación.

La FIG. 3 representa un sistema que utiliza múltiples fuentes de luz, consistente con una realización de la presente divulgación.

Se han demostrado aspectos de la presente divulgación a modo de ejemplo en los dibujos y se describirán en detalle.

Descripción detallada

5 La presente divulgación proporciona, inter alia, composiciones y métodos para el suministro de luz a las células
 10 neuronales que expresan una o más opsinas proteicas sensibles a la luz en las membranas plasmáticas de las células
 neuronales. Los inventores han descubierto que se pueden utilizar las nanopartículas dopadas con un metal lantánido
 (por ejemplo, el Gadolinio) que convierte la radiación electromagnética infrarroja (IR) o cerca de la infrarroja (NIR) en
 15 longitudes de onda correspondientes al espectro de luz visible para activar las opsinas proteicas sensibles a la luz
 en la membrana plasmática de una célula neural y alterar selectivamente el estado de polarización de la membrana
 de la célula. A diferencia de la luz visible, la energía electromagnética IR o NIR penetra fácilmente los tejidos
 biológicos. Por ejemplo, la NIR puede penetrar los tejidos biológicos una distancia de hasta 4 centímetros (Heyward
 & Dale Wagner, "Applied Body Composition Assessment", 2ª edición (2004), p. 100). Se desvelan ciertas ecuaciones
 20 útiles para calcular la penetración de luz en el tejido en función de la longitud de onda se desvela en la Pat. de EE.
 UU. N.º 7.043.287. De manera similar, la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º 2007/0027411 desvela
 que el tratamiento con láser de bajo nivel cerca del infrarrojo la luz penetra en el cuerpo hasta una profundidad de
 entre 3-5 cm. Por lo tanto, el uso de fuentes de IR o NIR de radiación electromagnética en métodos optogenéticos
 pueden aliviar la necesidad de colocar una fuente de luz en proximidad directa a las células neuronales. En particular,
 para las técnicas optogenéticas en el cerebro, el uso de las nanopartículas dopadas con lantánidos en combinación
 con energía electromagnéticas IR o NIR pueden permitir la activación de la opsina proteica sin la necesidad de
 perforar el cráneo o insertar una fuente de luz de fibra óptica en el cerebro. De manera similar, en el sistema nervioso
 periférico, los nervios que expresan opsina se pueden activar mediante fuentes de IR o NIR colocadas bajo la piel o
 25 dispuestas contra la piel.

Técnicas generales

La práctica de la presente invención empleará, a menos de que se indique otra cosa, técnicas convencionales de
 30 biología molecular, microbiología, biología celular, bioquímica, química de ácidos nucleicos, inmunología, y fisiología,
 que se conocen bien por los expertos en la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal
 como, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook et al., 1989) y Molecular Cloning: A
 Laboratory Manual, tercera edición (Sambrook y Russel, 2001), (a los que se hace referencia conjuntamente en el
 presente documento como "Sambrook"); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987, que
 incluyen los suplementos hasta 2001); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Harlow y
 35 Lane (1988), Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York; Harlow y Lane (1999),
 Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (a los que se
 hace referencia conjuntamente en el presente documento como "Harlow y Lane"), Beaucage et al. eds., Current
 Protocols in Nucleic Acid Chemistry, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000), Handbook of Experimental
 Immunology, 4ª edición (D. M. Weir & C. C. Blackwell, eds., Blackwell Science Inc., 1987), y Gene Transfer Vectors
 40 for Mammalian Cells (J. M. Miller & M. P. Calos, eds., 1987). Otras referencias útiles incluyen Harrison's Principles of
 Internal Medicine (McGraw Hill; J. Isseleacher et al., eds.) y Lanthanide Luminescence: Photophysical, Analytical and
 Biological Aspects (Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg; Hanninen & Harma, eds., 2011).

Definiciones

45 Como se utiliza en el presente documento, "infrarrojos" o "cerca de infrarrojos" o "luz infrarroja" o "luz cerca de
 infrarroja" se refiere a la radiación electromagnética en el espectro inmediatamente por encima de la luz visible,
 medido desde el extremo nominal de la luz roja visible a 0,74 μm , y se extiende hasta los 300 μm . Estas longitudes
 de onda se corresponden con un intervalo de frecuencias de aproximadamente 1 a 400 THz. En particular, "cerca de
 50 infrarrojos" o "luz cerca de infrarroja" también se refiere a la radiación electromagnética que mida de 0,75-1,4 μm de
 longitud de onda, definida por la absorción de agua.

"Luz visible" se define como una radiación electromagnética con longitudes de onda entre 380 nm y 750 nm. En
 general, la "radiación electromagnética" incluyendo la luz, se genera por la aceleración y deceleración o cambios en
 55 el movimiento (vibración) de partículas cargadas eléctricamente, tal como partes de moléculas (o átomos
 adyacentes) con alta energía térmica, o electrones en átomos (o moléculas).

El término "nanopartículas" como se utiliza en el presente documento, también se puede referir a nanocristales,
 60 nanobarras, nanoagrupamientos, agrupamientos, partículas, puntos, puntos cuánticos, pequeñas partículas, y
 materiales nanoestructurados. El término "nanopartícula" engloba todos los materiales con un tamaño pequeño
 (generalmente, aunque no necesariamente) menos de 100 nm asociado con efectos de tamaño cuántico.

Un "individuo" es un mamífero que incluye un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales
 65 de granja, animales deportivos, mascotas, primates, ratones y ratas. Los individuos también incluyen animales de
 compañía que incluyen, pero no se limitan a, perros y gatos. En algunos aspectos un individuo es un animal no
 humano, tal como un mamífero. En un aspecto, un individuo es un ser humano.

Como se utiliza en el presente documento, la forma singular de “un”, “una” y “el” incluye las referencias en plural a menos de que se indique otra cosa.

Nanopartículas dopadas con lantánidos

5 En los materiales de la ciencia, el dopaje se utiliza comúnmente para incorporar especies específicas de iones o átomos en el núcleo de una estructura cristalina para producir materiales híbridos con propiedades nuevas y útiles. Cuando se sintetizan nanopartículas el dopaje puede influir no solo en el tamaño y forma de las partículas sino también otras propiedades, tales como la capacidad para convertir la excitación cerca de infrarrojos (NIR) en una
10 emisión de luz visible.

Los metales lantánidos, o lantanoides (también conocidos como metales “tierras raras”), son elementos de número atómico de 57 (lantano) a 71 (lutecio), y a menudo incluyen el ltrio (número atómico 39) y escandio (número atómico 21) debido a sus similitudes químicas. Los iones lantánidos presentan propiedades luminiscentes únicas, incluyendo la capacidad de convertir la ración de excitación de longitud de onda larga cerca del infrarrojo en longitudes de onda más cortas visibles mediante un proceso convertido como conversión ascendente de fotones. Los lantánidos habitualmente existen como cationes trivalentes, en cuyo caso su configuración electrónica es (Xe) 4f, variando la n de 1 (Ce³⁺) a 15 (Lu³⁺). Las transiciones en el f-manifold son responsables de muchas de las propiedades foto-
15 físicas de los iones lantánidos, tal como luminiscencia de larga duración y líneas agudas de absorción y emisión. Los electrones f están protegidos de las perturbaciones externas por los Ts cargados y 5p orbitales, dando de esta manera a un espectro tipo lineal. Adicionalmente, las transiciones electrónicas f-f de lantánidos son prohibidos de LaPorte, dando lugar a largos periodos de estado excitado, en el intervalo de micro a milisegundos.

En algunas realizaciones, se puede utilizar cualquier método conocido para sintetizar nanopartículas dopadas con lantánidos. Dichos métodos se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Xu & Li, 2007, Clin Chem., 53(8):1503-10; Wang et al., 2010, Nature, 463(7284): 1061-5; Publicaciones de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º: 2003/0030067 y 2010/0261263; y Patente de EE. UU. N.º: 7.550.201). Por ejemplo, en algunas realizaciones, se pueden sintetizar nanobarras dopadas con lantánido con un núcleo dieléctrico NaYF₄, en el que una solución de agua DI (1,5 ml) de 0,3 g de NaOH se mezcla con 5 ml de etanol y 5 ml de ácido oleico con agitado. A la mezcla resultantes se añade selectivamente 2 ml de REC1₃ (0,2 M, RE=Y, Yb, Er, Gd, Sm, Nd o La) y 1 ml de NH₄F (2 M). La solución se transfirió entonces a un autoclave y se calentó a 200 °C durante 2 horas. Las nanobarras se obtienen entonces por centrifugación, se lavan con agua y etanol varias veces, y finalmente se re-dispersan en ciclohexano. En otro ejemplo, se pueden sintetizar nanopartículas utilizando 2 ml de REC13 (0,2 M, RE = Y, Yb, Er, Gd, o Tm) en metanol añadido a un matraz que contenía 3 ml de ácido oleico y 7 ml de 1-octadeceno. Esa solución se calienta entonces a 160 °C durante 30 min y se enfrió a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 5 ml de una solución de metanol de NH₄F (1,6 mmol) y NaOH (1 mmol) se agita la solución durante 30 min. Después de la evaporación del metanol, la solución se calienta a continuación a 300 °C bajo argón durante 1,5 h y se enfrió a temperatura ambiente. Las nanopartículas resultantes se precipitaron por la adición de etanol, recolectados por centrifugación, se lavaron con metanol y etanol varias veces, y finalmente se re-dispersaron en ciclohexano.
25
30
35

40 En una realización, los materiales para el núcleo de nanopartículas dopadas con lantánidos pueden incluir una amplia variedad de materiales dieléctricos. En distintas realizaciones, el núcleo dieléctrico puede incluir materiales de óxido dopados con lantánidos. Los lantánidos incluyen lantano (La), cerio (Ce), praseodimio (Pr), neodimio (Nd), prometio (Pm), samario (Sm), europio (Eu), gadolinio (Gd), terbio (Tb), disprosio (Dy), holmio (Ho), erbio (Er), tulio (Tm), yterbio (Yb), y lutecio (Lu). Otros materiales del núcleo dieléctrico adecuados incluyen elementos no lantánidos tales como itrio (Y) y escandio (Sc). Por lo tanto, los materiales del núcleo dieléctrico adecuados incluyen Y₂O₃, Y₂O₂S, NaYF₄, NaYbF₄, YbF₃ dopado con Na, YAG, YAP, Nd₂O₃, LaF₃, LaCl₃, La₂O₃, TiO₂, LuPO₄, YVO₄, YbF₃, YF₃, o SiO₂. En una realización, el núcleo dieléctrico de la nanopartícula es NaYTV. Estos núcleos dieléctricos se pueden dotar con uno o más de Er, Eu, Yb, Tm, Nd, Tb, Ce, Y, U, Pr, La, Gd y otras especies de tierras raras o una combinación de los mismos. En una realización, el material del núcleo dieléctrico está dopado con Gd. En otra realización, la nanopartícula dopada con lantánidos comprende NaYF₄:Yb/X/Gd, en el que X es ER, Tm, o Er/Tm. En algunas realizaciones, las nanopartículas dopadas con lantánido comprenden un núcleo dieléctrico NaYF₄:Yb/Er (18/2 moles %) dopado con cualquiera de aproximadamente 0 moles %, aproximadamente 5 moles %, aproximadamente 10 moles %, aproximadamente 15 moles %, aproximadamente 20 moles %, aproximadamente 25 moles %, aproximadamente 30 moles %, aproximadamente 35 moles %, aproximadamente 40 moles %, aproximadamente 45 moles %, aproximadamente 50 moles %, aproximadamente 55 moles %, o aproximadamente 60 moles % de iones Gd, inclusive incluyendo cualquier moles % entre estos valores. En otras realizaciones, las nanopartículas dopadas con lantánidos comprenden un núcleo dieléctrico NaYF₄:Yb/Er (18/2 moles %) dopado con cualquiera de aproximadamente 0 moles %, aproximadamente 5 moles %, aproximadamente 10 moles %, aproximadamente 15 moles %, aproximadamente 20 moles %, aproximadamente 25 moles %, o aproximadamente 30 moles % de iones Yb³⁺, inclusive, incluyendo cualquier moles % entre estos valores. En otras realizaciones más, las nanopartículas dopadas con lantánidos comprenden un núcleo dieléctrico NaYF₄:Yb/Er (18/2 moles %) dopado con cualquiera de aproximadamente 0 moles %, aproximadamente 5 moles %, aproximadamente 10 moles %, aproximadamente 15 moles %, aproximadamente 20 moles %, aproximadamente 25 moles %, o aproximadamente 30 moles % de iones Er, inclusive, incluyendo cualquier moles % entre estos valores. En otras realizaciones, las nanopartículas dopadas con lantánidos comprenden un núcleo dieléctrico NaYF₄:Yb/Er
45
50
55
60
65

(18/2 moles %) dopado con cualquiera de aproximadamente 0 moles %, aproximadamente 5 moles %, aproximadamente 10 moles %, aproximadamente 15 moles %, aproximadamente 20 moles %, aproximadamente 25 moles %, o aproximadamente 30 moles % de iones Tm^{3+} , inclusive, incluyendo cualquier moles % entre estos valores. En otra realización, la nanopartícula dopada con lantánidos se selecciona de entre el grupo que consiste en NaYF₄:Yb/Er/Gd (18/2/5 moles %), NaYF₄:Yb/Tm/Er/Gd (20/0.2/0.1/5 moles %), NaYF₄:Yb/Tm/Er/Gd (20/0.2/0.05/5 moles %), y NaYF₄:Yb/Tm/Gd (20/0.2/5 moles %).

En algunos aspectos, las nanopartículas dopadas con lantánidos que se desvelan en el presente documento se conjugan con una o más moléculas de suministro para dirigirlas a una o más moléculas expresadas en la superficie de una célula neural de interés (tal como una célula neural que expresa una o más opsinas proteicas sensibles a la luz en su membrana plasmática). Estas pueden incluir anticuerpos o fragmentos de los mismos, moléculas pequeñas, así como lectinas o cualquier otro motivo de carbohidrato. Las moléculas de suministro aseguran que las nanopartículas dopadas con lantánidos se mantengan en estrecha proximidad a las opsinas proteicas para permitir la activación en la conversión ascendente de la radiación electromagnética IR o NIR. La conjugación de anticuerpos a nanopartículas se conoce bien en la técnica (véase, por ejemplo, las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º 2010/0209352 y 2008/0267876). En otro aspecto, las nanopartículas dopadas con lantánidos se pueden embeber o atrapar en un material biocompatible que se coloca quirúrgicamente próximas a (tal como adyacente o alrededor) la célula neural de interés (tal como una célula neural que expresa una o más opsinas proteicas sensibles a la luz en su membrana plasmática). En algunas realizaciones, el material biocompatible es transparente, de manera que la luz visible que se produce por la conversión ascendente de la radiación electromagnética IR o NIR por las nanopartículas dopadas con lantánidos puede alcanzar las opsinas proteicas sensibles a la luz que se expresan en la superficie de la célula neural de interés. Los materiales biocompatibles utilizados para embeber o atrapar las nanopartículas dopadas con lantánidos pueden incluir materiales lóplex y otros hidrogeles tales como los que se basan en 2-hidroximetil metacrilato o acrilamida, y ureas de poliéster poliuretano (PEUU) que incluyen Biomer (Ethicon Corp.), Avcothani (Avco-Everrett Laboratories), polietileno, polipropileno, politetrafluoroetileno (Core-Tex™), poli(vinilcloruro), polidimetilsiloxano, un copolímero etileno/ácido acrílico, Dacrón tejido o de punto, poliéster-poliuretano, poliuretano, policarbonato de poliuretano (Corethane™), poliamida (Nailon) y poliestireno. En una realización, el material biocompatible puede ser polidimetilsiloxano (PDMS). Compuestos adicionales que se pueden utilizar para embeber y/o atrapar las nanopartículas dopadas con lantánidos desveladas en el presente documento se describen en Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, 3ª Edición 1982 (Vol. 19, pp. 275-313, y Vol. 18, pp. 219-2220), van der Giessen et al., 1996, Circulation, 94:1690-1997 (1996), Publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º: 2011/0054305, y Patente de EE. UU. N.º: 6.491.965.

Opsinas proteicas sensibles a la luz

Se proporcionan en el presente documento composiciones basadas en optogenética para la hiperpolarización o despolarización selectiva de neuronas del sistema nervioso central o periférico. La optogenética se refiere a la combinación de la genética y métodos ópticos utilizados para controlar eventos específicos en células diana de tejido vivo, incluso en mamíferos de movimiento libre y otros animales, con precisión temporal (en escala de tiempo de milisegundos) necesarios para mantener el ritmo con el funcionamiento de sistemas biológicos intactos. La optogenética necesita la introducción de un canal de respuesta a la luz rápida o bombear proteínas a las membranas plasmáticas de las células neuronales diana que permita la modificación temporal precisa del potencial de membrana neuronal mientras que se mantiene la resolución de tipo celular mediante el uso de mecanismos de direccionamiento específica.

Las opsinas proteicas sensibles a la luz que se pueden utilizar en la presente invención incluyen las opsinas que inducen la hiperpolarización de las neuronas por la luz y las opsinas que inducen la despolarización de las neuronas por la luz. Ejemplos de opsinas se muestran en las Tablas 1 y 2 a continuación.

Tabla 1 que muestra las opsinas identificadas para la inhibición de la actividad celular a lo largo del espectro visible:

Tipo de opsina	Origen biológico	Sensibilidad a longitud de onda	Acción definida
<i>NpHR</i>	<i>Natronomonas pharaonis</i>	589 nm máx	Inhibición (hiperpolarización)
<i>BR</i>	<i>Halobacterium helobium</i>	570 nm máx	Inhibición (hiperpolarización)
<i>AR</i>	<i>Acetabularia acetabulum</i>	518 nm máx	Inhibición (hiperpolarización)
<i>GtR3</i>	<i>Guillardia theta</i>	472 nm máx	Inhibición (hiperpolarización)

<i>Mac</i>	<i>Leptosphaeria maculans</i>	470-500 nm máx	Inhibición (hiperpolarización)
<i>NpHr3.0</i>	<i>Natronomonas pharaonis</i>	680 nm útiles 589 nm máx	Inhibición (hiperpolarización)
<i>NpHR3.1</i>	<i>Natronomonas pharaonis</i>	680 nm útiles 589 nm máx	Inhibición (hiperpolarización)

Tabla 2 que muestra las opsinas identificadas para la excitación y modulación a lo largo del espectro visible:

Tipo de opsina	Origen biológico	Sensibilidad a longitud de onda	Acción definida
<i>VChRI</i>	<i>Volvox carteri</i>	589 nm útiles 535 nm máx	Excitación (despolarización)
<i>DChR</i>	<i>Dunaliella salina</i>	500 nm máx	Excitación (despolarización)
<i>ChR2</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	470 nm máx 380-405 nm útiles	Excitación (despolarización)
<i>ChETA</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	470 nm máx 380-405 nm útiles	Excitación (despolarización)
<i>SFO</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	470 nm máx 530 nm máx	Excitación (despolarización) Inactivación
<i>SSFO</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	445 nm máx 590 nm; 390-400 nm	Activación por etapas (despolarización) Inactivación
<i>C1V1</i>	<i>Volvox carteri</i> y <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	542 nm máx	Excitación (despolarización)
<i>C1V1 E122</i>	<i>Volvox carteri</i> y <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	546 nm máx	Excitación (despolarización)
<i>C1V1 E162</i>	<i>Volvox carteri</i> y <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	542 nm máx	Excitación (despolarización)
<i>C1V1 E122/E162</i>	<i>Volvox carteri</i> y <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	546 nm máx	Excitación (despolarización)

5 Como se utiliza en el presente documento, una opsina sensible a la luz (tal como NpHR, BR, AR, GtR3, Mac, ChR2, VChRI, DChR, y ChETA) incluye una proteína de origen natural y variantes funcionales, fragmentos, proteínas de fusión que comprenden fragmentos o la proteína de longitud completa. Por ejemplo, el péptido de señal se puede eliminar. Una variante puede tener una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente cualquiera de un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia proteica de origen natural. Una variante puede tener la misma o similar función de hiperpolarización o función de despolarización que la proteína de origen natural.

Mejora del transporte intracelular de motivos de aminoácidos

15 La presente divulgación proporciona la modificación de opsinas proteicas sensibles a la luz en una célula mediante la adición de uno o más motivos de secuencia de aminoácidos que aumentan el transporte a las membranas plasmáticas de células de mamífero. Las opsinas proteicas sensibles a la luz que tienen componentes derivados de organismos evolucionariamente más simples pueden no expresarse o tolerarse por células de mamífero o pueden presentar una localización subcelular discapacitada cuando se expresan a altos niveles en células de mamífero. En consecuencia, en algunas realizaciones las opsinas proteicas sensibles a la luz que se expresan en una célula se

pueden fusionar a una o más motivos de secuencia de aminoácidos seleccionados de entre el grupo que consiste en un péptido de señal, una señal de exportación del retículo endoplásmico (ER), una señal de tráfico de membrana, y/o una señal de exportación del aparato de Golgi en el extremo N. Le uno o más motivos de secuencias de aminoácidos que aumenta el transporte de las opsinas proteicas sensibles a la luz hacia las membranas plasmáticas de células de mamífero se pueden fusionar en el extremo N, el extremo Co en ambos extremos N y C de la opsina proteica sensible a la luz. Opcionalmente, la opsina proteica sensible a la luz y el uno o más motivos de secuencia de aminoácidos se pueden separar por un enlazador. En algunas realizaciones, la opsina proteica sensible a la luz se puede modificar mediante la adición de una señal de tráfico (ts) que aumenta el transporte de la proteína a la membrana plasmática. En algunas realizaciones, la señal de tráfico se puede derivar de la secuencia de aminoácidos del rectificador humano hacia dentro del canal de potasio Kir2.1. En otras realizaciones, la señal de tráfico puede comprender la secuencia de aminoácidos KSRITSEGEYTPLDQIDINV.

Motivos proteicos adicionales que pueden aumentar el transporte de opsinas proteicas sensibles a la luz a la membrana plasmática de una célula se describen en la Publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º 2009/0093403. En algunas realizaciones, la secuencia del péptido de señal en la proteína se puede eliminar o sustituir con una secuencia de péptido de señal de una proteína diferente.

Bombas de cloro sensibles a la luz

En algunos aspectos, las opsinas proteicas sensibles a la luz descritas en el presente documento son bombas de cloro sensibles a la luz. En algunos aspectos de los métodos que se proporcionan en el presente documento, uno o más miembros de la familia de la halorrodopsina de bombas de cloro sensibles a la luz se expresan en las membranas plasmáticas de las neuronas de los sistemas nerviosos central y periférico.

En algunos aspectos, dicha una o más proteínas de bomba de cloro sensibles a la luz que se expresan en las membranas plasmáticas de las células nerviosas de los sistemas nerviosos central y periférico se puede derivar de *Natronomonas pharaonis*. En algunas realizaciones, las proteínas de la bomba de cloro sensibles a la luz pueden responder a la luz ámbar, así como a la luz roja y puede mediar una corriente hiperpolarizante en la interneurona cuando las proteínas de la bomba de cloro sensibles a la luz se iluminan con luz ámbar o roja. La longitud de onda de la luz que puede activar las bombas de cloro sensibles a la luz puede estar entre aproximadamente 580 y aproximadamente 630 nm. En algunas realizaciones, la luz puede tener una longitud de onda de aproximadamente 590 nm o la luz puede tener una longitud de onda mayor de aproximadamente 630 nm (por ejemplo, menos de aproximadamente 740 nm). En una realización, la luz tiene una longitud de onda de alrededor de 630 nm. En algunas realizaciones, la proteína de la bomba de cloro sensible a la luz puede hiperpolarizar una membrana neural durante al menos aproximadamente 90 minutos cuando se expone a un pulso continuo de luz. En algunas realizaciones, la proteína de la bomba de cloro sensible a la luz puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1. Adicionalmente, la proteína de la bomba de cloro sensible a la luz puede comprender sustituciones, eliminaciones, y/o inserciones introducidas en una secuencia de aminoácidos nativa para aumentar o disminuir la sensibilidad a la luz, aumentar o disminuir la sensibilidad a una luz de longitudes de onda particulares, y/o aumentar o disminuir la capacidad de la proteína sensible a la luz para regular el estado de polarización de la membrana plasmática de la célula. En algunas realizaciones, la proteína de la bomba de cloro sensible a la luz contiene una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras. En algunas realizaciones, la proteína sensible a la luz contiene una o más sustituciones de aminoácidos no conservadoras. La proteína sensible a la luz comprende sustituciones, eliminaciones, y/o inserciones introducidas en la secuencia de aminoácidos que mantiene adecuadamente la capacidad de hiperpolarizar la membrana plasmática de una célula neuronal en respuesta a la luz.

Adicionalmente, en otros aspectos, la proteína de la bomba de cloro sensible a la luz puede comprender una secuencia de aminoácidos central al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntico a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1 y una señal de exportación del retículo endoplásmico (ER). Esta señal de exportación del ER puede fusionarse al extremo C del centro de la secuencia de aminoácidos o puede fusionarse al extremo N del centro de la secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, la señal de exportación del ER se une al centro de la secuencia de aminoácidos por un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de aproximadamente 5, 10, 20, 30,40, 50, 75,100,125,150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400, o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador puede comprender adicionalmente una proteína fluorescente, por ejemplo, pero no limitada a, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde, o una proteína fluorescente azul. En algunas realizaciones, la señal de exportación ER puede comprender la secuencia de aminoácidos FXYENE, donde X puede ser cualquier aminoácido. En otra realización, la señal de exportación de ER puede comprender la secuencia de aminoácidos VXXSL, donde X puede ser cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, la señal de exportación ER puede comprender la secuencia de aminoácidos FCYENEV.

En otros aspectos, las proteínas de la bomba de cloro sensibles a la luz que se proporcionan en el presente documento pueden comprender una proteína sensible a la luz que se expresa en la membrana celular, en el que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos central al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntico a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1 y una señal de exportación del retículo endoplásmico (ER). Esta señal de exportación del ER puede fusionarse al extremo C del centro de la secuencia de aminoácidos o puede fusionarse al extremo N del centro de la secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, la señal de exportación del ER se une al centro de la secuencia de aminoácidos por un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de aproximadamente 5, 10, 20, 30,40, 50, 75,100,125,150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400, o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador puede comprender adicionalmente una proteína fluorescente, por ejemplo, pero no limitada a, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde, o una proteína fluorescente azul. En algunas realizaciones, la señal de exportación ER puede comprender la secuencia de aminoácidos FXYENE, donde X puede ser cualquier aminoácido. En otra realización, la señal de exportación de ER puede comprender la secuencia de aminoácidos VXXSL, donde X puede ser cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, la señal de exportación ER puede comprender la secuencia de aminoácidos FCYENEV.

94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1 y una señal de tráfico (por ejemplo, que puede aumentar el transporte de la proteína de la bomba de cloro sensible a la luz a la membrana plasmática). La señal de tráfico se puede fusionar en el extremo C de la secuencia de aminoácidos central o se puede fusionar en el extremo N de la secuencia de aminoácidos central. En algunas realizaciones, la señal de tráfico se puede unir a la secuencia de aminoácidos central por un enlazador que puede comprender cualquiera de aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125,150, 175, 200, 225, 250, 275, 300,400, o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador puede comprender una proteína fluorescente, por ejemplo, pero no limitada a, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde, una proteína fluorescente azul. En algunas realizaciones, la señal de tráfico puede derivarse de la secuencia de aminoácidos del rectificador humano hacia dentro del canal de potasio Kir2.1. En otras realizaciones, la señal de tráfico puede comprender la secuencia de aminoácidos KSRITSEGEYIPLDQIDINV.

En algunos aspectos, la proteína de la bomba de cloro sensible a la luz puede comprender una secuencia de aminoácidos central al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1 y al menos uno (tal como uno, dos, tres, o más) motivos de secuencia de aminoácidos que aumenta el transporte a la membrana plasmática de células de mamífero que se selecciona de entre el grupo que consiste en una señal de exportación del ER, un péptido de señal, y una señal de tráfico de membrana. En algunas realizaciones, la proteína de la bomba de cloro sensible a la luz comprende un péptido de señal en el extremo N, una señal de exportación del ER en el extremo C, y una señal de tráfico en el extremo C. En algunas realizaciones, la señal de exportación del ER del extremo C y la señal de tráfico del extremo C se pueden unir por un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de aproximadamente 5, 10, 20, 30,40, 50, 75,100,125,150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400, o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador puede comprender adicionalmente una proteína fluorescente, por ejemplo, pero no limitada a, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde, o una proteína fluorescente azul. En algunas realizaciones la señal de exportación del ER puede localizarse más hacia el extremo C que la señal de tráfico. En otras realizaciones, la señal de tráfico está localizada más hacia el extremo C que la señal de exportación del ER. En algunas realizaciones, el péptido de señal comprende la secuencia de aminoácidos MTETLPPVTESAVALQAE. En otra realización la proteína de la bomba de cloro sensible a la luz comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.

Además, en otros aspectos, las proteínas de la bomba de cloro sensibles a la luz pueden comprender una secuencia de aminoácidos central al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1, en el que el péptido de señal del extremo N de SEQ ID NO: 1 se ha eliminado o sustituido. En algunas realizaciones, se pueden utilizar otros péptidos de señal (tal como péptidos de señal de otras opsinas). La proteína sensible a la luz puede comprender adicionalmente una señal de transporte de ER y/o señal de tráfico de membrana descritas en el presente documento. En algunas realizaciones la proteína de bomba de cloro sensible a la luz comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, la opsina proteica sensible a la luz es una opsina proteica NpHR que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la opsina proteica NpHR comprende adicionalmente una señal de exportación del retículo endoplásmico (ER) y/o una señal de tráfico de membrana. Por ejemplo, la opsina proteica NpHR comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1 y una señal de exportación del retículo endoplásmico (ER). En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1 está unida a la señal de exportación de ER mediante un enlazador. En algunas realizaciones, la señal de exportación del ER comprende la secuencia de aminoácidos FXYENE, donde X puede ser cualquier aminoácido. En otra realización, la señal de exportación del ER comprende la secuencia de aminoácidos VXXSL, donde X puede ser cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, la señal de exportación del ER comprende la secuencia de aminoácidos FCYENEV. En algunas realizaciones, la opsina proteica NpHR comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1, una señal de exportación del ER, y una señal de tráfico de membrana. En otras realizaciones, la opsina proteica NpHR comprende, desde el extremo N al extremo C, la secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1, la señal de exportación del ER, y la señal de tráfico de membrana. En otras realizaciones, la opsina proteica NpHR comprende, desde el extremo N al extremo C, la secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1, la señal de tráfico de membrana, y la señal de exportación del ER. En algunas realizaciones, la señal de tráfico de membrana se deriva de la secuencia de aminoácidos del rectificador humano hacia dentro del canal de potasio Kir2.1. En algunas realizaciones, la señal de tráfico de membrana comprende la secuencia de aminoácidos KSRITSEGEYIPLDQIDINV. En algunas realizaciones, la señal de tráfico de membrana está unida a la secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1 por un enlazador. En algunas realizaciones, la señal de tráfico de membrana se une a la señal de exportación del ER mediante un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de aproximadamente 5, 10, 20, 30,40, 50, 75,100,125,150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400, o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador puede comprender adicionalmente una proteína fluorescente, por ejemplo, pero no limitada a, una proteína fluorescente amarilla, una proteína

fluorescente roja, una proteína fluorescente verde, o una proteína fluorescente azul. En algunas realizaciones, la opsina proteica sensible a la luz comprende adicionalmente un péptido de señal hacia el extremo N. En algunas realizaciones, la opsina proteica sensible a la luz comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la opsina proteica sensible a la luz comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

También se proporcionan en el presente documento polinucleótidos que codifican cualquiera de las proteínas de la bomba de ion cloro sensibles a la luz que se describen en el presente documento, tales como la proteína sensible a la luz que comprende una secuencia de aminoácidos dental al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1, una señal de exportación del ER, y una señal de tráfico de membrana. En otra realización, los polinucleótidos comprenden una secuencia que codifica una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 y/o la SEQ ID NO: 3. Los polinucleótidos pueden estar en un vector de expresión (tal como, pero sin limitarse a, un vector vírico descrito en el presente documento). Los polinucleótidos puede utilizarse para la expresión de proteínas de la bomba de ion cloro sensible a la luz en las neuronas de los sistemas nerviosos central y periférico.

Se puede encontrar una divulgación adicional relacionada con las proteínas de la bomba de cloro sensibles a la luz en las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º 2009/0093403 y 2010/0145418 así como en la Solicitud de Patente internacional N.º PCT/US2011/028893, las divulgaciones de cada una de las cuales se incorporan por referencia en su totalidad.

Bombas de protones sensibles a la luz

En algunos aspectos, las opsinas proteicas sensibles a la luz que se describen en el presente documento son bombas de protones sensibles a la luz. En algunos aspectos de las composiciones y métodos que se proporcionan en el presente documento, se expresan una o más bombas de protones sensibles a la luz en las membranas plasmáticas de las neuronas de los sistemas nerviosos central y periférico.

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

En otros aspectos de los métodos desvelados en el presente documento, la proteína de la bomba de protones sensible a la luz puede comprender una secuencia de aminoácidos central al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 4 y al menos uno (tal como, uno, dos, tres o más) motivos de secuencia de aminoácidos que aumenta el transporte hacia las membranas plasmáticas de células de mamífero seleccionadas de entre el grupo que consisten en un péptido de señal, una señal de exportación del ER, y una señal de tráfico de membrana. En algunas realizaciones, la proteína de la bomba de protones sensible a la luz comprende un péptido de señal en el extremo N, una señal de exportación del ER en el extremo C. En algunas realizaciones, la proteína de la bomba de protones sensible a la luz comprende una señal de exportación del ER del extremo C y una señal de tráfico del extremo C. En algunas realizaciones, la señal de exportación del ER del extremo C y la señal de tráfico en el extremo C están unidos por un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400, o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador puede comprender adicionalmente una proteína fluorescente, por ejemplo, pero no limitada a, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde, o una proteína fluorescente azul. En algunas realizaciones la señal de exportación del ER puede localizarse más hacia el extremo C que la señal de tráfico. En otras realizaciones, la señal de tráfico está localizada más hacia el extremo C que la señal de exportación del ER.

También se proporciona en el presente documento polinucleótidos aislados que codifican cualquiera de las proteínas de la bomba de protones sensibles a la luz descritas en el presente documento, tales como la proteína de la bomba de protones sensible a la luz que comprende una secuencia de aminoácidos central al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia que se muestra en

la SEQ ID NO: 4. También se proporcionan en el presente documento vectores de expresión (tales como un vector vírico que se describe en el presente documento) que comprende un polinucleótido que codifica las proteínas descritas en el presente documento, tal como una proteína de la bomba de protones sensible a la luz que comprende una secuencia de aminoácidos central al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 4. Los polinucleótidos se puede utilizar para la expresión de bombas de protones sensibles a la luz en las células neurales de los sistemas nerviosos central y periférico.

Se puede encontrar una divulgación adicional relacionado con las proteínas de las bombas de protones sensibles a la luz en la Solicitud de Patente Internacional N.º PCT/US2011/028893.

Proteínas del canal de cationes activados por la luz

En algunos aspectos, las opsinas proteicas sensibles a la luz descritas en el presente documento son proteínas del canal de cationes activados por la luz. En algunos aspectos de los métodos proporcionados en el presente documento, se pueden expresar uno o más canales de cationes activados por la luz en las membranas plasmática de las células neurales de los sistemas nerviosos central y periférico.

En algunos aspectos, la proteína del canal de cationes activado por la luz se puede derivar de *Chlamydomonas reinhardtii*, en el que la proteína del canal de cationes activado por la luz puede ser capaz de mediar una corriente despolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En otra realización, la proteína del canal de cationes activado por la luz puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 5. La luz que se utiliza para activar la proteína del canal de cationes activado por la luz derivada de *Chlamydomonas reinhardtii* puede tener una longitud de onda entre aproximadamente 460 y aproximadamente 495 nm o puede tener una longitud de onda de aproximadamente 480 nm. Adicionalmente, la luz puede tener una intensidad de al menos aproximadamente 100 Hz. En algunas realizaciones, la activación del canal de cationes activado por la luz derivado de *Chlamydomonas reinhardtii* con luz que tiene una intensidad de 100 Hz puede producir el agotamiento sináptico inducido por despolarización de las neuronas que expresan el canal de cationes activado por la luz. La proteína del canal de cationes activado por la luz puede comprender adicionalmente sustituciones, eliminaciones, y/o inserciones introducidas en una secuencia de aminoácidos nativa para aumentar o disminuir la sensibilidad a la luz, aumentar o disminuir la sensibilidad a longitudes de onda de luz particulares, y/o aumentar o disminuir la capacidad de la proteína del canal de cationes activado por la luz para regular el estado de polarización de la membrana plasmática de la célula.

Adicionalmente, la proteína del canal de cationes activado por la luz puede contener una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras y/o una o más sustituciones de aminoácidos no conservadoras. La proteína de la bomba de protones activado por la luz que comprende sustituciones, eliminaciones, y/o inserciones introducidas en la secuencia de aminoácidos nativa mantiene adecuadamente la capacidad de despolarizar la membrana plasmática de una célula neuronal en respuesta a la luz.

Se puede encontrar una divulgación adicional relacionada con las proteínas del canal de cationes activado por la luz en la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º 2007/0054319 y las Publicaciones de Solicitud de Patente internacional N.º WO 2009/131837 y WO 2007/024391.

Opsinas de función por etapa y opsinas de función por etapas estabilizadas

En otras realizaciones, la proteína del canal de cationes activado por la luz puede ser una opsina proteica de función por etapas (SFO) o una opsina proteica de función por etapas estabilizadas (SSFO) que puede tener sustituciones de aminoácidos específicas en posiciones claves a lo largo del bolsillo de unión retinal de la proteína. En algunas realizaciones, la proteína SFO puede tener una mutación en el resto de aminoácido C128 de la SEQ ID NO: 5. En otras realizaciones, la proteína SFO tiene una mutación C128A en la SEQ ID NO: 5. En otras realizaciones, la proteína SFO tiene una mutación C128S en la SEQ ID NO: 5. En otra realización la proteína SFO tiene una mutación C128T en la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones la proteína SFO puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 6.

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

En algunas realizaciones, las proteínas SFO o SSFO que se proporcionan en el presente documento pueden ser capaces de mediar una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz azul. En otras

realizaciones, la luz puede tener una longitud de onda de aproximadamente 445 nm. Adicionalmente, la luz puede tener una intensidad de aproximadamente 100 Hz. En algunas realizaciones, la activación de la proteína SFO o SSFO con luz que tiene una intensidad de 100 Hz puede producir el agotamiento sináptico inducido por despolarización de las neuronas que expresan la proteína SFO o SSFO. En algunas realizaciones, cada una de las opsinas proteicas de función por etapas y opsinas de función por etapas estabilizadas que se desvelan pueden tener propiedades y características específicas para su uso en la despolarización de la membrana de una célula neuronal en respuesta a la luz.

Se puede encontrar una divulgación adicional relacionada con las proteínas SFO o SSFO en la Publicación de Solicitud de Patente internacional N.º WO 2010/056970 y las Solicitudes de patente provisional de EE. UU. N.º 61/511.905.

Canales de cationes quiméricos C1V1

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

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

Variantes mutantes de C1V1 quimérica

En algunos aspectos, la invención puede incluir polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos sustituidas o mutadas, en los que el polipéptido mutante mantiene las características de naturaleza de respuesta a la luz del polipéptido C1V1 precursor, pero también pueden poseer propiedades alteradas en algunos aspectos específicos. Por ejemplo, las proteínas quiméricas C1V1 activadas por la luz que se describen en el presente documento pueden presentar un aumento del nivel de expresión en una célula animal o en la membrana plasmática de la célula animal; una respuesta alterada cuando se exponen a diferentes longitudes de onda de luz, particularmente la luz roja; y/o una combinación de rasgos por los que el polipéptido quimérico C1V1 posee las propiedades de baja desensibilización, desactivación rápida, activación por luz violeta baja para la activación cruzada mínima con otros canales de cationes activados por la luz, y/o fuerte expresión en células animales.

En consecuencia, se proporcionan en el presente documento proteínas quiméricas C1V1 activadas por la luz que tienen sustituciones de aminoácidos específicos en posiciones clave a lo largo del bolsillo de unión retinal de la parte de VChR1 del polipéptido quimérico. En algunas realizaciones, la proteína C1V1 puede tener una mutación en el resto de aminoácido E122 de la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la proteína C1V1 puede tener una mutación en el resto de aminoácidos E162 de la SEQ ID NO: 7. En otras realizaciones, la proteína C1V1 puede tener una mutación en los restos de aminoácidos E162 y E122 de la SEQ ID NO: 7. En otras realizaciones, la proteína C1V1 puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 11. En algunas realizaciones, cada una de las proteínas quiméricas C1V1 mutantes

desveladas pueden tener propiedades y características específicas para su uso en la despolarización de la membrana de una célula animal en respuesta a la luz.

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

20 En otros aspectos, la proteína quimérica mutante C1V1-E162 es capaz de mediar una corriente despolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En algunas realizaciones la luz puede ser luz verde. En otras realizaciones, la luz puede tener una longitud de onda de entre aproximadamente 540 nm a aproximadamente 535 nm. En algunas realizaciones la luz puede tener una longitud de onda de aproximadamente 542 nm. En otras realizaciones, la luz puede tener una longitud de onda de aproximadamente 530 nm. En algunas realizaciones, la proteína quimérica mutante C1V1-E162 no media una corriente despolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz violeta. En algunas realizaciones, la proteína quimérica no media una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con una luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 405 nm. Adicionalmente, la luz puede tener una intensidad de aproximadamente 100 Hz. En algunas realizaciones, la activación de la proteína quimérica mutante C1V1-E162 con una luz que tiene una intensidad de 100 Hz puede producir un agotamiento sináptico inducido por despolarización de las neuronas que expresan la proteína quimérica mutante C1V1-E162. En algunas realizaciones, la proteína quimérica mutante C1V1-E122 desvelada puede tener propiedades y características específicas para su uso en la despolarización de la membrana de una célula neuronal en respuesta a la luz.

35 En otros aspectos más, En algunos aspectos, la proteína quimérica mutante C1V1-E122/E162 es capaz de mediar una corriente despolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En algunas realizaciones la luz puede ser luz verde. En otras realizaciones, la luz puede tener una longitud de onda de entre aproximadamente 540 nm a aproximadamente 560 nm. En algunas realizaciones la luz puede tener una longitud de onda de aproximadamente 546 nm. En otras realizaciones, la proteína quimérica mutante C1V1-E122/E162 no media una corriente despolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz violeta. En algunas realizaciones, la proteína quimérica no media una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con una luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 405 nm. En algunas realizaciones, la proteína quimérica mutante C1V1-E122/E162 puede presentar menos activación cuando se expone a la luz violeta con respecto a las proteínas C1V1 quiméricas que carecen de mutaciones en E122/E162 o respecto a otras proteínas del canal de cationes activado por la luz. Adicionalmente, la luz puede tener una intensidad de aproximadamente 100 Hz. En algunas realizaciones, la activación de la proteína quimérica mutante C1V1-E122/E162 con una luz que tiene una intensidad de 100 Hz puede producir un agotamiento sináptico inducido por despolarización de las neuronas que expresan la proteína quimérica mutante C1V1-E122/E162. En algunas realizaciones, la proteína quimérica mutante C1V1-E122/E162 desvelada puede tener propiedades y características específicas para su uso en la despolarización de la membrana de una célula neuronal en respuesta a la luz.

50 Se puede encontrar una divulgación adicional relacionada con los canales de cationes quiméricos C1V1, así como las variantes mutantes de los mismos en las Solicitudes Provisionales de Patente de EE. UU. N.º 61/410.736, 61/410.744, y 61/511.912.

Polinucleótidos

55 La divulgación también proporciona polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una opsina proteica sensible a la luz descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende un casete de expresión. En algunas realizaciones, el polinucleótido es un vector que comprende el ácido nucleico descrito anteriormente. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica una proteína activada por la luz de la divulgación está unido operativamente a un promotor. Los promotores son bien conocidos en la técnica. Cualquier promotor que funciona en la célula huésped puede utilizarse para la expresión de las opsinas proteicas sensibles a la luz y/o cualquier variante de las mismas de la presente divulgación. En una realización, el promotor que se utiliza para dirigir la expresión de las opsinas proteicas sensibles a la luz es un promotor que sea específico para las neuronas motoras. En otra realización, el promotor que se utiliza para dirigir la expresión de las opsinas proteicas sensibles a la luz es un promotor que es específico de las neuronas del sistema nervioso central. En otras realizaciones, el promotor es capaz de dirigir la expresión de las opsinas proteicas sensibles a la luz tanto en el

sistema nervioso simpático como para simpático. Las regiones de control de inicio o promotores, que son útiles para dirigir la expresión de las opsinas proteicas sensibles a la luz o una variante de las mismas en una célula animal específica son numerosos y familiares para los expertos en la técnica. Virtualmente se pueden utilizar cualquier promotor capaz de dirigir estos ácidos nucleicos. Ejemplos de genes específicos de neuronas motoras pueden encontrarse, por ejemplo, en Kudo, et al., Human Mol. Genetics, 2010, 19(16): 3233-3253. En algunas realizaciones, el promotor que se utiliza para dirigir la expresión de la proteína activada por la luz puede ser el promotor Thy1, que es capaz de dirigir la expresión robusta de transgenes en las neuronas tanto del sistema nervioso central como periférico (véase, por ejemplo, Llewellyn, et al., 2010, Nat. Med., 16(10):1161-1166). En otras realizaciones, el promotor que se utiliza para dirigir la expresión de la opsina proteica sensible a la luz puede ser el promotor EFla, un promotor de citomegalovirus (CMV), el promotor CAG, el promotor sinapsina, o cualquier otro promotor ubicuo capaz de dirigir la expresión de las opsinas proteicas sensibles a la luz en las neuronas de los sistemas nerviosos central y/o periférico de mamíferos.

También se proporcionan en el presente documento vectores que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifican una opsina proteica sensible a la luz o cualquier variante de la misma descrita en el presente documento. Los vectores que se pueden administrar de acuerdo con la presente invención también incluyen vectores que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un ARN (por ejemplo, un ARNm) que cuando se transcribe a partir de los polinucleótidos del vector dará como resultado la acumulación de opsinas proteicas sensibles a la luz en las membranas plasmáticas de células animales diana. Los vectores que se pueden utilizar incluyen, sin limitación, lentivíricos, HSV, vectores víricos adenovíricos y adenoasociados (AAV). Los lentivirus incluyen, pero no se limitan a HTV-1, HTV-2, SIV, FIV y EIAV. Los lentivirus se pueden pseudotipar con las proteínas de envoltura de otros virus, incluyendo, pero sin limitarse a, VSV, rabia, Mo-MLV, baculovirus y Ébola. Dichos vectores se pueden preparar utilizando métodos convencionales de la técnica.

En algunas realizaciones, el vector es un vector AAV recombinante. Los vectores AAV son virus ADN de tamaño relativamente pequeño que se pueden integrar, de manera estable, y específica del sitio, en el genoma de las células que infectan. Son capaces de infectar un amplio espectro de células e inducir efectos sobre el crecimiento, morfología o diferenciación celular, y no parecen estar implicados en patologías humanas. El genoma de AAV se ha clonado, secuenciado y caracterizado. Engloba aproximadamente 4700 bases y contiene una región repetida terminar invertida (ITR) de aproximadamente 145 bases en cada extremo, que sirve como origen de replicación del virus. El resto del genoma se divide en dos regiones esenciales que llevan las funciones de encapsidación: la parte izquierda del genoma, que contiene el gen *rep* implicado en la replicación y expresión de genes víricos; y la parte derecha del genoma, que contiene el gen *cap* que codifica las proteínas de la cápside del virus.

Los vectores AAV se puede preparar utilizando métodos convencionales en la técnica. Los virus adeno-asociados de cualquier serotipo son adecuados (véase, por ejemplo, Blacklow, pp. 165-174 de "Parvoviruses and Human Disease" J. R Pattison, ed. (1988); Rose, Comprehensive Virology 3:1, 1974; P. Tattersall "The Evolution of Parvovirus Taxonomy" in Parvoviruses (JR Kerr, SF Cotmore. ME Bloom, RM Linden, CR Parrish, Eds.) p5-14, Hudder Arnold, London, UK (2006); y DE Bowles, JE Rabinowitz, RJ Samulski "77ze Genus Dependovirus" (JR Kerr, SF Cotmore. ME Bloom, RM Linden, CR Parrish, Eds.) p 15-23, Hudder Arnold, Londres, UK (2006). Los métodos para la purificación de los vectores se pueden encontrar, por ejemplo, en las Pat. de EE. UU. N.º 6.566.118, 6.989.264, y 6.995.006 y la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º WO/1999/011764 titulada "Methods for Generating High Titer Helper-free Preparation of Recombinant AAV Vectors". La preparación de vectores híbridos se describe, por ejemplo, en la Solicitud PCT N.º PCT/US2005/027091, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Se ha descrito el uso de vectores derivados de los AAV para la transferencia de genes *in vitro* e *in vivo*. (Véase, por ejemplo, las Publicaciones de Solicitud de Patente internacional N.º WO 91/18088 y WO 93/09239; Patentes de EE. UU. N.º 4.797.368, 6.596.535, y 5.139.941; y Patente Europea N.º: 0488528). Estas publicaciones describen distintas construcciones derivadas de AAV en las que se eliminan los genes *rep* y/o *cap* y se remplazan por un gen de interés, y el uso de estas construcciones para la transferencia del gen de interés *in vitro* (en cultivos celulares) o *in vivo* (directamente en un organismo). La replicación de AAV recombinantes defectuosos de acuerdo con la invención se pueden preparar co-transfectando un plásmido que contiene la secuencia de ácido nucleico de interés flanqueada por dos regiones de repetición terminales invertidas (ITR), y un plásmido que alberga los genes de encapsidación de AAV (genes *rep* y *cap*), en una línea celular que se infecta con un virus auxiliar humano (por ejemplo, un adenovirus). Los AAV recombinantes que se producen se purifican entonces por técnicas convencionales.

En algunas realizaciones, el vector para su uso en los métodos de la invención se encapsidan en una partícula vírica (por ejemplo, una partícula de virus AAV que incluye, pero no se limita a, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15, y AAV16). En consecuencia, la invención incluye una partícula recombinante vírica (recombinante porque contiene un polinucleótido recombinante) que comprende cualquiera de los vectores descritos en el presente documento. Los métodos de producción de dichas partículas se conocen en la técnica y se describen en la Patente de EE. UU. N.º 6.596.535.

Suministro de opsinas proteicas sensibles a la luz y nanopartículas dopadas con lantánidos

En algunos aspectos, los polinucleótidos que codifican las opsinas proteicas sensibles a la luz desveladas en el presente documento (por ejemplo, un vector AAV1) se pueden suministrar directamente a las neuronas del sistema nervioso central o periférico con una aguja, catéter, o dispositivo relacionado, utilizando técnicas neuroquirúrgicas conocidas en la técnica, tal como la inyección estereotáctica (véase, por ejemplo, Stein et al., J. Virol, 1999, 73:3424-3429; Davidson et al, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97:3428-3432; Davidson et al., Nat. Genet., 1993, 3:219-223; y Alisky & Davidson, Hum. Gene Ther., 2000, 11:2315-2329) o fluoroscopia. En algunas realizaciones, el polinucleótido que codifica las opsinas proteicas sensibles a la luz desveladas en el presente documento (por ejemplo, un vector AAV1) se pueden suministrar a las neuronas del sistema nerviosos periférico por la inyección en uno cualquiera de los nervios espinales (tal como los nervios espinales cervicales, los nervios espinales torácicos, los nervios espinales lumbares, los nervios espinales sacros, y/o los nervios espinales coxígeos).

También se pueden utilizar otros métodos de suministro de las opsinas proteicas sensibles a la luz a los nervios de interés, tal como, pero sin limitarse a, transfección con lípidos iónicos o polímeros, electroporación, transfección óptica, impalefección, o mediante una pistola genética.

En otro aspecto, el polinucleótido que codifica las opsinas proteicas sensibles a la luz desveladas en el presente documento (por ejemplo, un vector AAV2) se puede suministrar directamente a los músculos inervados por las neuronas del sistema nervioso periférico. Debido a las limitaciones inherentes a la inyección de vectores víricos directamente en los cuerpos celulares específicos que inervan músculos particulares, los investigadores han intentado suministrar transgenes a las neuronas periféricas inyectando vectores víricos directamente en el músculo. Estos experimentos han demostrado que algunos serotipos víricos tales como adenovirus, AAV2 y lentivirus pseudotipados con glicoproteína de rabia pueden captarse por las células musculares y transportada retrógradamente a las neuronas motoras a través de la sinapsis neuromuscular (véase, por ejemplo, Azzouz et al., 2009, AntioxidRedox Signal., 11 (7): 1523-34; Kaspar et al., 2003, Science, 301(5634):839-842; Manabe et al., 2002, Apoptosis, 7(4)329-334). En consecuencia, en algunas realizaciones, los vectores que expresan las opsinas proteicas sensibles a la luz desveladas en el presente documento (por ejemplo, el vector AAV2) puede suministrarse a las neuronas responsables de la inervación de los músculos por inyección directa en el músculo de interés.

Las nanopartículas dopadas con lantánidos desveladas en el presente documento se pueden suministrar a las neuronas que expresan una o más opsinas proteicas sensibles a la luz por cualquier vía, tal como intravascular, intracraneal, intracerebral, intramuscular, intradérmica, intravenosa, intraocular, oral, nasal, tópica, o por un procedimiento quirúrgico abierto, dependiendo del sitio o sitios anatómicos en los que se van a suministrar las nanopartículas. Las nanopartículas se pueden suministrar adicionalmente por la misma vía utilizada para el suministro de los vectores de polinucleótidos que expresan las opsinas proteicas sensibles a la luz, tales como cualquiera de las descritas anteriormente. Las nanopartículas se pueden administrar también de manera abierta, como en el corazón durante una cirugía a corazón abierto, o en el cerebro durante la cirugía estereotáctica, o por métodos de intervención intravascular utilizando catéteres que van a suministrar sangre a órganos específicos, o por otros métodos de intervención.

Las composiciones farmacéuticas utilizadas para el suministro y/o almacenamiento de polinucleótidos que codifican las opsinas proteicas sensibles a la luz desveladas en el presente documento y/o las nanopartículas dopadas de lantánidos desveladas en el presente documento se pueden formular de acuerdo con métodos conocidos para la preparación de composiciones farmacéuticamente útiles. Las formulaciones se describen en varias fuentes que son bien conocidas y fácilmente disponibles para los expertos en la técnica. Por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin E W, 1995, Easton Pa., Mack Publishing Company, 19 ed.) describe formulaciones que se pueden utilizar en conexión con la invención objeto. Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen, por ejemplo, soluciones para inyección acuosas estériles, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del presunto receptor; y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes suspensores y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentares en recipientes de dosis unitaria o multi-dosis, por ejemplo, ampollas selladas y viales, y se pueden almacenar en una condición secada por congelación (liofilizada) que necesita solo la condición de que el vehículo líquido sea estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, antes de su uso.

Las nanopartículas dopadas con lantánidos también se pueden administrar por vía intravenosa o intraperitoneal por infusión o inyección. Las soluciones de las nanopartículas y/o células se pueden preparar en agua, opcionalmente mezcladas con un tensioactivo no tóxico. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las formas de dosificación farmacéutica adecuadas para la inyección o infusión de las nanopartículas dopadas con lantánidos descritas en el presente documento pueden inducir soluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden el principio activo que se adapta para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables o infundibles. El vehículo o excipiente líquido puede ser un disolvente o un medio de dispersión de líquidos que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol,

polietilenglicoles líquidos, y similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos, y mezclas adecuadas de los mismos. La prevención de la acción de microorganismos se puede conseguir mediante distintos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares.

5 Fuentes de radiación electromagnética infrarroja o cerca de la infrarroja

Se puede utilizar cualquier dispositivo que sea capaz de producir una fuente de radiación que tenga una longitud de onda en el espectro infrarrojo (IR) o cerca del infrarrojo (NIR) para activar una o más proteínas sensibles a la luz que se expresan en la superficie de una neurona en combinación con las nanopartículas dopadas con lantánidos descritas en el presente documento. La fuente de IR o NIR se puede configurar para proporcionar un estímulo óptico a una región diana específica del cerebro. La fuente de IR o NIR puede proporcionar adicionalmente una radiación electromagnética IR o NIR continua y/o una radiación electromagnética IR o NIR pulsada, y puede ser programable para proporcionar radiación electromagnética IR o NIR en secuencias de pulso predeterminadas.

En otros aspectos, la fuente de IR o NIR implantable no necesita estar físicamente atada a una fuente de energía externa. En algunas realizaciones, la fuente de energía puede ser una batería interna para alimentar la fuente de IR o NIR. En otra realización, la fuente de IR o NIR implantable puede comprender una antena externa para recibir de manera inalámbrica la energía electromagnética transmitida a partir de una fuente de energía externa para alimentar la fuente de IR o NIR. La energía electromagnética transmitida de manera inalámbrica puede ser una onda de radio, una microonda, o cualquier otra fuente de energía electromagnética que se pueda transmitir desde una fuente externa para alimentar la fuente que genera el IR o NIR. En una realización, la fuente de IR o NIR se controla mediante un circuito integrado producido utilizando un semiconductor u otros procedimientos conocidos en la técnica.

En algunos aspectos, la fuente de radiación electromagnética IR o NIR implantable puede activarse externamente por un controlador externo. El controlador externo puede comprender un generador de energía que se puede montar en un collar transmisor. En algunas realizaciones del controlador externo, se puede conectar una batería al generador de energía para proporcionar energía a este. Se puede conectar un interruptor al generador de energía, permitiendo a un individuo activar o desactivar manualmente el generador de energía. En algunas realizaciones, al activar el interruptor, el generador de energía puede proporcionar energía a la fuente de radiación electromagnética IR o NIR mediante el acoplamiento electromagnético entre el collar transmisor en el controlador externo y la antena externa de la fuente de IR o NIR implantable. Cuando se utiliza el acoplamiento de inductancia magnética de radiofrecuencia, la frecuencia operativa de la onda de radio puede estar entre aproximadamente 1 a 20 MHz, inclusive, incluyendo cualquier valor entre estos números (por ejemplo, aproximadamente 1 MHz, aproximadamente 2 MHz, aproximadamente 3 MHz, aproximadamente 4 MHz, aproximadamente 5 MHz, aproximadamente 6 MHz, aproximadamente 7 MHz, aproximadamente 8 MHz, aproximadamente 9 MHz, aproximadamente 10 MHz, aproximadamente 11 MHz, aproximadamente 12 MHz, aproximadamente 13 MHz, aproximadamente 14 MHz, aproximadamente 15 MHz, aproximadamente 16 MHz, aproximadamente 17 MHz, aproximadamente 18 MHz, aproximadamente 19 MHz, o aproximadamente 20 MHz). Sin embargo, se pueden utilizar otras técnicas de acoplamiento, tales como un receptor óptico o un sistema de telemetría biomédica (véase, por ejemplo, Kiourti, "Biomedical Telemetry: Communication between Implanted Devices and the External World, Opticon 1826, (8): Spring, 2010).

En algunos aspectos, la intensidad de la radiación electromagnética IR o NIR que alcanza las células neurales (tales como células neurales que expresan una o más opsinas proteicas sensibles a la luz) producida por la fuente de radiación electromagnética de IR o NIR tiene una intensidad de cualquiera de aproximadamente 0,05 mW/mm², 0,1 mW/mm², 0,2 mW/mm², 0,3 mW/mm², 0,4 mW/mm², 0,5 mW/mm², aproximadamente 0,6 mW/mm², aproximadamente 0,7 mW/mm², aproximadamente 0,8 mW/mm², aproximadamente 0,9 mW/mm², aproximadamente 1,0 mW/mm², aproximadamente 1,1 mW/mm², aproximadamente 1,2 mW/mm², aproximadamente 1,3 mW/mm², aproximadamente 1,4 mW/mm², aproximadamente 1,5 mW/mm², aproximadamente 1,6 mW/mm², aproximadamente 1,7 mW/mm², aproximadamente 1,8 mW/mm², aproximadamente 1,9 mW/mm², aproximadamente 2,0 mW/mm², aproximadamente 2,1 mW/mm², aproximadamente 2,2 mW/mm², aproximadamente 2,3 mW/mm², aproximadamente 2,4 mW/mm², aproximadamente 2,5 mW/mm², aproximadamente 3 mW/mm², aproximadamente 3,5 mW/mm², aproximadamente 4 mW/mm², aproximadamente 4,5 mW/mm², aproximadamente 5 mW/mm², aproximadamente 5,5 mW/mm², aproximadamente 6 mW/mm², aproximadamente 7 mW/mm², aproximadamente 8 mW/mm², aproximadamente 9 mW/mm², o aproximadamente 10 mW/mm², inclusive, incluyendo los valores entre estos números.

En otros aspectos, la radiación electromagnética de IR o NIR producida por la fuente de radiación electromagnética de IR o NIR puede tener una longitud de onda que engloba el espectro infrarrojo completo, tal como desde aproximadamente 740 nm a aproximadamente 300.000 nm. En otras realizaciones, la radiación electromagnética IR o NIR producida por la fuente de radiación electromagnética de IR o NIR puede tener una longitud de onda que se corresponde con el espectro NIR, tal como aproximadamente 740 nm a aproximadamente 1400 nm. En otras realizaciones, la radiación electromagnética producida tiene una longitud de onda entre 700 nm y 1000 nm.

En algunos aspectos, se utiliza una fuente de radiación electromagnética IR o NIR para hiperpolarizar o despolarizar las membranas plasmáticas de células neurales (tales como células neurales que expresan una o más opsinas

proteicas sensibles a la luz) en el cerebro o el sistema nervioso central de un individuo cuando se utiliza en combinación con las nanopartículas dopadas con lantánidos desveladas en el presente documento. En algunas realizaciones, el cráneo del individuo se adelgaza en un área adyacente a la región del cerebro de interés sin perforar el hueso. La fuente de radiación electromagnética de IR o NIR puede situarse directamente sobre la región del cráneo adelgazada. En otras realizaciones, el generador de radiación electromagnética de IR o NIR se implanta ajo la piel del individuo directamente adyacente a la región del cráneo adelgazada.

En algunos aspectos, se utiliza una fuente de radiación electromagnética de IR o NIR para hiperpolarizar o despolarizar las membranas plasmáticas de las células neurales (tales como las células neurales que expresan una o más opsinas proteicas sensibles a la luz) en el sistema nervioso periférico de un individuo cuando se utilizan en combinación con las nanopartículas dopadas con lantánidos desveladas en el presente documento. En algunas realizaciones, la fuente de radiación electromagnética de IR o NIR se implanta quirúrgicamente bajo la piel del individuo directamente adyacente a la célula neural periférica de interés. En otras realizaciones, la fuente de radiación electromagnética de IR o NIR se coloca contra la piel directamente adyacente a la célula neural periférica de interés. En una realización, la fuente de radiación electromagnética de IR o NIR se mantiene contra la piel en una configuración de brazalete o pulsera.

Ejemplos de fuentes de radiación electromagnética IR o NIR, particularmente las suficientemente pequeñas para implantarse bajo la piel se pueden encontrar en las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º 2009/0143842, 2011/0152969, 2011/0144749, y 2011/0054305. En otros aspectos más, las nanopartículas dopadas con lantánidos desveladas en el presente documento se pueden exponer a una luz de mayor longitud de onda en el espectro visible (tal como luz roja) para convertir de manera ascendente la luz visible de longitud de onda mayor en luz visible de longitud de onda menor (tal como luz azul o verde). Como se ha descrito anteriormente, la luz pasa a través del tejido biológico pobremente. Sin embargo, cuando la luz visible penetra en los tejidos, normalmente lo hace en longitudes de onda mayores que se corresponden con la luz roja (por ejemplo, entre aproximadamente 620 nm a 740 nm). En consecuencia, las nanopartículas dopadas con lantánidos desveladas en el presente documento pueden utilizarse adicionalmente en combinación con fuentes ópticas de luz visible para cambiar de manera ascendente las longitudes de onda que corresponden a la luz roja en longitudes de onda que se corresponden con la luz verde o azul (por ejemplo, entre aproximadamente 440 nm y 570 nm). Ejemplos de dispositivos de estimulación por la luz, incluyendo las fuentes de luz, se pueden encontrar en las Solicitudes de Patente internacional N.º PCT/US 08/50628 y PCT/US 09/49936 y en Llewellyn et al., 2010, Nat. Med., 16(10): 161-165.

Métodos de la invención

Despolarización de células neurales

Se proporciona en el presente documento un producto que comprende una pluralidad de nanopartículas dopadas con lantánidos para su uso en un método de tratamiento de un individuo para despolarizar la membrana plasmática de una célula neural en un individuo, en el que dicho método comprende: (a) colocar la pluralidad de nanopartículas dopadas con lantánido en proximidad a la célula neural; y (b) exponer la pluralidad de nanopartículas a la radiación electromagnética en el espectro infrarrojo (IR) o cerca del infrarrojo (NIR), en el que la radiación electromagnética en el espectro IR o NIR se convierte de manera ascendente en el espectro de luz visible por las nanopartículas, y en el que la opsina sensible a la luz se expresa en la membrana plasmática de las células neurales y la activación de la opsina por la luz del espectro visible induce la despolarización de la membrana plasmática. También se proporciona en el presente documento un producto que comprende un polinucleótido que codifica una opsina sensible a la luz para su uso en un método de tratamiento de un individuo para despolarizar la membrana plasmática de una célula neural en un individuo, en el que dicho método comprende: (a) la administración del polinucleótido que codifica la opsina sensible a la luz al individuo, en el que se expresa la proteína sensible a la luz en la membrana plasmática de la célula neural en el individuo y la opsina es capaz de inducir la despolarización de la membrana de la célula neural cuando se ilumina con luz; (b) la administración de una pluralidad de nanopartículas dopadas con lantánidos en proximidad de la célula neural; y (c) la exposición de la pluralidad de nanopartículas a la radiación electromagnética en el espectro infrarrojo (IR) o cerca del infrarrojo (NIR), en el que la radiación electromagnética en el espectro IR o NIR, en el que la radiación electromagnética en el espectro IR o NIR se convierte de manera ascendente en luz del espectro visible y la activación de la opsina por la luz del espectro visible induce la despolarización de la membrana plasmática. En algunas realizaciones, la opsina proteica sensible a la luz es ChR2, VChR1, o C1V1. En otras realizaciones, la opsina proteica sensible a la luz se selecciona de entre el grupo que consiste en SFO, SSFO, C1V1-E122, C1V1-E162, y C1V1-E122/E162.

El metal lantánido puede ser iones o átomos de cualquiera de la serie de elementos lantánidos, tales como Lantano, cerio, praseodimio, neodimio, prometio, samario, europio, gadolinio, terbio, disprosio, holmio, erbio, tulio, iterbio, o lutecio. En otras realizaciones, las nanopartículas comprenden NaYF₄:Yb/X/Gd, en el que X es Er, Tm o Er/Tm.

La radiación electromagnética del espectro IR o cerca de IR se puede convertir de manera ascendente en luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 450 nm a aproximadamente 550 nm. La luz puede tener longitudes de onda que se corresponden con la luz roja, amarilla, ámbar, naranja, verde o azul. En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano o un animal no humano. En otras realizaciones, la célula neural está en el sistema

nervioso periférico. En otra realización, la célula neural está en el sistema nervioso central.

Hiperpolarización de células neurales

- 5 Se proporciona en el presente documento un producto que comprende una pluralidad de nanopartículas dopadas con lantánidos para su uso en un método de tratamiento de un individuo para hiperpolarizar la membrana plasmática de una célula neural en un individuo, en el que dicho método comprende: (a) colocar una pluralidad de nanopartículas dopadas con lantánidos en proximidad a la célula neural; y (b) exponer la pluralidad de nanopartículas a la radiación electromagnética en el espectro infrarrojo (IR) o cerca de infrarrojo (NIR), en el que la radiación electromagnética en el espectro IR o NIR se convierte de manera ascendente en luz en el espectro visible por las nanopartículas, y en el que se expresa una opsina sensible a la luz en la membrana plasmática de las células neurales y la activación de la opsina por la luz en el espectro visible induce la hiperpolarización de la membrana plasmática. También se proporciona en el presente documento un producto que comprende un polinucleótido que codifica una opsina sensible a la luz para su uso en un método de tratamiento de un individuo para hiperpolarizar la membrana plasmática de una célula neural en un individuo, en el que dicho método comprende: (a) la administración del polinucleótido que codifica la opsina sensible a la luz al individuo en el que la proteína sensible a la luz se expresa en la membrana plasmática de la célula neural del individuo y la opsina es capaz de inducir la hiperpolarización de la membrana de la célula neural cuando se ilumina con luz; (b) la administración de un pluralidad de nanopartículas dopadas con lantánidos en proximidad a la célula neural; y (c) exposición de la pluralidad de nanopartículas a la radiación electromagnética en el espectro infrarrojo (IR) o cerca de infrarrojo (NIR), en que la radiación electromagnética en el espectro IR o NIR se convierte de manera ascendente en luz en el espectro visible y la activación de la opsina por la luz en el espectro visible induce la hiperpolarización de la membrana plasmática. En algunas realizaciones, la opsina proteica sensible a la luz es una NpHR o GtR3.
- 25 El metal lantánido puede ser iones o átomos de cualquiera de la serie de elementos lantánidos, tales como Lantano, cerio, praseodimio, neodimio, prometio, samario, europio, gadolinio, terbio, disprosio, holmio, erbio, tulio, iterbio, o lutecio. En otras realizaciones, las nanopartículas comprenden NaYF₄:Yb/X/Gd, en el que X es Er, Tm o Er/Tm.

30 La radiación electromagnética en el espectro IR o cerca de IR se puede convertir de manera ascendente en luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 450 nm a aproximadamente 550 nm. La luz puede tener longitudes de onda correspondientes a la luz roja, amarilla, ámbar, naranja, verde, o azul. En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano o un animal no humano. En otras realizaciones, la célula neural está en el sistema nervioso periférico. En otra realización, la célula neural está en el sistema nervioso central.

Kits

35 También se proporcionan en el presente documento kits que comprende los polinucleótidos que codifican una opsina proteica sensible a la luz (tal como cualquiera de las opsinas proteicas sensibles a la luz descritas en el presente documento) y nanopartículas dopadas con lantánidos para su uso en cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento para alterar el estado de polarización de la membrana de una o más neuronas del sistema nervioso central y/o periférico. En algunas realizaciones, los kits comprenden adicionalmente una fuente de radiación electromagnética infrarroja o cerca de la infrarroja. En otras realizaciones, los kits comprenden adicionalmente instrucciones para utilizar los polinucleótidos y nanopartículas dopadas con lantánidos descritos en el presente documento. En otras realizaciones más, las nanopartículas dopadas con lantánidos descritos en el presente documento están embebidas y/o atrapadas en un material biocompatible (tal como cualquiera de los materiales biocompatibles descritos anteriormente).

Realizaciones a modo de ejemplo

- 50 Se pueden entender más completamente los aspectos de la presente invención en consideración de la descripción detallada de distintas realizaciones de la presente divulgación a continuación en conexión con los dibujos adjuntos. Esta descripción y las distintas realizaciones se presentan de la siguiente manera:
Las realizaciones y aplicaciones específicas expuestas en el presente documento se pueden implementar en conexión con uno o más de los aspectos, realizaciones e implementaciones descritos anteriormente, así como los que se muestran en las figuras y se describen posteriormente. También se puede hacer referencia a Wang et al., 2010, Nature, 463(7284): 1061-5. Para detalles adicionales de las moléculas y/u opsinas sensibles a la luz, incluyendo la metodología, dispositivos y sustancias, también se puede hacer referencia a las siguientes publicaciones antecedentes: Publicación de Patente N.º 2010/0190229, titulada "System for Optical Stimulation of Target Cells" de Zhang et al.; Publicación de Patente N.º 2007/0261127, titulada "System for Optical Stimulation of Target Cells" de Boyden et al. Consistente con estas publicaciones, se pueden utilizar numerosas opsinas en células de mamífero *in vivo* e *in vitro* para proporcionar la estimulación y control óptico de las células diana. Por ejemplo, cuando se introduce ChR2 en una célula excitable eléctricamente, tal como una neurona, la activación del canal de rodopsina ChR2 por la luz puede dar como resultado la excitación y/o disparo de la célula. En casos en los que se introduce NpHR en una célula excitable eléctricamente, tal como una neurona, la activación de la opsina NpHR por la luz puede dar como resultado la inhibición del disparo de la célula. Estos y otros aspectos de las divulgaciones de las solicitudes de patente a las que se hace referencia anteriormente pueden ser útiles para implementar

distintos aspectos de la presente divulgación.

En distintas realizaciones de la presente divulgación, se consigue un suministro de luz mínimamente invasivo, por ejemplo, como puede ser útil para la modificación de los circuitos neurales con optogenética, utilizando la conversión de manera ascendente de nanocristales cerca del infrarrojo. Esto se utiliza para evitar el implante de fuentes de luz en los tejidos vivos, incluyendo, por ejemplo, el cerebro de un sujeto. El tejido de mamífero tiene una ventana de transparencia en la parte del espectro cercana a infrarrojo (700-1000 nm). En consecuencia, los aspectos de la presente divulgación se refieren al uso de nanopartículas para el fin de utilizar luz (cerca de) infrarroja para suministrar energía en la profundidad del cerebro convirtiendo la luz infrarroja en longitudes de onda visibles en un sitio de interés.

En ciertas realizaciones, el suministro de longitudes de onda visibles en el sitio de interés en el cerebro se consigue mediante un proceso de conversión ascendente óptica en nanocristales dopados con lantánidos. Durante la conversión ascendente se absorben 3-4 fotones por el material que entonces emite un fotón con una energía ~ 1,5-2 veces la energía de los fotones absorbidos. Por ejemplo, los nanocristales NaYF₄: Yb/X/Gd pueden absorber luz de 980 nm y emite luz con un espectro centrado entre 450-550 nm dependiendo de la naturaleza y contenido relativo de los dopantes (X = Er, Tm Er/Tm). Para más información con respecto a la modificación de la luz emitida por nanopartículas, véase Wang et al., Nature, 2010, 463(7284):1061-5. En ciertas realizaciones, se lleva a cabo una cirugía de una única etapa para modificar una población celular diana y proporciona nanopartículas para convertir la luz cerca a infrarroja a luz visible que estimula la población de células diana modificadas. Durante la cirugía, el cirujano inyecta tanto un virus adeno-asociado que alberga un gen de opsina y una solución de nanopartículas en el sitio de interés.

El virus está optimizado para infectar solamente la población de células diana. De manera similar, las nanopartículas se funcionalizan con anticuerpos de manera que las nanopartículas también se anclan a la población de células diana. En ciertas realizaciones más específicas la población de células diana es un tipo particular de neuronas. Después de terminar la cirugía, se coloca un LED que emite luz cerca de infrarroja en una parte adelgazada del cráneo del paciente, debajo de la piel. También se puede implantar una batería bajo la piel para alimentar el LED. En ciertas realizaciones, la batería tiene características similares a las de una batería de marcapasos. Se puede utilizar un microcontrolador para controlar la batería para suministrar energía al LED a intervalos especificados, dando como resultado pulsos de luz LED a intervalos especificados.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren al uso de optogenética *in vivo*. La optogenética, aplicada *in vivo*, se basa en el suministro de luz a poblaciones neuronales específicas que se pueden localizar profundas en el cerebro. El tejido de mamífero es altamente absorbente y dispersa la luz del espectro visible. Sin embargo, la luz cerca de infrarrojos es capaz de penetrar a niveles profundos del cerebro sin una absorción ni dispersión excesiva.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren a la incrustación de nanopartículas en el cerebro cerca de las neuronas diana. Las nanopartículas pueden ser nanopartículas dopadas con lantánidos. Las nanopartículas dopadas con lantánidos o con otros dopantes pueden optimizarse con respecto al espectro de activación de una opsina en particular. Como se expone con más detalle en Wang et al., Nature, 2010, 463(7284):1061-5, el espectro de la luz emitida por los nanocristales dopados con lantánidos se pueden modificar basándose en los dopantes que se utilicen, y cuantos. De manera similar, la luz emitida por las nanopartículas dopadas con otras moléculas se puede modificar basándose en la concentración de dopantes.

La capacidad para proporcionar un espectro de salida diferente dependiendo del dopante de las nanopartículas permite una aproximación no invasiva a la modificación neural aguda. Una fuente de luz, tal como un LED puede montarse sobre un cráneo adelgazado bajo la piel. Dependiendo de la composición de las nanopartículas, y la opsina suministrada a las neuronas diana, se pueden utilizar los aspectos de la presente divulgación para la excitación o silenciamiento neural. De manera similar, se pueden controlar simultáneamente múltiples poblaciones neurales mediante el uso de distintos dopantes y opsinas en combinación.

Volviendo a la **FIG. 1**, se muestra una cabeza de paciente **100**. Una población de células diana **114** (neurales) que incluye moléculas sensibles a la luz. Estas moléculas sensibles a la luz pueden incluir, por no se limita necesariamente a, opsinas derivadas del canal de rodopsinas (por ejemplo, ChR1 o ChR2) o Halorrodopsinas (NpHR). La molécula específica se puede seleccionar/ajustar basándose en el efecto deseado sobre la población de células diana y la longitud de onda a la que las moléculas responden a la luz.

Se introducen nanocristales **100** cerca de la población de células diana. Distintas realizaciones de la presente divulgación se refieren a métodos y dispositivos para posicionar y mantener la posición de los nanocristales cerca de la población de células diana. Ciertas realizaciones se refieren al anclaje de los nanocristales a las células de (o cerca) la población de células diana utilizando anticuerpos.

De acuerdo con otras realizaciones a modo de ejemplo, se puede introducir una estructura que incluye los nanocristales. Por ejemplo, una estructura de malla que se puede revestir con los nanocristales. La malla sintética puede construirse de manera que permita que las dendritas y axones pasen a través de la malla sin permitir el paso de la neurona entera (por ejemplo, el cuerpo celular). Un ejemplo de dicha malla tiene poros que están en el orden de 3-7 micrómetros de diámetro y está fabricada de tereftalato de polietileno. Esta estructura de malla se puede construir con células/neuronas sensibles a la luz contenidas en la misma y/o se puede colocar cerca de la población de células diana, que incluye las células sensibles a la luz. En concordancia con otra realización, se puede posicionar una o más cápsulas transparentes que cada una incluye una solución de nanocristales, cerca de las poblaciones de células diana.

Las realizaciones de la presente divulgación también se refieren a distintas fuentes ópticas de estimulación. Estas fuentes pueden incluir, pero no se limitan a, fuentes de láser externas y diodos emisores de luz (LED). Los aspectos particulares de la presente divulgación se refieren a la relativamente baja absorción y dispersión/difusión producida por el material que interviene cuando la luz está a ciertas longitudes de onda (por ejemplo, (cerca de) infrarrojas). En consecuencia, la fuente de luz se puede localizar externamente debido a la capacidad para penetrar el tejido con poca pérdida de intensidad óptica o potencia. Además, la reducción de la difusión puede ser particularmente útil para proporcionar una precisión espacial relativamente alta en el suministro de la luz. Por lo tanto, las realizaciones de la presente divulgación se refieren a múltiples poblaciones de células diana con respectivos nanocristales que se pueden controlar individualmente utilizando un estímulo óptico espacialmente preciso. Por ejemplo, los nanocristales se pueden implantar en varias localizaciones en el cerebro. Entonces se puede dirigir la fuente de luz a una localización respectiva y particular.

En concordancia con una realización particular de la presente divulgación, el cráneo 102 tiene una parte adelgazada 106. Se localiza un LED 104 por encima de la parte adelgazada del cráneo y emite una luz cerca de infrarroja 108. Cuando el IR alcanza el nanocristal 110, se absorbe. El nanocristal emite una luz visible 112 en respuesta a la absorción de la luz IR 108. La luz visible 112 se absorbe por la célula modificada 114.

El sistema que se muestra en la **FIG. 1** permite el suministro de luz a una célula diana profundamente en el tejido cerebral de un paciente. La molécula sensible a la luz se puede dirigir específicamente a un tipo celular neural de interés. De manera similar, los nanocristales **112** se anclan a la célula neural con anticuerpos escogidos basándose en el tipo de célula neural **114** a la que se van a dirigir.

Volviendo a la **FIG. 2**, se ilumina un grupo de neuronas con luz infrarroja 2098 entre 700-1000 nm. Las neuronas diana **214** expresan un gen de opsina, permitiendo que las neuronas se activen o inhiban dependiendo de que opsina y que longitud de onda de luz se absorbe por las neuronas **214**. Las neuronas **214** diana pueden estar intercaladas entre otras neuronas **216**. Como se muestra en la incrustación 202, las neuronas diana **214** están revestidas con nanopartículas de conversión ascendente **210** que están ancladas a la membrana neural mediante anticuerpos. Las nanopartículas **210** absorben fotones IR y emiten fotones visibles que entonces son absorbidos por las opsinas que desencadenan la activación neural.

El sistema de la **FIG. 2** se puede utilizar con varias neuronas diana **214**. El gen de la opsina **215** que se expresa en las neuronas diana **214** se modifica basándose en la neurona diana. De manera similar, los anticuerpos utilizados para anclar las nanopartículas **210** a las membranas de las neuronas diana se modifican para unirse a un tipo de membrana específica. Como se muestra en la incrustación **202**, las nanopartículas **210** están íntimamente unidas a las neuronas diana de manera que los fotones de luz visible emitidos por las nanopartículas **210** se absorben por las neuronas diana **214**.

La **FIG. 3** representa un sistema que utiliza múltiples fuentes de luz, en concordancia con una realización de la presente divulgación. Un paciente tiene nanopartículas localizadas en las localizaciones diana **308-312**. El sistema incluye las fuentes de luz **302-306**, que se pueden configurar para generar luz a una frecuencia que se convierte de manera ascendente por las nanopartículas localizadas en las localizaciones diana **308-312**. Aunque se representan tres fuentes de luz, puede haber cualquier cantidad de fuentes de luz. Estas fuentes de luz pueden ser externas al paciente (por ejemplo, un sistema de direccionamiento que dirija varias fuentes de luz utilizando un posicionamiento mecánico), utilizando fuentes de luz embebidas (por ejemplo, LED implantados en el cráneo) o combinaciones de las mismas. Las localizaciones diana **308-312** incluyen células que tiene moléculas de membrana que responden ópticamente. Estas moléculas de membrana que responden ópticamente reaccionan a la luz a la frecuencia convertida de manera ascendente.

Las nanopartículas localizadas en la intersección **314** de la luz de las diferentes fuentes de luz **302-306** reciben una intensidad creciente de estímulo óptico con respecto a otras localizaciones, incluyendo las localizaciones el haz de luz de una única fuente de luz. De esta manera, la intensidad de luz de cada una de las fuentes de luz se puede fijar por debajo de un nivel de umbral. Cuando se dirijan múltiples fuentes de luz a la misma localización, el nivel de intensidad umbral puede exceder el de la localización. Esto permite el control espacial en tres dimensiones y también permite efectos reducidos inadvertidos en tejidos no dirigidos. En consonancia con una realización, el nivel del umbral se puede finar de acuerdo con una cantidad de luz necesaria para producir el efecto deseado (por ejemplo, excitación o inhibición) de las células diana. En consonancia con otras realizaciones, el nivel de umbral se

puede fijar para evitar los efectos adversos en el tejido no dirigido (por ejemplo, calentamiento).

El uso de múltiples fuentes de luz también puede conllevar un aumento por etapas de la intensidad lumínica. Por ejemplo, en un modelo de enfermedad se podría ensayar controlando los efectos de la estimulación adicional producida por el aumento de intensidad lumínica. El uso de fuentes de luz independientes permite un control relativamente simple en aumentos o disminuciones temporales y espaciales. En concordancia con otras realizaciones de la presente divulgación, la precisión espacial de las fuentes de luz se puede variar entre las diferentes fuentes de luz. Por ejemplo, una primera fuente de luz puede proporcionar luz que ilumina la localización completa de células diana. Esto permite que todas las células de la población se iluminen. Una segunda fuente de luz puede proporcionar luz que tenga un punto focal que ilumine menos de la localización completa de las células diana. Se puede utilizar la combinación de la primera y la segunda (o más) fuentes de luz para proporcionar diferentes niveles de estimulación en la misma población celular.

Las realizaciones de la presente divulgación se refieren al uso de una o más fuentes de luz que operan en un modo de barrido. Las fuentes de luz tienen su objetivo en localizaciones específicas de la población de células diana. Los efectos de la estimulación se pueden controlar según se utiliza la fuente de luz para barrer o moverse de otra manera por la población de células diana. Esto puede ser particularmente útil en conexión con el control tridimensional proporcionado por el uso de múltiples fuentes de luz.

Distintas realizaciones de la presente divulgación se refieren al uso de nanocristales que emiten luz a diferentes longitudes de onda. Esto puede ser particularmente útil cuando se utilizan múltiples opsinas que tienen diferentes espectros de absorción de luz. Los nanocristales se pueden dirigir hacia diferentes opsinas y/o colocarse en las localizaciones correspondientes.

25 Ejemplos

Ejemplo 1: Uso de nanopartículas dopadas con lantánidos en el uso de optogenética para hiperpolarizar las interneuronas colinérgicas del núcleo accumbens

El núcleo accumbens (NAc) es una colección de neuronas que forma la parte principal del estriatum ventral. Se piensa que el NAc tiene un importante papel en el complejo de comportamientos de mamífero asociados con la recompensa, placer, risa, adicción, agresión, medio y efecto placebo. Las interneuronas en el NAc constituyen menos del 1 % de la población neuronal local, aunque se proyectan a lo largo del NAc y proporcionan su única entrada colinérgica. En este ejemplo, se utiliza una estrategia optogenética que utiliza una proteína de la bomba de cloro sensible a la luz en combinación con nanopartículas dopadas con lantánidos para bloquear la acción del disparo potencial de estas células, tanto con alta resolución temporal como alta especificidad por el tipo celular. Para expresar los genes de opsina microbianos específicamente en las interneuronas colinérgicas, se empleó una línea de ratón transgénico que expresa Cre recombinasa bajo el promotor de colina acetiltransferasa (ChAT). Se inyectó estereotácticamente un vector de virus adeno asociado (AAV) inducible por Cre que llevaba un gen de halorrodopsina de bomba de cloro de tercera generación regulado por luz amarilla (eNpHR3.0) fusionado en fase con la secuencia codificante para la proteína fluorescente amarilla aumentada (eYFP).

Específicamente, los ratones se anestesiaron y entonces se colocaron en el aparato de cabeza estereotáctico. Se llevaron a cabo las cirugías en ratones de 4-6 semanas de edad y se aplicó un ungüento oftálmico completamente para evitar que se secan los ojos. se hizo una incisión en la línea media con el bisturí seguida por una craneotomía, y entonces se inyectó el vector AAV con una jeringa de 10 μ l y una aguja de metal de calibre 34. El volumen de inyección y el casual (1 μ l a 0,15 μ l/min) se controlaron mediante una bomba de inyección. Cada NAc recibe dos inyecciones (inyección 1: AP 1,15 mm, ML 0,8 mm, DV -4,8 mm; inyección 2: AP 1,15 mm, ML 0,8 mm, DV -4,2 mm). La inyección con virus y la posición de la fibra se escogen de manera que se estimule la capa completa.

A continuación, antes de retirar la aguja, se inyectan las nanopartículas NaYF₄: Yb/Er/Gd, en el NAc. Se utilizan concentraciones de 3,4, 8,5 o 17 nmoles de nanopartículas NaYF₄: Yb/Er/Gd. Después de completar la inyección del vector AAV y las nanopartículas dopadas con lantánidos, se deja la aguja en el sitio durante 5 minutos adicionales y luego se retira muy lentamente.

Después de un periodo de recuperación, los ratones se anestesian de nuevo, se adelgazan los cráneos de los ratones y se coloca una fuente de radiación electromagnética NIR adyacente a la región de cráneo adelgazada. La estimulación simultánea NIR y el registro eléctrico extracelular se llevan a cabo con métodos descritos previamente utilizando la estimulación óptica (Gradinaru et al., J. Neurosci., 27, 14231-14238 (2007)). El electrodo consiste en un electrodo de tungsteno (1 M Ω ; 0,005 in; aislamiento de parileno) proyectándose la punta del electrodo más allá de la fibra unos 300-500 μ m. El electrodo se baja a través del NAc con aumentos de 100 pm aproximadamente, y las respuestas ópticas de NIR convertido de manera ascendente se registran a cada aumento. Las señales se amplifican y se filtran en paso de banda (300 Hz de corte inferior, 10 kHz de corte superior) antes de digitalizar y grabarlo en un disco. En cada sitio se presentaron y grabaron 5 repeticiones de estimulación.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY
- 5 <120> Conversión ascendente de la luz para su uso en métodos optogenéticos
- <130> AHB/FP6897383
- 10 <140> EP 11838859.4
<141> 04-11-2011
- <150> PCT/US2011/059287
<151> 04-11-2011
- 15 <150> 61/410.729
<151> 05-11-2010
- <160> 15
- 20 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
<211> 273
<212> PRT
- 25 <213> *Natronomonas pharaonis*
- <400> 1

Val	Thr	Gln	Arg	Glu	Leu	Phe	Glu	Phe	Val	Leu	Asn	Asp	Pro	Leu	Leu
1				5					10					15	
Ala	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Asn	Ile	Ala	Leu	Ala	Gly	Leu	Ser	Ile	Leu
			20					25					30		
Leu	Phe	Val	Phe	Met	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Asp	Pro	Arg	Ala	Lys	Leu
		35					40					45			
Ile	Ala	Val	Ser	Thr	Ile	Leu	Val	Pro	Val	Val	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr
	50					55					60				
Thr	Gly	Leu	Ala	Ser	Gly	Leu	Thr	Ile	Ser	Val	Leu	Glu	Met	Pro	Ala
65					70					75					80
Gly	His	Phe	Ala	Glu	Gly	Ser	Ser	Val	Met	Leu	Gly	Gly	Glu	Glu	Val
				85					90					95	
Asp	Gly	Val	Val	Thr	Met	Trp	Gly	Arg	Tyr	Leu	Thr	Trp	Ala	Leu	Ser
			100					105					110		
Thr	Pro	Met	Ile	Leu	Leu	Ala	Leu	Gly	Leu	Leu	Ala	Gly	Ser	Asn	Ala
		115					120					125			
Thr	Lys	Leu	Phe	Thr	Ala	Ile	Thr	Phe	Asp	Ile	Ala	Met	Cys	Val	Thr
	130					135					140				
Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Thr	Thr	Ser	Ser	His	Leu	Met	Arg	Trp	Phe
145					150					155					160
Trp	Tyr	Ala	Ile	Ser	Cys	Ala	Cys	Phe	Leu	Val	Val	Leu	Tyr	Ile	Leu
				165					170					175	
Leu	Val	Glu	Trp	Ala	Gln	Asp	Ala	Lys	Ala	Ala	Gly	Thr	Ala	Asp	Met
			180					185					190		
Phe	Asn	Thr	Leu	Lys	Leu	Leu	Thr	Val	Val	Met	Trp	Leu	Gly	Tyr	Pro
	195						200					205			
Ile	Val	Trp	Ala	Leu	Gly	Val	Glu	Gly	Ile	Ala	Val	Leu	Pro	Val	Gly
	210					215					220				
Val	Thr	Ser	Trp	Gly	Tyr	Ser	Phe	Leu	Asp	Ile	Val	Ala	Lys	Tyr	Ile
225					230					235					240
Phe	Ala	Phe	Leu	Leu	Leu	Asn	Tyr	Leu	Thr	Ser	Asn	Glu	Ser	Val	Val
				245					250					255	
Ser	Gly	Ser	Ile	Leu	Asp	Val	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Ala	Asp
			260					265					270		

Asp

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

5

<220>
 <223> Polipéptido sintético

10

<400> 2

Met	Thr	Glu	Thr	Leu	Pro	Pro	Val	Thr	Glu	Ser	Ala	Val	Ala	Leu	Gln
1				5					10					15	
Ala	Glu	Val	Thr	Gln	Arg	Glu	Leu	Phe	Glu	Phe	Val	Leu	Asn	Asp	Pro
			20					25					30		
Leu	Leu	Ala	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Asn	Ile	Ala	Leu	Ala	Gly	Leu	Ser
		35					40					45			
Ile	Leu	Leu	Phe	Val	Phe	Met	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Asp	Pro	Arg	Ala
	50					55					60				
Lys	Leu	Ile	Ala	Val	Ser	Thr	Ile	Leu	Val	Pro	Val	Val	Ser	Ile	Ala
65					70					75				80	
Ser	Tyr	Thr	Gly	Leu	Ala	Ser	Gly	Leu	Thr	Ile	Ser	Val	Leu	Glu	Met
				85					90					95	
Pro	Ala	Gly	His	Phe	Ala	Glu	Gly	Ser	Ser	Val	Met	Leu	Gly	Gly	Glu
			100					105					110		
Glu	Val	Asp	Gly	Val	Val	Thr	Met	Trp	Gly	Arg	Tyr	Leu	Thr	Trp	Ala
		115					120						125		
Leu	Ser	Thr	Pro	Met	Ile	Leu	Leu	Ala	Leu	Gly	Leu	Leu	Ala	Gly	Ser
	130					135					140				
Asn	Ala	Thr	Lys	Leu	Phe	Thr	Ala	Ile	Thr	Phe	Asp	Ile	Ala	Met	Cys
145					150					155				160	
Val	Thr	Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Thr	Thr	Ser	Ser	His	Leu	Met	Arg
				165					170					175	
Trp	Phe	Trp	Tyr	Ala	Ile	Ser	Cys	Ala	Cys	Phe	Leu	Val	Val	Leu	Tyr
			180					185					190		
Ile	Leu	Leu	Val	Glu	Trp	Ala	Gln	Asp	Ala	Lys	Ala	Ala	Gly	Thr	Ala
		195					200					205			
Asp	Met	Phe	Asn	Thr	Leu	Lys	Leu	Leu	Thr	Val	Val	Met	Trp	Leu	Gly
	210					215					220				
Tyr	Pro	Ile	Val	Trp	Ala	Leu	Gly	Val	Glu	Gly	Ile	Ala	Val	Leu	Pro
225					230					235				240	
Val	Gly	Val	Thr	Ser	Trp	Gly	Tyr	Ser	Phe	Leu	Asp	Ile	Val	Ala	Lys
				245					250					255	
Tyr	Ile	Phe	Ala	Phe	Leu	Leu	Leu	Asn	Tyr	Leu	Thr	Ser	Asn	Glu	Ser
			260					265					270		
Val	Val	Ser	Gly	Ser	Ile	Leu	Asp	Val	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro
		275					280					285			
Ala	Asp	Asp	Ala	Ala	Ala	Lys	Ser	Arg	Ile	Thr	Ser	Glu	Gly	Glu	Tyr
	290					295					300				
Ile	Pro	Leu	Asp	Gln	Ile	Asp	Ile	Asn	Val	Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu
305					310					315				320	
Leu	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu	Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val
				325					330					335	
Asn	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr
			340					345					350		
Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro
		355					360					365			
Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Phe	Gly	Tyr	Gly	Leu	Gln	Cys
	370					375					380				
Phe	Ala	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys	Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser
385					390					395					400

Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp
				405					410					415	
Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr
			420					425					430		
Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly
		435					440					445			
Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val
	450					455					460				
Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys
465					470					475					480
Ile	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr
			485						490					495	
Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn
			500					505					510		
His	Tyr	Leu	Ser	Tyr	Gln	Ser	Ala	Leu	Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys
		515					520					525			
Arg	Asp	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr
	530						535				540				
Leu	Gly	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Lys	Phe	Cys	Tyr	Glu	Asn	Glu	Val	
545					550					555					

<210> 3
 <211> 542
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido sintético

10

<400> 3

ES 2 690 172 T3

Met	Val	Thr	Gln	Arg	Glu	Leu	Phe	Glu	Phe	Val	Leu	Asn	Asp	Pro	Leu
1				5					10					15	
Leu	Ala	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Asn	Ile	Ala	Leu	Ala	Gly	Leu	Ser	Ile
			20					25					30		
Leu	Leu	Phe	Val	Phe	Met	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Asp	Pro	Arg	Ala	Lys
		35					40					45			
Leu	Ile	Ala	Val	Ser	Thr	Ile	Leu	Val	Pro	Val	Val	Ser	Ile	Ala	Ser
	50					55					60				
Tyr	Thr	Gly	Leu	Ala	Ser	Gly	Leu	Thr	Ile	Ser	Val	Leu	Glu	Met	Pro
65					70					75					80
Ala	Gly	His	Phe	Ala	Glu	Gly	Ser	Ser	Val	Met	Leu	Gly	Gly	Glu	Glu
			85						90					95	
Val	Asp	Gly	Val	Val	Thr	Met	Trp	Gly	Arg	Tyr	Leu	Thr	Trp	Ala	Leu
			100					105					110		
Ser	Thr	Pro	Met	Ile	Leu	Leu	Ala	Leu	Gly	Leu	Leu	Ala	Gly	Ser	Asn
		115					120					125			
Ala	Thr	Lys	Leu	Phe	Thr	Ala	Ile	Thr	Phe	Asp	Ile	Ala	Met	Cys	Val
	130					135					140				
Thr	Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Thr	Thr	Ser	Ser	His	Leu	Met	Arg	Trp
145					150					155					160
Phe	Trp	Tyr	Ala	Ile	Ser	Cys	Ala	Cys	Phe	Leu	Val	Val	Leu	Tyr	Ile
			165						170					175	
Leu	Leu	Val	Glu	Trp	Ala	Gln	Asp	Ala	Lys	Ala	Ala	Gly	Thr	Ala	Asp
			180					185					190		
Met	Phe	Asn	Thr	Leu	Lys	Leu	Leu	Thr	Val	Val	Met	Trp	Leu	Gly	Tyr
		195					200					205			
Pro	Ile	Val	Trp	Ala	Leu	Gly	Val	Glu	Gly	Ile	Ala	Val	Leu	Pro	Val
	210					215					220				
Gly	Val	Thr	Ser	Trp	Gly	Tyr	Ser	Phe	Leu	Asp	Ile	Val	Ala	Lys	Tyr
225					230					235					240
Ile	Phe	Ala	Phe	Leu	Leu	Leu	Asn	Tyr	Leu	Thr	Ser	Asn	Glu	Ser	Val
				245						250					255

```

Val Ser Gly Ser Ile Leu Asp Val Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Ala
      260                               265                               270
Asp Asp Ala Ala Ala Lys Ser Arg Ile Thr Ser Glu Gly Glu Tyr Ile
      275                               280                               285
Pro Leu Asp Gln Ile Asp Ile Asn Val Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu
      290                               295                               300
Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn
      305                               310                               315                               320
Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr
      325
Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val
      340                               345                               350
Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe
      355                               360                               365
Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala
      370                               375                               380
Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp
      385                               390                               395                               400
Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu
      405                               410                               415
Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn
      420                               425                               430
Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr
      435                               440                               445
Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile
      450                               455                               460
Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln
      465                               470                               475                               480
Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His
      485                               490                               495
Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg
      500                               505                               510
Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu
      515                               520                               525
Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Phe Cys Tyr Glu Asn Glu Val
      530                               535                               540

```

<210> 4
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> *Guillardia theta*

5

<400> 4

ES 2 690 172 T3

Ala Ser Ser Phe Gly Lys Ala Leu Leu Glu Phe Val Phe Ile Val Phe
 1 5 10 15
 Ala Cys Ile Thr Leu Leu Leu Gly Ile Asn Ala Ala Lys Ser Lys Ala
 20 25 30
 Ala Ser Arg Val Leu Phe Pro Ala Thr Phe Val Thr Gly Ile Ala Ser
 35 40 45
 Ile Ala Tyr Phe Ser Met Ala Ser Gly Gly Gly Trp Val Ile Ala Pro
 50 55 60
 Asp Cys Arg Gln Leu Phe Val Ala Arg Tyr Leu Asp Trp Leu Ile Thr
 65 70 75 80
 Thr Pro Leu Leu Leu Ile Asp Leu Gly Leu Val Ala Gly Val Ser Arg
 85 90 95
 Trp Asp Ile Met Ala Leu Cys Leu Ser Asp Val Leu Met Ile Ala Thr
 100 105 110
 Gly Ala Phe Gly Ser Leu Thr Val Gly Asn Val Lys Trp Val Trp Trp
 115 120 125
 Phe Phe Gly Met Cys Trp Phe Leu His Ile Ile Phe Ala Leu Gly Lys
 130 135 140
 Ser Trp Ala Glu Ala Ala Lys Ala Lys Gly Gly Asp Ser Ala Ser Val
 145 150 155 160
 Tyr Ser Lys Ile Ala Gly Ile Thr Val Ile Thr Trp Phe Cys Tyr Pro
 165 170 175
 Val Val Trp Val Phe Ala Glu Gly Phe Gly Asn Phe Ser Val Thr Phe
 180 185 190
 Glu Val Leu Ile Tyr Gly Val Leu Asp Val Ile Ser Lys Ala Val Phe
 195 200 205
 Gly Leu Ile Leu Met Ser Gly Ala Ala Thr Gly Tyr Glu Ser Ile
 210 215 220

<210> 5
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> *Chlamydomonas reinhardtii*

5

<400> 5

Met Asp Tyr Gly Gly Ala Leu Ser Ala Val Gly Arg Glu Leu Leu Phe
 1 5 10 15
 Val Thr Asn Pro Val Val Val Asn Gly Ser Val Leu Val Pro Glu Asp
 20 25 30
 Gln Cys Tyr Cys Ala Gly Trp Ile Glu Ser Arg Gly Thr Asn Gly Ala
 35 40 45
 Gln Thr Ala Ser Asn Val Leu Gln Trp Leu Ala Ala Gly Phe Ser Ile
 50 55 60
 Leu Leu Leu Met Phe Tyr Ala Tyr Gln Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly
 65 70 75 80
 Trp Glu Glu Ile Tyr Val Cys Ala Ile Glu Met Val Lys Val Ile Leu
 85 90 95
 Glu Phe Phe Phe Glu Phe Lys Asn Pro Ser Met Leu Tyr Leu Ala Thr
 100 105 110
 Gly His Arg Val Gln Trp Leu Arg Tyr Ala Glu Trp Leu Leu Thr Cys
 115 120 125
 Pro Val Ile Leu Ile His Leu Ser Asn Leu Thr Gly Leu Ser Asn Asp
 130 135 140
 Tyr Ser Arg Arg Thr Met Gly Leu Leu Val Ser Asp Ile Gly Thr Ile
 145 150 155 160
 Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Ala Thr Gly Tyr Val Lys Val Ile
 165 170 175
 Phe Phe Cys Leu Gly Leu Cys Tyr Gly Ala Asn Thr Phe Phe His Ala
 180 185 190
 Ala Lys Ala Tyr Ile Glu Gly Tyr His Thr Val Pro Lys Gly Arg Cys
 195 200 205
 Arg Gln Val Val Thr Gly Met Ala Trp Leu Phe Phe Val Ser Trp Gly
 210 215 220
 Met Phe Pro Ile Leu Phe Ile Leu Gly Pro Glu Gly Phe Gly Val Leu
 225 230 235 240
 Ser Val Tyr Gly Ser Thr Val Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Met Ser
 245 250 255
 Lys Asn Cys Trp Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His
 260 265 270
 Glu His Ile Leu Ile His Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Lys Leu Asn
 275 280 285
 Ile Gly Gly Thr Glu Ile Glu Val Glu Thr Leu Val Glu Asp Glu Ala
 290 295 300
 Glu Ala Gly Ala Val Pro
 305 310

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

5

<220>
 <223> Polipéptido sintético

10

<400> 6

Met Asp Tyr Gly Gly Ala Leu Ser Ala Val Gly Arg Glu Leu Leu Phe
 1 5 10 15
 Val Thr Asn Pro Val Val Val Asn Gly Ser Val Leu Val Pro Glu Asp
 20 25 30
 Gln Cys Tyr Cys Ala Gly Trp Ile Glu Ser Arg Gly Thr Asn Gly Ala
 35 40 45
 Gln Thr Ala Ser Asn Val Leu Gln Trp Leu Ala Ala Gly Phe Ser Ile
 50 55 60
 Leu Leu Leu Met Phe Tyr Ala Tyr Gln Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly
 65 70 75 80
 Trp Glu Glu Ile Tyr Val Cys Ala Ile Glu Met Val Lys Val Ile Leu
 85 90 95
 Glu Phe Phe Phe Glu Phe Lys Asn Pro Ser Met Leu Tyr Leu Ala Thr
 100 105 110
 Gly His Arg Val Gln Trp Leu Arg Tyr Ala Glu Trp Leu Leu Thr Ser
 115 120 125
 Pro Val Ile Leu Ile His Leu Ser Asn Leu Thr Gly Leu Ser Asn Asp
 130 135 140
 Tyr Ser Arg Arg Thr Met Gly Leu Leu Val Ser Asp Ile Gly Thr Ile
 145 150 155 160
 Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Ala Thr Gly Tyr Val Lys Val Ile
 165 170 175
 Phe Phe Cys Leu Gly Leu Cys Tyr Gly Ala Asn Thr Phe Phe His Ala
 180 185 190
 Ala Lys Ala Tyr Ile Glu Gly Tyr His Thr Val Pro Lys Gly Arg Cys
 195 200 205
 Arg Gln Val Val Thr Gly Met Ala Trp Leu Phe Phe Val Ser Trp Gly
 210 215 220
 Met Phe Pro Ile Leu Phe Ile Leu Gly Pro Glu Gly Phe Gly Val Leu
 225 230 235 240
 Ser Val Tyr Gly Ser Thr Val Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Met Ser
 245 250 255
 Lys Asn Cys Trp Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His
 260 265 270
 Glu His Ile Leu Ile His Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Lys Leu Asn
 275 280 285
 Ile Gly Gly Thr Glu Ile Glu Val Glu Thr Leu Val Glu Asp Glu Ala
 290 295 300
 Glu Ala Gly Ala Val Pro
 305 310

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

- <220>
- <223> Polipéptido sintético

- <400> 7

5

10

Met Asp Tyr Gly Gly Ala Leu Ser Ala Val Gly Arg Glu Leu Leu Phe
 1 5 10 15
 Val Thr Asn Pro Val Val Val Asn Gly Ser Val Leu Val Pro Glu Asp
 20 25 30
 Gln Cys Tyr Cys Ala Gly Trp Ile Glu Ser Arg Gly Thr Asn Gly Ala
 35 40 45
 Gln Thr Ala Ser Asn Val Leu Gln Trp Leu Ala Ala Gly Phe Ser Ile

	50					55						60			
Leu	Leu	Leu	Met	Phe	Tyr	Ala	Tyr	Gln	Thr	Trp	Lys	Ser	Thr	Cys	Gly
65					70					75					80
Trp	Glu	Glu	Ile	Tyr	Val	Cys	Ala	Ile	Glu	Met	Val	Lys	Val	Ile	Leu
				85					90					95	
Glu	Phe	Phe	Phe	Glu	Phe	Lys	Asn	Pro	Ser	Met	Leu	Tyr	Leu	Ala	Thr
			100				105						110		
Gly	His	Arg	Val	Gln	Trp	Leu	Arg	Tyr	Ala	Glu	Trp	Leu	Leu	Thr	Ser
	115						120					125			
Pro	Val	Ile	Leu	Ile	His	Leu	Ser	Asn	Leu	Thr	Gly	Leu	Ser	Asn	Asp
	130					135					140				
Tyr	Ser	Arg	Arg	Thr	Met	Gly	Leu	Leu	Val	Ser	Ala	Ile	Gly	Thr	Ile
145					150					155					160
Val	Trp	Gly	Ala	Thr	Ser	Ala	Met	Ala	Thr	Gly	Tyr	Val	Lys	Val	Ile
				165					170					175	
Phe	Phe	Cys	Leu	Gly	Leu	Cys	Tyr	Gly	Ala	Asn	Thr	Phe	Phe	His	Ala
			180					185					190		
Ala	Lys	Ala	Tyr	Ile	Glu	Gly	Tyr	His	Thr	Val	Pro	Lys	Gly	Arg	Cys
	195						200					205			
Arg	Gln	Val	Val	Thr	Gly	Met	Ala	Trp	Leu	Phe	Phe	Val	Ser	Trp	Gly
	210					215					220				
Met	Phe	Pro	Ile	Leu	Phe	Ile	Leu	Gly	Pro	Glu	Gly	Phe	Gly	Val	Leu
225					230					235					240
Ser	Val	Tyr	Gly	Ser	Thr	Val	Gly	His	Thr	Ile	Ile	Asp	Leu	Met	Ser
				245					250					255	
Lys	Asn	Cys	Trp	Gly	Leu	Leu	Gly	His	Tyr	Leu	Arg	Val	Leu	Ile	His
			260					265					270		
Glu	His	Ile	Leu	Ile	His	Gly	Asp	Ile	Arg	Lys	Thr	Thr	Lys	Leu	Asn
	275					280						285			
Ile	Gly	Gly	Thr	Glu	Ile	Glu	Val	Glu	Thr	Leu	Val	Glu	Asp	Glu	Ala
	290					295					300				
Glu	Ala	Gly	Ala	Val	Pro										
305					310										

<210> 8
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido sintético

10

<400> 8

ES 2 690 172 T3

Met Ser Arg Arg Pro Trp Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Val Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Ala Gly Ser Ala Gly Ala Ser Thr Gly Ser Asp Ala Thr Val Pro
 20 25 30
 Val Ala Thr Gln Asp Gly Pro Asp Tyr Val Phe His Arg Ala His Glu
 35 40 45
 Arg Met Leu Phe Gln Thr Ser Tyr Thr Leu Glu Asn Asn Gly Ser Val
 50 55 60
 Ile Cys Ile Pro Asn Asn Gly Gln Cys Phe Cys Leu Ala Trp Leu Lys
 65 70 75 80
 Ser Asn Gly Thr Asn Ala Glu Lys Leu Ala Ala Asn Ile Leu Gln Trp
 85 90 95
 Ile Thr Phe Ala Leu Ser Ala Leu Cys Leu Met Phe Tyr Gly Tyr Gln
 100 105 110
 Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly Trp Glu Glu Ile Tyr Val Ala Thr Ile
 115 120 125
 Glu Met Ile Lys Phe Ile Ile Glu Tyr Phe His Glu Phe Asp Glu Pro
 130 135 140
 Ala Val Ile Tyr Ser Ser Asn Gly Asn Lys Thr Val Trp Leu Arg Tyr
 145 150 155 160
 Ala Glu Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Leu Leu Ile His Leu Ser Asn
 165 170 175
 Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Ser Lys Arg Thr Met Gly Leu Leu
 180 185 190
 Val Ser Asp Val Gly Cys Ile Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Cys
 195 200 205
 Thr Gly Trp Thr Lys Ile Leu Phe Phe Leu Ile Ser Leu Ser Tyr Gly
 210 215 220
 Met Tyr Thr Tyr Phe His Ala Ala Lys Val Tyr Ile Glu Ala Phe His
 225 230 235 240
 Thr Val Pro Lys Gly Ile Cys Arg Glu Leu Val Arg Val Met Ala Trp
 245 250 255
 Thr Phe Phe Val Ala Trp Gly Met Phe Pro Val Leu Phe Leu Leu Gly
 260 265 270
 Thr Glu Gly Phe Gly His Ile Ser Pro Tyr Gly Ser Ala Ile Gly His
 275 280 285
 Ser Ile Leu Asp Leu Ile Ala Lys Asn Met Trp Gly Val Leu Gly Asn
 290 295 300
 Tyr Leu Arg Val Lys Ile His Glu His Ile Leu Leu Tyr Gly Asp Ile
 305 310 315 320
 Arg Lys Lys Gln Lys Ile Thr Ile Ala Gly Gln Glu Met Glu Val Glu
 325 330 335
 Thr Leu Val Ala Glu Glu Glu Asp
 340

<210> 9
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido sintético

10

<400> 9

Met	Ser	Arg	Arg	Pro	Trp	Leu	Leu	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Val	Ala	Leu
1				5					10					15	
Ala	Ala	Gly	Ser	Ala	Gly	Ala	Ser	Thr	Gly	Ser	Asp	Ala	Thr	Val	Pro
			20					25					30		
Val	Ala	Thr	Gln	Asp	Gly	Pro	Asp	Tyr	Val	Phe	His	Arg	Ala	His	Glu
		35					40					45			
Arg	Met	Leu	Phe	Gln	Thr	Ser	Tyr	Thr	Leu	Glu	Asn	Asn	Gly	Ser	Val
	50					55					60				
Ile	Cys	Ile	Pro	Asn	Asn	Gly	Gln	Cys	Phe	Cys	Leu	Ala	Trp	Leu	Lys
65					70					75					80
Ser	Asn	Gly	Thr	Asn	Ala	Glu	Lys	Leu	Ala	Ala	Asn	Ile	Leu	Gln	Trp
				85					90					95	
Ile	Thr	Phe	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Cys	Leu	Met	Phe	Tyr	Gly	Tyr	Gln
			100					105					110		
Thr	Trp	Lys	Ser	Thr	Cys	Gly	Trp	Glu	Thr	Ile	Tyr	Val	Ala	Thr	Ile
		115					120					125			
Glu	Met	Ile	Lys	Phe	Ile	Ile	Glu	Tyr	Phe	His	Glu	Phe	Asp	Glu	Pro
	130					135					140				
Ala	Val	Ile	Tyr	Ser	Ser	Asn	Gly	Asn	Lys	Thr	Val	Trp	Leu	Arg	Tyr
145					150					155					160
Ala	Glu	Trp	Leu	Leu	Thr	Cys	Pro	Val	Leu	Leu	Ile	His	Leu	Ser	Asn
				165					170					175	
Leu	Thr	Gly	Leu	Lys	Asp	Asp	Tyr	Ser	Lys	Arg	Thr	Met	Gly	Leu	Leu
			180					185					190		
Val	Ser	Asp	Val	Gly	Cys	Ile	Val	Trp	Gly	Ala	Thr	Ser	Ala	Met	Cys
		195					200					205			
Thr	Gly	Trp	Thr	Lys	Ile	Leu	Phe	Phe	Leu	Ile	Ser	Leu	Ser	Tyr	Gly
		210					215					220			
Met	Tyr	Thr	Tyr	Phe	His	Ala	Ala	Lys	Val	Tyr	Ile	Glu	Ala	Phe	His
225					230					235					240
Thr	Val	Pro	Lys	Gly	Ile	Cys	Arg	Glu	Leu	Val	Arg	Val	Met	Ala	Trp
			245						250				255		
Thr	Phe	Phe	Val	Ala	Trp	Gly	Met	Phe	Pro	Val	Leu	Phe	Leu	Leu	Gly
			260					265					270		
Thr	Glu	Gly	Phe	Gly	His	Ile	Ser	Pro	Tyr	Gly	Ser	Ala	Ile	Gly	His
		275					280					285			
Ser	Ile	Leu	Asp	Leu	Ile	Ala	Lys	Asn	Met	Trp	Gly	Val	Leu	Gly	Asn
	290					295					300				
Tyr	Leu	Arg	Val	Lys	Ile	His	Glu	His	Ile	Leu	Leu	Tyr	Gly	Asp	Ile
305					310					315					320
Arg	Lys	Lys	Gln	Lys	Ile	Thr	Ile	Ala	Gly	Gln	Glu	Met	Glu	Val	Glu
			325						330					335	
Thr	Leu	Val	Ala	Glu	Glu	Glu	Asp								
			340												

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

5

<220>
 <223> Polipéptido sintético

10

<400> 10

Met Ser Arg Arg Pro Trp Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Val Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Ala Gly Ser Ala Gly Ala Ser Thr Gly Ser Asp Ala Thr Val Pro
 20 25 30
 Val Ala Thr Gln Asp Gly Pro Asp Tyr Val Phe His Arg Ala His Glu
 35 40 45
 Arg Met Leu Phe Gln Thr Ser Tyr Thr Leu Glu Asn Asn Gly Ser Val
 50 55 60
 Ile Cys Ile Pro Asn Asn Gly Gln Cys Phe Cys Leu Ala Trp Leu Lys
 65 70 75 80
 Ser Asn Gly Thr Asn Ala Glu Lys Leu Ala Ala Asn Ile Leu Gln Trp
 85 90 95
 Ile Thr Phe Ala Leu Ser Ala Leu Cys Leu Met Phe Tyr Gly Tyr Gln
 100 105 110
 Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly Trp Glu Glu Ile Tyr Val Ala Thr Ile
 115 120 125
 Glu Met Ile Lys Phe Ile Ile Glu Tyr Phe His Glu Phe Asp Glu Pro
 130 135 140
 Ala Val Ile Tyr Ser Ser Asn Gly Asn Lys Thr Val Trp Leu Arg Tyr
 145 150 155 160
 Ala Thr Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Leu Leu Ile His Leu Ser Asn
 165 170 175
 Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Ser Lys Arg Thr Met Gly Leu Leu
 180 185 190
 Val Ser Asp Val Gly Cys Ile Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Cys
 195 200 205
 Thr Gly Trp Thr Lys Ile Leu Phe Phe Leu Ile Ser Leu Ser Tyr Gly
 210 215 220
 Met Tyr Thr Tyr Phe His Ala Ala Lys Val Tyr Ile Glu Ala Phe His
 225 230 235 240
 Thr Val Pro Lys Gly Ile Cys Arg Glu Leu Val Arg Val Met Ala Trp
 245 250 255
 Thr Phe Phe Val Ala Trp Gly Met Phe Pro Val Leu Phe Leu Leu Gly
 260 265 270
 Thr Glu Gly Phe Gly His Ile Ser Pro Tyr Gly Ser Ala Ile Gly His
 275 280 285
 Ser Ile Leu Asp Leu Ile Ala Lys Asn Met Trp Gly Val Leu Gly Asn
 290 295 300
 Tyr Leu Arg Val Lys Ile His Glu His Ile Leu Leu Tyr Gly Asp Ile
 305 310 315 320
 Arg Lys Lys Gln Lys Ile Thr Ile Ala Gly Gln Glu Met Glu Val Glu
 325 330 335
 Thr Leu Val Ala Glu Glu Glu Asp
 340

<210> 11
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 11

5

10

Met Ser Arg Arg Pro Trp Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Val Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Ala Gly Ser Ala Gly Ala Ser Thr Gly Ser Asp Ala Thr Val Pro
 20 25 30
 Val Ala Thr Gln Asp Gly Pro Asp Tyr Val Phe His Arg Ala His Glu
 35 40 45
 Arg Met Leu Phe Gln Thr Ser Tyr Thr Leu Glu Asn Asn Gly Ser Val
 50 55 60
 Ile Cys Ile Pro Asn Asn Gly Gln Cys Phe Cys Leu Ala Trp Leu Lys
 65 70 75 80
 Ser Asn Gly Thr Asn Ala Glu Lys Leu Ala Ala Asn Ile Leu Gln Trp
 85 90 95
 Ile Thr Phe Ala Leu Ser Ala Leu Cys Leu Met Phe Tyr Gly Tyr Gln
 100 105 110
 Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly Trp Glu Thr Ile Tyr Val Ala Thr Ile
 115 120 125
 Glu Met Ile Lys Phe Ile Ile Glu Tyr Phe His Glu Phe Asp Glu Pro
 130 135 140
 Ala Val Ile Tyr Ser Ser Asn Gly Asn Lys Thr Val Trp Leu Arg Tyr
 145 150 155 160
 Ala Thr Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Leu Leu Ile His Leu Ser Asn
 165 170 175
 Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Ser Lys Arg Thr Met Gly Leu Leu
 180 185 190
 Val Ser Asp Val Gly Cys Ile Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Cys
 195 200 205
 Thr Gly Trp Thr Lys Ile Leu Phe Phe Leu Ile Ser Leu Ser Tyr Gly
 210 215 220
 Met Tyr Thr Tyr Phe His Ala Ala Lys Val Tyr Ile Glu Ala Phe His
 225 230 235 240
 Thr Val Pro Lys Gly Ile Cys Arg Glu Leu Val Arg Val Met Ala Trp
 245 250 255
 Thr Phe Phe Val Ala Trp Gly Met Phe Pro Val Leu Phe Leu Leu Gly
 260 265 270
 Thr Glu Gly Phe Gly His Ile Ser Pro Tyr Gly Ser Ala Ile Gly His
 275 280 285
 Ser Ile Leu Asp Leu Ile Ala Lys Asn Met Trp Gly Val Leu Gly Asn
 290 295 300
 Tyr Leu Arg Val Lys Ile His Glu His Ile Leu Leu Tyr Gly Asp Ile
 305 310 315 320
 Arg Lys Lys Gln Lys Ile Thr Ile Ala Gly Gln Glu Met Glu Val Glu
 325 330 335
 Thr Leu Val Ala Glu Glu Glu Asp

340

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

5

<220>
 <223> Péptido sintético

10

<400> 12

Lys Ser Arg Ile Thr Ser Glu Gly Glu Tyr Ile Pro Leu Asp Gln Ile
 1 5 10 15
 Asp Ile Asn Val
 20

ES 2 690 172 T3

5
 <210> 13
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2) ... (2)
 <223> x = cualquier aminoácido

15
 <400> 13

Phe Xaa Tyr Glu Asn Glu
1 5

20
 <210> 14
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 14

Phe Cys Tyr Glu Asn Glu Val
1 5

30
 <210> 15
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35
 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 15

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

40

REIVINDICACIONES

1. Un producto que comprende una pluralidad de nanopartículas dopadas con lantánidos para su uso en un método de tratamiento de un individuo para despolarizar o hiperpolarizar la membrana plasmática de una célula neural en un individuo, en donde dicho método comprende:
- (a) la colocación de la pluralidad de nanopartículas dopadas con lantánidos en la proximidad de la célula neural; y
 (b) la exposición de la pluralidad de nanopartículas a una radiación electromagnética en el espectro infrarrojo (IR) o cerca de infrarrojo (NIR), en donde la radiación electromagnética en los espectros IR o NIR se convierte de manera ascendente en luz del espectro visible por las nanopartículas, y en donde se expresa una opsina sensible a la luz en la membrana plasmática de las células neurales y la activación de la opsina por la luz en el espectro visible induce la despolarización o la hiperpolarización de la membrana plasmática.
2. Un producto que comprende un polinucleótido que codifica una opsina sensible a la luz para su uso en un método de tratamiento de un individuo para despolarizar o hiperpolarizar la membrana plasmática de una célula neural en un individuo, en donde dicho método comprende:
- (a) administrar al individuo el polinucleótido que codifica la opsina sensible a la luz, en donde la proteína sensible a la luz se expresa en la membrana plasmática de la célula neural del individuo y la opsina es capaz de inducir la despolarización o la hiperpolarización de la membrana de la célula neural cuando se ilumina con luz.
 (b) administrar una pluralidad de nanopartículas dopadas con lantánidos en la proximidad de la célula neural; y
 (c) exponer la pluralidad de nanopartículas a radiación electromagnética en el espectro infrarrojo (IR) o cerca de infrarrojo (NIR), en donde la radiación electromagnética en los espectros IR o NIR se convierte de manera ascendente en luz del espectro visible y la activación de la opsina por la luz en el espectro visible induce la despolarización o la hiperpolarización de la membrana plasmática.
3. El producto para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que la opsina sensible a la luz que induce la despolarización es una opsina ChR1 o ChR2.
4. El producto para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que la opsina sensible a la luz que induce la hiperpolarización es una opsina NpHR.
5. El producto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que el metal lantánido se selecciona de entre el grupo que consiste en Lantano, Cerio, Praseodimio, Neodimio, Prometio, Samario, Europio Gadolinio, Terbio, Disprosio, Holmio, Erblio, Tulio, Iterbio y Lutecio.
6. El producto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las nanopartículas comprenden NaYF₄: Yb/X/Gd, en donde X es Er, Tm o Er/Tm.
7. El producto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las nanopartículas son nanopartículas dopadas.
8. El producto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el diodo emisor de luz suministra luz de aproximadamente 700 nm a 1.000 nm.
9. El producto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las nanopartículas emiten luz entre 450-550 nm.
10. El producto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la radiación electromagnética en el espectro IR o NIR se:
- (a) convierte de manera ascendente en luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 450 nm a aproximadamente 550 nm;
 (b) convierte de manera ascendente en luz que tiene una longitud de onda correspondiente a las luces roja, amarilla o ámbar; o
 (c) convierte de manera ascendente en luz que tiene una longitud de onda correspondiente a las luces verde o azul.
11. El producto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el individuo es un animal no humano.
12. El producto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el individuo es un ser humano.
13. El producto para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 11 o 12 en donde el cráneo del ser humano o del

animal no humano se ha adelgazado quirúrgicamente en un área adyacente a una región cerebral de interés sin perforar el hueso, y se coloca una fuente de IR o NIR directamente sobre la región de cráneo adelgazada.

5 14. El producto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la célula neural es una célula neural del sistema nervioso central o del sistema nervioso periférico.

10 15. El producto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se administra un polinucleótido que codifica la opsina sensible a la luz y la pluralidad de nanopartículas dopadas con lantánidos utilizando la misma vía de administración.

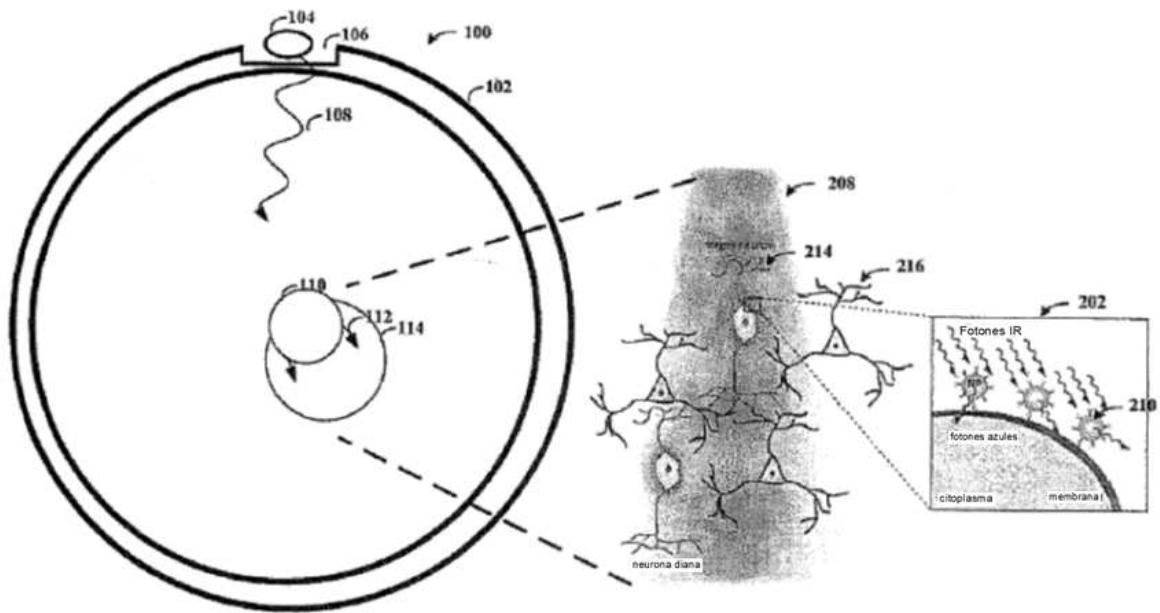


FIG. 1

FIG. 2

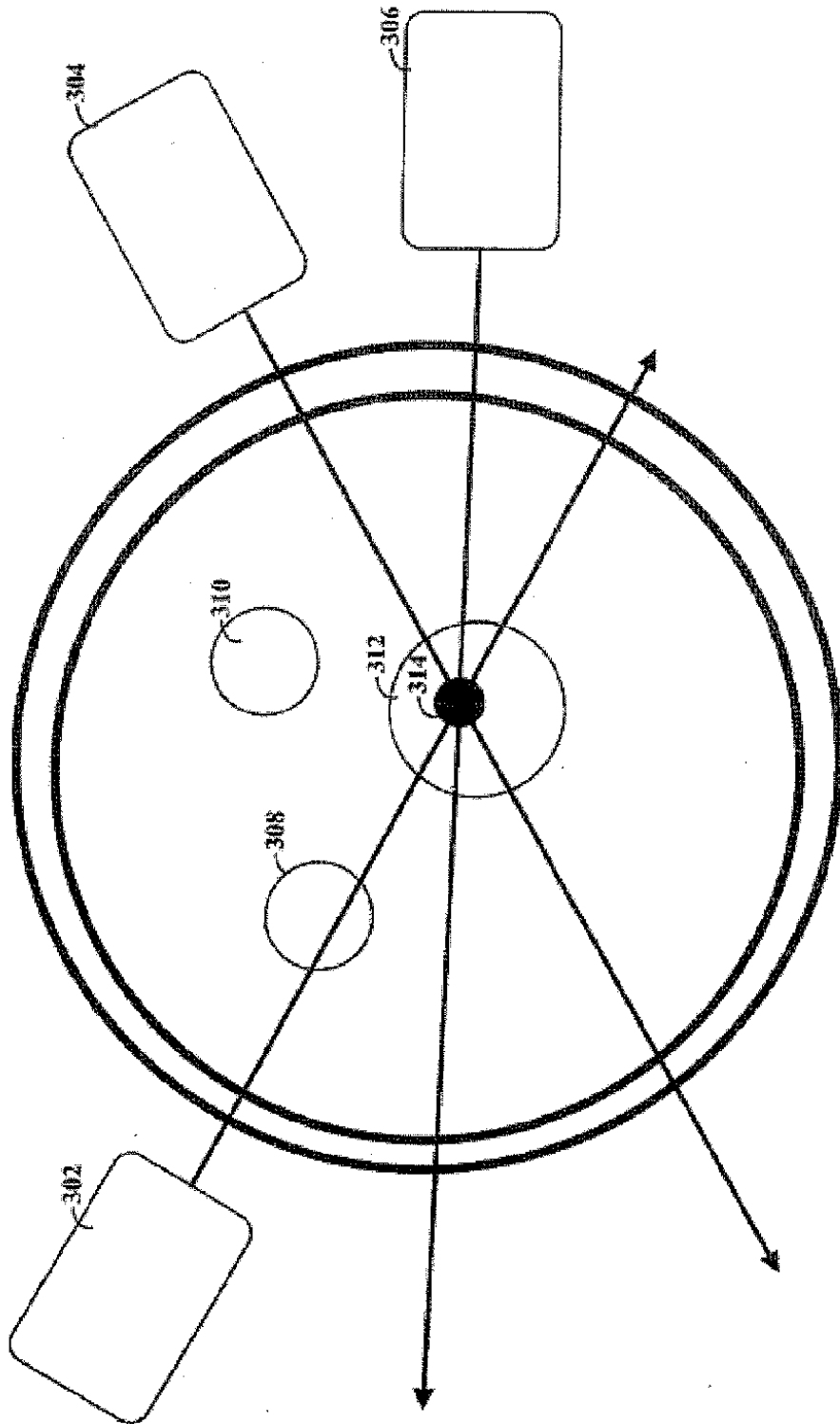


FIG. 3