

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico aislado, que comprende:

(i) un promotor que es un promotor híbrido que comprende una primera secuencia de nucleótidos que comprende al menos porción de un promotor específico de cono y una segunda secuencia de nucleótidos que comprende al menos una porción de un promotor específico de bastón, donde la primera y la segunda secuencias de nucleótidos están operativamente unidas y funcionan como un único promotor para la expresión en fotorreceptores de cono, o un promotor específico de cono, o una variante activa, fragmento o truncamiento de cualquiera de los anteriores;

(ii) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína optogenética despolarizante y opcionalmente una molécula indicadora; y

(iii) un elemento regulador posterior a la transcripción del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE);

en donde el promotor, la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína optogenética despolarizante y opcionalmente una molécula indicadora y el WPRE están unidos operativamente.

2. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, en donde el promotor es un promotor híbrido que comprende SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 11 o variante activa, fragmento o truncamiento de cualquiera de los anteriores.

3. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, en donde el promotor es un promotor híbrido y la primera secuencia de nucleótidos comprende al menos aproximadamente 150 nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 2 y la segunda secuencia de nucleótidos comprende al menos aproximadamente 264 nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 10, o una variante activa, fragmento o truncamiento de cualquiera de los anteriores.

4. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 3, en donde la primera secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, y una secuencia que contiene al menos aproximadamente 150 nucleótidos continuos desde el extremo 3' de SEQ ID NO: 2, y el segundo ácido nucleico comprende SEQ ID NO: 54, o una variante activa de cualquiera de

los anteriores.

5. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 4, en donde el segundo nucleótido comprende SEQ ID NO: 10 o una variante activa, fragmento o truncamiento de esta.

6. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, en donde el promotor es un promotor específico de cono que comprende al menos aproximadamente 150 nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 2 o una variante activa de este.

7. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 6, en donde el promotor se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, y una secuencia que contiene al menos aproximadamente 150 nucleótidos continuos desde el extremo 3' de SEQ ID NO: 2, o una variante activa de cualquiera de estas.

8. El ácido nucleico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el promotor híbrido o el promotor específico de cono comprende de una a aproximadamente diez copias de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, una secuencia que contiene al menos aproximadamente 150 nucleótidos continuos desde el extremo 3' de SEQ ID NO: 2, una variante activa de cualquiera de las anteriores y combinaciones de estas.

9. El ácido nucleico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el promotor híbrido comprende de una a aproximadamente diez copias de SEQ ID NO: 54 o una variante activa de este.

10. El ácido nucleico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el WPRE codificado por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70 % de identidad con SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, SEQ ID NO: 8) o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70 % de identidad con SEQ ID NO: 86.

11. El ácido nucleico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una señal

de poliadenilación (PoliA) que es 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el WPRE; en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la PoliA y la secuencia de nucleótidos que codifica el WPRE están operativamente unidas.

12. El ácido nucleico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de repetición terminal invertida (ITR) de AAV.

13. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 12, que comprende una primera ITR de AAV que es 5' del promotor y una segunda ITR de AAV que es 3' del WPRE y preferentemente 3' de la señal de PoliA.

14. El ácido nucleico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína optogenética despolarizante es un polipéptido sensible a la luz.

15. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 14, en donde el polipéptido sensible a la luz es un polipéptido de canal iónico activado por luz.

16. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 15, en donde el polipéptido del canal iónico activado por luz es una canalrodopsina o una variante funcional de esta.

17. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 16, en donde la canalrodopsina es un polipéptido ReaChR o una variante funcional de este.

18. El ácido nucleico aislado de una cualquiera de la reivindicación 17, en donde el ácido nucleico aislado comprende una secuencia de nucleótidos que codifica ReaCHR o una variante funcional de esta.

19. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 18, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica ReaChR o una variante funcional de esta se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 73 o una secuencia de aminoácidos con al

menos aproximadamente 70 % de identidad con cualquiera de las anteriores.

20. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 16, en donde la canalrodopsina o variante funcional de esta se modifica genéticamente para mejorar la localización de la membrana cuando se expresa en fotorreceptores de cono humano.

21. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 20, en donde la canalrodopsina modificada genéticamente comprende SEQ ID NO: 57 o una variante funcional de esta.

22. El ácido nucleico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ácido nucleico aislado no codifica la molécula indicadora opcional.

23. El ácido nucleico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el promotor comprende:

- dos o más secuencias de primer nucleótido;
- dos o más secuencias de segundo nucleótido;
- dos o más promotores específicos de cono; o
- dos o más de estos.

24. El ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un intrón.

25. El ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, o SEQ ID NO: 83, o una secuencia que tiene al menos aproximadamente 70 % de identidad con cualquiera de las anteriores.

26. El ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-24, que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82 o SEQ

ID NO: 83.

27. El ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la variante activa tiene al menos aproximadamente 70 % de identidad con la secuencia de referencia correspondiente.

28. El ácido nucleico de la reivindicación 27, en donde la variante activa contiene una o más de optimización de codones, reducción de CpG, eliminación del sitio de inicio alternativo, eliminación de repeticiones, eliminación de horquillas, eliminación de sitios de donantes y aceptores de empalme indeseados, eliminación del sitio de resolución terminal de ITR, adición de secuencia de relleno o adición de miARN.

29. Una partícula viral que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

30. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-28 o la partícula vírica de la reivindicación 28.

31. Un vector de AAV, que comprende:

- (i) un ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-28; y
- (ii) una cápside de AAV.

32. El vector de AAV de la reivindicación 31, en donde la cápside de AAV es una cápside de AAV5, una cápside de PHP.eB, una cápside de NHP26, una cápside de AAV8, una cápside de AAV8-BP2, una cápside de AAV9 o una cápside de PHP.B.

33. El vector de AAV de la reivindicación 32, en donde la cápside de AAV es una cápside de AAV5, y una cápside de AAV8 o una cápside de AAV9.

34. Una célula hospedadora que comprende el vector de AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 31-33.

35. Una composición farmacéutica que comprende:

- (i) un ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-28, una

partícula vírica de las reivindicaciones 29, un vector de AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 31-33 o una célula hospedadora de la reivindicación 30 o 34; y

(ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

36. Un método para administrar una proteína optogenética despolarizante a una célula de cono humano en un sujeto que la necesita, donde el método comprende administrar al sujeto un ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-28, una partícula vírica de la reivindicación 29, un vector de AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 31-33, una célula hospedadora de la reivindicación 30 o 34 o una composición farmacéutica de la reivindicación 35.

37. Un método para tratar una enfermedad de la retina, donde el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-28, una partícula vírica de las reivindicaciones 29, un vector de AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 31-33, una célula hospedadora de la reivindicación 30 o 34 o una composición farmacéutica de la reivindicación 35.

38. Un método para restaurar la visión, donde el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-28, una partícula vírica de las reivindicaciones 29, un vector de AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 31-33, una célula hospedadora de la reivindicación 30 o 34 o una composición farmacéutica de la reivindicación 35.

39. Un método para restaurar la sensibilidad a la luz en una célula de fotorreceptor de cono humano, el método comprende administrar a la célula de fotorreceptor de cono humano que lo necesita un ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-28, una partícula vírica de la reivindicación 29, un vector de AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 31-33, una célula hospedadora de la reivindicación 30 o 34 o una composición farmacéutica de la reivindicación 35.

40. Un método para tratar la degeneración de la retina en un sujeto, donde el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-28, una partícula vírica de las

reivindicaciones 29, un vector de AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 31-33, una célula hospedadora de la reivindicación 30 o 34 o una composición farmacéutica de la reivindicación 35.

41. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 36-40, en donde el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar retinosis pigmentaria, distrofia de conos y bastones, amaurosis congénita de Leber, síndrome de Usher, síndrome de Bardet-Biedl, enfermedad de Best, retinosquiasis, enfermedad de Stargardt, desprendimiento de retina no tratado, distrofia de patrón, distrofia de conos y bastones, acromatopsia, albinismo ocular, síndrome del cono S mejorado, retinopatía diabética, degeneración macular senil, retinopatía del prematuro, retinopatía de células falciformes, ceguera nocturna estacionaria congénita, coroideremia, una degeneración tapetoretiniana, oclusión venosa de la retina o atrofia geográfica.

42. El método de la reivindicación 41, en donde el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar retinosis pigmentaria.

43. El método de la reivindicación 41, en donde el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar atrofia geográfica.

44. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 36-43, en donde se administran por inyección subretiniana el ácido nucleico, la partícula vírica, el vector de AAV, la célula hospedadora o la composición farmacéutica.

45. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 36-43, en donde el ácido nucleico, la partícula vírica, el vector de AAV, la célula hospedadora o la composición farmacéutica se administran antes o después del inicio de la pérdida de fotorreceptores.

46. El ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-28, la partícula vírica de la reivindicación 29, el vector de AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 31-33, la célula hospedadora de la reivindicación 30 o 34, o la composición farmacéutica de la reivindicación 35 para su uso para tratar la enfermedad de la retina, restaurar la visión, restaurar la sensibilidad a la luz en una célula de fotorreceptor de cono humano, o tratar la degeneración de la retina en un sujeto que lo necesita.

47. El uso de la reivindicación 46, en donde el sujeto que lo necesita tiene o está en riesgo de desarrollar retinosis pigmentaria, distrofia de conos y bastones, amaurosis congénita de Leber, síndrome de Usher, síndrome de Bardet-Biedl, enfermedad de Best, retinosquiasis, enfermedad de Stargardt, desprendimiento de retina no tratado, distrofia de patrón, distrofia de conos y bastones, acromatopsia, albinismo ocular, síndrome del cono S mejorado, retinopatía diabética, degeneración macular senil, retinopatía del prematuro, retinopatía de células falciformes, ceguera nocturna estacionaria congénita, coroideremia, una degeneración tapetoretiniana, oclusión venosa de la retina o atrofia geográfica.

48. El uso de la reivindicación 47, en donde el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar retinosis pigmentaria.

49. El uso de la reivindicación 47, en donde el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar atrofia geográfica.

50. El método o uso de una cualquiera de las reivindicaciones 36-49, en donde la proteína optogenética despolarizante se expresa en una membrana celular de una célula de cono humano.

51. El método o uso de una cualquiera de las reivindicaciones 36-50 en donde la proteína optogenética despolarizante es capaz de mediar una corriente despolarizante que despolariza una célula de cono humano cuando se expone a la luz.

52. El método o uso de la reivindicación 51, en donde la despolarización de la célula de cono humano induce los picos de células ganglionares impulsados por luz que pueden ser comparables a los picos de células ganglionares impulsados por luz en una célula de cono humano funcional.

53. El método o uso de la reivindicación 52, en donde los picos de las células ganglionares impulsados por luz se evalúan utilizando una matriz multielectrodo.

54. El método o uso de una cualquiera de las reivindicaciones 36-53, en donde el ácido nucleico es capaz de restaurar la sensibilidad a la luz cuando se introduce en una

célula de cono humano, en donde la restauración de la sensibilidad a la luz ocurre cuando (i) la proteína optogenética despolarizante se expresa en una membrana celular de la célula de cono humano, (ii) la proteína optogenética despolarizante es capaz de mediar una corriente despolarizante que despolariza una célula de cono humano cuando se expone a la luz, y (iii) la despolarización de la célula de cono humano induce los picos de células ganglionares impulsados por luz.

