

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 324**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2013 PCT/US2013/029171**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13134295**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2013 E 13710253 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2822964**

54 Título: **Identificación de mutaciones de canalrodopsina-2 (Chop2) y métodos de uso**

30 Prioridad:

**05.03.2012 US 201261606663 P**

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

**08.03.2019**

73 Titular/es:

**WAYNE STATE UNIVERSITY (100.0%)  
656 West Kirby  
Detroit, MI 48202, US**

72 Inventor/es:

**PAN, ZHUO-HUA**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN BADAJOZ, Irene**

**ES 2 703 324 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

Identificación de mutaciones de canalrodopsina-2 (Chop2) y métodos de uso

5 **Apoyo del gobierno**

Esta invención se realizó con apoyo del gobierno de los EE. UU. con la subvención NIH EY 17130 de los Institutos Nacionales de la Salud/Instituto Nacional del Ojo. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

10 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere generalmente al campo de biología molecular. Se identifican mutaciones en el gen de canalopsina-2 (Chop2). Se usan composiciones que comprenden un gen mutante de Chop2 en métodos terapéuticos para mejorar y restablecer pérdida de visión.

15

**Antecedentes de la invención**

La retina se compone de fotorreceptores (o células fotorreceptoras, bastones y conos). Los fotorreceptores son neuronas altamente especializadas que son responsables de la fototransducción, o la conversión de luz (en forma de radiación electromagnética) en señales químicas y eléctricas que propagan una cascada de eventos dentro del sistema visual, generando finalmente una representación de nuestro mundo.

20

La pérdida o degeneración de fotorreceptores compromete gravemente, si no impide completamente, la fototransducción de información visual dentro de la retina. La pérdida de células fotorreceptoras y/o pérdida de una función de células fotorreceptoras son las causas principales de agudeza visual reducida, sensibilidad lumínica reducida y ceguera. Existe una necesidad desde hace mucho tiempo en la técnica de composiciones y método que restablezcan la fotosensibilidad de la retina de un sujeto que experimenta pérdida de visión. Kleinlogel, S. *et al.* (2011), *Nature Neuroscience*; 14: 513-518 describen la sensibilidad lumínica y permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  de canalrodopsina que transloca calcio (CatCh). Rein, M. L., *et al.* (2012), *Mol Genet Genomics*; 287(2): 95-109 describen enfoques optogenéticos.

25

30

**Sumario de la invención**

La invención proporciona una solución para la necesidad desde hace mucho tiempo de un método de restablecer y/o mejorar la sensibilidad lumínica de células fotorreceptoras mediante expresión de mutaciones ventajosas, y/o combinaciones de las mismas, del gen de canalopsina-2 (Chop2), y posteriormente proporcionar métodos para terapia génica basada en canalopsina-2 (Chop2).

35

La terapia génica basada en canalopsina-2 (Chop2) ofrece una estrategia superior para restablecer fotosensibilidad retiniana después de degeneración de fotorreceptor. El producto de proteína del gen de Chop2, cuando se une al cromóforo isomerizable por luz *todo-trans*-retinal, forma un canal regulado por luz funcional, llamado canalrodopsina-2 (ChR2). ChR2 nativo muestra baja sensibilidad lumínica. Recientemente, se notificaron que dos mutantes de ChR2s, L132C y T159C, aumentaron notablemente su sensibilidad lumínica (Kleinlogel *et al.* (2011) *Nat Neurosci.* 14:513-8; Berndt *et al.* (2011) *Proc Natl Acad Sci USA.* 108:7595-600; Prigge *et al.* (2012) *J Biol Chem.* 287(38):3104-12). Se examinaron las propiedades de estos dos mutantes de ChR2 (es decir, L132C y T159C) y se compararon con varios mutantes dobles en estos dos sitios para identificar candidatos adecuados para métodos terapéuticos. Se proporcionan composiciones que comprenden uno o más de estas mutaciones a un sujeto que necesita las mismas con el fin de restablecer la visión. Específicamente, se introducen mutaciones deseadas en el gen de Chop2 a una célula y/o se integran dentro del ADN genómico de una célula para mejorar o restablecer la visión. Las mutaciones deseadas en el gen de Chop2 que se introducen a una célula para mejorar o restablecer la visión también pueden permanecer episomales, no habiéndose integradas dentro del ADN genómico.

40

45

50

Las mutaciones en las posiciones de aminoácido L132 o T159 de Chop2 (y por tanto el ChR2 resultante) disminuyen notablemente la intensidad luminosa umbral que se requiere para desencadenar la fotocorriente mediada por ChR2. Los mutantes dobles en las posiciones de aminoácido L132 y T159 aumentan además la fotocorriente a intensidades luminosas bajas, excediendo aquellas de cualquiera de las correspondientes mutaciones individuales. Células ganglionares retinianas que expresan los mutantes dobles en las posiciones L132 y T159 pueden responder a intensidades luminosas que se encuentran dentro del intervalo de condiciones de iluminación exterior normales pero todavía deben mantener una resolución temporal alta y adecuada que es apropiada para restablecer visión útil. Por tanto, la proteína Chop2 mutante de la presente invención que forma ChR2 mutantes que tienen sensibilidad lumínica mejorada se usan sola o en combinación para restablecer o mejorar la visión.

55

60

Específicamente, la invención se define según las reivindicaciones adjuntas. También se describe una molécula de polipéptido aislado que comprende o consiste en SEQ ID NO: 26 en la que el aminoácido en posición 132 de SEQ ID NO: 26 no es leucina (L). En ciertos aspectos de la molécula de polipéptido aislado, el aminoácido en posición 132 es cisteína (C) o alanina (A). Cuando el aminoácido en posición 132 es cisteína (C), la molécula de polipéptido

65

puede comprender o consistir en SEQ ID NO: 13. Cuando el aminoácido en posición 132 es alanina (A), la molécula de polipéptido puede comprender o consistir en SEQ ID NO: 20.

La divulgación proporciona una molécula de polipéptido aislado que comprende o consiste en SEQ ID NO: 26 en la que el aminoácido en posición 159 de SEQ ID NO: 26 no es treonina (T). En ciertos aspectos de la molécula de polipéptido aislado, el aminoácido en posición 159 es cisteína (C), serina (S) o alanina (A). Cuando el aminoácido en posición 159 es cisteína (C), la molécula de polipéptido puede comprender o consistir en SEQ ID NO: 14. Cuando el aminoácido en posición 159 es serina (S), la molécula de polipéptido puede comprender o consistir en SEQ ID NO: 17. Cuando el aminoácido en posición 159 es alanina (A), la molécula de polipéptido puede comprender o consistir en SEQ ID NO: 23.

La divulgación proporciona una molécula de polipéptido aislado que comprende o consiste en SEQ ID NO: 26 en la que el aminoácido en posición 132 de SEQ ID NO: 26 no es leucina (L) y el aminoácido en posición 159 no es treonina (T). En determinadas realizaciones de la molécula de polipéptido aislado que comprende o consiste en SEQ ID NO: 26 en la que el aminoácido en posición 132 de SEQ ID NO: 26 no es leucina (L) y el aminoácido en posición 159 no es treonina (T), el aminoácido en posición 132 es cisteína (C) y el aminoácido en posición 159 es cisteína (C). En una realización preferida de esta molécula de polipéptido aislado, la molécula de polipéptido comprende o consiste en SEQ ID NO: 16. La invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido aislado que comprende o consiste en SEQ ID NO: 16. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido aislado que comprende o consiste en SEQ ID NO: 16 es una molécula de ácido nucleico que comprende o consiste en SEQ ID NO: 15.

En determinadas realizaciones de la molécula de polipéptido aislado que comprende o consiste en SEQ ID NO: 26 en la que el aminoácido en posición 132 de SEQ ID NO: 26 no es leucina (L) y el aminoácido en posición 159 no es treonina (T), el aminoácido en posición 132 es cisteína (C) y el aminoácido en posición 159 es serina (S). La molécula de polipéptido aislado que comprende o consiste en SEQ ID NO: 26 en la que el aminoácido en posición 132 de SEQ ID NO: 26 no es leucina (L) y el aminoácido en posición 159 no es treonina (T), puede comprender o consistir en SEQ ID NO: 19. Alternativa o adicionalmente, la molécula de polipéptido aislado que comprende o consiste en SEQ ID NO: 26 en la que el aminoácido en posición 132 de SEQ ID NO: 26 no es leucina (L) y el aminoácido en posición 159 no es treonina (T), en la que el aminoácido en posición 132 es cisteína (C) y en la que el aminoácido en posición 159 es serina (S), puede comprender o consistir en SEQ ID NO: 19. La invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido aislado que comprende o consiste en SEQ ID NO: 19. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico comprende o consiste en SEQ ID NO: 18.

En ciertos aspectos de la molécula de polipéptido aislado que comprende o consiste en SEQ ID NO: 26 en la que el aminoácido en posición 132 de SEQ ID NO: 26 no es leucina (L) y el aminoácido en posición 159 no es treonina (T), el aminoácido en posición 132 es alanina (A) y el aminoácido en posición 159 es cisteína (C). La molécula de polipéptido aislado que comprende o consiste en SEQ ID NO: 26 en la que el aminoácido en posición 132 de SEQ ID NO: 26 no es leucina (L) y el aminoácido en posición 159 no es treonina (T) puede comprender o consistir en SEQ ID NO: 22. Alternativa o adicionalmente, la molécula de polipéptido aislado que comprende o consiste en SEQ ID NO: 26 en la que el aminoácido en posición 132 de SEQ ID NO: 26 no es leucina (L) y el aminoácido en posición 159 no es treonina (T), en la que el aminoácido en posición 132 es alanina (A) y en la que el aminoácido en posición 159 es cisteína (C), puede comprender o consistir en SEQ ID NO: 22. La divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido aislado que comprende o consiste en SEQ ID NO: 22. Preferiblemente, esta molécula de ácido nucleico comprende o consiste en SEQ ID NO: 21.

En ciertos aspectos de la molécula de polipéptido aislado que comprende o consiste en SEQ ID NO: 26 en la que el aminoácido en posición 132 de SEQ ID NO: 26 no es leucina (L) y el aminoácido en posición 159 no es treonina (T), el aminoácido en posición 132 es cisteína (C) y el aminoácido en posición 159 es alanina (A). La molécula de polipéptido aislado que comprende o consiste en SEQ ID NO: 26 en la que el aminoácido en posición 132 de SEQ ID NO: 26 no es leucina (L) y el aminoácido en posición 159 no es treonina (T) puede comprender o consistir en SEQ ID NO: 25. Alternativa o adicionalmente, la molécula de polipéptido aislado que comprende o consiste en SEQ ID NO: 26 en la que el aminoácido en posición 132 de SEQ ID NO: 26 no es leucina (L) y el aminoácido en posición 159 no es treonina (T), en la que el aminoácido en posición 132 es cisteína (C) y en la que el aminoácido en posición 159 es alanina (A), puede comprender o consistir en SEQ ID NO: 25. La divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido aislado que comprende o consiste en SEQ ID NO: 25. Preferiblemente, esta molécula de ácido nucleico comprende o consiste en SEQ ID NO: 24.

La divulgación proporciona una cualquiera de las moléculas de polipéptido aislado descritas en el presente documento, en las que la molécula de polipéptido codifica una proteína Chop2 mutante que forma un ChR2 mutante que desencadena una corriente en respuesta a una intensidad umbral de luz que es menor que el umbral de una proteína de ChR2 de tipo natural. Además, la corriente conduce cationes. Los cationes a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, iones  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ . Las proteínas de ChR2 de tipo natural y mutantes descritas en el presente documento conducen cationes de manera no específica. Consecuentemente, la corriente conduce uno o más de los siguientes: iones  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ .

La divulgación proporciona una cualquiera de las moléculas de polipéptido aislado descritas en el presente documento que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable. La divulgación también proporciona una composición que comprende al menos una molécula de polinucleótido aislado descrita en el presente documento. La composición puede comprender además un portador farmacéuticamente aceptable.

La divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los polipéptidos aislados descritos en el presente documento. Además, la molécula de ácido nucleico aislado puede incluir además un portador farmacéuticamente aceptable. La divulgación también proporciona una composición que comprende al menos una molécula de ácido nucleico aislado descrita en el presente documento. La composición puede comprender además un portador farmacéuticamente aceptable.

La divulgación proporciona una célula, en la que la célula se ha puesto en contacto con o comprende una molécula de polipéptido aislado de la invención. Además, la divulgación proporciona una célula, en la que la célula se ha puesto en contacto con o comprende una molécula de ácido nucleico aislado que codifica una molécula de polipéptido aislado de la invención. La divulgación proporciona una composición que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una célula que comprende una molécula de polipéptido aislado de la invención o una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de polipéptido aislado de la invención. Las células de la invención pueden ponerse en contacto con el polipéptido aislado o un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo* o *in situ*. En determinadas realizaciones de la invención, la célula es un fotorreceptor; una célula horizontal; una célula bipolar; una célula amacrina y especialmente una célula amacrina AII; o una célula ganglionar retiniana, incluyendo una célula ganglionar retiniana fotosensible. Preferiblemente, la célula es una célula ganglionar retiniana, una célula ganglionar retiniana fotosensible, una célula bipolar, una célula bipolar de tipo ON, un bastón bipolar o una célula amacrina AII. En ciertos aspectos de la invención, la célula es un fotorreceptor, una célula bipolar, un bastón bipolar, un cono bipolar de tipo ON, una célula ganglionar retiniana, una célula ganglionar retiniana fotosensible, una célula horizontal, una célula amacrina o una célula amacrina AII.

La divulgación proporciona un método de mejora o restablecimiento de la visión que comprende administrar a un sujeto una cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento. La divulgación proporciona además un método profiláctico de conservar la visión que comprende administrar a un sujeto una cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento.

Los métodos descritos en el presente documento también pueden aplicarse a aquellos sujetos que están sanos, ciegos (en parte o totalmente) y/o aquellos sujetos con degeneración retiniana (caracterizada por una pérdida de células fotorreceptoras de bastón y/o cono), pero pueden ser dependientes de la actividad de células ganglionares retinianas fotosensibles para una determinación de niveles lumínicos ambientales. Por ejemplo, los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para conservar, mejorar o restablecer la actividad de una célula ganglionar retiniana fotosensible que media en la transducción de información lumínica para sincronizar los ritmos circadianos al ciclo luz/oscuridad de 24 horas, control y reflejos pupilares y regulación luminosa de liberación de melatonina.

En ciertos aspectos de los métodos de la divulgación, el sujeto puede tener visión normal o visión deficiente. Alternativa o adicionalmente, el sujeto puede estar en riesgo de desarrollar una enfermedad ocular que conduce a una deficiencia de visión. Por ejemplo, el sujeto puede tener antecedentes familiares de enfermedad ocular que incluye degeneración macular y retinosis pigmentaria. El sujeto puede estar en riesgo de sufrir una lesión ocular que produce daño de las células fotosensibles en la retina. El sujeto puede tener un marcador genético o una alteración genética/congénita que da como resultado visión deficiente, dificultad para ver, ceguera legal, ceguera parcial o ceguera total. Los sujetos pueden tener un defecto refractivo que da como resultado miopía (cortedad de vista) o hipermetropía (mala visión de cerca).

Pueden administrarse las composiciones de los métodos de la divulgación a un sujeto o bien de manera sistémica o bien de manera local. Una vía preferida de administración local es inyección intravítrea.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de y están abarcadas por las siguientes descripción detallada y reivindicaciones.

### Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra registros representativos de las corrientes provocadas por luz de ChR2 de tipo natural (WT), mutantes L132C, L132C/T159C y L132C/159S en células HEK para comparar su sensibilidad lumínica (A). Se generaron los estímulos lumínicos (fotones/cm<sup>2</sup>.s a 460 nm) mediante una lámpara de arco de xenon y se atenuaron mediante filtros de densidad neutra: ND4,0 (2,8 × 10<sup>14</sup>), ND3,0 (1,4 × 10<sup>15</sup>), ND2,5 (4,8 × 10<sup>15</sup>); ND2,0 (1,6 × 10<sup>16</sup>), ND1,0 (1,3 × 10<sup>17</sup>), ND0 (1,2 × 10<sup>18</sup>). (B) Se muestran los mismos perfiles de corriente a una escala de corriente diferente. Los perfiles indicados por flechas están provocados por la misma intensidad luminosa (ND2,5).

La figura 2 muestra registros representativos de las corrientes provocadas por luz de ChR2 de tipo natural (WT), mutantes T159C, L132C, L132C/T159C y L132C/T159S a un pulso de luz de 10 ms (1,2 × 10<sup>18</sup> fotones/cm<sup>2</sup>/s a

460 nm) en células HEK para comparar su evolución temporal de desactivación (evolución temporal de desintegración después de apagado de luz).

La figura 3 muestra registros de matriz de múltiples canales representativos de actividades de disparo neuronal mediadas por ChR2 de tipo natural, L132C, L132C/T159C y L132C/T159S de células ganglionares retinianas en preparaciones completas retinianas para comparar su sensibilidad lumínica. Se generó estímulo lumínico (fotones/cm<sup>2</sup>/s) mediante un láser azul a 473 nm y se atenuó mediante filtros de densidad neutra: ND0 ( $6,3 \times 10^{16}$ ), ND1,0 ( $7,4 \times 10^{15}$ ), ND1,5 ( $2,7 \times 10^{15}$ ), ND2,0 ( $7,3 \times 10^{14}$ ), ND2,5 ( $3,2 \times 10^{14}$ ), ND3,0 ( $8,5 \times 10^{13}$ ), ND3,5 ( $3,8 \times 10^{13}$ ) y ND4,0 ( $9,5 \times 10^{12}$ ).

La figura 4 muestra registros de matriz de múltiples canales representativos de actividades de disparo neuronal mediadas por ChR2 de tipo natural, L132C, L132C/T159C y L132C/T159S de células ganglionares retinianas en preparaciones completas retinianas para comparar sus dinámicas temporales. En cada panel, se muestran los diagramas de trama de 10 disparos neuronales desencadenados por luz consecutivos originados a partir de una sola neurona (arriba) y los histogramas de tasa de disparos neuronales promediada (abajo). Se generaron pulsos de luz a diferente frecuencia mediante un láser azul a 473 nm con intensidades de aproximadamente de una unidad logarítmica por encima de la intensidad umbral de cada mutante. Se muestran registros de ChR2 de tipo natural y L132C en (A), y se muestran registros de L132C/T159C y L132C/T159S en (B).

## Descripción detallada

### *Sistema visual*

El sistema nervioso central media en la visión (también se denomina en el presente documento vista) a través de células especializadas y métodos únicos de transducción de señales presentes en el sistema visual. La principal responsabilidad del sistema visual es transformar la luz, en forma de radiación electromagnética, en una representación o imagen del mundo que nos rodea. Además de la función "visual" de este sistema, el sistema visual también regula el reflejo fotomotor pupilar (PLR), la fotosincronización circadiana a ciclos luz/oscuridad periódicos y la liberación de la hormona melatonina.

Las células de la retina son las primeras células del sistema nervioso o visual en encontrar luz (radiación electromagnética de longitudes de onda e intensidades variables). Los fotones viajan a través de la cornea, pupila y cristalino antes de alcanzar la retina. La retina tiene una estructura única porque las células fotorreceptoras que absorben directamente fotones están situadas en la capa exterior de la retina. Los fotones que atraviesan el cristalino se encuentran primero con una capa interior de células ganglionares retinianas (un minoría de las que son fotosensibles a través de la expresión de la opsina, melanopsina) y una capa intermedia de células bipolares antes de alcanzar la capa exterior de células fotorreceptoras (también conocidas como bastones y conos). Los fotorreceptores de bastón funcionan en condición de iluminación tenue (visión escotópica) mientras que los fotorreceptores de cono funcionan en condiciones de iluminación luminosa (visión fotópica) responsables de la visión en color. Fotorreceptores de cono forman sinapsis directamente sobre conos bipolares de tipo ON y OFF, que a su vez, forman sinapsis directamente sobre células ganglionares retinianas de tipo ON y OFF. Fotorreceptores de bastón forman sinapsis con bastones bipolares (un tipo único de células bipolares de tipo ON) que forman sinapsis con células amacrinas AII. Las células amacrinas AII transmiten entonces las señales visuales a conos bipolares de tipo ON a través de unión comunicante y a conos bipolares de tipo OFF así como células ganglionares OFF a través de sinapsis glicinérgicas inhibitoras. Las células ganglionares retinianas son responsables de relacionar información visual a las neuronas del cerebro.

### *Fototransducción*

Dentro de la retina, las células fotorreceptoras absorben partículas fotónicas y transforman los datos brutos de frecuencia y longitud de onda de luz en señales químicas y posteriormente eléctricas que propagan esta información inicial a través de los sistemas visual y nervioso. Específicamente, una proteína de opsina situada en la superficie de un fotorreceptor (bastón, cono y/o célula ganglionar retiniana fotosensible) absorbe un fotón e inicia una cascada de señalización intracelular, que da como resultado la hiperpolarización del fotorreceptor. En la oscuridad, las proteínas de opsina no absorben fotones, se despolarizan los fotorreceptores. Las señales visuales de fotorreceptores se transmiten entonces a través de células bipolares, células amacrinas y células ganglionares a los centros visuales superiores en el cerebro. Específicamente, cuando los fotorreceptores de cono y bastón se despolarizan (en la oscuridad), producen la despolarización de bastones bipolares y conos bipolares de tipo ON, pero la hiperpolarización de conos bipolares de tipo OFF, que a su vez producen la despolarización de células amacrinas AII y el aumento del disparo neuronal de células ganglionares retinianas de tipo ON y la disminución del disparo neuronal de células ganglionares retinianas de tipo OFF. Ocurre lo contrario (a bastones bipolares ON y OFF, células amacrinas AII y células ganglionares ON y OFF) cuando se hiperpolarizan los fotorreceptores de cono y bastón (en respuesta a la luz).

Mediante las acciones de fotorreceptores, células bipolares, células horizontales, células amacrinas y células ganglionares retinianas se procesa y refina significativamente la información lumínica. Para añadir complejidad a

este sistema, se encuentran fotorreceptores en tres variedades principales, incluyendo bastones, conos (que, de los tres tipos, reaccionan más fuertemente para distinguir longitudes de onda de luz), y células ganglionares retinianas fotosensibles. Por tanto, una primera capa de procesamiento de información se produce al nivel de los fotorreceptores que reaccionan de manera diferencial a ciertas longitudes de onda e intensidades de luz. Las células bipolares de la retina reciben información tanto de células fotorreceptoras como de células horizontales. Las células horizontales de la retina reciben información de múltiples células fotorreceptoras, y, por tanto, integran información entre tipos de célula y a lo largo de distancias en la retina. Las células bipolares integran además información directamente de células fotorreceptoras y células horizontales produciendo principalmente potenciales graduados a células ganglionares retinianas, aunque algunos estudios recientes indican que algunas células bipolares pueden generar potenciales de acción. Los conos bipolares forman sinapsis en células ganglionares retinianas y células amacrinas mientras que los bastones bipolares forman sinapsis solo con células amacrinas AII. De manera similar a las células horizontales, la mayoría de las células amacrinas integran información lateralmente dentro de la retina. A diferencia de las células horizontales, la mayoría de las células amacrinas son interneuronas inhibitoras (GABAérgicas). Las células amacrinas también están más especializadas que las células horizontales, porque cada célula amacrina forma sinapsis específicamente en un tipo particular de célula bipolar (una de las diez variedades de célula bipolar). Particularmente, la célula amacrina AII es una neurona de transmisión crítica en la ruta de bastón (bajo visión escotópica cuando los fotorreceptores de cono no reaccionan). Las células amacrinas AII reciben entradas sinápticas de bastones bipolares y entonces llevan las señales a la ruta de cono a través de conos bipolares ON y OFF a células ganglionares ON y OFF tal como se describió anteriormente. Por tanto, la expresión de Chop2, y la formación resultante de ChR2, en bastones bipolares o células amacrinas AII pueden crear respuestas ON y OFF en células ganglionares retinianas. Además, células ganglionares retinianas integran información de células bipolares y de células amacrinas. Aunque las células ganglionares retinianas varían significativamente con respecto a su tamaño, conectividad y respuestas a estimulación visual (por ejemplo campos visuales), todas las células ganglionares retinianas extienden un largo axón en el cerebro. A excepción de una porción insignificante de las células ganglionares retinianas que transducen información no visual referente al reflejo fotomotor pupilar y sincronización circadiana, la totalidad de axones que se extienden de las células ganglionares retinianas forman el nervio óptico, quiasma óptico y cintilla óptica del sistema nervioso central. Consecuentemente, una cantidad significativa de procesamiento de información se produce en la propia retina.

Las células fotorreceptoras expresan proteínas de opsina endógena, tales como rodopsina. Las proteínas Chop2 mutantes de la invención pueden expresarse en cualquier tipo de célula, y formar canales de ChR2 funcionales. Preferiblemente, la célula es una célula retiniana. Las células a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, células fotorreceptoras (por ejemplo, bastones, conos y células ganglionares retinianas fotosensibles), células horizontales, células bipolares, células amacrinas y células ganglionares retinianas.

#### Canalopsina-2 (Chop2)

Canalopsina-2 (Chop2) se aisló por primera vez a partir de algas verdes, *Chlamydomonas reinhardtii*. Canalopsina-2 es una proteína con siete dominios transmembrana que puede cambiar con la luz (sensible a la luz) cuando se une al cromóforo todo-*trans*-retinal. Chop2, cuando se une a una molécula retiniana por medio de un enlace de base de Schiff, forma un canal de cationes regulado por luz, no específico, de rectificación interna llamado canalrodopsina-2 (Chop2 retinalideno, abreviado ChR2).

"Canalopsina-2" o "Chop2", tal como se usa en el presente documento se refiere al gen que codifica canalopsina-2 que forma entonces canalrodopsina-2 (ChR2) una vez unido a la molécula retiniana. Los constructos génicos de la presente divulgación se refieren principalmente a canalopsina-2 (es decir, sin la molécula retiniana), y todas las variantes de Chop2 dadas a conocer en el presente documento forman variantes de canalrodopsina-2 funcionales. Los métodos dados a conocer en el presente documento pueden incluir administrar Chop2 a células sin molécula retiniana exógena. Se entiende que tras la expresión de Chop2 en células (es decir, neuronas retinianas), se une la molécula retiniana disponible de manera endógena a Chop2 de tipo natural o a los mutantes Chop2 de la presente invención para formar canales regulados por luz funcionales, ChR2 de tipo natural o ChR2 mutante. Como tal, proteínas Chop2, tal como se usa en el presente documento, pueden ser también sinónimas de ChR2.

"Canalrodopsina-2" o "ChR2", tal como se usa en el presente documento se refiere al canal sensible a la luz funcional unido a molécula retiniana. En un aspecto, la molécula retiniana unida puede proporcionarse de manera exógena. En un aspecto preferido, la molécula retiniana unida se proporciona a partir de niveles endógenos disponibles en la célula. La presente divulgación también abarca los canales de canalrodopsina-2 funcionales formados por los polipéptidos y polinucleótidos que codifican los mutantes de Chop2 descritos en el presente documento.

Tras iluminación mediante la dosis preferida de radiación luminosa, ChR2 abre el poro del canal, a través del cual los iones  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  y/o  $Ca^{2+}$  fluyen del espacio extracelular a la célula. La activación del canal de ChR2 produce normalmente una despolarización de la célula que expresa el canal. Las células despolarizadas producen potenciales graduados y/o potenciales de acción para llevar información de la célula que expresa Chop2/ChR2 a otras células de la retina o el cerebro.

La forma de tipo natural de ChR2 o ChR2 mutantes con resolución temporal alta se ha convertido en un foco central de investigación en neurociencia. Cuando se expresa en una neurona de mamífero, ChR2 media en la despolarización controlada por luz de cultivos *in vitro* o *ex vivo*. ChR2 de tipo natural o ChR2 mutantes con resolución temporal alta (el último habitualmente muestra baja sensibilidad lumínica) presentan varios desafíos que deben abordarse para permitir su uso con el propósito de restablecer la visión. Con el propósito de restablecer la visión, se desea el ChR2 con sensibilidad lumínica alta antes que resolución temporal alta.

Las proteínas de ChR2 de tipo natural requieren iluminación de altas intensidades de luz azul para activación completa (es decir  $10^{18}$ - $10^{19}$  fotones  $s^{-1} cm^{-2}$  a una longitud de onda de 480 nm). La iluminación continua de este tipo puede dañar las células.

Las cinéticas de la proteína de ChR2 de tipo natural no son suficientes para maximizar la eficacia del canal. Puede aumentarse la eficacia modificando uno o más aminoácidos de la proteína de ChR2 de tipo natural o bien para prolongar el estado abierto del canal o bien para aumentar la conductancia unitaria del canal, o ambos. La conductancia de canal único de ChR2 de tipo natural es pequeña. Por tanto, la activación neuronal *in vivo* requeriría o bien expresión alta del canal de tipo natural o activación muy intensa con la longitud de onda preferida de luz azul. Se puede encontrar una solución más sencilla alterando la conductancia de canal o prolongando el tiempo de apertura del canal. Cualquiera de estos mecanismos y, en particular, la combinación de estos mecanismos, permite usar intensidades luminosas menores y más seguras para alcanzar el mismo nivel de despolarización celular.

Por ejemplo, proteínas de ChR2 mutantes de la invención consiguen sensibilidad lumínica mayor a través de la prolongación del estado de apertura del canal. Consecuentemente, cada canal de ChR2 mutante conduce una fotocorriente mayor que un canal de ChR2 de tipo natural cuando se activa mediante las mismas intensidades luminosas. Por tanto, los canales mutantes se activan mediante intensidades luminosas que son menores que las requeridas para la activación de los canales de ChR2 de tipo natural. Cuantitativamente, puede desencadenarse actividad de disparo neuronal detectable de células ganglionares retinianas que expresan proteínas de ChR2 mutantes mediante una intensidad luminosa que es de 1,5-2 unidades logarítmicas menor que la intensidad luminosa requerida para desencadenar actividad de disparo neuronal de células ganglionares retinianas que expresan ChR2 de tipo natural. Por tanto, las intensidades luminosas requeridas para activar las proteínas de ChR2 mutantes se encuentran cerca de o dentro del intervalo de condiciones de iluminación exterior normales.

Las siguientes secuencias proporcionan ejemplos no limitativos de proteínas Chop2 de tipo natural y mutantes, y polinucleótidos que codifican dichas proteínas Chop2 de tipo natural y mutantes de la divulgación, y que forman ChR2 de tipo natural y mutantes de la divulgación.

Una Chop2 de tipo natural (WT) de la divulgación puede codificarse mediante la siguiente secuencia de ARNm de canal iónico regulado por luz (COP4) de clamiopsina 4 de *Chlamydomonas reinhardtii* (n.º de registro de GenBank XM\_001701673, y SEQ ID NO: 1):

```

1 gcagcaccat acttgacatc tgtcgccaag caagcattaa acatggatta tggaggcgcc
61 ctgagtgccg ttggggcgca gctgctatct gtaacgaacc cagtagtcgt caatggctct
121 gtacttgtgc ctgaggacca gtgttactgc gcgggctgga ttgagtcgcg tggcaciaaac
181 ggtgccccaaa cggcgctgaa cgtgctgcaa tggcttgcgt ctggcttctc catcctactg
241 cttatgtttt acgcctacca aacatggaag tcaacctgcg gctgggagga gatctatgtg
301 tgcgctatcg agatgggtaa ggtgattctc gagttcttct tcgagtttaa gaaccctcc
361 atgctgtatc tagccacagg ccaccgcgct cagtgggtgc gttacgccga gtggcttctc
421 acctgcccgg tcattctcat tcacctgtca aacctgacgg gcttgtccaa cgactacagc
481 aggcgcacca tgggtctgct tgtgtctgat attggcaciaa ttgtgtgggg cgccacttcc
541 gccatggcca ccgatacgt caaggtcatc ttcttctgcc tgggtctgtg ttatggtgct
601 aacacgttct ttcacgctgc caaggcctac atcgaggggt accacaccgt gccgaagggc
661 cgggtgctgcc aggtggtgac tggcatggct tggctcttct tcgtatcatg gggtatgttc
721 cccatcctgt tcacctcgg ccccgagggc ttcggcgctc tgagcgtgta cggctccacc

```

## ES 2 703 324 T3

```

781 gtcggccaca ccatcattga cctgatgtcg aagaactgct ggggtctgct cggccactac
841 ctgcgctgct tgatccacga gcatatcctc atccacggcg acattcgcaa gaccaccaa
901 ttgaacattg gtggcactga gattgaggtc gagacgctgg tggaggacga ggccgaggct
961 ggcgcggtca acaagggcac cggcaagtac gcctcccgcg agtccttctt ggtcatgcgc
1021 gacaagatga aggagaaggc cattgacgtg cgcgcctctc tggacaacag caaggaggtg
1081 gagcaggagc aggccgccag ggctgccatg atgatgatga acggcaatgg catgggtatg
1141 ggaatgggaa tgaacggcat gaacggaatg ggcggtatga acgggatggc tggcggcgcc
1201 aagccccgcc tggagctcac tccgcagcta cagccccgcc gcgtcatcct ggcggtgccg
1261 gacatcagca tggttgactt cttccgcgag cagtttgctc agctatcggg gacgtacgag
1321 ctggtgccgg ccttgggcgc tgacaacaca ctggcgctgg ttacgcaggc gcagaacctg
1381 ggcggcgtgg actttgtggt gattcaccac gagttcctgc gcgaccgctc tagcaccagc
1441 atcctgagcc gcctgcgcgg cgcgggcccag cgtgtggctg cgttcggctg ggcgcagctg
1501 gggccccatg gtgacctgat cgagtcgca aacctggagc gctggctgga gggccccctg
1561 ttcggacagg gcatcctgcc ggcccacatc gttgccctgg tggccaagat gcagcagatg
1621 cgcaagatgc agcagatgca gcagattggc atgatgaccg gcggcatgaa cggcatgggc
1681 ggcggtatgg ggcggcgcac gaacggcatg ggcggcggca acggcatgaa caacatgggc
1741 aacggcatgg ggcggcgcac gggcaacggc atggcgggca atggcatgaa cggaatgggt
1801 ggcggcaacg gcatgaacaa catggcgggc aacggaatgg cgggcaacgg aatggcgggc
1861 aacatggggc gcaacgggat ggggtggctc atgaacggca tgagctccgg cgtgggtggc
1921 ggcagtgacc gctccgcccg cggcgcatg ggcggcatg tgaacggcgg catggctgcg
1981 cccagctgca cggcatgaa cggcgcccgc ctgggtacca acccgctctt caacgcgcgcg
2041 cctcaccgca tcagctcgca gctcgggtcc gaggcaggca tgggcagcat gggaggcatg
2101 ggcggaatga gcggaatggg aggcattgggt ggaatggggg gcatggcgcg cgccggcgcc
2161 gccacgacgc agctgcccgg cggcaacgcg gaggcggaga tgctgcagaa tctcatgaac
2221 gagatcaatc ccctgaagcg cgagcttggc gagtaaaagg ctggaggcgc gtaactcgat
2281 acctgcgagc tcgcgcgcct gactcgtcgt acacacggct caggagcagc cgcgcgtgga
2341 cttctcaacc tgtgtgcaac gtatctagag cggcctgtgc gcgaccgctc gtgagcattc
2401 cgggtgcatc ttcccgcctt cgcaccgcaa gttccccttc tggccctgct gcgctgacg
2461 catcgtccga accggaaggc ggcttgatca gtaaagcatt gaagactgaa gtcgtgacg
2521 cgtagtacta tggctctgca cgtaaagtgg cgctgccctg cttactacgc attgcccaag
2581 actgcttctt tttgggtggc gaggcctgg tcccacatca ttcatttgca taactgactg
2641 tttagttaca tacgctttgc ttaacctcga caatgcaac atgggctgag agtccgtacg
2701 cgggctatgg acgaaaggtg tatcggatgt gattaggaat ctcggtgaa aggcttcgag
2761 aaagtgagct tcactctggt cttctgttgg ggtcatcaag aagaacgacg gtaaggcaaa
2821 cgattacaaa acactttgat tttgtgcaca acgggccctg ggagagtggg ggaagtcatg
2881 tgtgcggtcc taacacgcga gtgcaaacgc ggcttttctg gagctgggtt acggtctggc
2941 tcggcaactg ctctgtgttt taaccacagc ttcggaagtc tgggtatggt ttgttggcag
3001 aacatttgg gtaacttgag ggtgatcgt ctggagtcg acaacatggc tgccgtccgt
3061 gtgcagggac gtaactcaat gagctggagc tgtgatgctc accacacggt gcatacccct
3121 gcttacaaaa acactttgat gtcgtggcca aactatcgt gagcaaaagag ttaaagaggc
3181 atgagtgcac ggttgcggac gtgcgcaaca attgcatcaa gtatttgacg cctcaagcc
3241 aacaagtgcg cgcgcggcaa cttgattaac acgcccggac cagtgggtgg ggcgtgtaca
3301 gtgtttatga gctgccattc tgcgatccgt agtgttaggt tgcgtgtgac gccgcggcgc
3361 tgtgggccc tccatggaga gttgggtgct tcaccacagc gttggcgcgc ctgaagggtg
3421 tgctatgttt ttgtaaaagc ggggccctga agaccgcaac cgtagaaccg tactgaaag
3481 gtgtcagccc ggggtaactg gatgccctgg gacatagcta ttaatgttga agtgaagccg
3541 tcaagccgag tgccgtgccc cgctgtatca ccaagcccc tecta

```

Una Chr2 de tipo natural (WT) de la divulgación puede codificarse mediante la siguiente secuencia de aminoácidos de canal iónico regulado por luz (COP4) de clamiopsina 4 de *Chlamydomonas reinhardtii* (n.º de registro de GenBank XP\_001701725, y SEQ ID NO: 2):

5

```

1 mdyggalsav grellfvtnp vvnngsvlvp edqcyagwi esrgtngaqt asnvlqwlaa
61 gfsilllmfy ayqtwkstcg weeiyvcaie mvkvilefff efknpsmlyl atghrvqwlr
121 yaewlltcpv ilihlsnlgt lsndysrrtm gllvsdigti vwqatsamat gyvkviffcl
181 glygantff haakayiegy htvpkgrcrq vvtgmawlff vswgmfpilf ilgpegfgvl
241 svygstvght iidlmskncw gllghylrvl ihehilihgd irkttklmig gteievetlv
301 edeaeagavn kgtgkyasre sflvmrdkmk ekgidvrasl dnskeveqeq aaraammmmn
361 gngmgmgmgm ngmngmggmn gmaggakppl eltpqlqppr vilavpdism vdfreqqfaq
421 lsvtyelvpa lgadntlalv tgaqnlggvd fvlhpeflr drsstsilsr lrgagqrvaa
481 fgwaqlgpmr dliesanldg wlegpsfggg ilpahivalv akmqmkrkmq qmqqigmmtg
541 gmnmgmgmgm gmnmgmgggn gmnmgmgmgm gmnmgmgggn mnmngmgngma
601 gngmgggmgm ngmggsmngm ssgvvanvtp saaggmggmm nggmaapqsp gmnngrlgtn
661 plfnaapspl ssqlgaeagm gsmggmggms gmggmgmgm mggagaattq aaggnaeaeam

```

721 lqnlmneinr lkrelge

10

Una Chop2 de tipo natural (WT) de la divulgación puede codificarse mediante la siguiente secuencia génica de proteína de unión a molécula retiniana (cop4) de *Chlamydomonas reinhardtii* (n.º de registro de GenBank AF461397, y SEQ ID NO: 3):



ES 2 703 324 T3

1 gcattctgtcg ccaagcaagc attaaacatg gattatggag ggcacctgag tgcctgtggg  
61 cgcgagctgc tatttgaac gaacccagta gtcgtcaatg gctctgtact tgtgcctgag  
121 gaccagtgtt actgcgctgg ctggattgag tgcgctggca caaacgggtgc ccaaacggcg  
181 tcgaacgtgc tgcaatggct tgctgctggc ttctccatcc tactgcttat gttttacgcc  
241 taccaaacat ggaagtcaac ctgctgctgg gaggagatct atgtgtgctc tatcgagatg  
301 gtcaaggtga ttctcgagtt cttcttcgag tttaagaacc cgtccatgct gtatctagcc  
361 acaggccacc gcgtccagtg gttgctgtac gccgagtggtc ttctcacctg cccggtcatt  
421 ctcatcacc tgtcaaacct gacgggcttg tccaacgact acagcaggcg caccatgggt  
481 ctgcttgtgt ctgatattgg cacaattgtg tggggcgcca ctcccgccat ggccaccgga  
541 tacgtcaagg tcatcttctt ctgcctgggt ctgtgttatg gtgctaacac gttctttcac  
601 gctgccaaagg cctacatcga gggttaccac accgtgccga agggccgggtg tcgccagggtg  
661 gtgactggca tggcttggct cttcttcgta tcatggggta tgttcccat cctgttcatc  
721 ctgggccccg agggcttcgg cgtcctgagc gtgtacggct ccacctcgg ccacaccatc  
781 attgacctga tgcgaagaa ctgctggggc ctgctcggcc actacctgcg cgtgctgatc  
841 caccagcata tcctcatcca cggcgacatt cgcaagacca ccaaattgaa catgggtggc  
901 actgagattg aggtcgagac gctggtggag gacgaggccg aggctggcgc ggtcaacaag  
961 ggcaccggca agtacgcctc ccgagctcc ttctgggtca tgcgcgaca gatgaaggag  
1021 aagggcattg acgtgcgcgc ctctctggac aacagcaagg aggtggagca ggagcaggcc  
1081 gccaggctgc ccattgatgat gatgaacggc aatggcatgg gtatgggaat gggaaatgaac  
1141 ggcattgaacg gcaatggcgg tatgaacggg atggctggcg gcgccaagcc cggcctggag  
1201 ctcaactccgc agctacagcc cggccgcgct atcctggcgg tgcgggacat cagcatgggt  
1261 gacttcttcc ggcagcagtt tgctcagcta tccgtgacgt acgagctggt gccggccctg  
1321 ggcgctgaca acacactggc gctggttacg caggcgcaga acctgggctg cgtggacttt  
1381 gtgttgattc accccagatt cctgcgcgac cgctctagca ccagcatcct gagccgctg  
1441 cgcggcgcgg gccagcgtgt ggctgcgttc ggctgggccc agctggggcc catgctgac  
1501 ctgatcgagt ccgcaaacct ggacggctgg ctggagggcc cctcgttcgg acagggcatc  
1561 ctgcccggccc acatcgcttc cctggtggcc aagatgcagc agatgcgcaa gatgcagcag  
1621 atgcagcaga ttggcatgat gaccggcggc atgaacggca tggggcggcg tatggggcggc  
1681 ggcattgaacg gcatggggcg cggcaacggc atgaacaaca tgggcaacgg catggggcggc  
1741 ggcattgggca accgcatggg cggcaatggc atgaacggaa tgggtggcgg caacggcatg  
1801 aacaacatgg gcggcaacgg aatggccggc aacggaatgg gcggcggcat gggcggcaac  
1861 ggtatgggtg gctccatgaa cggcatgagc tccggcgtgg tggccaacgt gacgccctcc  
1921 gccgcccggc gcatggggcg catgatgaac ggccgcatgg ctgcccaca gtcccggc  
1981 atgaacggcg gccgctggg taccaaccg ctcttcaac cgcgcctc accgctcagc  
2041 tcgcagctcg gtcgagggc aggcattggc agcatgggag gcatggggcg aatgagcggg  
2101 atgggaggca tgggtggaat ggggggcatg ggccggcgg gcgcccac gacgcaggct  
2161 gccggcggca accgagggc ggagatgctg cagaatctca tgaacgagat caatcgctg  
2221 aagcgcgagc ttggcgagta a

5 Una Chop2 de tipo natural (WT) de la divulgación puede codificarse mediante la siguiente secuencia de aminoácidos de proteína de unión a molécula retiniana (cop4) de *Chlamydomonas reinhardtii* (n.º de registro de GenBank AAM15777, y SEQ ID NO: 4):

1 mdyggalsav grellfvtnp vvnngsvlvp edqcyagwi esrgtngagt asnvlqwlaa  
61 gfsilllmfy ayqtwkstcg weeiyvcaie mvkvilefff efknpsmlyl atghrvqwlr  
121 yaewlltcbv ilihlsnlgt lsndysrrtm gllvsdigti vwgatsamat gyvkviffcl  
181 glcygantff haakayiegy htpkgrcrq vvtgmawlff vswgmfpilf ilgpegfgvl  
241 svygstvght iidlmskncw gllghylrvl ihehilihgd irkttklng gteievetlv  
301 edeaeagavn kgtgkyasre sflvmrdkmk ekgidvrasl dnskeveqeq aaraammmmm  
361 gngmgmgmgm ngmngmngm gmaggakpjl eltpqlqppr vilavpdism vdfreqqfaq  
421 lsvtyelvpa lgadntlalv tqaqnlggvd fvlihpflr drsstsilsr lrgagqrva  
481 fgwaqlgpmr dliesanldg wlegpsfggg ilpahivalv akmqgmrmq qmqqigmmtg  
541 gmgmgggmg gmgmggggn gmnmgngmg gmgmgmggn gmgmgggng mnmngngma  
601 gngmgggmg ngmngsmngm ssgvvanvtp saaggmgmm nggmaapqsp gmggrrlgt  
661 plfnaapspl ssqlgaeagm gsmggmgms gmgmgmgmg mggagaattq aagngaeam  
721 lqnlmneinr lkrelge

10 Una Chop2 de tipo natural (WT) de la divulgación puede codificarse mediante la siguiente secuencia de ARNm de opsina B sensorial (CSOB) de *Chlamydomonas reinhardtii* (n.º de registro de GenBank AF508966, y SEQ ID NO: 5):

## ES 2 703 324 T3

```

1  ttgacatctg  tcgccaagca  agcattaaac  atggattatg  gagggcgccct  gagtgcgctt
61  gggcgcgagc  tgctatthgt  aacgaaccca  gtagtcgtca  atggctctgt  acttgtgcct
121  gaggaccagt  gttactgctg  gggctggatt  gtagtcgctg  gcacaaacgg  tgcccaaacg
181  gcgtcgaaac  tgctgcaatg  gcttgctgct  ggcttctcca  tcctactgct  tatgttttac
241  gcctaccaaa  catggaagtc  aacctgctgc  tgggaggaga  tctatgtgtg  cgctatcgag
301  atggccaagg  tgattctcga  gttcttcttc  gagtttaaga  acccgcccat  gctgtateta
361  gccacagggc  accgcgtcca  gtggttgctg  tacgcagagt  ggcttctcac  ctgcccggtc
421  attctcattc  acctgtcaaa  cctgacgggc  ttgtccaacg  actacagcag  gcgcaccatg
481  ggtctgcttg  tgtctgatat  tggcacaatt  gtgtggggcg  ccaactccgc  catggccacc
541  ggatacgtca  aggtcatctt  cttctgcctg  ggtctgtggt  atggtgctaa  cacgttcttt
601  cacgctgcca  aggcctacat  cgagggttac  cacaccgtgc  cgaagggccg  gtgtcgccag
661  gtggtgactg  gcatggcttg  gctcttcttc  gtatcatggg  gtatgttccc  catctgtctc
721  atcctcggcc  cggaggcttc  cggcgctctg  agcgtgtacg  gctccaccgt  cggccacacc
781  atcattgacc  tgatgtcgaa  gaactgctgg  ggtctgctcg  gccactacct  gcgctgctg
841  atccacgagc  atatcctcat  ccacggcgac  attcgcaaga  ccaccaaatt  gaacattggt
901  ggcaactgaga  ttgaggtcga  gacgctggtg  gaggacgagg  ccgaggctgg  cgcggtcaac
961  aagggcaccg  gcaagtacgc  ctcccgcgag  tccttcctgg  tcatgctcga  caagatgaag
1021  gagaagggca  ttgacgtgct  cgctctctct  gacaacagca  aggaggtgga  gcaggagcag
1081  gccgcagggg  ctgccatgat  gatgatgaac  ggcaatggca  tgggtatggg  aatgggaaatg
1141  aacggcatga  acggaatggg  cggatgaac  gggatggctg  gcggcgccaa  gcccgccctg
1201  gagctcactc  cgcagctaca  gccggccgcg  gtcatcctgg  cggtgccgga  catcagcatg
1261  gttgacttct  tccgcgagca  gtttgctcag  ctatcgggta  cgtacgagct  ggtgccggcc
1321  ctgggctctg  acaacacact  ggcgctggtt  acgcaggcgc  agaacctggg  cggcgtggac
1381  tttgtggtga  ttcaccccga  gttcctgctg  gaccgctcta  gcaccagcat  cctgagccgc
1441  ctgctcggcg  cgggcccagc  tgtggctggg  ttcggctggg  cgcagctggg  gcccatgctg
1501  gacctgatcg  agtccgcaaa  cctggacggc  tggctggagg  gccctcgtt  cggacagggc
1561  atcctgccgg  cccacatcgt  tgccctggtg  gccaaagtgc  agcagatgct  caagatgcag
1621  cagatgcagc  agattggcat  gatgaccggc  ggcatgaacg  gcatgggctg  cggatggggc
1681  gcggcatgca  acggcatggg  cggcggcaac  ggcatgaaca  acatgggcaa  cggcatgggg
1741  gcggcatgca  gcaacggcat  gggcggcaat  ggcatgaacg  gaatgggtgg  cggcaacggc
1801  atgaacaaca  tgggcccga  cggaatggcc  ggcaacggaa  tgggcccggg  catgggcccg
1861  aacggatagg  gtggctccat  gaaocggcat  agctccggcg  tggggccaa  ctgacgccc
1921  tccgcgccc  gcggcatggg  cggcatgatg  aacggcggca  tggctgccc  ccagtccc
1981  ggcatgaacg  gcggcccct  gggtagcaac  ccgctcttca  acccccgc  ctaccgctc
2041  agctcgcagc  tcggtgccga  ggcaggcatg  ggcagcatgg  gaggcaggg  cggaatgagc
2101  ggaatgggag  gcatgggtgg  aatggggggc  atgggcccgc  ccggcccgc  cacgacgcag
2161  gctgcccggc  gcaacgcgga  ggcggagatg  ctgcagaatc  tcatgaacga  gatcaatcgc
2221  ctgaagccgc  agcttggcga  gtaaaaggct  ggaggccggt  actgcgatac  ctgcaagctc
2281  gcgcccctga  ctgctgtac  acacggctca  ggagcacgcg  cgcgtggact  tctcaactg
2341  tgtgcaacgt  atctagagcg  gcctgtgctg  gaccgtcctg  gagcattccg  gtgctgctt
2401  cccgcttctg  caccgcaagt  tcccttctct  gcctgtctgc  gcctgacgca  tctgcccga
2461  ggaagggcgg  ctgatcagct  aaagcattga  agactgaagt  cgtgacaccg  tagtgctatg
2521  gctctgcacg  taagtgggct  ctgcccctg  tactacgcat  tgcccgaagc  tgcttcttt
2581  ttggtggcca  gcccctggct  ccacatcatt  catttgcata  acgtactggt  tagttacata
2641  cgcttggctt  aacctcgaca  attgcaacat  gggctgagag  tccgtacggc  ggtatggac
2701  gaaggtggtt  tcggatgtga  ttaggaatct  cgggtgaaag  gcttcgagaa  agtgagctt
2761  ttctgtggct  tctgttgggg  tcatcaagaa  gaacgacgg  aaggcaaacg  aggtaaaagt
2821  ggcacgtctt  tgtgcacaac  gggcccctgg  agagtggggg  agtgcatgtg  tgcggctcta
2881  acacgcgagt  gcaaaagcgg  ctttcttgg  gctgggttac  ggtctggctc  ggcaactgct
2941  ctgtgtttta  accacagctt  cggaaagtct  ggtatgtttt  gttggcagaa  acatttgggt
3001  aacttgaggg  tgattcgtct  ggagtcggac  aacatggctg  ccgtccgtgt  gcaggacgg
3061  taatcaatga  agctgaagct  gtgatgctca  ccacacgctg  catacccctg  cttaaaaaaa

3121  cactttgatg  tcgtggccaa  actatgcctg  agcaaagagt  taaagaggca  tgagtgcag
3181  gttgcccagc  tgcgcaacaa  ttgcatcaag  tatttgacgc  cttaacgca  acaagtgcg
3241  gcgcccgaac  ttgattaaca  cgcccgaagc  agtgggtggg  gcgtgtacag  tgtttatgag
3301  ctgccattct  gcgacccgta  gtgttaggtt  gcgtgtgacg  ccgcccggct  gtgggcccct
3361  acatgagagc  ttgggtgctt  caccacagcg  ttggcggcgc  tgaaggggtg  gctatgtttt
3421  ggtaaagccg  gggcccctga  gaccgcaacc  gtagaaccgt  actgaaaggg  tgtcagccc
3481  gggtaactgg  atgcccctgg  acatagctat  taatgttgaa  gtgaagccgt  caagccgagt
3541  gccgtgccc  gctgtatcac  caaggcccgt  ccaaaaaaaa  aaaaaaaa  aaaaaaaa

```

5 Una Chop2 de tipo natural (WT) de la divulgación puede codificarse mediante la siguiente secuencia de aminoácidos de opsina B sensorial (CSOB) de *Chlamydomonas reinhardtii* (n.º de registro de GenBank AAM44040, y SEQ ID NO: 6):

## ES 2 703 324 T3

```

1 mdyggalsav grellfvtnp vvnngsvlvp edqycagwi esrgtngagt asnvlqwlaa
61 gfsilllmfy ayqtwkstcg weeiyvcaie mvkvilefff efknpsmlyl atghrvqwlr
121 yaewlltcbv ilihlsnlgt lsndysrrtm gllvsdigti vwgatsamat gyvkviffcl
181 glcygantff haakayiegy htpkgrcrq vvtgmawlff vswgmfpilf ilgpegfgvl
241 svygstvght iidlmskncw gllghylrvl ihehilihgd irkttklnig gteievettlv
301 edeaeagavn kgtgkyasre sflvmrdkmk ekgidvrasl dnskeveqeq aaraammmmm
361 gngmgmgmgm ngmngmggmn gmaggakppl eltpqlqppr vilavpdism vdfdfreqfaq
421 lsvtyelvpa lgadntlalv tgaqnlggvd fvlhipeflr drsstsilsr lrgaggrvaa
481 fgwaqlgpmr dliesanldg wlegpsfggg ilpahivalv akmqgmrmq qmqqigmmtg
541 gmgmgggmgg ggmgmggggn gmnmgmgmgg gmgmgmgggn gmgmgggng mnmnggngma
601 gngmgggmgg ngmggsmngm ssgvvanvtp saaggmggmm nggmaapqsp gmgnggrlgtm
661 plfnaapspl ssqlgaeagm gsmggmggms gmgmgggmgg mggagaattq aaggnaeaeam
721 lqnlmneinr lkrelge

```

Una Chop2 de tipo natural (WT) de la divulgación puede codificarse mediante el siguiente ARNm de acop2 de *Chlamydomonas reinhardtii* para la secuencia de ácido nucleico de opsina 2 de tipo arquea (n.º de registro de GenBank AB058891, y SEQ ID NO: 7):

5

```

1 catctgtcgc caagcaagca ttaaacaatgg attatggagg cgccttgagt gccgttgggc
61 gcgagctgct atttgtaacg aaccagtag tctgcaatgg ctctgtactt gtgcctgagg
121 accagtgtta ctgcgcgggc tggattgagt cgcgtggcac aaacggtgcc caaacggcgt
181 cgaacgtgct gcaatggcct gctgctggct tctccatcct actgcttatg ttttacgcct
241 accaaacatg gaagtcaacc tgcggctggg aggagatcta tgtgtgcgct atcgagatgg
301 tcaaggtgat tctcgagttc ttcttcgagt ttaagaacct gtccatgctg tatctagcca
361 caggccaccg cgtccagtggt ttgcgttacg ccgagtggtt tctcacctgc ccggtcattc
421 tcattcacct gtcaaacctg acgggcttgt ccaacgacta cagcaggcgc accatgggtc
481 tgcttgtgtc tgatattggc acaattgtgt gggcgccac ttccgcatg gccaccgat
541 acgtcaaggt catcttcttc tgctgggtc tgtgttatgg tgctaacacg ttctttcacg
601 ctgccaaggc ctacatcgag ggttaccaca ccgtgccgaa gggccggtgt gccaggtgg
661 tgactggcat ggcttggctc ttcttcgat catggggtat gttccccatc ctgttcatcc
721 tcggccccga gggcttcggc gtctgagcgt tgtacggctc caccgtcggc cacaccatca
781 ttgacctgat tgcaagaac tgctgggtc tgetcggcca ctacctgccc gtgctgatcc
841 acgagcatat cctcatccac ggcgacattc gcaagaccac caaattgaac attggtggca
901 ctgagattga ggtcgagacg ctggtggagg acgagggcca ggtggcgcg gtcaacaagg
961 gcaccggcaa gtacgcctcc cgcgagtcct tcttgggtcat ggcgacaag atgaaggaga
1021 agggcattga cgtgcgcgcc tctctggaca acagcaagga ggtggagcag gagcaggccg
1081 ccagggtcgc catgatgatg atgaacggca atggcatggg tatgggaatg ggaatgaacg
1141 gcatgaacgg aatgggcggg atgaacggga tggctggcgg cgccaagccc ggcctggagc
1201 tcaactccgca gctacagccc ggcgcgctca tcttggcggg gccggacatc agcatggttg
1261 acttcttccg cgagcagttt gctcagctat ccggtgacgta cgagctgggt ccggccctgg
1321 gcgctgacaa cacactggcg ctgggttacgc aggcgcagaa cctgggcggc gtggactttg
1381 tgttgattca ccccgagttc ctgcgcgacc gctctagcac cagcatcctg agccgcctgc
1441 gcggcgcggg ccagcgtgtg gctgcgttcg gctgggcgca gctggggccc atgctgacc
1501 tgatcgagtc cgcaaacctg gacggctggc tggagggccc ctgcttcgga cagggcatcc

```

```

1561 tgccggccca catcgttgcc ctggtggcca agatgcagca gatgcgcaag atgcagcaga
1621 tgagcagat tggcatgatg accggcggca tgaacggcat gggcggcggg atgggcggcg
1681 gcatgaacgg catgggcggc ggcaacggca tgaacaacat gggcaacggc atgggcggcg
1741 gcatgggcaa cggcatgggc ggcaatggca tgaacggaat ggggtggcggc aacggcatga
1801 acaacatggg cggcaacgga atggcggcga acggaatggg cggcggcatg ggcggcaacg
1861 gtatgggtgg tccatgaac ggcatgagct ccggcgtggt ggccaacgtg acgcccctcg
1921 gcgcggcgg catgggcggc atgatgaacg gcggcatggc tgcgccccag tcgcccggca
1981 tgaacggcgg ccgctgggt accaaccgcg tcttcaacgc cgcgcccctc ccgctcagct
2041 cgcagctcgg tgccgaggca ggcatgggca gcatgggagg catgggcgga atgagcggaa
2101 tgggaggcat ggggtggaatg gggggcatgg gcggcgccgg ccgcccacg acgcaggctg
2161 cggcgggcaa cgcggaggcg gagatgctgc agaattctcat gaacgagatc aatcgctga
2221 agcgcgagct tggcgagtaa aaggctggag gccggactg cgatacctgc gagctcgcg
2281 gctgactcgt tctgacacac ggctcaggag cacgcgcgcg tggacttctc aacctgtgtg
2341 caacgtatct agagcggcct gtgcgcgacc gtccgtgagc attccggtgc gatcttcccg
2401 ccttcgacc gcaagttccc ttctggccc tgcgtgcct gaagcgc

```

10

Una Chop2 de tipo natural (WT) de la divulgación puede codificarse mediante el siguiente ARNm de acop2 de *Chlamydomonas reinhardtii* para la secuencia de aminoácidos de opsina 2 de tipo arquea (n.º de registro de GenBank BAB68567, y SEQ ID NO: 8):

```

1 mdyggalsav grellfvtnp vvnngsvlvp edqcyagwi esrgtngagt asnvlqwlaa
61 gfsilllmfy ayqtwkstcg weeiyvcaie mvkvilefff efknpsmlyl atghrvqwlr
121 yaewlltcbv ilihlsnltg lsndysrrtm gllvsdigti vwgatsamat gyvkviffcl
181 glcygantff haakayiegy htpkgrcrq vvtgmawlff vswgmfpilf ilgpegfgvl
241 svygstvght iidlmskncw gllghylrvl ihehilihgd irkttklmig gteievettv
301 edeaeagavn kgtgkyasre sflvmrdkmk ekgidvrasl dnskeveqeq aaraammmmm
361 gngmgmgmgm ngmngmggmn gmaggakppl eltpqlqppr vilavpdism vdfreqqfaq
421 lsvtyelvpa lgadntlalv tgaqnlggvd fvlihpelr drsstsilsr lrgaggrvaa
481 fgwaqlgpmr dliesanldg wlegpsfggg ilpahivalv akmqmrkmq qmqgigmmtg
541 gmgmgggmg ggmgmggggn gmnmgmgmg ggmgngmggn gmgmgggng mnnmgngma
601 gngmgggmg ngmggsmngm ssgvvanvtp saaggmgmm nggmaapqsp gmgggrlgtm
661 plfnaapspl ssqlgaeagm gsmggmgms gmgmgggmg mggagaattq aaggnaeaeam
721 lqnlmneinr lkrelge

```

*Mutantes de ChR2*

5 La presente divulgación proporciona mutantes de Chop2 en los que se mutan uno o más aminoácidos. En algunos aspectos, el Chop2 es el polipéptido de longitud completa, tal como SEQ ID NO: 2, 4, 6 y 8, con al menos una mutación de aminoácido. En algunos aspectos, la mutación es en el aminoácido 132 y/o aminoácido 159. En algunos aspectos preferidos, el aminoácido en posición 132 se muta de una leucina a una cisteína o una alanina. En algunos aspectos preferidos, el aminoácido en posición 159 se muta de una treonina a una alanina, una cisteína o una serina. En todas las realizaciones, los mutantes de Chop2 forman un canal de ChR2 funcional.

15 La presente divulgación también abarca proteínas Chop2 y ácidos nucleicos que codifican un fragmento biológicamente activo o una sustitución de aminoácido conservadora u otra variante de mutación de Chop2. Los ejemplos no limitativos de fragmentos útiles incluyen aminoácidos 1-315 de Chop2 de tipo natural que codifican polipéptidos, es decir, SEQ ID NO: 26, en la que al menos se muta o se sustituye de forma conservadora un aminoácido, por ejemplo en las posiciones de aminoácido 132 y/o 159. También pueden ser útiles fragmentos más pequeños de Chop2 de tipo natural, en los que se muta o se sustituye de forma conservadora al menos un aminoácido (es decir, en las posiciones de aminoácido 132 y/o 159). Por consiguiente, ácidos nucleicos y polipéptidos de Chop2 de la presente divulgación incluyen además, pero no se limitan a, fragmentos biológicamente activos que codifican aminoácidos 1-315, 1-310, 1-300, 1-275, 1-250, 1-225, 1-200, 1-175 o 1-160 de Chop2 de tipo natural, en los que se muta o se sustituye de forma conservadora al menos un aminoácido, por ejemplo en las posiciones de aminoácido 132 y/o 159. En otros aspectos, los ácidos nucleicos y polipéptidos de Chop2 de la presente divulgación pueden ser hasta de, o aproximadamente, 315 aminoácidos de largo, 310 aminoácidos de largo, 300 aminoácidos de largo, 275 aminoácidos de largo, 250 aminoácidos de largo, 225 aminoácidos de largo, 200 aminoácidos de largo, 175 aminoácidos de largo o 160 aminoácidos de largo.

Una Chop2 con mutación individual de la divulgación puede codificarse mediante la siguiente secuencia génica del constructo sintético hVChR1-mKate-betaChR2(L132C) (n.º de registro de GenBank JN836746, y SEQ ID NO: 9) con las siguientes anotaciones, la secuencia de GFP está en negrita, la secuencia de Chop2 L132C está subrayada:

30

## ES 2 703 324 T3

```

1 atggattacc ctgtggcccg gtccttgatt gtaagatacc ccaccgatct gggcaatgga
61 accgtgtgca tgcccagagg acaatgctac tgcgaggggt ggctgaggag cgggggcact
121 agtatcgaaa aaaccatcgc tatcaccctc cagtgggtag tgttcgctct gtccgtagcc
181 tgtctcggct ggtatgcata ccaagcctgg agggctacct gtgggtggga ggaagtatac
241 gtggccctga tcgagatgat gaagtccatc atcgaggctt tccatgagtt cgactcccca
301 gccacactct ggctccagcag tgggaatggc gtagtggtga tgagatatgg agagtggctg
361 ctgacctgtc ccgtcctgct cattcatctg tccaatctga cggggctgaa agatgactac
421 tccaagagaa caatgggact gctgggtgagt gacgtgggggt gtattgtgtg gggagccacc
481 tccgccatgt gcaactggatg gaccaagatc ctctttttcc tgatttcctt ctccatggg
541 atgtatacat acttccacgc cgctaagggtg tatattgagg ccttccacac tgtacctaaa
601 ggcatctgta gggagctcgt gcgggtgatg gcatggacct tctttgtggc ctgggggatg
661 ttccccgtgc tgttctctct cggcactgag ggatttggcc acattagtc taccgggtcc
721 gcaattggct actccactct ggatctgatt gccaagaata tgtggggggt gctgggaaat
781 tatctgctgg taaagatcca cgagcatatc ctgctgtatg gcgatatcag aaagaagcag
841 aaaatcacca ttgctggaca ggaaatggag gtggagacac tggtagcaga ggaggaggac
901 gggaccgcgg tcgccacat ggtgtctaag ggcgaagagc tgattaagga gaacatgcac
961 atgaagctgt acatggaggg caccgtgaac aaccaccact tcaagtgcac atccgagggc
1021 gaaggcaagc cctacgaggg caccagacc atgagaatca agggtggtcga ggggggccct
1081 ctccccttcg ccttcgacat cctggctacc agcttcatgt acggcagcaa aaccttcac
1141 aaccacaccc agggcattccc cgacttcttt aagcagtcct tccctgaggg cttcacatgg
1201 gagagagtca ccacatacga agacgggggc gtgctgaccg ctaccagga caccagcctc
1261 caggacggct gcctcatcta caacgtcaag atcagagggg tgaacttccc atccaacggc
1321 cctgtgatgc agaagaaaac actcggctgg gaggcctcca ccgagatgct gtaccccgct
1381 gacggcggcc tgaagggcag agccgacatg gcccgaagc tcgtggggcg gggccacctg
1441 atctgcaact tgaagaccac atacagatcc aagaaaccgc ctaagaacct caagatgcc
1501 ggcgtctact atgtggacag aagactggaa agaatcaagg aggccgacaa agagacctac
1561 gtcagcagc acgaggtggc tgtggccaga tactgcgacc tccctagcaa actggggcac
1621 aaacttaatt gcctgcagga gaagaagtca tgcagccagc gcatggccga attccggcaa
1681 tactgttggg accgggacac tgggcagatg ctgggcccga ccccagcccg gtgggtgtgg
1741 atcagcctgt actatgcagc tttctacgtg gtcatgactg ggctctttgc cttgtgcatc

1801 tatgtgctga tgcagaccat tgatccctac accccogact accaggacca gttaaagtca
1861 ccgggggtaa ccttgagacc ggatgtgtat ggggaaagag ggctgcagat ttcctacaac
1921 atctctgaaa acagctctag acaggcccag atcaccggac gtccggagac tgagacattg
1981 ccaccgggtg actacggggg ggcctgagc gctgtgggca gagaactcct gttcgtgaca
2041 aatccagtcg tggtgaacgg ctccgtactc gtaccggagg atcagtgcga ttgcccagga
2101 tggatcgaga gcagaggcac aaacggcgca cagactgcac ccaacgtgct ccagtggttg
2161 gcccagggc tttccattct cctgctcatg ttttaagcct accagacttg gaagtccaca
2221 tgtggctggg aggaaatcta cgctgtgca atcgaaatgg tgaaggatgat cctggagttt
2281 ttcttogaat ttaaaaacce aagcatgctg tacctggcta ctggccacag agtgcagtgg
2341 ctgcggtatg ccgaatggct gctgacttgc ccagtgattt gcatccacct gtccaacctg
2401 actgggctgt ctaaccgatta cagtaggaga acaatgggac tgetcgtatc cgacatcggc
2461 actatcgtat ggggcgcaac tagtgccatg gccactggat acgtgaaagt gatcttcttc
2521 tgccctggac tctgctacgg agcaaacaca ttttttcatg ccgcaaaagc atatacggag
2581 gggtatcata ccgtcccaaa ggccgggtgt agacaagtgg tgactggcat ggcttggctg
2641 ttcttctgtg cctgggggat gtttcccatc ctctttatcc tggggccaga aggcttcggg
2701 gtgctgagtg tgtatggcag taccgtagga cacactatca ttgacctgat gagcaaaaac
2761 tgctgggggc tgctcggcca ctacctgaga gtactcatcc acgagcatat cctgattcat
2821 ggcgatatcc ggaaaactac caagctcaat atcgggggca ccgagattga agtggagaca
2881 ctcgtggagg acgagggcca ggccggagca gtgaacaaa gcaactggca gtatgctccc
2941 agagaatcct ttctggtgat gcgggacaaa atgaaggaga aaggcattga tgtacgggtg
3001 agtaatgcca aagccgtcga gactgatgtg tag

```

- 5 Un Chr2 con mutación individual de la divulgación puede codificarse mediante la siguiente secuencia de aminoácidos del constructo sintético hVChr1-mKate-betaChR2(L132C) (n.º de registro de GenBank AER29839, y SEQ ID NO: 10) con las siguientes anotaciones, la secuencia de GFP está en negrita, la secuencia de Chop2 L132C está subrayada:

## ES 2 703 324 T3

```

1 mdypvarsli vryptdlng tvcmprgqcy cegwlrsgt siektiaitl qwvfvalsva
61 clgwyayqaw ratcgweevy valiemksi ieafhefdsp atlwlsngng vvwmyrgewl
121 ltcpllihl snltglkddy skrtmglivs dvgcivwgtat samctgwtki lfflislsyg
181 mytyfhaakv yieafhtvpk gicrelvrvm awtffvawgm fpvlflgte gfgthispygs
241 aighsildli aknmwgvlgv ylrkhihehi llygdirkkq kitiaggeme vetlvaeed
301 gtavatmvsk geelikenmh mklymegtvn nhhfkctseg egkpyegtqt mrikvveggp
361 lpfaldilat sfmygsktft nhtqgipdff kgsfpegftw ervttyedgg vltatqdtst
421 qdgcliynvk irgvnfpnsng pvmqkktlgw eastemlypa dgglegradm alkivggghl
481 icnlkttys kkpaknlkmp gvyyvdrle rikeadkety veqhevavar ycdlpsklgh
541 klnclqekks csqrmaefrq ycwnpdtgqm lgrtparvwv islyyaafyv vmtglfalci
601 yvlmqtidpy tpdydqqlks pgtlrdpvy gerglqisyn isenssrqag itgrpetetl
661 ppvdyggals avgrellfvt npvvngsvl vpedqycag wiesrgtnga qtasnvlqwl
721 aagfsilllm fyayqtwkst cgweeiycv iemkvilef ffefknpsml ylatghrvqw
781 lryaewlltc pvicihlsnl tglndysrr tmglvsdig tivwgatsam atgyvkviff
841 clglcygant ffhaakayie gyhtvpkgrc rqvvtgmawl ffvswgmfpi lfilgpegfg
901 vlsvygstvg htiidlmskn cwglghylr vlihehilih gdirkttkln iggteievet
961 lvedeaeaga vnkgtgkyas resflvmrdk mkekgidvrc snakavetdv

```

- 5 Una Chop2 con mutación individual de la divulgación puede codificarse mediante la siguiente secuencia génica del constructo sintético hVChR1-mKate-betahChR2(L132C) (n.º de registro de GenBank JN836745, y SEQ ID NO: 11) con las siguientes anotaciones, la secuencia de GFP está en negrita, la secuencia de Chop2 L132C está subrayada:

```

1 atggattacc ctgtggcccc gtcctgatt gtaagatacc ccaccgatct gggcaatgga
61 accgtgtgca tgcccagagg acaatgctac tgcgaggggt ggctgaggag ccggggcact
121 agtatcgaaa aaaccatcgc taccaccctc cagtgggttag tgttcgctct gtccgtagcc
181 tgtctcggct ggtatgcata ccaagcctgg agggctacct gtgggtggga ggaagtatac
241 gtggccctga tcgagatgat gaagtccatc atcgaggctt tccatgagtt cgactcccca

```

ES 2 703 324 T3

301 gccacactct ggctcagcag tgggaatggc gtagtggtga tgagatatgg agagtggctg  
361 ctgacctgtc ccgtcctgct catcactctg tccaatctga ccgggctgaa agatgactac  
421 tccaagagaa caatgggact gctgggtgagt gacgtgggggt gtattgtgtg gggagccacc  
481 tccgccatgt gcactggatg gaccaagatc ctctttttcc tgatttccct ctctatggg  
541 atgtatacat acttccacgc cgtaaggtg tatattgagg ccttccacac tgtacctaaa  
601 ggcatctgta tggagctcgt gcgggtgatg gcatggacct tctttgtggc ctgggggatg  
661 ttccccgtgc tgttccctcct cggcactgag ggatttggcc acattagtcc ttacgggtcc  
721 gcaattggac actccatcct ggatctgatt gccaaagaata tgtgggggggt gctgggaaat  
781 tatctgctggg taaagatcca cgagcatatc ctgctgtatg gcgatatcag aaagaagcag  
841 aaaatcacca ttgctggaca ggaaatggag gtggagacac tggtagcaga ggaggaggac  
901 gggaccgctg tgcgccacat ggtgtctaag ggccaagagc **tgattaagga gaacatgcac**  
961 **atgaagctgt acatggaggg caccgtgaac aaccaccact tcaagtgcac atccgagggc**  
1021 **gaaggcaagc cctacgaggg caccagacc atgagaatca agtggttcca gggcgccct**  
1081 **ctccccttcg ccttcgacat cctggctacc agcttcatgt acggcagcaa aaccttcac**  
1141 **aaccacaccc agggcatccc cgacttcttt aagcagtcct tccctgaggg ctccaatgg**  
1201 **gagagagtca ccacatacga agacgggggc gtgctgaccg ctaccagga caccagcctc**  
1261 **caggacggct gcctcatcta caacgtcaag atcagagggg tgaacttccc atccaacggc**  
1321 **cctgtgatgc agaagaaaac actcggctgg gaggcctcca ccgagatgct gtaccocgct**  
1381 **gacggcggcc tggaaaggc agccagatg gcctgaagc tegtggggcg gggccacctg**  
1441 **atctgcaact tgaagaccac atacagatcc aagaaaccg ctaagaacct caagatgcc**  
1501 **ggcgtctact atgtggacag aagactggaa agaatacagg aggcagcaa agagacctac**  
1561 **gtcagcagc acgaggtggc tgtggccaga tactgagacc tccctagcaa actggggcac**  
1621 **aaacttaatt gcctgcagga gaagaagtca tgcagccagc gcattggcca atccggcaa**  
1681 **tactgttggg acccggacac tgggcagatg ctgggcccga cccagcccg gtgggtgtgg**  
1741 **atcagcctgt actatgcagc tttctactgt gtcactgact ggctctttgc cttgtgcatc**  
1801 **tatgtgctga tgcagacct tgatccctac accccogact accaggacca gtaaaagtca**  
1861 **ccgggggtaa ccttgagacc ggatgtgat ggggaaagag ggctgcagat ttctacaac**  
1921 **atctctgaaa acagctctag acaggcccag atcaccggac gtccggagac tgagacattg**  
1981 **ccaccggctg actaccgggg ggccctgagc gctgtgggca gagaactcct gtctgtgaca**  
2041 **aatccagctg tggatgaacg ctccgtactc gtaccogagg atcagtgcta ttgcccagga**  
2101 **tggatcgaga gcagagggc aaacggcgca cagactgcat ccaacgtgct ccagtgggtg**  
2161 **gccgcaggct ttccattct cctgctcact ttttaccgct accagacttg gaagtccaca**  
2221 **tgtggctggg aggaaatcta cgtgtgtgca atcgaaatgg tgaaggatgat cctggagttt**  
2281 **ttcttcgaat ttaaaaacce aagcatgctg tacttggtca ctggccacag agtgcagtg**  
2341 **ctgcccgtat ccgaatggct gctgacttgc ccagtgattc tgatccacct gtccaacctg**  
2401 **actgggctgt ctaacgatta cagtaggaga acaatgggac tgctcgtatc cgacatcggc**  
2461 **actatcgtat ggggcgcaac tagtgccatg gccactggat acgtgaaagt gatcttcttc**  
2521 **tgctggggc tctgctacgg agcaaacaca tttttctatg ccgcaaaagc atatatcgag**  
2581 **gggtatcata tcttccaaa ggcgggtgt agacaagtgg tgaactggcat ggcttggctg**  
2641 **ttcttcgtgt cctgggggat gtttccctc ctctttatcc tgggcccaga agcttccggg**  
2701 **gtgctgagtg tgtatggcag taccgtagga cacactatca ttgacctgat gagcaaaaac**  
2761 **tgtggggggc tgctcggcca ctacctgaga gtactcatcc acgagcatat cctgattcat**  
2821 **ggcgatatcc ggaaaactac caagctcaat atcgggggca ccgagattga agtggagaca**  
2881 **ctcgtggagg acgagggcca ggccggagca gtgaacaaag gcaactggca gtatgcctcc**  
2941 **agagaatcct ttctggtgat gcgggacaaa atgaaggaga aaggcattga tgtaccggtg**  
3001 **agtaatgcca aagccgtcga gactgatgtg tag**

Una Chop2 con mutación individual de la divulgación puede codificarse mediante la siguiente secuencia de aminoácidos del constructo sintético hVChR1-mKate-betaChR2(L132C) (n.º de registro de GenBank AER29838, y SEQ ID NO: 12) con las siguientes anotaciones, la secuencia de GFP está en **negrita**, la secuencia de Chop2 L132C está subrayada:

5

1 mdypvarslv vryptdlng tvcmprgqcy cegwlrstrgt siektiaitl qwvfvfalsva  
61 clgwyayqaw ratcgweevy valiemmsi ieafhefdsp atlwlssng vvmrygawl  
121 ltcpvllihl snltglkddy skrtmglivs dvgcivwgat samctgwtki lfflislsyg  
181 mytyfhaakv yieafhtvpk gicrelvrvm awtffvawgm fpvlfillgte gfgghispygs  
241 aighsildli aknmwgvln ylrvihehi llygdirkkq kitiaggeme vetlvaeeed  
301 gtavatmvs **geelikenmh mklymegtvn nhhfktseg egkpyegtgt mrikvveggp**  
361 **lpfaldilat sfmygsktft nhtqgipdff kqsfpegftw ervttyedgg vltatqdtsl**

421 **qdgcliynvk irgvnfpsng pvmqkktlgw eastemlypa dgglegradm alkivggghl**  
 481 **icnlkttysrskpkaknlkmp gvyyvdrrie rikeadkety veghevavar ycdlpsklgh**  
 541 **klncqlgekks csqrmaefrq ycwnpdtgqm lgrtparvww islyyaafyv vmtglfalci**  
 601 **yvlmqtidpy tpdyqdgqlks pgvtlrpdvy gerglqisyn isenssrqag itgrpetetl**  
 661 **ppvdyggals avgrellfvt npvvngsvl vpedqycag wiesrgtnga qtasnvlqwl**  
 721 **aagfsilllm fyayqtwkst cgweeiyyca iemvkvilef ffefknpsml ylatghrvqw**  
 781 **lryaewlltc pvilihlsnl tglsndysrr tmgllvsdig tivwgatsam atgyvkviff**  
 841 **clglcygant ffhaakayie gyhtvpkgrc rqvvtgmawl ffvswgmfpi lfilgpegfg**  
 901 **vlsvygstvg htiiidlmskn cwglghylr vlihehilih gdirkttkln iggteievet**  
 961 **lvedeaeaga vnkgtgkyas resflvmrdk mkekgidvrc snakavetdv**

Una Chop2 con mutación individual L132C de la divulgación puede codificarse mediante la siguiente secuencia de aminoácidos (posiciones 132 subrayadas y en negrita, SEQ ID NO: 13):

5

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA  
 61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR  
 121 YAEWLLTCPV **I**CIHLSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGTI VWGATSAMAT GYVKVIFFCFL  
 181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMALFF VSWGMPILF ILGPEGFGVL  
 241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV  
 301 EDEAEAGAVN KGTGK

Una Chop2 con mutación individual T159C de la divulgación puede codificarse mediante la siguiente secuencia de aminoácidos (posiciones 159 subrayadas y en negrita, SEQ ID NO: 14):

10

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA  
 61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR  
 121 YAEWLLTCPV ILIHLSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIG**C**I VWGATSAMAT GYVKVIFFCFL  
 181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMALFF VSWGMPILF ILGPEGFGVL  
 241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV  
 301 EDEAEAGAVN KGTGK

Una Chop2 con mutación doble L132C/T159C de la invención puede codificarse mediante la siguiente secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 15):

15

1 atggactacg ggggggctct gtctgctgtc gggagggaac tgctgtttgt gactaacctt  
 61 gtcgctgctga acgggagtggt gctggtccct gaggaccagt gctactgtgc cggctggatc  
 121 gaatcacgcg gaaccaacgg ggcccagaca gctagcaatg tgctgcagtg gctggccgct  
 181 gggtttagta tcctgctgct gatgttctac gcctatcaga cttggaagtc aacctgcggc  
 241 tgggaggaat tctacgtgtg cgctattgag atggtgaaag tgatcctgga gttcttcttc  
 301 gagttcaaga acccaagcat gctgtacctg gctactggac accgagtga gtggctgaga  
 361 tatgcagaat ggctgctgac atgccccgtc atctgcattc acctgtccaa cctgacaggc  
 421 ctgagcaatg actactccag gagaactatg ggactgctgg tgtccgacat cggctgcatt  
 481 gtctggggag caacttctgc tatggcaacc ggatacgtga aggtcatctt tttctgctg  
 541 gggctgtgct atggcgcaaa tacctttttc cacgcagcca aggcctacat tgaggggtat  
 601 cataccgtgc caaaaggccg gtgcccagac gtggtcacag gaatggcttg gctgtttttc  
 661 gtctcttggg gaatgtttcc catcctgttc attctggggc ctgaagggtt cggcgtgctg  
 721 tctgtctacg gaagtacagt ggggcatact atcattgacc tgatgtccaa aaactgttgg  
 781 ggctgctggt gacactatct gagagtgtg atccacgagc atatcctgat tcatggcgat  
 841 attcgggaaga ccacaaaact gaatatcggc ggaaccgaga ttgaagtgga aacctgggtg  
 901 gaagacgagg ctgaggctgg ggctgtgaac aaggggactg gcaaaa

Una Chop2 con mutación doble L132C/T159C de la invención puede codificarse mediante la siguiente secuencia de aminoácidos (posiciones 132 y 159 subrayadas y en negrita, SEQ ID NO: 16):

20

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA  
 61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR  
 121 YAEWLLTCPV **I**CIHLSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIG**C**I VWGATSAMAT GYVKVIFFCFL  
 181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMALFF VSWGMPILF ILGPEGFGVL  
 241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV  
 301 EDEAEAGAVN KGTGK

Una Chop2 con mutación individual T159S de la divulgación puede codificarse mediante la siguiente secuencia de aminoácidos (posición 159 subrayada y en negrita, SEQ ID NO: 17):

25



## ES 2 703 324 T3

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV ILIHLSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGSI VWGATSAMAT GYVKVIFFL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPILF ILGPEGFVGL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

Una Chop2 con mutación doble L132C/T159S de la invención puede codificarse mediante la siguiente secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 18):

5

```

1 atggactacg ggggggctct gtctgctgct gggagggaac tgctgtttgt gactaacctt
61 gtcgctcgtga acgggagtggt gctgggtccct gaggaccagt gctactgtgc cggctggatc
121 gaatcacgcg gaaccaacgg ggcccagaca gctagcaatg tgctgcagtg gctggccgct
181 gggtttagta tctgctgctg gatgttctac gcctatcaga cttggaagtc aacctgcggc
241 tgggaggaat tctacgtgtg cgctattgag atggtgaaag tgatcctgga gttcttcttc
301 gagttcaaga acccaagcat gctgtacctg gctactggac accgagtcca gtggctgaga
361 tatgcagaat ggctgctgac atgccccgtc atctgcattc acctgtccaa cctgacaggc
421 ctgagcaatg actactccag gagaactatg ggactgctgg tgtccgacat cggcagcatt
481 gtctggggag caacttctgc tatggcaacc ggatacgtga aggtcatctt tttctgcctg
541 gggctgtgct atggcgcaaa taccttttcc cacgcagcca aggcctacat tgaggggtat
601 catacctgct caaaaggccg gtgcccagac gtggctcacag gaatggcttg gctgtttttc
661 gtctcttggg gaatgtttcc catcctgttc attctggggc ctgaagggtt cggcgtgctg
721 tctgtctacg gaagtacagt ggggcatact atcattgacc tgatgtccaa aaactgttgg
781 ggcctgctgg gacactatct gagagtgtct atccacgagc ataccctgat tcatggcgat
841 attcgggaaga ccacaaaact gaatatcggc ggaaccgaga ttgaagtgga aacctgggtg
901 gaagacgagg ctgaggctgg ggctgtgaac aaggggactg gcaaaa

```

Una Chop2 con mutación doble L132C/T159S de la invención puede codificarse mediante la siguiente secuencia de aminoácidos (posiciones 132 y 159 subrayadas y en negrita, SEQ ID NO: 19):

10

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV ICIHLSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGSI VWGATSAMAT GYVKVIFFL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPILF ILGPEGFVGL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

Una Chop2 con mutación individual L132A de la divulgación puede codificarse mediante la siguiente secuencia de aminoácidos (posición 132 subrayada y en negrita, SEQ ID NO: 20):

15

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV IAIHLNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGTI VWGATSAMAT GYVKVIFFL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPILF ILGPEGFVGL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

Una Chop2 con mutación doble L132A/T159C de la divulgación puede codificarse mediante la siguiente secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 21):

20

ES 2 703 324 T3

1 ATGGACTACG GGGGGGCTCT GTCTGCTGTC GGGAGGGAAC TGCTGTTTGT GACTAACCCCT  
 61 GTCGTCGTGA ACGGGAGTGT GCTGGTCCCT GAGGACCAGT GCTACTGTGC CGGCTGGATC  
 121 GAATCACGCG GAACCAACGG GGCCCAGACA GCTAGCAATG TGCTGCAGTG GCTGGCCGCT  
 181 GGGTTTAGTA TCCTGCTGCT GATGTTCTAC GCCTATCAGA CTTGGAAGTC AACCTGCGGC  
 241 TGGGAGGAAA TCTACGTGTG CGCTATTGAG ATGGTGAAAG TGATCCTGGA GTTCTTCTTC  
 301 GAGTTCAAGA ACCCAAGCAT GCTGTACCTG GCTACTGGAC ACCGAGTGCA GTGGCTGAGA  
 361 TATGCAGAAAT GGCTGCTGAC ATGCCCCGTC ATCGCCATT CACCTGTCCA CCTGACAGGC  
 421 CTGAGCAATG ACTACTCCAG GAGAACTATG GGACTGCTGG TGTCCGACAT CGGCTGCATT  
 481 GTCTGGGGAG CAACTTCTGC TATGGCAACC GGATACGTGA AGGTCATCTT TTTCTGCCTG  
 541 GGGCTGTGCT ATGGCGCAA TACCTTTTTC CACGCAGCCA AGGCCTACAT TGAGGGGTAT  
 601 CATACCGTGC CAAAAGGCCG GTGCCGACAG GTGGTCACAG GAATGGCTTG GCTGTTTTTC  
 661 GTCTCTTGGG GAATGTTTCC CATCCTGTTC ATTCTGGGGC CTGAAGGTT CGGCGTGTG  
 721 TCTGTCTACG GAAGTACAGT GGGGCATACT ATCATTGACC TGATGTCCA AACTGTTGG  
 781 GGCCTGCTGG GACACTATCT GAGAGTGCTG ATCCACGAGC ATATCCTGAT TCATGGCGAT  
 841 ATTCGGAAGA CCACAAAAC GAATATCGGC GGAACCGAGA TTGAAGTGA AACACTGGTG  
 901 GAAGACGAGG CTGAGGCTGG GGCTGTGAAC AAGGGGACTG GCAA

Una Chop2 con mutación doble L132A/T159C de la divulgación puede codificarse mediante la siguiente secuencia de aminoácidos (posiciones 132 y 159 subrayadas y en negrita, SEQ ID NO: 22):

5

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA  
 61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR  
 121 YAEWLLTCPV I**A**IHLNLG LSNDYSRRM GLLVSDIG**C**I VWGATSAMAT GYVKVIFFL  
 181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMALFF VSWGMPILF ILGPEGFVGL  
 241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTKLNIG GTEIEVETLV  
 301 EDEAEAGAVN KGTGK

Un Chop2 con mutación individual T159A de la divulgación puede codificarse mediante la siguiente secuencia de aminoácidos (posición 159 subrayada y en negrita, SEQ ID NO: 23):

10

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA  
 61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR  
 121 YAEWLLTCPV ILIHLNLG LSNDYSRRM GLLVSDIGAI VWGATSAMAT GYVKVIFFL  
 181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMALFF VSWGMPILF ILGPEGFVGL  
 241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTKLNIG GTEIEVETLV  
 301 EDEAEAGAVN KGTGK

Un Chop2 con mutación doble L132C/T159A de la divulgación puede codificarse mediante la siguiente secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 24):

15

1 atggactacg ggggggctct gtctgctgtc gggaggggaac tgctgtttgt gactaacccct  
 61 gtcgtcgtga acgggagtggt gctgggccct gaggaccagt gctactgtgc cggctggatc  
 121 gaatcacgcg gaaccaacgg ggcccagaca gctagcaatg tgctgcagtg gctggccgct  
 181 gggtttagta tcctgctgct gatgttctac gcctatcaga cttggaagtc aacctgcggc  
 241 tgggaggaaa tctacgtgtg cgctattgag atggtgaaag tgatcctgga gttcttcttc  
 301 gattcaaga acccaagcat gctgtacctg gctactggac accgagtga gtggctgaga  
 361 tatgcagaat ggctgctgac atgcccgtc atctgcattc acctgtccaa cctgacaggc  
 421 ctgagcaatg actactccag gagaactatg ggactgctgg tgtccgacat cggcgccatt  
 481 gtctggggag caacttctgc tatggcaacc ggatacgtga aggtcatctt tttctgctg  
 541 gggctgtgct atggcgcaa taccttttcc cagcagcca aggcctacat tgaggggtat  
 601 cataccgtgc caaaaggccg gtgccgacag gtggtcacag gaatggcttg gctgttttcc  
 661 gtctcttggg gaatgtttcc catcctgttc attctggggc ctgaagggtt cggcgtgctg  
 721 tctgtctacg gaagtacagt ggggcatact atcattgacc tgatgtccaa aactggttg  
 781 ggcctgctgg gacactatct gagagtgtg atccacgagc atatcctgat tcatggcgat  
 841 attcggaga ccacaaaact gaatatcggc ggaaccgaga ttgaagtga aactggttg  
 901 gaagacgagg ctgaggctgg ggctgtgaac aaggggactg gcaa

Un Chop2 con mutación doble L132C/T159A de la divulgación puede codificarse mediante la siguiente secuencia de aminoácidos (posiciones 132 y 159 subrayadas y en negrita, SEQ ID NO: 25):

20

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV ICIHLSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGAI VWGATSAMAT GYVKVIFFFCL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

Una Chop2 de tipo natural (WT) de la divulgación puede codificarse mediante la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 26):

5

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV ILIHLNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGTI VWGATSAMAT GYVKVIFFFCL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

10 Proteínas de ChR2 mutantes de la invención también demuestran cinéticas de canal más lentas. Se encontró que una sensibilidad lumínica más alta se correlaciona con cinéticas de canal más lenta, indicando una compensación entre sensibilidad lumínica y cinéticas de canal. Las proteínas Chop2 que forman las proteínas de ChR2 de la presente invención también pueden comprender mutaciones o modificaciones adicionales que pueden mejorar las cinéticas de canal, o aumentar la tasa de desactivación, de ChR2. Mutantes de ChR2 particularmente preferidos equilibran el umbral de sensibilidad lumínica con las cinéticas de canal.

#### 15 *Composiciones y kits*

20 Las Composiciones y kits de la divulgación comprenden al menos una molécula de ácido nucleico o molécula de polipéptido que codifica una proteína Chop2 mutante, y el ChR2 resultante, de la invención. La al menos una molécula de ácido nucleico o molécula de polipéptido que codifica una proteína Chop2 mutante de la divulgación puede incluir además un portador farmacéuticamente aceptable. Los kits de la divulgación incluyen además instrucciones para administrar una composición de la invención a un sujeto.

#### *Usos terapéuticos*

25 Se realizaron mutaciones en una proteína de fusión de Chop2-GFP con codones optimizados para crear mutaciones individuales y dobles en los sitios L132 (leucina 132) y T159 (treonina 159). Se examinaron en primer lugar las propiedades funcionales de cada ChR2 mutante, o una combinación de las mismas, en células HEK. Se obtuvieron vectores de virus VAA2 que portaban constructos de Chop2 mutante-GFP impulsados por el promotor de CAG y se inyectaron por vía intravítrea en los ojos de ratones adultos. Se examinaron las respuestas a la luz mediadas por Chop2 mutante usando registros de matriz de múltiples electrodos de retinas de preparación completa.

35 El ChR2 con mutación individual, es decir, L132 y T159C, disminuye notablemente la intensidad luminosa umbral que se requiere para provocar una fotocorriente mediada por ChR2. Además, se encontró que varias variantes de ChR2 con mutación doble, incluyendo L132C/T159C, L132A/T159C y L132C/T159S, aumentaban adicionalmente la fotocorriente por encima de los resultados de cualquier ChR2 con mutación individual a intensidades luminosas bajas. Los mutantes dobles mostraron una disociación más lenta, que es probable que contribuya a la fotocorriente aumentada a las intensidades luminosas bajas. Se observó la actividad de disparo neuronal de las células ganglionares retinianas mediada por el mutante doble L132C/T159C a la intensidad luminosa de  $10^{13}$  fotón/cm<sup>2</sup>/s y a la longitud de onda de 473 nm. Este nivel de luz es aproximadamente de 1,5 a 2 unidades logarítmicas por debajo del nivel de luz que se requiere para desencadenar la actividad de disparo neuronal con ChR2 de tipo natural. El disparo neuronal de las células ganglionares retinianas que expresan L132C/T159C podría seguir una frecuencia de parpadeo de luz de hasta 15 Hz. Estudios en curso están evaluando la expresión y seguridad a largo plazo de ChR2 mutantes de la invención en neuronas retinianas.

45 Además, no se encontró que la expresión de las proteínas Chop2 mutantes, y las proteínas de ChR2 resultantes, de la presente invención causaran neurotoxicidad de hasta dos meses después de la inyección viral en ratones, demostrando la seguridad de la presente invención para uso terapéutico.

50 Vectores para su uso en la presente invención pueden incluir diversos vectores virales, tales como virus recombinantes y plásmidos, es decir, virus adenoasociados recombinantes (VAAr), adenovirus recombinantes, retrovirus recombinantes, lentivirus recombinantes y otros virus conocidos en la técnica.

55 En algunos aspectos, la expresión de las proteínas de Chop2 de la presente invención se impulsa por un promotor constitutivo, es decir, promotor de CAG, promotor de CMV, LTR. En otros aspectos, el promotor es un promotor específico de células o inducible. Pueden preferirse los promotores de tipo específico de células que permiten la expresión de proteínas Chop2 en subpoblaciones de células específicas, es decir, células neuronales retinianas o

células degeneradoras. Estas células pueden incluir, pero no se limitan a, una célula ganglionar retiniana, una célula fotorreceptora, una célula bipolar, un bastón bipolar, un cono bipolar de tipo ON, una célula ganglionar retiniana, una célula ganglionar retiniana fotosensible, una célula horizontal, una célula amacrina o una célula amacrina AII. Son bien conocidos en la técnica promotores de tipo específico de células. Los promotores de tipo específico de células particularmente preferidos incluyen, pero no se limitan a, mGluR6, NK-3 y Pcp2(L7).

En algunos aspectos, el uso de diferentes genes de opsina además de las proteínas Chop2 mutantes de la presente invención y la expresión génica dirigida pueden aumentar adicionalmente la sensibilidad lumínica o mejorar la visión. La información visual se procesa a través de la retina por medio de dos rutas: una ruta ON que señala el aumento de luz, y una ruta OFF que señala la disminución de luz. La existencia de la ruta ON y OFF es importante para la potenciación de la sensibilidad al contraste. La señal visual en la ruta ON se transmite desde los conos bipolares ON hasta las células ganglionares ON. Tanto los conos bipolares ON como las células ganglionares ON se despolarizan en respuesta a la luz. Por otra parte, la señal visual en la ruta OFF se lleva a cabo desde los conos bipolares OFF hasta las células ganglionares OFF. Tanto los conos bipolares OFF como las células ganglionares OFF se hipopolarizan en respuesta a la luz. Los bastones bipolares, que son responsables de la capacidad para ver en luz tenue (visión escotópica), son células bipolares ON (se despolarizan en respuesta a la luz). Los bastones bipolares transmiten la señal de visión a través de células amacrinas AII (unas células retinianas de tipo ON) hasta los conos bipolares ON y OFF.

Por consiguiente, puede usarse un sistema de rodopsina doble para recapitular las rutas ON y OFF esenciales para el procesamiento y la agudeza visuales. En resumen, una proteína Chop2 de la presente invención puede dirigirse específicamente a neuronas retinianas de tipo ON (es decir, células ganglionares de tipo ON y/o células bipolares de tipo ON), mientras que un sensor de luz de hipopolarización (es decir, halorrodopsina u otra bomba de cloro conocida en la técnica) pueden dirigirse a neuronas retinianas de tipo OFF (es decir, células ganglionares de tipo OFF y/o células bipolares de tipo OFF) para crear rutas ON y OFF. El direccionamiento específico hacia subpoblaciones de células preferidas puede lograrse a través del uso de diferentes promotores específicos de célula. Por ejemplo, la expresión de Chop2 puede impulsarse por el promotor de mGluR6 para la expresión dirigida en neuronas retinianas de tipo ON (es decir, células ganglionares de tipo ON y/o células bipolares de tipo ON) mientras que una expresión de canal de hipopolarización, tal como halorrodopsina, se impulsa por el promotor de NK-3 para la expresión dirigida en neuronas retinianas de tipo OFF (es decir, células ganglionares de tipo OFF y/o células bipolares de tipo OFF).

Un enfoque alternativo para restablecer las rutas ON y OFF en la retina se logra mediante la expresión de un sensor de luz de despolarización, tal como Chr2, en bastones bipolares o amacrina AII. En este enfoque, la despolarización de bastones bipolares o células amacrinas AII puede conducir a las respuestas ON y OFF a los niveles de los conos bipolares y las células ganglionares retinianas posteriores. Por tanto, se mantienen las rutas ON y OFF que son inherentes en la retina.

La presente invención puede formularse en una composición farmacéutica o medicamento adecuado para su administración a un sujeto o paciente. Las vías de administración adecuadas incluyen, por ejemplo, inyección intravítrea, intraocular o subretiniana.

Tales formulaciones comprenden un vehículo, diluyente, portador o excipiente farmacéutica y/o fisiológicamente aceptable, tal como solución salina tamponada u otros tampones, por ejemplo, HEPES, para mantener el pH fisiológico. Para una descripción de tales componentes y su formulación, véase, en general, Gennaro, AE., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 2003 o la última edición). Véase también el documento WO00/15822. Si la preparación va a almacenarse durante periodos prolongados, puede congelarse, por ejemplo, en presencia de glicerol.

La composición farmacéutica descrita anteriormente se administra a un sujeto que tiene una enfermedad visual o que produce ceguera mediante cualquier vía apropiada, preferiblemente mediante inyección intravítrea o subretiniana, dependiendo de la capa retiniana que se seleccione como diana.

Las divulgaciones de Bennett y colaboradores (citadas en el presente documento) se refieren a la selección como diana del epitelio pigmentario retiniano (la capa más distal del espacio vítreo). Según la presente invención, el polipéptido o constructo de Chop2 se dirige a las células retinianas, es decir, las células bipolares o células ganglionares retinianas. Se sabe que puede accederse a tales células de manera razonablemente bien mediante inyección intravítrea, tal como se da a conocer en el presente documento. La inyección intravítrea y/o subretiniana puede proporcionar el acceso necesario a las células bipolares, especialmente en circunstancias en que la capa de células fotorreceptoras está ausente debido a degeneración (lo que es el caso en determinadas formas de degeneración que la presente invención intenta superar).

Para someter a prueba la capacidad del vector para expresar los mutantes de Chop2 de la presente invención, específicamente en neuronas retinianas de mamífero, mediante administración mediada por VAA, puede insertarse una combinación de una secuencia promotora preferida unida a un gen indicador tal como LacZ o GFP unida a una secuencia de poli A de SV40 en un plásmido y empaquetarse en partículas virales de VAAr, concentrarse,

someterse a prueba para determinar adenovirus contaminantes y titularse para determinar VAAr usando un ensayo de centro infeccioso. Puede inyectarse en los ojos derechos de varios sujetos de prueba, preferiblemente ratones consanguíneos, por vía subretiniana aproximadamente 1  $\mu$ l de la preparación de VAAr (por ejemplo, más de aproximadamente  $10^{10}$  unidades infecciosas/ml). Dos semanas después, los ojos derecho (de prueba) e izquierdo (de control) de la mitad de los animales pueden extraerse, fijarse y teñirse con un sustrato o anticuerpo apropiado u otra sustancia para revelar la presencia del gen indicador. La mayoría de las retinas de prueba en los ojos con inyección mostrarán una región teñida focal, por ejemplo, azul para LacZ/Xgal, o verde para GFP de acuerdo con una ampolla subretiniana del virus inyectado creando un desprendimiento de retina localizado. Todos los ojos de control pueden ser negativos para el producto del gen indicador. Se detecta la expresión del gen indicador examinada en ratones sacrificados en periodos posteriores durante al menos 10 semanas tras la inyección, lo que sugiere la expresión persistente del transgén indicador.

En un aspecto, los constructos de Chop2 se empaquetan en vectores de adenovirus para la administración del transgén. Una cantidad eficaz de viriones de VAAr que portan una secuencia de ácido nucleico que codifica el ADN de Chop2 bajo el control del promotor de elección, preferiblemente un promotor de CMV constitutivo o un promotor específico de célula, tal como mGluR6, está preferiblemente en el intervalo de entre aproximadamente  $10^{10}$  y aproximadamente  $10^{13}$  unidades infecciosas de VAAr en un volumen de entre aproximadamente 150 y aproximadamente 800  $\mu$ l por inyección. Las unidades infecciosas de VAAr pueden medirse según McLaughlin, SK *et al.*, 1988, *J Virol* 62:1963. Más preferiblemente, la cantidad eficaz es de entre aproximadamente  $10^{10}$  y aproximadamente  $10^{12}$  unidades infecciosas de VAAr y el volumen de inyección es preferiblemente de entre aproximadamente 250 y aproximadamente 500  $\mu$ l. El profesional sanitario puede seleccionar otras dosificaciones y volúmenes, preferiblemente dentro de estos intervalos, pero posiblemente fuera de ellos, teniendo en cuenta el estado físico del sujeto (preferiblemente un humano), que está tratándose, incluyendo la edad, el peso, la salud general y la naturaleza y la gravedad del trastorno ocular particular.

También puede ser deseable administrar dosis adicionales ("administraciones de refuerzo") del/de los presentes ácido(s) nucleico(s) o composiciones de VAAr. Por ejemplo, dependiendo de la duración de la expresión transgénica dentro de la célula diana ocular, puede administrarse un segundo tratamiento tras 6 meses o al año, y puede repetirse de manera similar. No se espera que se generen anticuerpos neutralizantes frente a VAA en vista de las vías y dosis usadas, permitiendo de ese modo rondas de tratamiento repetidas.

El profesional sanitario puede monitorizarse la necesidad de tales dosis adicionales usando, por ejemplo, pruebas electrofisiológicas bien conocidas y otras pruebas de la función retiniana y visual y pruebas del comportamiento visual. El profesional sanitario podrá seleccionar las pruebas apropiadas aplicando las capacidades de rutina en la técnica. Puede ser deseable inyectar volúmenes mayores de la composición en dosis tanto individuales como múltiples para mejorar adicionalmente los parámetros de salida relevantes.

#### *Trastornos oculares*

Los trastornos oculares para los que se desean las presentes proteínas Chop2, y las proteínas de ChR2 resultantes, y que pueden usarse para mejorar uno o más parámetros de visión incluyen, pero no se limitan a, anomalías del desarrollo que afectan a los segmentos tanto anterior como posterior del ojo. Los trastornos del segmento anterior incluyen glaucoma, cataratas, distrofia corneal, queratocono. Los trastornos del segmento posterior incluyen trastornos de ceguera producidos por el mal funcionamiento de fotorreceptores y/o muerte producida por distrofias y degeneraciones de la retina. Los trastornos de la retina incluye ceguera nocturna estacionaria congénita, degeneración macular asociada a la edad, distrofias de conos congénitas y un gran grupo de trastornos relacionados con retinitis pigmentaria (RP). Estos trastornos incluyen muerte predispuesta genéticamente de células fotorreceptoras, bastones y conos en la retina, que se produce a diversas edades. Entre estas están retinopatías graves, tales como subtipos de la propia RP que avanzan con la edad y producen ceguera en la niños y adultos jóvenes, y enfermedades asociadas con RP, tales como subtipos genéticos de LCA, que con frecuencia dan como resultado pérdida de visión durante la infancia, ya en el primer año de vida. Estos últimos trastornos generalmente se caracterizan por reducción grave, y a menudo pérdida completa de células fotorreceptoras, bastones y conos. (Trabulsi, EI, ed., *Genetic Diseases of the Eye*, Oxford University Press, NY, 1998).

En particular, las proteínas Chop2 y de ChR2 de la presente invención son útiles para el tratamiento y/o el restablecimiento de al menos la visión parcial en sujetos que han perdido la visión debido a trastornos oculares, tales como retinopatías asociadas con RPE, que se caracterizan por una conservación a largo plazo de la estructura del tejido ocular pese a la pérdida de función y por la asociación entre la pérdida de función y el defecto o ausencia de un gen normal en las células oculares del sujeto. Se conoce una variedad de tales trastornos oculares, tales como enfermedades que producen ceguera que comienzan en la infancia, retinosis pigmentaria, degeneración macular y retinopatía diabética, así como enfermedades que producen ceguera ocular conocidas en la técnica. Se prevé que estos otros trastornos, así como los trastornos que producen ceguera de causas desconocidas en la actualidad que se caractericen más tarde por la misma descripción anterior, puedan tratarse también satisfactoriamente mediante las proteínas Chop2 y de ChR2 de la presente invención. Por tanto, el trastorno ocular particular tratado por la presente invención puede incluir los trastornos mencionados anteriormente y varias enfermedades que todavía no se han caracterizado.

*Optogenética*

5 El campo emergente de la optogenética implica la combinación de métodos genéticos y ópticos para controlar acontecimientos específicos en células seleccionadas como diana de un tejido vivo. La optogenética puede usarse en mamíferos y otros animales que se mueven libremente. Además, la precisión temporal (escala de tiempo de milisegundos) de los métodos optogenéticos es suficiente para funcionar en sistemas biológicos intactos.

10 La presente divulgación proporciona terapia génica de Chop2 para tejidos retinianos del ojo, introduciendo en células retinianas un polipéptido o ácido nucleico que codifica al menos una forma mutante de Chop2. Las proteínas Chop2/ChR2 mutantes de la invención están adaptadas específicamente para activarse por luz a umbrales inferiores de intensidades luminosas que sus homólogas de tipo natural. Por consiguiente, las proteínas Chop2/de ChR2 mutantes de la invención pueden usarse para activar células de la retina y el sistema visual usando fuentes de iluminación menos dañinas. Las proteínas Chop2/de ChR2 mutantes también conducen fotocorrientes mayores tras la activación, dando como resultado una respuesta más robusta o eficaz de las células que expresan Chop2/ChR2 mutantes.

20 Por ejemplo, las proteínas Chop2 mutantes de la invención se administran a un sujeto a través de la inyección local, intravítrea o subretiniana de una molécula de ácido nucleico que codifica Chop2 mutante, una molécula de polipéptido de Chop2 mutante o una célula que expresa Chop2/ChR2 mutante. Las células retinianas del sujeto expresan las proteínas Chop2 mutantes dentro de la membrana plasmática. Cuando las células retinianas transfectadas o transformadas encuentran radiación luminosa, las células retinianas transfectadas o transformadas transducen una señal mejorada o restablecida.

25 Estos métodos pueden usarse en sujetos de visión normal y/o deficiente. Los mutantes de Chop2/ChR2 de la invención pueden conservar, mejorar o restablecer la visión. Además, los mutantes de Chop2/ChR2 de la invención se usan para conservar, mejorar o restablecer la transducción de información no visual desde las células ganglionares retinianas fotosensibles hasta el cerebro.

30 El término “visión”, tal como se usa en el presente documento se define como la capacidad de un organismo para detectar la luz de manera útil como un estímulo para diferenciación o acción. Se pretende que visión englobe lo siguiente:

- 35 1. Detección o percepción de luz: la capacidad para distinguir si la luz está presente o no;
2. Proyección de luz: la capacidad para distinguir la dirección de la que procede un estímulo luminoso;
3. Resolución: la capacidad para detectar diferentes niveles de brillo (es decir, contraste) en un objetivo de letra o retícula; y
- 40 4. Reconocimiento: la capacidad para reconocer la forma de un objetivo visual con referencia a los diversos niveles de contraste dentro del objetivo.

45 Por tanto, “visión” incluye la capacidad para detectar simplemente la presencia de luz. Los polipéptidos y polinucleótidos que codifican Chop2 mutante de la presente invención pueden usarse para mejorar o restablecer la visión, incluyendo la mejora o el restablecimiento de la visión, por ejemplo, aumentos en la detección o percepción de luz, aumento en la sensibilidad lumínica o fotosensibilidad en respuesta a un estímulo luminoso, aumento en la capacidad para distinguir la dirección de la que procede un estímulo luminoso, aumento en la capacidad para detectar diferentes niveles de brillo, aumento en la capacidad para reconocer la forma de un objetivo visual, y aumentos en el potencial provocado visual o en la transmisión desde la retina hasta la corteza. Como tal, la mejora o el restablecimiento de la visión puede incluir o no el restablecimiento completo de la vista, es decir, en el que la visión del paciente tratado con la presente invención se restablece hasta el grado de visión de un individuo no afectado. La recuperación visual descrita en los estudios con animales descritos a continuación puede colocar, en lo que se refiere a los humanos, a la persona en el límite inferior de la función de visión aumentando un aspecto de visión (es decir, la sensibilidad lumínica o el potencial provocado visual) sin restablecer la vista completa. No obstante, la colocación en un nivel de este tipo constituiría un beneficio significativo, porque estos individuos podrían entrenarse en movilidad y potencialmente en tareas de resolución de orden bajo lo que les proporcionarían un nivel de independencia visual mejorado enormemente en comparación con la ceguera total. Incluso la percepción de luz básica puede usarse por individuos afectados visualmente, cuya visión se mejora usando las presentes composiciones y métodos, para llevar a cabo tareas diarias específicas y mejorar la movilidad, capacidad y calidad de vida general.

60 El grado de restablecimiento de la visión puede determinarse a través de la medición de la visión antes, y preferiblemente después de, administrar un vector que comprende, por ejemplo, ADN que codifica Chop2. La visión puede medirse usando cualquiera de varios métodos bien conocidos en la técnica o métodos todavía no establecidos. La visión, ya sea mejorada o restablecida por la presente invención, puede medirse mediante

cualquiera de las siguientes respuestas visuales:

1. una respuesta de detección de luz por parte del sujeto tras la exposición a un estímulo luminoso, en que se busca evidencia para una respuesta fiable de una indicación o movimiento en la dirección general de la luz por parte del individuo cuando la luz está apagada;

2. una respuesta de proyección de luz por parte del sujeto tras la exposición a un estímulo luminoso, en que se busca evidencia para una respuesta fiable de una indicación o movimiento en la dirección específica de la luz por parte del individuo cuando la luz está apagada;

3. resolución de luz por parte del sujeto de un estímulo visual con patrón de luz frente a oscuridad, que mide la capacidad del sujeto para resolver estímulos visuales con patrón de luz frente a oscuridad tal como se pone de manifiesto por:

a. la presencia de movimientos oculares de nistagmo producidos de manera optocinética fiables demostrables y/o movimientos relacionados de la cabeza o el cuerpo que demuestran el seguimiento del objetivo (véase anteriormente), y/o

b. la presencia de una capacidad fiable para distinguir un estímulo visual con patrón y para indicar tal distinción mediante medios verbales o no verbales incluyendo, por ejemplo, señalización, o presión de una barra o botón; o

4. registro eléctrico de una respuesta de la corteza visual a un estímulo de destello luminoso o un estímulo visual con patrón, que es un punto final de transmisión eléctrica desde una retina restablecida hasta la corteza visual, también denominado potencial provocado visual (VEP). La medición puede ser mediante registro eléctrico sobre la superficie del cuero cabelludo en la región de la corteza visual, sobre la superficie cortical y/o registro dentro de células de la corteza visual.

Por tanto, la mejora o el restablecimiento de la visión, según la presente invención, puede incluir, pero no se limita a: aumentos en la amplitud o la cinética de fotocorrientes o respuesta eléctrica en respuesta al estímulo luminoso en las células retinianas, aumentos en la sensibilidad lumínica (es decir, disminución de la intensidad luminosa umbral requerida para iniciar una fotocorriente o respuesta eléctrica en respuesta al estímulo luminoso, requiriendo de ese modo menos luz o luz más baja para provocar una fotocorriente) de las células retinianas, aumentos en el número o la amplitud de disparos neuronales o actividad neuronal provocados por luz, aumentos en respuestas a la luz en la corteza visual, lo que incluye aumentar el potencial provocado visual transmitido desde la retina o las células retinianas hasta la corteza visual o el cerebro.

Pueden usarse tanto estudios *in vitro* como *in vivo* para evaluar los diversos parámetros de la presente invención, incluyendo modelos animales reconocidos de trastornos oculares humanos que producen ceguera. Son útiles los modelos animales grandes de retinopatía humana, por ejemplo, ceguera en la infancia. Los ejemplos proporcionados en el presente documento permiten que un experto en la técnica prevea fácilmente que este método puede usarse de manera similar en el tratamiento de una variedad de enfermedades retinianas.

Aunque los estudios anteriores realizados por terceros han demostrado que la degeneración retiniana puede retardarse mediante técnicas de terapia génica, la presente invención demuestra una recuperación fisiológica definitiva de la función, que se espera que genere o mejore diversos parámetros de visión, incluyendo parámetros del comportamiento.

Pueden obtenerse mediciones del comportamiento usando pruebas y modelos animales conocidos, por ejemplo actuación en un laberinto acuático, en el que un sujeto en que se ha conservado o restablecido la visión en diversos grados nada hacia la luz (Hayes, JM *et al.*, 1993, *Behav Genet* 23:395-403).

En modelos en que se induce ceguera durante la vida adulta o se desarrolla ceguera congénita de manera suficientemente lenta como para que el individuo experimente visión antes de perderla, puede realizarse el entrenamiento del sujeto en diversas pruebas. De este modo, cuando estas pruebas vuelven a administrarse tras la pérdida visual para someter a prueba la eficacia de las presentes composiciones y métodos para determinar sus efectos de restablecimiento de la visión, los animales no tienen que aprender las tareas *de novo* aunque estén en un estado de ceguera. Otras pruebas de comportamiento no requieren aprendizaje y se basan en el instinto de determinados comportamientos. Un ejemplo es la prueba de nistagmo optocinético (Balquema GW *et al.*, 1984, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 25:795-800; Mitchiner JC *et al.*, 1976, *Visión Res.* 16:1169-71).

La presente invención también puede usarse en combinación con otras formas de terapia de visión conocidas en la técnica para mejorar o restablecer la visión. Por ejemplo, el uso de prótesis visuales, que incluyen implantes retinianos, implantes corticales, implantes de núcleo geniculado lateral o implantes de nervio óptico. Por tanto, además de la modificación genética de las neuronas retinianas supervivientes usando los presentes métodos, puede dotarse al sujeto que está tratándose de una prótesis visual antes, al mismo tiempo que o después de emplear el método molecular. La eficacia de las prótesis visuales puede mejorarse con el entrenamiento del individuo,

potenciando así el impacto potencial de la transformación de Chop2 de células del paciente tal como se contempla en el presente documento. Los métodos de entrenamiento, tales como entrenamiento de habituación caracterizado por entrenar al sujeto para reconocer (i) diversos niveles de estimulación con patrón y/o luz, y/o (ii) estimulación ambiental a partir de un objeto o una fuente de luz común tal como entendería un experto en la técnica; y

5 entrenamiento de orientación y movilidad caracterizado por entrenar al sujeto para detectar visualmente objetos locales y moverse entre dichos objetos más eficazmente que sin el entrenamiento. De hecho, puede aplicarse aquí cualquier técnica de estimulación visual que se usa normalmente en el campo de la rehabilitación por dificultad para ver.

## 10 Ejemplos

### Ejemplo 1: Generación de constructos de Chop2 mutantes marcados

15 Se realizaron mutaciones en una proteína de fusión Chop2-GFP con codones optimizados para crear mutaciones individuales y dobles en los sitios L132 (leucina 132) y T159 (treonina 159). Se generaron varios mutantes, por ejemplo, mutantes individuales tales como L132A, L132C, T159A, T159C y T159S, y mutantes dobles tales como L132C/T159C, L132C/T159S, L132A/T159C y L132C/T159A. Se clonaron transgenes de Chop2-GFP en un vector de VAAr bajo el control de un promotor de CAG usando métodos conocidos en la técnica.

### Ejemplo 2: Análisis *in vitro* de constructos de Chop2 mutantes

25 Se examinaron en primer lugar las propiedades funcionales de cada Chop2 mutante, o una combinación de las mismas, en células HEK. Se administraron constructos de Chop2 a células HEK mediante infección adenoviral, por ejemplo. Tras la expresión de Chop2 de tipo natural o mutante, se formaron canales ChR2 de tipo natural y mutante. Se evaluaron las mediciones de la sensibilidad lumínica y otras propiedades de los canales ChR2 tal como se describe en el presente documento. Se generaron los estímulos lumínicos (fotones/cm<sup>2</sup>.s a 460 nm) mediante una lámpara de arco de xenón y se atenuaron mediante filtros de densidad neutra: ND4,0 ( $2,8 \times 10^{14}$ ), ND3,0 ( $1,4 \times 10^{15}$ ), ND2,5 ( $4,8 \times 10^{15}$ ); ND2,0 ( $1,6 \times 10^{16}$ ), ND1,0 ( $1,3 \times 10^{17}$ ), ND0 ( $1,2 \times 10^{18}$ ). Se midieron corrientes provocadas por luz a partir de ChR2 de tipo natural, T159C, L132C, L132C/T159C y L132C/T159S. Se realizaron registros de pinzamiento zonal usando métodos conocidos en la técnica.

35 Registros representativos para este experimento que compara la sensibilidad lumínica entre los constructos de Chop2 demostraron que las mutaciones en L132 solas o en combinación con la mutación en T159 muestran una fotocorriente aumentada en comparación con el tipo natural (figuras 1A y 1B). La figura 1B muestra los mismos perfiles de corriente a una escala diferente para ilustrar la diferencia en amplitud de las fotocorrientes entre ChR2 de tipo natural y mutantes de ChR2 más claramente. La figura 1B compara específicamente los perfiles de corriente que resultan de la estimulación con luz usando el filtro de densidad neutra (ND2,5), equivalente a  $4,8 \times 10^{15}$  fotos/cm<sup>2</sup>.s; los perfiles se designan mediante las flechas. La amplitud de la fotocorriente del mutante L132C es mayor que la del tipo natural; la amplitud de la fotocorriente del mutante doble L132C/T159C es mayor que la de L132C; y la amplitud de la fotocorriente del mutante L132C/T159S es mayor que la de L132C/T159C. Los perfiles de corriente de los mutantes de ChR2, particularmente de los mutantes dobles L132C/T159C y L132C/T159S, también muestran cinéticas de desactivación más lentas cuando se compran con el tipo natural y L132C.

45 La figura 2 muestra los registros representativos de las corrientes provocadas por luz de ChR2 de tipo natural, L132C, L132C/T159C y L132C/T159S tras la estimulación mediante un pulso de luz de 10 ms ( $1,2 \times 10^{18}$  fotones/cm<sup>2</sup>.s a una longitud de onda de 460 nm) para comparar su evolución temporal de desactivación, o evolución temporal de desintegración después de apagado de luz. ChR2 mutantes muestran evoluciones temporales de desactivación más prolongadas, teniendo el mutante doble L132C/T159S la más prolongada. La sensibilidad lumínica superior, tal como se demuestra mediante L132C/T159C y L132C/T159S, puede estar correlacionada con cinéticas de canal más lentas.

### Ejemplo 3: Administración ocular *in vivo* y análisis de constructos de Chop2 mutantes

55 Se obtuvieron vectores de virus VAA2 que portaban constructos de Chop2 mutante-GFP impulsados por el promotor de CAG y se inyectaron por vía intravítrea en los ojos de ratones adultos C57BL/6J. Se anestesió a los ratones adultos mediante inyección i.p. de ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg). Bajo un microscopio de disección, se practicó una incisión mediante tijeras a través del párpado para exponer la esclerótica. Se realizó una pequeña perforación en la región de la escleróticas posterior al cristalino con una aguja y se inyectó una suspensión de vectores virales de 0,8-1,5  $\mu$ l a la concentración de aproximadamente  $10^{11}$  partículas genómicas/ml en el espacio intravítreo a través del orificio con una jeringa Hamilton con una aguja de punta roma de calibre 32. Para cada animal, habitualmente solo se inyectaron en un ojo vectores virales que portaban un constructo de Chop2, y el otro ojo se dejó sin inyectar o se le inyectaron vectores virales de control que portaban GFP solo. Tras la expresión de Chop2 de tipo natural o mutante de la presente invención, se formaron canales ChR2 mutantes o de tipo natural funcionales utilizando moléculas retinianas endógenas, y se evaluaron las propiedades de estas proteínas ChR2 tal como se describe en el presente documento.



Se examinaron las respuestas a la luz mediadas por ChR2 usando registros de matriz de múltiples electrodos de retinas de preparación completa. Se generaron estímulos lumínicos (fotones/cm<sup>2</sup>/s) mediante un láser azul de 473 nm y se atenuaron mediante filtros de densidad neutra: ND0 ( $6,3 \times 10^{16}$ ), ND1,0 ( $7,4 \times 10^{15}$ ), ND1,5 ( $2,7 \times 10^{15}$ ), ND2,0 ( $7,3 \times 10^{14}$ ), ND2,5 ( $3,2 \times 10^{14}$ ), ND3,0 ( $8,5 \times 10^{13}$ ), ND3,5 ( $3,8 \times 10^{13}$ ) y ND4,0 ( $9,5 \times 10^{12}$ ).

La matriz de múltiples electrodos se basó en los procedimientos notificados por Tian y Copenhagen (2003). En resumen, se diseccionó la retina y se colocó con los fotorreceptores hacia abajo sobre una tira de papel de filtro de nitrocelulosa (Millipore Corp., Bedford, MA). La preparación de retina se colocó en la cámara de registro de matriz de múltiples electrodos MEA-60 con electrodos de 30  $\mu\text{m}$  de diámetro separados 200  $\mu\text{m}$  (Multi Channel System MCS GmbH, Reutlingen, Alemania), con la capa de células ganglionares orientada hacia los electrodos de registro. Se perfundió la retina de manera continua en disolución extracelular oxigenada a 34 °C durante todos los experimentos. La disolución extracelular contenía (en mM): NaCl, 124; KCl, 2,5; CaCl<sub>2</sub>, 2; MgCl<sub>2</sub>, 2; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,25; NaHCO<sub>3</sub>, 26; y glucosa, 22 (pH 7,35 con 95 % de O<sub>2</sub> y 5 % de CO<sub>2</sub>). Los registros se iniciaron habitualmente 60 min después de que la retina se colocara en la cámara de registro. El intervalo entre comienzos de cada estímulo luminoso fue de 10-15 s. Las señales se filtraron entre 200 Hz (punto de corte bajo) y 20 kHz (punto de corte alto). Se analizaron las respuestas de neuronas individuales usando el software Offline Sorter (Plexon, Inc., Dallas, TX).

Los mutantes de Chop2/ChR2 con mutaciones individuales, es decir, L132 y T159C, disminuyeron notablemente la intensidad luminosa umbral que se requiere para provocar una fotocorriente mediada por ChR2. Además, se encontró que varios mutantes dobles, incluyendo L132C/T159C, L132A/T159C y L132C/T159S, aumentaban adicionalmente la fotocorriente a intensidades luminosas bajas. Se usaron diferentes filtros de densidad neutra para atenuar los estímulos lumínicos para diferenciar las respuestas provocadas por luz de los constructos de Chop2 con luz baja. Se observó la actividad de disparo neuronal de las células ganglionares retinianas mediada por los mutantes de la presente invención a las intensidades luminosas de aproximadamente 1,5 a 2 unidades logarítmicas por debajo del nivel de luz que se requiere para desencadenar la actividad de disparo neuronal con ChR2 de tipo natural (figura 3). Específicamente, ChR2 de tipo natural no mostró ninguna actividad de disparo neuronal en respuesta a estímulos lumínicos con filtro de densidad neutra 2,5 ( $3,2 \times 10^{14}$  fotones/cm<sup>2</sup>/s) mientras que los mutantes de ChR2 (L132C, L132C/T159C y L132C/T159S) demostraron actividad de disparo neuronal. De hecho, los mutantes de ChR2 todavía mostraron actividad de disparo neuronal en respuesta a la luz con filtros de densidad neutra 3,0 y 3,5. Por tanto, los mutantes de ChR2 de la presente invención poseen sensibilidad lumínica superior y, por tanto, una intensidad luminosa umbral notablemente inferior que se requiere para desencadenar una fotocorriente mediada por ChR2. Además, los mutantes dobles de ChR2 poseen una sensibilidad lumínica superior a la de los mutantes individuales, es decir L132C. Además, los disparos neuronales de las células ganglionares retinianas que expresan L132C/T159C y L132/T159S podían seguir una frecuencia de parpadeo de luz de hasta 15 Hz y 5 Hz, respectivamente (figura 4).

El mutante L132C/T159A muestra alta sensibilidad lumínica, probablemente el más sensible a la luz de entre estos mutantes, pero todavía muestra disociación extremadamente lenta (el canal continua abierto durante muchos envíos después de apagarse la luz). Resulta interesante que puede desconectarse más rápidamente usando una luz con longitudes de onda largas, tales como luz amarilla. El mutante L132C/T159A (codificado por las SEQ ID NO: 24 y 25) demuestra potencial significativo.

Dada la compensación entre sensibilidad lumínica y cinéticas de canal, los mutantes de Chop2/ChR2 que demuestran un equilibrio entre la sensibilidad lumínica y la cinética de canal, tales como L132C/T159C o L132C/T159S, pueden ser adecuados para la aplicación del restablecimiento de la visión.

#### Ejemplo 4: Análisis de constructos de Chop2 mutantes en modelos de enfermedad de ratón

Se conocen en la técnica modelos de ratón de enfermedades oculares degenerativas. Por ejemplo, los ratones homocigotos *rd1* (*rd1/rd1*) son un modelo de degeneración de fotorreceptores usado comúnmente. Los ratones *Rd1* portan una mutación nula en la GMP fosfodiesterasa cíclica, PDE6, similar a algunas formas de retinosis pigmentaria en humanos. Otros modelos de ratón de enfermedad ocular bien establecidos que pueden ser de interés particular para demostrar la seguridad y la eficacia del mutante de ChR2 incluyen los ratones *rd*s (también conocido como *PrphRd2*), *rd3*, *rd4*, *rd5*, *rd6*, *rd7*, *rd8*, *rd9*, *Pde6b*<sup>rd10</sup> o *cpfl1*.

Los constructos de Chop2-GFP de la presente invención pueden inyectarse por vía intravítrea en los ojos de ratones recién nacidos (P1) o adultos a los 2-12 meses de edad. La señal de GFP puede observarse en las retinas en las que se ha inyectado Chop2-GFP, para determinar los niveles de expresión de ChR2 o expresión en poblaciones de células particulares, tales como las células ganglionares retinianas. La expresión de Chop2 mutante-GFP puede monitorizarse durante una cantidad de tiempo predeterminada, es decir 3-6 meses, o 1 año tras la inyección viral. Pueden realizarse registros de pinzamiento zonal y matriz de múltiples canales usando los métodos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento para medir las respuestas provocadas por luz de células que expresan Chop2 mutante-GFP *in vivo*.

Técnicas y pruebas adicionales están bien establecidas en la técnica para someter a prueba el restablecimiento de

la sensibilidad lumínica o la visión. Pueden examinarse los potenciales provocados visuales procedentes de la corteza visual o células que expresan Chop2-GFP, tal como se describe en la publicación PCT WO 2007/131180. Otras pruebas incluyen la evaluación del comportamiento de la agudeza visual en los ratones, es decir, prueba optomotriz virtual y laberinto acuático visual.

5 Ejemplo 5: Análisis de la expresión y la seguridad a largo plazo de la administración de constructos de Chop2 mutantes a neuronas retinianas

10 Se evaluó la neurotoxicidad en ratones adultos C57BL/6J a los que se inyectaron constructos de Chop2 de la presente invención. La seguridad de expresión de los mutantes de Chop2 en la retina se evaluó mediante inmunotinción y recuento de células tras la exposición a luz azul fuerte durante dos semanas. No se encontró que ninguno de los ratones mostrara síntomas de neurotoxicidad durante hasta dos meses tras la inyección.

15 Estudios en curso adicionales están evaluando la expresión y seguridad a largo plazo de mutantes de Chop2/ChR2 de la invención en neuronas retinianas.

**Otras realizaciones**

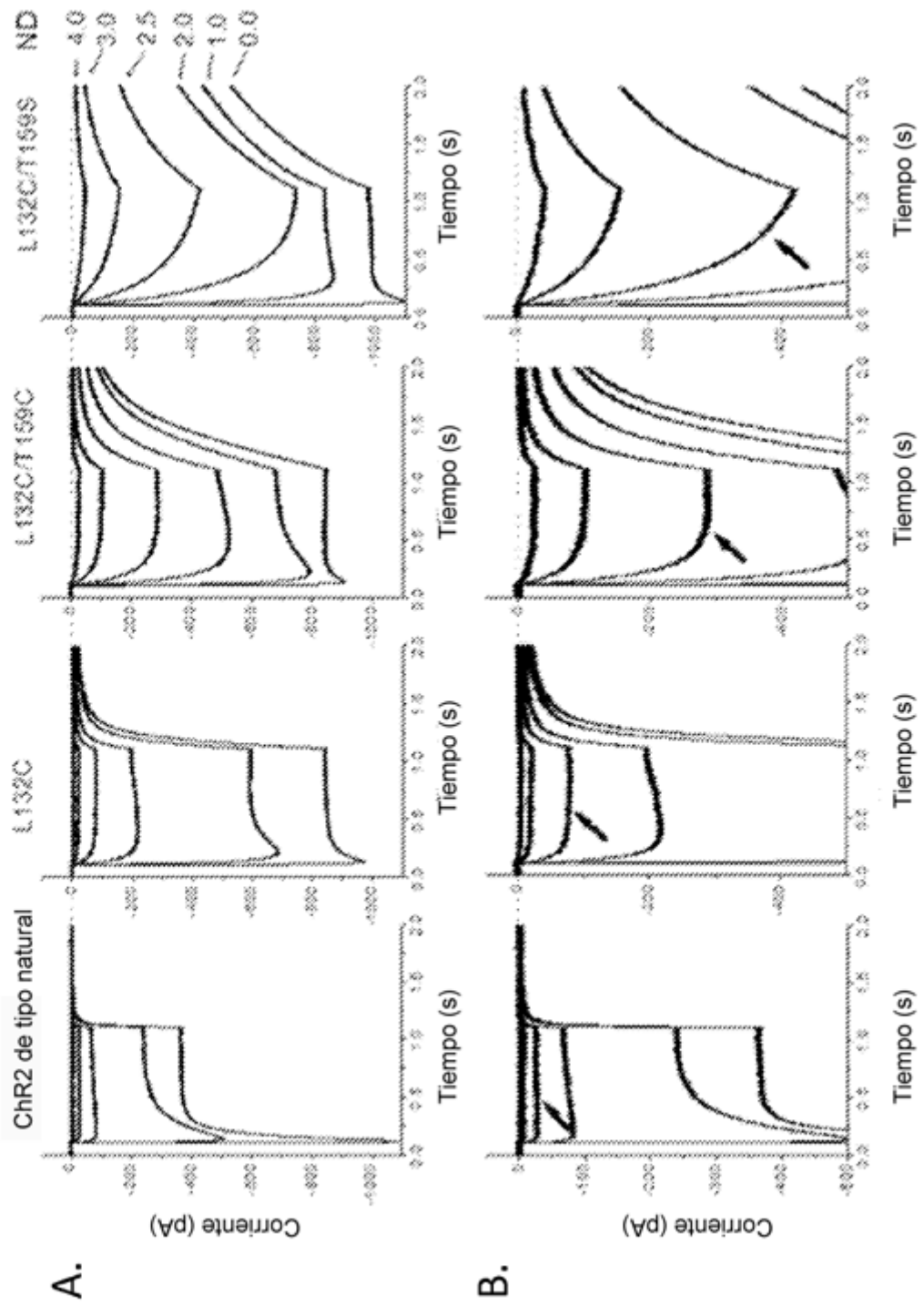
20 Aunque la invención se ha descrito conjuntamente con la descripción detallada de la misma, se pretende que la descripción anterior ilustre y no limite el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

25 La bibliografía de patente y científica a la que se hace referencia en el presente documento establece el conocimiento que está disponible para los expertos en la técnica.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Molécula de polipéptido aislado que comprende SEQ ID NO: 26 en la que el aminoácido en posición 132 de SEQ ID NO: 26 es cisteína (C) y el aminoácido en posición 159 es cisteína (C) o serina (S).
2. Molécula de polipéptido según la reivindicación 1, en la que el aminoácido en posición 159 es cisteína (C).
3. Molécula de polipéptido según la reivindicación 2, en la que la molécula de polipéptido comprende SEQ ID NO: 16.
- 10 4. Molécula de ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido aislado según la reivindicación 3, que comprende SEQ ID NO: 15.
- 15 5. Molécula de polipéptido según la reivindicación 1, en la que el aminoácido en posición 159 es serina (S).
6. Molécula de polipéptido según la reivindicación 5, en la que la molécula de polipéptido comprende SEQ ID NO: 19.
- 20 7. Molécula de ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido aislado según la reivindicación 6, que comprende SEQ ID NO: 18.
8. Molécula de ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 5 o 6.
- 25 9. Polipéptido aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 5 o 6 o molécula de ácido nucleico aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 4, 7 u 8, que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.
- 30 10. Célula que comprende la molécula de polipéptido aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 5 o 6 o molécula de ácido nucleico aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 4, 7 u 8.
- 35 11. Célula según la reivindicación 10, en la que la célula se pone en contacto con el polipéptido aislado o el ácido nucleico aislado *in vitro*.
- 40 12. Célula según la reivindicación 11, en la que la célula es un fotorreceptor, una célula bipolar, un bastón bipolar, un cono bipolar de tipo ON, una célula ganglionar retiniana, una célula ganglionar retiniana fotosensible, una célula horizontal, una célula amacrina o una célula amacrina AII.
- 45 13. Célula según la reivindicación 12, en la que la célula es una célula ganglionar retiniana o una célula ganglionar retiniana fotosensible.
14. Composición que comprende la molécula de polipéptido aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 5, 6 o 9 o molécula de ácido nucleico aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 4, 7, 8 o 9 o célula según una cualquiera de las reivindicaciones 10-13.
- 50 15. Composición según la reivindicación 14, para su uso en un método de mejora o restablecimiento de la visión en un sujeto.
16. Composición para su uso según la reivindicación 15, en la que el sujeto tiene visión deficiente, o el sujeto padece una enfermedad ocular.
17. Composición para su uso según la reivindicación 16, en la que la enfermedad ocular es degeneración macular o retinosis pigmentaria.
- 55 18. Composición para su uso según la reivindicación 15, en la que la composición es para administración mediante inyección intravítrea o subretiniana.
- 60 19. Composición para su uso según la reivindicación 15, en la que dicha mejora o restablecimiento de la visión comprende cualquiera de lo siguiente: aumentar la sensibilidad lumínica; disminuir la intensidad luminosa umbral requerida para desencadenar una fotocorriente; y aumentar el potencial provocado visual en la corteza visual.

Figura 1



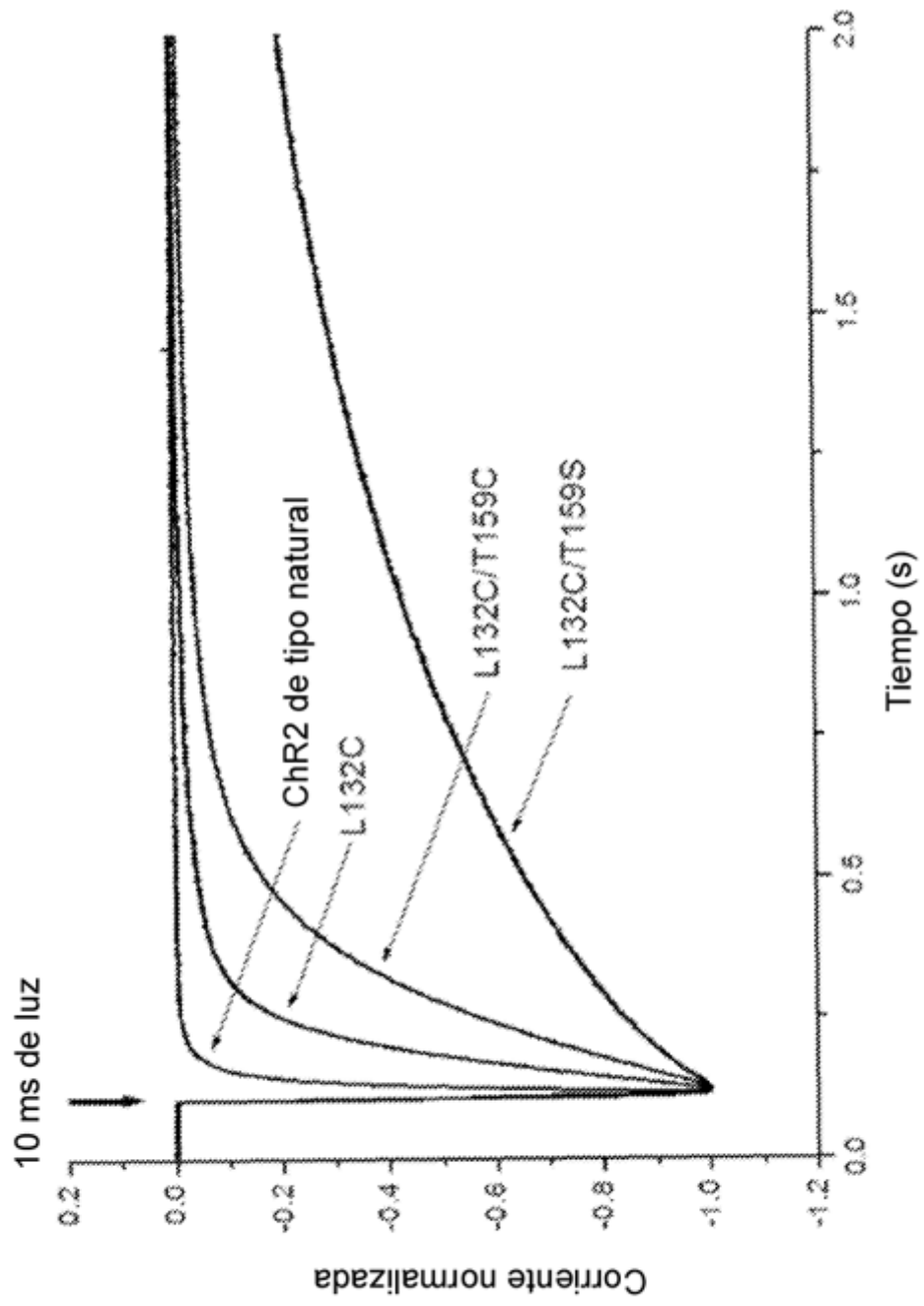


Figura 2

Figura 3

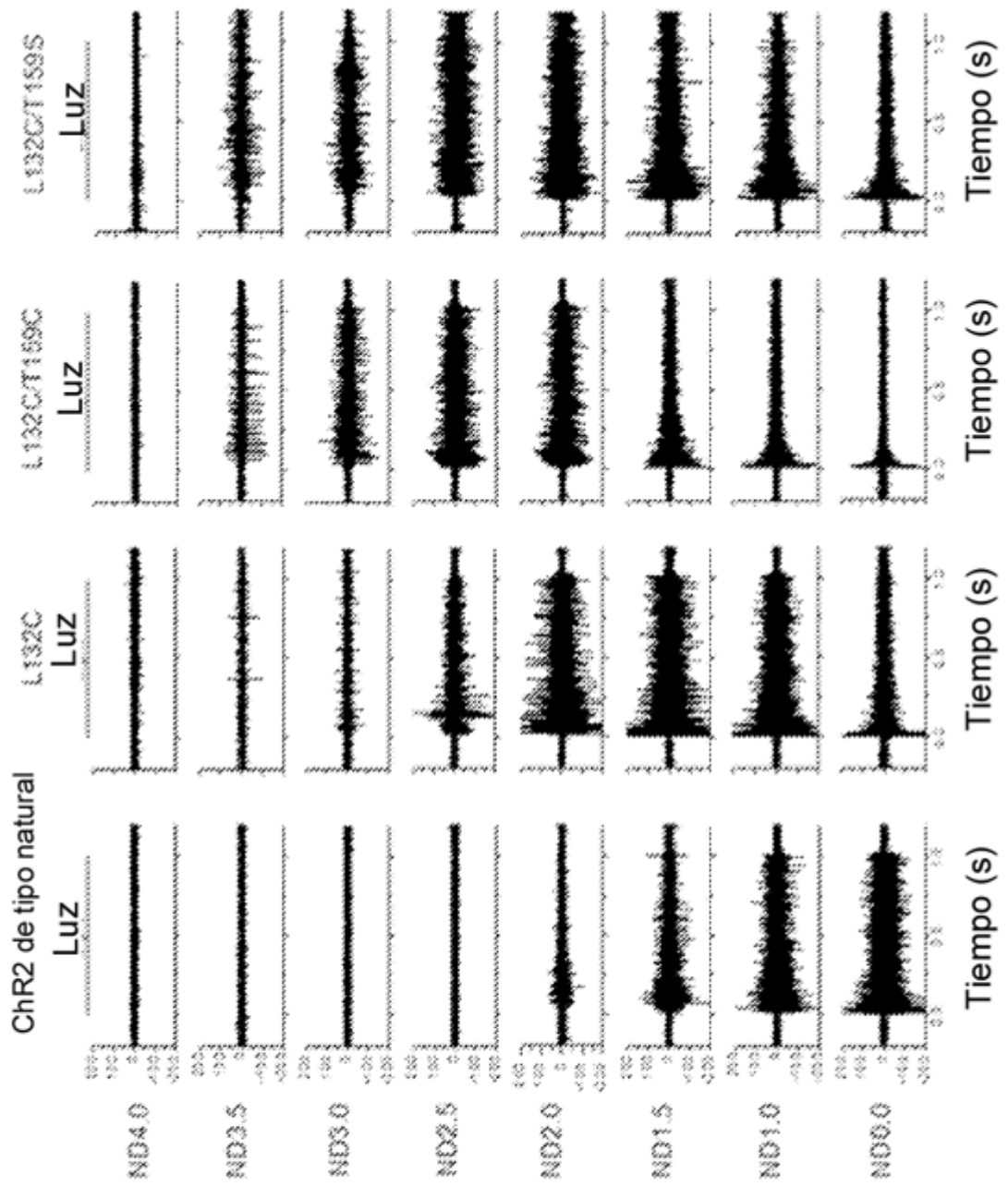
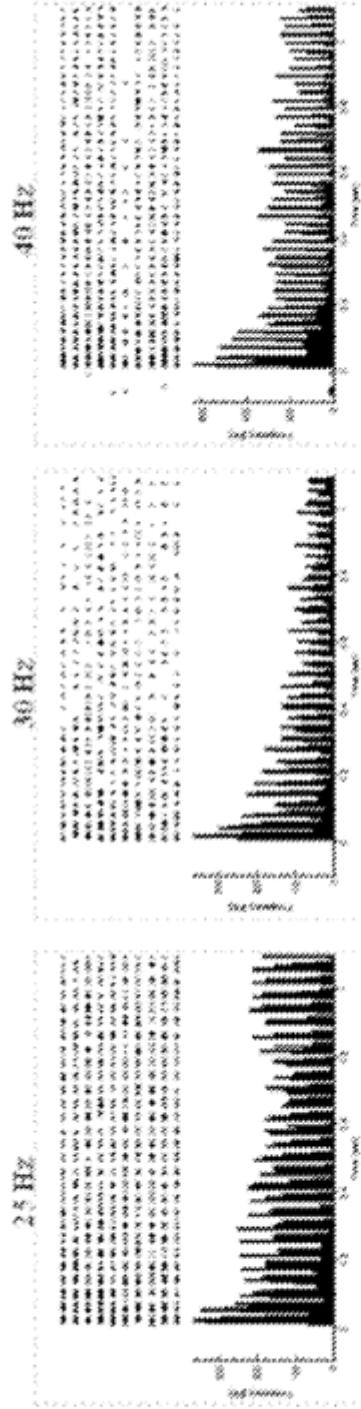


Figura 4a

Chr2 de tipo natural



L132C

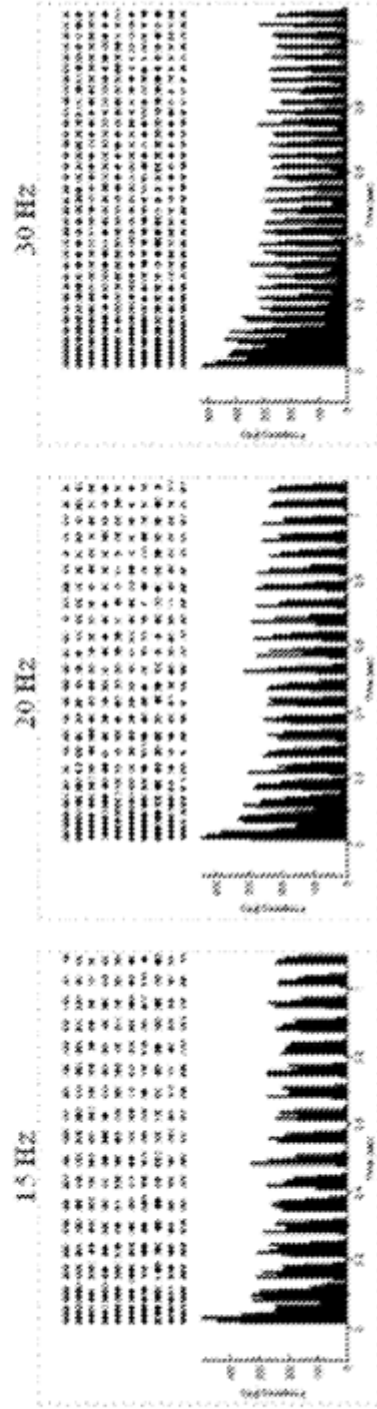


Figura 4b

