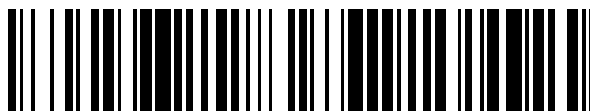


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 766 398**

51 Int. Cl.:

C07K 14/72 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2012 E 15201713 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 3029063**

54 Título: **Proteína GPCR quimérica sensible a la luz**

30 Prioridad:

24.06.2011 US 201161500863 P

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

12.06.2020

73 Titular/es:

**ARCTOS MEDICAL AG (100.0%)
Taubenstrasse 8
3011 Bern, CH**

72 Inventor/es:

**VAN WYK, MICHIEL y
KLEINLOGEL, SONJA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 766 398 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

Proteína GPCR quimérica sensible a la luz

CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se encuentra en el campo de los agentes terapéuticos médicos y la terapia médica para el tratamiento de pacientes humanos o animales que padecen pérdida de visión y se refiere a tratamientos y a la fabricación de medicamentos para mejorar la visión, en particular para tratar pérdida de visión resultante de degeneración retiniana de fotorreceptores con una proteína GPCR quimérica sensible a la luz.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Las principales causas de la degeneración retiniana de fotorreceptores incluyen retinitis pigmentosa (RP), degeneración macular senil (ARMD), retinopatía diabética, y otras enfermedades. Aproximadamente uno de cada tres mil, o tres millones de personas en todo el mundo, padecen retinitis pigmentosa (RP), una condición genética que conduce a la degeneración de fotorreceptores y con el tiempo a ceguera. La tasa y gravedad de la degeneración de fotorreceptores es variable y altamente dependiente de la propia mutación. Se pueden afectar más de cincuenta genes (Hartong et al. Lancet 368:1795-1809; 2006). Hasta la fecha, poco tratamiento está disponible para pacientes con RP. Los ensayos en curso que se centran en los agentes neuroprotectores (por ejemplo, factor neurotrófico ciliar) o terapia génica de adición (que introducen el gen "no mutado"), que tienen la finalidad de corregir las deficiencias genéticas adquiridas o hereditarias al gen funcional natural, han mostrado hasta la fecha solo un éxito marginal. Dado que la retina adulta no tiene la capacidad de generar nuevos fotorreceptores después de la pérdida de fotorreceptores, la terapia génica de adición solo es útil en tanto que la pérdida de fotorreceptores sea pequeña y principalmente ralentiza o estabiliza la condición previa.

Un enfoque alternativo empleado en los recientes estudios experimentales es convertir los fotorreceptores restantes o las neuronas retinianas internas supervivientes en sensibles a la luz mediante la expresión transgénica de una proteína sensible a la luz.

25 En los documentos de patente US 2009/0088399 y US 2010/0015095 se propone introducir la canalrodopsina-2 (ChR2) de canales de iones de algas regulada por la luz en la retina interna de pacientes que padecen degeneración de células fotorreceptoras. Esto convierte las células retinianas internas naturalmente insensibles a la luz, tales como las células bipolares o amacrinas, en sensibles a la luz y capaces de detectar información visual, que posteriormente se envía al cerebro sin recibir la entrada de fotorreceptores.

30 Similarmente, en los documentos de patente US 2005/0208022 y US 2009/0208462 se propone introducir una proteína fotorreceptora, tal como una opsina (incluyendo melanopsina) o citocromos, en las neuronas retinianas internas que incluyen células amacrinas, horizontales y bipolares de pacientes que padecen degeneración de fotorreceptores.

35 El enfoque para expresar ChR2 en neuronas retinianas internas es muy prometedor y se prueba actualmente en primates no humanos (Fradot M et al. Human Gene Therapy 22(5), 587-593; 2011) y retinas humanas aisladas (Ivanova E et al. Ophthalmol Vis Sci 51(10), 5288-5296, 2010), alimentado la esperanza de ensayos clínicos en un futuro cercano.

40 En los últimos años, ha sido satisfactoria la terapia retiniana de sustitución génica usando virus adenoasociado recombinante (rAAV) y ha llegado a ensayos clínicos finales. En particular, Bainbridge y colaboradores usaron rAAV para sustituir el gen defectuoso de la proteína de 65 kDa específica del epitelio pigmentario de la retina (RPE65). Una deficiencia en la proteína RPE65 convierte los fotorreceptores en incapaces de responder a la luz, como se requiere para la recirculación del cromóforo, es decir, la conversión de all-trans retinal en 11-cis retinal (Bainbridge JWB et al., N Engl J Med 358(21), 2231-2239;2008). La terapia génica es, por tanto, un enfoque terapéutico prometedor para corregir las deficiencias visuales por la introducción de genes adecuados en neuronas retinianas.

45 Yamashita et al. (J. Biochem. 130, 149-155, 2001) estudiaron la función de proteínas GPCR y desvelan mutantes sensibles a la luz quiméricos de rodopsina en los que el segundo bucle citoplásmico del receptor 6 de glutamato metabotrópico sustituye el tercer bucle citoplásmico de rodopsina.

50 Las proteínas activables por la luz actualmente disponibles que se podrían usar en la terapia génica para compensar la pérdida de células fotorreceptores, sin embargo, todavía tienen varios inconvenientes sustanciales: 1) la expresión artificial de proteínas extrañas, de invertebrados o algas, por ejemplo ChR2, podría desencadenar reacciones inmunitarias impredecibles en pacientes. 2) la ChR2 tiene una permeabilidad relativamente alta al calcio, que podría ser tóxica a largo plazo. 3) La respuesta de ChR2 es inherentemente débil a la intensidad de la luz natural, ya que cada fotón capturado solo puede activar una única proteína. 4) Aunque la melanopsina es capaz de amplificar señales de la luz regulando las actividades de reacciones enzimáticas de alto rendimiento, estos componentes enzimáticos no están lo suficientemente disponibles en las neuronas retinianas internas. Por tanto, la expresión de melanopsina en las células ganglionares y en células bipolares ENCENDIDAS no provoca una amplificación de la señal de la luz suficiente para restaurar la visión funcional a la intensidad de la luz natural. 5) Por tanto, los

mecanismos reguladores que controlan naturalmente la actividad de proteínas de control mediante cambios a sus renovaciones y modulación están ausentes cuando que expresan proteínas extrañas.

5 El objeto de la actual invención es proporcionar una proteína quimérica sensible a la luz que, cuando se expresa en neuronas retinianas internas, vence estas deficiencias. Es decir, es un objeto de la invención proporcionar una proteína sensible a la luz superior para la mejora y restauración de la visión, particularmente en pacientes con degeneración retiniana de fotorreceptores. Esta proteína quimérica mejorará o restaurará la sensibilidad a la luz a un mayor grado en comparación con la sensibilidad a la luz que es obtenible por las proteínas propuestas en el estado de la técnica. Los objetos adicionales de la invención incluyen la información genética que codifica la proteína sensible a la luz quimérica y los métodos de expresión de esta proteína quimérica en células vivas y organismos.

10 Aún objetos adicionales de la invención incluyen la expresión de la información genética que codifica la proteína sensible a la luz quimérica en células retinianas internas *in vivo* para el tratamiento terapéutico, y los productos biomédicos que comprenden la proteína sensible a la luz o información genética que codifica la proteína quimérica.

SUMARIO DE LA INVENCION

15 Este problema técnico se resuelve por una proteína quimérica sensible a la luz que comprende dominios de al menos dos miembros de la superfamilia de proteínas del receptor acoplado a la proteína G (GPCR), que están fusionadas para dar una quimera de GPCR sensible a la luz capaz de acoplar una señal de luz a la cascada de señalización del receptor 6 de glutamato metabotrópico (mGluR6).

20 Los miembros de la superfamilia de proteínas del receptor acoplado a la proteína G (GPCR) son receptores de proteína transmembranaria que transmiten señales desde la superficie celular hasta efectores intracelulares. Tienen una estructura, que normalmente comprende siete dominios transmembranarios (TM1 a TM7), tres bucles extracelulares (EL1 a EL3), tres bucles intracelulares (IL1 a IL3), un dominio extracelular del extremo N (NT) y un dominio intracelular del extremo C (CT). La superfamilia de la proteína GPCR incluye proteínas de receptores sensibles a la luz denominados fotorreceptores tales como opsinas, por ejemplo rodopsina y melanopsina. La superfamilia de GPCR también incluyen receptores metabotrópicos regulados por ligando, por ejemplo mGluR6. Los receptores metabotrópicos acoplados a la proteína G se unen indirectamente a los canales de iones en la membrana por una cascada de transducción de señales mediada por proteínas G específicas que logran una amplificación de la señal. Es decir, las proteínas G activadas regulan la actividad de enzimas, por ejemplo adenilato ciclasa, que producen rápidamente grandes cantidades de producto, por ejemplo cAMP, que puede a su vez activar grandes números de canales de iones en la membrana celular. A diferencia de dichos GPCRs metabotrópicos, los receptores ionotrópicos se unen directamente a canales de iones en la membrana. Por tanto, los receptores ionotrópicos como la canalrodopsina no son capaces de señalar la amplificación como receptores metabotrópicos.

25

30

Un aspecto de la invención se refiere a una proteína GPCR quimérica, que comprende dominios que derivan de al menos dos miembros de la familia de GPCR:

35 Un primero del al menos dos miembros de la familia de GPCR contribuye a dominios que median en la fotosensibilidad a la proteína GPCR sensible a la luz quimérica. Este primer miembro pertenece a la familia de las proteínas GPCR sensibles a la luz también denominadas fotorreceptores, y es melanopsina, en particular melanopsina humana.

Un segundo del al menos dos miembros de la familia de GPCR, concretamente mGluR6, contribuye a dominios para acoplar la señal de luz a la cascada de señalización intracelular de mGluR6.

40 mGluR6 es un componente nativo de la membrana celular de células bipolares ENCENDIDAS en la retina interna. Para los aspectos terapéuticos de la presente invención, estas células bipolares ENCENDIDAS son las células diana en las que se expresará la proteína GPCR quimérica sensible a la luz.

45 Fisiológicamente, la mGluR6 de células bipolares ENCENDIDAS nativas activa su cascada de señales intracelulares tras la unión extracelular de glutamato. Así, las células bipolares ENCENDIDAS contienen naturalmente los componentes intracelulares específicos que median en la cascada de señalización de mGluR6.

50 En la vía fisiológica de la transducción de señales de luz, las células fotorreceptoras de bastones y conos sanas activadas por la luz responden a una disminución en la intensidad de la luz con un aumento en el nivel de glutamato liberado de sus terminales sinápticos, que entonces se une a mGluR6 en las células bipolares ENCENDIDAS, que a su vez provoca una amplificación de la señal de la luz mediante la cascada de señalización intracelular acoplada a proteína G específica de mGluR6. En analogía a esta vía natural, la proteína sensible a la luz quimérica expresada en células bipolares ENCENDIDAS de retinas ciegas transmite la señal de luz a la cascada de señales intracelulares todavía existente (Križaj D et al., Vision Res. 50:2460-65, 2010) del receptor mGluR6 tras la activación por luz.

55 Sorprendentemente, las células bipolares ENCENDIDAS, cuando se complementan con la proteína GPCR sensible a la luz quimérica, perciben directamente la señal de luz mediante la proteína GPCR sensible a la luz quimérica, evitando la señal de glutamato indirecta que sigue a la estimulación de la luz de los fotorreceptores. Así, la proteína GPCR sensible a la luz quimérica es capaz de acoplar directamente la activación por luz con la cascada de señales de mGluR6. En otras palabras, la activación por luz es independiente de cualquier célula fotorreceptora de bastones

o conos. Además, la amplificación fisiológica de la señal provocada por un fotón se retiene mediante la cascada de señalización del mGluR6.

El término "dominio" en el contexto de la presente solicitud de patente se refiere a los bucles intracelulares y extracelulares, los extremos N y C y las regiones transmembranarias de un miembro de la familia de proteínas GPCR. El término "dominio derivado de", tal como dominio derivado de mGluR6 o un dominio derivado de una opsina, incluye cualquier dominio para el que la parte correspondiente fisiológicamente relevante tiene una secuencia de aminoácidos idéntica o una secuencia de aminoácidos similar a la secuencia de dicho dominio en el homólogo fisiológico del miembro de la familia GPCR. En general, las secuencias de aminoácidos similares o dominios similares presentan al menos 60 % de homología, preferentemente al menos 80 % de homología, y lo más preferentemente al menos 90 % de homología. Los dominios similares también incluyen particularmente dominios que comprenden aminoácidos conservados relevantes, independientemente de si una parte de la secuencia restante está desviada o falta del homólogo nativo o si secuencias adicionales están presentes en la proteína quimérica que no están presentes en el miembro nativo de la familia de GPCR.

La proteína quimérica comprende un dominio extracelular activable por la luz que deriva del fotopigmento biestable melanopsina, y no de rodopsina, por ejemplo. La ventaja de los fotopigmentos biestables es que se recirculan después de la decoloración mediante la recuperación por luz en vez de por enzimas celulares externas. La velocidad de recuperación es muy rápida y mantendrá una alta sensibilidad a la luz, incluso a alta intensidad de la luz. Con fotopigmentos biestables, la decoloración por la luz y la recuperación de la decoloración se incrementan igualmente a alta intensidad de la luz, mientras que la rodopsina, que no es biestable, pierde su fotosensibilidad durante la iluminación, ya que cada vez se decoloran más y más rodopsinas. La decoloración por la luz en fotopigmentos biestables tales como la rodopsina puede conducir en el peor caso a ceguera a corto plazo. La velocidad de recuperación podría incluso ser más lenta cuando un fotopigmento no biestable tal como la rodopsina se expresara en un tipo extraño de célula, debido a que las enzimas de recuperación no están necesariamente disponibles en la proximidad. En una retina sana, estas enzimas se localizan en el epitelio pigmentario retiniano.

Por consiguiente, la elección de los dominios del primer miembro del GPCR quimérico, que se obtienen de un fotopigmento biestable, convierte la recuperación del GPCR quimérico después de la decoloración por la luz en independiente de la disponibilidad de enzimas de recuperación de la decoloración. El dominio activable por la luz de una proteína fotorreceptora biestable se selecciona de melanopsina de la familia de las opsinas, y lo más preferentemente, si se usa en pacientes humanos, se selecciona de melanopsina humana para evitar una reacción inmunitaria.

La proteína GPCR quimérica el primer miembro de GPCR contribuye al menos a los dominios que contienen los restos de aminoácidos que forman la base de Schiff (que une el cromóforo covalentemente al GPCR), que son para melanopsina Tirosina¹⁴⁹ (Y149) en TM3 y Lisina³²¹ (K321) en TM7, o todos los dominios derivados de los dominios que forman el sitio que se une a cromóforo en el homólogo fisiológico. El sitio que se une a cromóforo se refiere al sitio de unión para el pigmento de luz, que absorbe un fotón, tal como por ejemplo 11-cis retinal en melanopsina (Hermann et al., Neuroscience Letters, Vol. 376 p76-80, 2004.)

La proteína GPCR quimérica comprende todos los dominios extracelulares del primer miembro de GPCR, que son el extremo N y los tres bucles extracelulares (EL1, EL2, EL3) y además los siete dominios transmembranarios (TM1 a TM7) del primer miembro de GPCR.

Al menos los dominios intracelulares IL2, IL3 y el extremo C de la proteína GPCR quimérica se obtienen del segundo GPCR, que es mGluR6.

Los dominios que son necesarios para el acoplamiento de la activación por la luz a la cascada de señalización de mGluR6 deben ser capaces de unirse a la proteína G específica para la vía de mGluR6, G-alfa(o). La IL3 parece ser particularmente relevante para la unión específica a la proteína G de la cascada de señales de GPCR. En general, los otros bucles intracelulares y el extremo C potencian la especificidad de la unión de proteína G.

Para minimizar las posibles reacciones inmunogénicas y para optimizar el acoplamiento fisiológico a mGluR6 en algunas realizaciones que se van a usar para terapia médica en seres humanos, los dominios sensibles a la luz se obtienen de melanopsina humana.

La proteína GPCR quimérica sensible a la luz se construye fusionando la información genética que codifica dominios de los miembros de GPCR con las funcionalidades deseadas de sensibilidad a la luz y acoplamiento de la activación de la luz a la cascada de señalización de mGluR6 según técnicas conocidas en la técnica. La identificación de los dominios deseados y la determinación de los sitios de corte y unión adecuados en los extremos N y C de cualquier dominio particular se basan principalmente en 1) el alineamiento de secuencias de genes/restos conservados y 2) el modelado informático de la estructura secundaria y terciaria del miembro de la familia de GPCR sensible a la luz y mGluR6, usando softwares convencionales disponibles en la técnica. Este enfoque tiene una variabilidad inherente en la definición exacta de la longitud de los dominios individuales y dicha variabilidad se incluye dentro del alcance de la presente invención cuando se habla de dominios. Además, en los sitios de fusión individuales entre dominios, hay, en general, varias posibilidades de corte y empalme de los dominios juntos para dar una proteína funcional. Y,

evidentemente, también están dentro del alcance de la invención la delección de porciones de una secuencia de aminoácidos no requerida para la función, sustituciones conservativas de aminoácidos, por ejemplo intercambiando aminoácidos hidrófobos con hidrófobos o hidrófilos con hidrófilos, y sustituciones de nucleótidos. Por consiguiente, un número considerable de variantes de secuencia particularmente en regiones de los sitios de fusión entre dominios adyacentes de las proteínas GPCR quiméricas entran dentro del alcance de la invención, a condición de que den proteínas GPCR quiméricas funcionales. En realizaciones en las que todos los dominios transmembranarios y extracelulares derivan del primer miembro de GPCR y al menos uno o todos de los dominios intracelulares se sustituyen por dominios correspondientes derivados de mGluR6, todos los sitios de corte y unión factibles para intercambiar IL1, IL2, IL3 y el extremo C están dentro del alcance de la invención.

5 Aspectos adicionales de la invención se refieren a la información genética de una proteína GPCR quimérica activable por luz capaz de acoplar la activación por luz a la cascada de señalización de mGluR6, vectores que incluyen vectores virales tales como rAAVs que comprenden esta información genética, y células de cultivo celular que comprenden dicha información genética o que expresan proteínas GPCR quiméricas activables por luz capaces de acoplar la activación por luz a la cascada de señalización de mGluR6, que incluye en particular líneas celulares neuronales, líneas celulares neuronales retinianas internas y líneas celulares bipolares, en particular células bipolares ENCENDIDAS.

10 Aún un aspecto adicional de la invención se refiere a la proteína GPCR quimérica sensible a la luz capaz de acoplar la activación por luz a la cascada de señalización de mGluR6 o la información genética que codifica dicha proteína quimérica y composiciones que comprenden dicha proteína o dicha información genética como tal o dentro de vectores o células con el fin de terapia médica, en particular para mejorar la visión, para el tratamiento de ceguera parcial o completa, para el tratamiento de retinitis pigmentosa (RP) y degeneración macular (ARMD), así como otras formas de degeneración de fotorreceptores.

15 Fisiológicamente, el receptor de glutamato metabotrópico de células bipolares ENCENDIDAS en la capa nuclear interna de la retina se activa por el neurotransmisor glutamato en respuesta a la actividad de células fotorreceptoras retinianas. Cuando los fotorreceptores se estimulan por luz, cambia la concentración de glutamato liberada sobre células bipolares ENCENDIDAS. La proteína GPCR quimérica sensible a la luz es una variante de la proteína mGluR6 nativa, que se activa por luz directamente mientras que la proteína mGluR6 nativa se activa indirectamente mediante glutamato después de la estimulación de células fotorreceptoras por cambios en la luz. Por tanto, los pacientes que padecen degeneración de fotorreceptores se pueden tratar expresando una proteína activable por luz quimérica que comprende dominios intracelulares de mGluR6 capaces de acoplar la activación por luz a la cascada de señalización de mGluR6 en sus células bipolares ENCENDIDAS.

20 En la proteína GPCR quimérica sensible a la luz según la invención, al menos IL2, IL3 y CT o todos los componentes intracelulares de la melanopsina se sustituyen con los componente intracelulares de mGluR6, dando como resultado una proteína quimérica que comprende los dominios fotorreceptores de melanopsina, que es capaz de conducir las cascadas de señalización de mGluR6 intracelulares existentes en neuronas retinianas internas, en particular en células bipolares ENCENDIDAS.

25 Debido a la expresión artificial de una proteína mGluR6-melanopsina quimérica activable por luz en células bipolares ENCENDIDAS, se amplifican señales de luz débiles conduciendo las reacciones enzimáticas rápidas preexistentes fisiológicas reguladas por mGluR6 nativo. Por tanto, dichas proteínas quiméricas escapan de las reacciones inmunitarias, cuando se usan los dominios extracelulares de proteínas fotorreceptoras nativas tales como melanopsina humana, debido a que la única parte accesible al sistema inmunitario será idéntica a la de la melanopsina humana nativa.

30 Una ventaja de uso de mGluR6 como el primer miembro de GPCR es que mGluR6 se expresa solo en células bipolares ENCENDIDAS en la retina. Por tanto, mGluR6-melanopsina quimérica transgénicamente expresada se acoplará eficientemente a la cascada de señalización de mGluR6 en células bipolares ENCENDIDAS solo. Además, la degradación y la modulación de la proteína quimérica (por ejemplo, unión a arrestina) ocurrirán mediante vías de mGluR6 preexistentes, permitiendo el autocontrol completo de la actividad de proteínas.

35 Existe otro efecto particular más de la expresión de la proteína mGluR6-melanopsina quimérica sensible a la luz en células bipolares ENCENDIDAS para restaurar la visión, que se diferencia de otros métodos de recuperación de la visión: se invertirá realmente el contraste visual; lo oscuro aparecerá brillante y lo brillante aparecerá oscuro. Es decir, los circuitos neurales naturalmente activados por un aumento en la intensidad de la luz se activarán por una disminución en la intensidad de la luz y viceversa. Esto, de hecho, podría tener una ventaja clave con respecto al estado de la técnica como se expone a continuación: Los fotorreceptores liberan niveles relativamente altos de su neurotransmisor (glutamato) en la oscuridad y menos transmisor a medida que aumenta la luminosidad. Las células bipolares ENCENDIDAS reciben su entrada mediante los receptores mGluR6, que hiperpolarizan las células bipolares cuando se activan (en la oscuridad) y viceversa. Si no existen fotorreceptores, no existe glutamato, las células bipolares ENCENDIDAS se despolarizan y la retina interna superviviente estará eficazmente en un modo adaptativo de "luz extremadamente brillante". En realidad, la degeneración muy lenta de las células bipolares ENCENDIDAS puede ser debida a esta despolarización sostenida. Los pacientes con retinitis pigmentosa no son conscientes de la adaptación a la luz de su retina, debido a que la salida retiniana solo señala cambios espaciales

y temporales en la intensidad de la luz. Es decir, si no se detectan los cambios en la intensidad, la retina no enviará eficazmente señal al cerebro, aunque la retina esté en el estado completamente adaptado a la luz.

Para mejorar la visión en pacientes con pérdida parcial o total de células fotorreceptoras, es importante tener en cuenta que la retina está en un estado completamente adaptado a la luz. Esto implica que las células bipolares ENCENDIDAS están permanentemente relativamente despolarizadas. La canalrodopsina-2 expresada en células bipolares ENCENDIDAS solo despolarizará estas células adicionalmente y así la diferencia de señal entre el estado foto-ENCENDIDO y el foto-APAGADO es relativamente pequeña. A diferencia, las células bipolares ENCENDIDAS que expresan la proteína mGluR6-GPCR quimérica sensible a la luz según la invención se hiperpolarizan por la luz. Evidentemente, esto aumenta la diferencia de señales y así potencia la salida y, por consiguiente, la sensibilidad a la luz.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Fig. 1: Dibujo esquemático que muestra los dominios y la orientación a través de la membrana celular de una realización de la proteína GPCR quimérica sensible a la luz con el extremo N (NT), dominios transmembranarios (TM1-TM7) y bucles extracelulares 1-3 (EL1-EL3) de melanopsina y los bucles intracelulares 1-3 (IL1-IL3) y el extremo C (CT) de mGluR6.

Fig. 2: Ejemplo 1 Respuestas a la corriente de células completas de células HEK293(GIRK) transfectadas con mGluR6-melanopsina de ratón (IL2(DRIY), IL3(I) y CT de mGluR6, realización a modo de ejemplo D con Seq. No. 7 / 8)-secuencia actualmente preferida con las mayores corrientes medidas en células HEK293 (GIRK)

Fig. 3: Ejemplo 1: Corrientes de K⁺ salientes

Fig. 4: Ejemplo 2: Transducción satisfactoria y específica de mGluR6-melanopsina de células bipolares ENCENDIDAS de ratón usando un vector mutante de la cápside de rAAV2

Fig. 5: Respuestas a la luz registradas de células ganglionares retinianas en retina de ratones rd1 de ocho semanas de edad (retina sin células fotorreceptoras), un mes después de introducir mGluR6-melanopsina en las células bipolares ENCENDIDAS retinianas usando un vector de rAAV2

Fig. 6: El inmunomarcado con el anticuerpo anti-Rab1A de conejo muestra que la retina adaptada a la oscuridad de un ratón rd1 ciego está en un estado despolarizado adaptado a la luz.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE ALGUNAS REALIZACIONES

La identificación de los dominios deseados y la determinación de los sitios de corte y unión adecuados en los extremos N y C de cualquier dominio particular se basan principalmente en 1) el alineamiento de secuencias de genes/restos conservados y 2) el modelado informático de la estructura secundaria y terciaria del miembro de la familia GPCR sensible a la luz y mGluR6, usando, por ejemplo, CLC Protein Workbench, I-TASSER, MODELLER, QUARK o SWISS-Model (Kiefer F et al., Nucleic Acids Res 37, D387-D392,2009).

En algunas realizaciones de la proteína GPCR quimérica sensible a la luz, el primer miembro de GPCR es melanopsina, en particular melanopsina humana o de ratón, y el segundo miembro de GPCR es mGluR6 humano o de ratón. De forma resumida, estas realizaciones de las proteínas GPCR quiméricas sensibles a la luz se denominan mGluR6-melanopsina.

Varias realizaciones para construir una mGluR6-melanopsina sensible a la luz se describen a continuación con más detalle. El alcance de la invención no se limita a estas realizaciones particulares. En algunas realizaciones, IL2, IL3 y CT derivan de mGluR6, mientras que el resto de la quimera deriva de melanopsina. En algunas otras realizaciones, los tres bucles intracelulares IL1 a IL3 y CT derivan de mGluR6 y todos los dominios transmembranarios y extracelulares derivan de melanopsina.

La **Figura 1** muestra esquemáticamente los dominios y la orientación a través de la membrana celular de una realización con el extremo N (NT), dominios transmembranarios (TM1-TM7) y bucles extracelulares 1-3 (EL1-EL3) de melanopsina y los bucles intracelulares 1-3 (IL1-IL3) y el extremo C (CT) de mGluR6. Se indican siete sitios de corte y empalme con las letras a-g. En principio, todos los sitios de corte y unión factibles para intercambiar bucles intracelulares de melanopsina con bucles intracelulares de mGluR6 están dentro del alcance de la invención.

La **Tabla 1** desvela varios sitios de corte y empalme particularmente satisfactorios para construir realizaciones de mGluR6-melanopsina, que se eligieron basándose en el alineamiento de secuencias y el modelado 3D y se encontró que eran funcionalmente activos. Existen diversas combinaciones de opciones de corte y empalme alternativas para la construcción de quimeras mGluR6-melanopsina funcionales y están dentro del alcance de la invención.

Sitios de corte y empalme-unión funcionales probados para mGluR6-melanopsina humana:

Sitio	Dominios adyacentes	Secuencia de aminoácidos en el sitio de corte y empalme-unión
a	TM 1 e IL1	Muchas posibilidades según la descripción
b	TM 2 e IL1	Muchas posibilidades según la descripción
c	TM 3 e IL2	Varias posibilidades probadas según la descripción
d	TM 4 e IL2	<u>FISPTSQVLLGVWL</u>
e	TM5 e IL 3	2 versiones probadas: I) según Seq. No. 2: YIFIFR <u>ARGVPETF</u> II) según Seq. No. 4: YIFIFRA <u>IKA</u> <u>RGVPETF</u>
f	TM6 e IL 3	<u>ETFNEAKIMLLVIL</u>
g	TM7 y extremo C	<u>IYAITHPEQNVQKR</u>

5 Para las realizaciones de la mGluR6-melanopsina quimérica, en donde IL2, IL3 y los dominios del extremo C de melanopsina se intercambian con los dominios correspondientes de mGluR6, se requiere el corte y empalme y unión de genes entre los dominios transmembranarios y los bucles intracelulares en los sitios numerados c a g según la Figura 1. Los sitios de corte y empalme d, e, f, g, que se indican en la Tabla 1, dan sustituciones de bucles que son funcionales como se prueba según el método del Ejemplo 1. Para el sitio de corte y empalme e, dos versiones de corte y empalme son funcionales y se enumeran en la tabla como las versiones I y II. Aunque los sitios de corte y empalme d, e, f, g según la Tabla 1 se recomiendan en particular, está dentro del alcance de la invención cualquier versión de corte y empalme que dé mGluR6-melanopsina sensible a la luz capaz de acoplar la activación por luz a la cascada de señalización de mGluR6.

10 Para el corte y empalme y la unión en el sitio c entre TM 3 e IL 2 existen varias opciones disponibles cuando se comparan las secuencias de aminoácidos de melanopsina y mGluR6. Cualquier versión de corte y empalme con secuencia de aminoácidos razonable y homología estructural 3D está dentro del alcance de la invención. Parece importante retener el sitio DRY entre TM3 e IL2, que es la secuencia de aminoácidos más conservados en proteínas GPCR. En particular, las variantes funcionales adicionales del sitio DRY incluyen DRIY, NRIY o NRY. Todas estas variantes dieron quimeras mGluR6-melanopsina funcionales en pruebas según el Ejemplo 1.

15 Para las realizaciones de la mGluR6-melanopsina quimérica en donde adicionalmente IL1 de melanopsina se intercambia por IL1 de mGluR6, también se requiere corte y empalme y unión del gen adicional entre los dominios transmembranarios TM1 y TM2 y el bucle intracelular IL1 en los sitios numerados en a y b según la Figura 1. La homología entre las secuencias de melanopsina y mGluR6 con respecto al porcentaje de aminoácidos conservados y principalmente con respecto a las predicciones estructurales de 3D es más baja en las regiones de corte y empalme y los sitios de unión a y b en comparación con los sitios c a g, que amplía la elección de los sitios óptimos de corte y empalme y unión. Las pruebas preliminares con realizaciones que comprenden IL1 derivada de mGluR6 dieron una quimera funcional y se espera que el intercambio óptimo de IL1 aumente el acoplamiento de proteínas G específicas de la proteína quimérica. Todos los sitios de corte y unión factibles para el intercambio de IL1 de melanopsina con IL1 de mGluR6 en consideración de sus secuencias de aminoácidos conservados están dentro del alcance de la invención.

20 Para las siguientes realizaciones a modo de ejemplo A - E de la proteína quimérica mGluR6-melanopsina, todo el gen de ADN y las secuencias de aminoácidos se enumeran con indicación de las secuencias codificantes correspondientes a los diversos dominios, tal como bucles intracelulares (IL) y extracelulares (EL), dominio del extremo N y C (NT, CT) y dominios transmembranarios (TM).

A: Realización de mGluR6-melanopsina humana con IL2(DRIY), versión I de corte y empalme de IL3 y CT derivado de mGluR6

Seq. No. 1: secuencia de ADN

35 Secuencia de ADN codificante de quimeras (usando genes humanos). Las áreas subrayadas codifican los dominios intracelulares de mGluR6 (IL2, IL3 (versión I de corte y empalme) y CT).

ES 2 766 398 T3

1-60 ATGAACCTCCTTCGGGGCCAAGAGTCCGCCCAGCCCAACCAAGAGCCAGCTGCATG
61-120 GCCACCCAGCACCACCCAGCTGGTGGGACAGCTCCAGAGCAGCATCTCCAGCCTGGGC
121-180 CGGCTTCCATCCATCAGTCCCACAGCACCTGGGACTTGGGCTGCTGCCTGGGTCCCCTC
181-240 CCCACGGTTGATGTTCCAGACCATGCCACTATACCCTGGGCACAGTGATCTTGCTGGT
241-300 GGA^{CT}CACGGGGATGCTGGGCAACCTGACGGTCATCTATACTTCTGCAGGAGCAGAAGC
301-360 CTCCGGACACCTGCCAACATGTTCAATTATCAACCTCGCGGTGAGCGACTTCTCATGTCC
361-420 TTCACCCAGGCCCTGTCTTCTTACCAGTAGCCTCTATAAGCAGTGGCTCTTTGGGGAG
421-480 ACAGGCTGCGAGTTCTATGCCTTCTGTGGAGCTCTCTTTGGCATTCTCCATGATACC
481-540 CTGACGGCCATCGCCCTGGACCGTATCTACCGCATCTTTGAGCAGGGCAAGCGCTCGGTC
541-600 ACACCCCTCCCTTCATCAGCCCCACCTCACAGGTCCTGCTGGGCGTTTGGCTCTATGCC
601-660 CTGGCCTGGAGTCTGCCACCCTTCTTCGGCTGGAGCGCCTACGTGCCGAGGGGTTGCTG
661-720 ACATCCTGCTCCTGGGACTACATGAGCTTACGCCGGCCGTGCGTGCCACCATGCTT
721-780 CTCTGCTGCTTCGTGTTCTTCCCTCTGCTTATCATCATCTACTGCTACATCTTCATC
781-840 TTCAGGGCCCGTGGCGTGCCCGAGACCTTCAACGAGGCCAAGATCATGCTGCTGGTCATC
841-900 CTCCTCTTCGTGCTCTCCTGGGCTCCCTATTCGGCTGTGGCCCTGGTGGCCTTTGCTGGG
901-960 TACGCACAGTCTGACACCCTACATGAGCTCGGTGCCAGCCGTATCGCCAAGGCCTCT
961-1020 GCAATCCACAACCCCATCATTTACGCCATCACCCACCCCGAGCAGAATGTGCAGAAGCGA
1021-1080 AAGCGGAGCCTCAAGGCCACCTCCACGGTGGCAGCCCCACCCAAGGGCGAGGATGCAGAG
1081-1092 GCCCACAAGTAG

Seq. No. 2: Secuencia de aminoácidos

Secuencia de péptidos quimérica (usando genes humanos). Las áreas subrayadas codifican los dominios intracelulares de mGluR6 (IL2 (DRIY), IL3 (versión I de corte y empalme) y CT). AA en negrita forman ELs y los restos Y y K enmarcados participan en la unión a cromóforo.

5

1-60 **MNPPSGPRVPPSPTQEPSCMATPAPPSWWDSSQSSISSLGRLPISPTAPGTWAAAWVPL**
61-120 **PTVDVDPDHAHYTLGTVILLVGLTGMLGNLTVIYTFCRSRSLRTPANMFIINLAVSDFLMS**
121-180 FTQAPVFFFTSSLY**KQWLFGETGCEFY**AFCGALFGISSMITLTAIALDRIYRIFEQGRSV
181-240 TPPPFISPTSQVLLGVWLYALAWSLPPFFGWSAYVPEGLLTSCSWDYMSFTPAVRAYTML
241-300 LCCFVFFLPLLIICYIFIFRARGVPETFNEAKIMLLVILLFVLSWAPYSAVALVAFAG
301-360 **YAHVLTPLYMSSVPAVIAK**ASAIHNPIIYAITHPEQNVQKRKRSKATSTVAAPPKGEDAE
361-363 AHK

B: Realización de mGluR6-melanopsina humana con IL2(DRIY), versión II de corte y empalme de IL3 y CT derivado de mGluR6

Seq. No. 3: secuencia de ADN

10 Secuencia de ADN codificante de quimeras (usando genes humanos). Las áreas subrayadas codifican los dominios intracelulares de mGluR6 (IL2, IL3 (versión II de corte y empalme) y CT).

ES 2 766 398 T3

1-60 ATGAACCTCCTTCGGGGCCAAGAGTCCCGCCAGCCCAACCAAGAGCCAGCTGCATG
 61-120 GCCACCCCAGCACCACCCAGCTGGTGGGACAGCTCCAGAGCAGCATCTCCAGCCTGGGC
 121-180 CGGCTTCCATCCATCAGTCCCACAGCACCTGGGACTTGGGCTGCTGCCTGGGTCCCCTC
 181-240 CCCACGGTTGATGTTCCAGACCATGCCACTATACCCTGGGCACAGTGATCTTGCTGGT
 241-300 GGA^{**CT**}CA^{**CG**}GGGATGCTGGGCAACCTGACGGTCATCTATACCTTCTGCAGGAGCAGAAGC
 301-360 CTCCGGACACCTGCCAACATGTTCA^{**TT**}ATCAACCTCGCGGTACGCGACTTCTCATGTCC
 361-420 TTCACCCAGGCCCTGTCTTCTTACCAGTAGCCTCTATAAGCAGTGGCTCTTTGGGGAG
 421-480 ACAGGCTGCGAGTTCTATGCCTTCTGTGGAGCTCTCTTTGGCATTTCCTCCATGATCACC
 481-540 CTGACGGCCATCGCCCTGGACCGTATCTACCGCATCTTTGAGCAGGGCAAGCGCTCGGTC
 541-600 ACACCCCTCCCTTCATCAGCCCCACCTCACAGGTCCTGCTGGGCGTTTGGCTCATGCC
 601-660 CTGGCCTGGAGTCTGCCACCTTCTTGGGCTGGAGCGCCTACGTGCCGAGGGGTTGCTG
 661-720 ACATCCTGCTCCTGGGACTACATGAGCTTACGCCGGCCGTGCGTGCCTACACCATGCTT
 721-780 CTCTGCTGCTTCGTGTTCTTCTCCCTCTGCTTATCATCATCTACTGCTACATCTTCATC
 781-840 TTCAGGGCCATCAAGGCCCGTGGCGTGCCCGAGACCTTCAACGAGGCCAAGATCATGCTG
 841-900 CTGGTCA^{**CT**}CCTCCTTCGTGCTCTCCTGGGCTCCCTATTCCGCTGTGGCCCTGGTGGCC
 901-960 TTTGCTGGGTACGCACACGCTCCTGACACCCCTACATGAGCTCGGTGCCAGCCGTCATCGCC
 961-1020 AAGGCCTCTGCAATCCACAACCCATCATTTACGCCATCACCCACCCCGAGCAGAATGTG
 1021-1080 CAGAAGCGAAAGCGGAGCCTCAAGGCCACCTCCACGGTGGCAGCCCCACCCAGGGCGAG
 1081-1101 GATGCAGAGGCCCAAGTAG

Seq. No. 4: Secuencia de aminoácidos

Secuencia de péptidos quimérica (usando genes humanos). Las áreas subrayadas codifican los dominios intracelulares de mGluR6 (IL2 (DRIV)), IL3 (versión II de corte y empalme) y CT). AA en negrita forman ELs y los restos Y y K enmarcados participan en la unión al cromóforo.

5

1-60 **MNPPSGPRVPPSPTQEPSCMATPAPPSWWDSSQSSISLGRLPISPTAPGTWAAAWVPL**
 61-120 **PTVDVDPDAH**YTLGTVILLVGLTGMLGNLTVIYTFCRSRSLRTPANMFIINLAVSDFLMS
 121-180 FTQAPVFF^{**T**}SSLY**KQWLFGETGCEFY**AF^{**C**}CGALFGISSMITLTAIALDRIVRIFEQGRSV
 181-240 TPPPFISPTSQVLLGWLYALAWSLPPFFGWSAYVPEGLLTSCSWDYMSFTPAVRAYTML
 241-300 LCCFVFLPLLI^{**Y**}YIFIFRAIKARGVPETFNEAKIMLLVILLFVLSWAPYSAVALVA
 301-360 **FAGYAHVLT**PMSSVPAVIA^{**K**}ASAIHNPIIYAITHPEONVQKRKRSKATSTVAAPPKGE
 361-366 DAEAHK

C: Realización de mGluR6-melanopsina humana con IL1, IL2(DRIV), versión I de corte y empalme de IL3 y CT derivado de mGluR6

Seq. No. 5: secuencia de ADN

10 Secuencia de ADN codificante de quimera (usando genes humanos). Las áreas subrayadas codifican los dominios intracelulares de mGluR6 (IL1, IL2, IL3 (versión I de corte y empalme) y CT).

ES 2 766 398 T3

1-60 ATGAACCTCCTTCGGGGCCAAAGAGTCCCGCCAGCCCAACCCAAGAGCCAGCTGCATG
 61-120 GCCACCCAGCACCACCCAGCTGCTGGGACAGCTCCCAGAGCAGCATCTCCAGCCTGGGG
 121-180 CGGCTTCCATCCATCAGTCCACAGCACCTGGGACTTGGGCTGCTGCCTGGGTCCCCTC
 181-240 CCCACGGTTGATGTTCCAGACCATGCCACTATACCCTGGGCACAGTGATCTTGCTGGTG
 241-300 GGA^{CT}CACGGGGATGCTGGGCAACCTGACGGTCATCTATACCTTCGTGCGGTACAACAAC
 301-360 ACGCCCATCGTCCGGGCCCTCGGGCCGAGAGCTCTTCATTATCAACCTCGCGGTACGCGAC
 361-420 TTCCTCATGTCTTACCCAGGCCCTGTCTTCTTACCAGTAGCCTCTATAAGCAGTGG
 421-480 CTCTTTGGGGAGACAGGCTGCGAGTTCTATGCCTTCTGTGGAGCTCTCTTTGGCATTCC
 481-540 TCCATGATCACCTGACGGCCATCGCCCTGGACCGTATCTACCGCATCTTTGAGCAGGGC
 541-600 AAGCGCTCGGTACACCCCCTCCCTTCATCAGCCCCACCTCACAGTCTCTGCTGGGCGTT
 601-660 TGGCTCTATGCCCTGGCCTGGAGTCTGCCACCTTCTTTCGGCTGGAGCGCCTACGTGCC
 661-720 GAGGGGTTGCTGACATCCTGCTCCTGGGACTACATGAGCTTACGCCGGCCGTGCGTGCC
 721-780 TACACCATGCTTCTCTGCTGCTTCGTGTTCTTCCCTCCTGCTTATCATCATCTACTGC
 781-840 TACATCTTATC TFCAGGGCCATCAAGGCCCGTGGCGTGCCCGAGACCTTCAACGAGGCC
 841-900 AAGATCATGCTGCTGGTACCTCCTCTTCGTGCTCTCCTGGGCTCCCTATTCCGCTGTG
 901-960 GCCCTGGTGGCCTTTGCTGGGTACGCACACGTCCTGACACCTTACATGAGCTCGGTGCCA
 961-1020 GCCGTACCGCCAAGGCCCTCTGCAATCCACAACCCCATCATTTACGCCATCACCCACCCC
 1021-1080 GAGCAGAATGTGCAGAAGCGAAAGCGGAGCCTCAAGGCCACCTCCACGGTGGCAGCCCCA
 1081-1113 CCCAAGGGCGAGGATGCAGAGGCCACAAGTAG

Seq. No. 6: Secuencia de aminoácidos

Secuencia de péptidos quimérica (usando genes humanos). Las áreas subrayadas codifican los dominios intracelulares de mGluR6 (IL1, IL2 (**DRIY**), IL3 (versión I corte y empalme) y CT). AA en negrita forman ELs y restos Y y K enmarcados participan en la unión al cromóforo.

1-60 **MNPPSGPRVPPSPTQEPSCMATPAPPSWWDSSQSSISLGRLPISPTAPGTWAAAWVPL**
 61-120 **PTVDVDPDAHHTLGTVILLVGLTGMLGNLTVIYTFVRYNNTPIVRASGRELFIINLAVSD**
 121-180 **FLMSFTQAPVFFTSSLYKQWLFGETGCEFYAFCGALFGISSMITLTAIALDRIYRIFEQG**
 181-240 **KRSVTPPPFISPTSQVLLGVWLYALAWSLPPFFGWSAYVPEGLLTS^WSDYMSFTPAVRA**
 241-300 **YTMLLCCFVFLPLLIHCYIFIFRAIKARGVPETFNEAKIMLLVILLFVLSWAPYSAV**
 301-360 **ALVAFAGYAHVLT^PYMSSVPAVIAKASAIHNPIIYAI^HTHPEQNVQKRKRSLKATSTVAAP**
 361-370 **PKGEDAEAHK**

D: mGluR6-melanopsina de ratón (según realización A) con IL2(DRIY), versión I de corte y empalme de IL3 y CT derivado de mGluR6

Seq. No. 7: secuencia de ADN

10 Secuencia de ADN codificante de quimeras (usando genes de ratón). Las áreas subrayadas codifican los dominios intracelulares de mGluR6 (IL2, IL3 (versión I de corte y empalme) y CT).

1-60 ATGGA^{CT}CTCCTTCAGGACCAAGAGTCTTGCAAGCTTAACTCAGGATCCAGCTTCA
 61-120 ACCAGTCC^TGGCC^TGCAAGGCATTTGGAACGGCACTCAGAACGCTCTCCGTAAGAGCCAG
 121-180 CTTCTCTCTGTTAGCCCCACGACATCTGCACATCAGGCTGCTGCCTGGGTCCCCTTCCC
 181-240 ACAGTCGATGTCCAGACCATGCTCACTATACCCTAGGCACGGTGATCCTGCTGGTGGGA
 241-300 CTCACAGGGATGCTGGGCAATCGACGGTCATCTACACCTTCTGCAGGAACAGAGGCCTG
 301-360 CGGACACCAGCAAACATGTTATCATCAACCTCGCAGTCAGCGACTTCCATGTCA^{CT}
 361-420 ACTCAGGCCCCGGTCTTCTTTGCCAGCAGCCTCTACAAGAAGTGGCTCTTTGGGGAGACA
 421-480 GGTTGCGAGTTCTATGCCCTTCTCGGGGCTGTCTTTGGCATCACTTCCATGATCACCCCTG
 481-540 ACAGCCATAGCCATGGACCGCATCTACCGCATTTTCGAGCAAGGGAAGCGCTCTGTCAGC
 541-600 CCGCCACCTTCTATCAGCCCCACCTCGCAGGTCTCTGCTAGGCCGTCTGGCTTTATGCCCTG
 601-660 GCCTGGAGTCTGCCACCTTCTTTGGTGGAGTGCCTACGTGCCCGAGGGGCTGCTGACA
 661-720 TCCTGCTCCTGGGACTACATGACCTTACACCCCCAGGTGCGTGCCTACACCATGCTGCTC
 721-780 TTCTGCTTTGCTCTTCTTCCCTCCCTGCTCATCATCTTCTGCTACATCTTCATCTC
 781-840 AGGGCCCGAGGTGTGCCAGAGACCTTCAATGAAGCCAAGTGC^{CT}GACTGATTGTCACTTCT
 841-900 CTCTTCGTGCTGTCTGGGCTCCCTACTCCACTGTGGCTCTGGTGGCCTTTGCTGGATAC
 901-960 TCGCACATCCTGACGCCCTACATGAGCTCGGTGCCAGCCGTATCGCCAAGGCTTCTGCC
 961-1020 ATCCACAATCCCATTATCTACGCCATCACTACCCCCAGCAGAAGCGTGCAGAAGCGGAAG
 1021-1080 CGCAGCCTCAAGAAGACCTCCACGATGGCGGCCCCGCCCAAGAGCGGAGA^{CT}CTCAGAGGAC
 1081-1089 GCCAAGTAG

Seq. No. 8: Secuencia de aminoácidos

ES 2 766 398 T3

Secuencia de péptidos quimérica (usando genes de ratón). Las áreas subrayadas codifican los dominios intracelulares de mGluR6 (IL2 (DRYI)), IL3 (versión I de corte y empalme) y CT). AA en negrita forman ELs y los restos Y y K enmarcados participan en la unión al cromóforo.

```

1-60      MDSPSGPRVLSLTDQPSFTTSPALQGIWNGTQNVSVRAQLLSVSPTTSAHQAAAWVPPF
61-120   TVDVPDHAHYTLGTVILLVGLTGMLGNLTVIYTFCRNRGLRTPANMFIINLAVSDFLMSV
121-180  TQAPVFFASSLYKKWLFGETGCEFYAFCGAVFGITSMITLTAIAMDRYRIFEQGRSVT
181-240  PPPFISPTSQVLLGVWLYALAWSLPPFFGWSAYVPEGLLTSCSWDYMTFTFPQVRAYTMLL
241-300  FCFVFFLPLLIIFCYIFIFRARGVPETFNEAKVALIVILLFVLSWAPYSTVALVAFAGY
301-360  SHILTPYMSSVPAVIAKASAIHNPIIYAITHPEQNVQKRKRSLKKTSTMAAPPKSENSED
361-362  AK
  
```

5 **E: mGluR6-melanopsina de ratón (según realización C) con IL1, IL2(DRIY), versión I de corte y empalme de IL3 y CT derivado de mGluR6**

Seq. No. 9: secuencia de ADN

Secuencia de ADN codificante de quimeras (usando genes de ratón). Las áreas subrayadas codifican los dominios intracelulares de mGluR6 (IL1, IL2, IL3 (versión I de corte y empalme) y CT).

```

1-60      ATGGACTCTCCTCAGGACCAAGAGTCTTGTCAAGCTTAACCTCAGGATCCCAGCTTCACA
61-120   ACCAGTCTGCCCTGCAAGGCATTTGGAACGGCACTCAGAACGTCTCCGTAAGAGGCCAG
121-180  CTTCTCTCTGTAGCCCCACGACATCTGCACATCAGGCTGCTGCCTGGGTCCTCCCTCC
181-240  ACAGTCGATGTCCAGACCATGCTCACTATACCTAGGACGGTGATCCTGCTGGTGGGA
241-300  CTCACAGGGATGCTGGGCAATCTGACGCTACCTACACCTTCATGGCAGACACAACGACACT
301-360  CCCATAGTCCGCGCCTCTGGCCGTGAGCTTTTCATCATCAACCTCGCAGTCAGCGACTTC
361-420  CTCATGTCAGTCACTCAGGCCCGGCTTTCTTTGCCAGCAGCCTTACAAGAAGTGGGTC
421-480  TTTGGGGAGACAGGTTGCGAGTTCATGCTTCTGCGGGGGTGTCTTTGGCATCACTTCC
481-540  ATGATCACCCCTGACAGCCATAGCCATGGACCGCATCTACCCGATTTTCGAGCAAGGGAAG
541-600  CGCTCTGTCACGGCCGCCACCCCTTCATCAGCCCCACCTCGCAGTCTCGTAGGCSTCTGG
601-660  CTTTATGCCCTGGCCTGGAGTCTGCCACCTTTCTTTGGTTGGAGTGCCTACGTGCCCGAG
661-720  GGGCTGCTGACATCCTGCTCCTGGGACTACATGACCTTACACCCAGGTGGTGCCTAC
721-780  ACCATGCTGCTCTTCTGCTTTGCTTCTTCTCCCTGCTCATCATCTTCTGCTAC
781-840  ATCTTCATCTCAGGGCCGAGGTTGCCAGAGACCTCAATGAAGCCAAGGTCGCATG
841-900  ATTGTCATTCTCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
901-960  TTTGCTGGATACTCGCACATCCTGACGCCCTACATGAGCTCGGTGCCAGCGCTATCGCC
961-1020 AAGGCTTCTGCCATCCACAATCCCAATTATCTACGCCATCACTCACCCCGAGCAGAACGTC
1021-1080 CAGAAGCGGAAGCGCAGCCTCAAGAAGACCTCCACGATGGCGGCCCGCCCAAGAGCGAG
1081-1101 AACTCAGAGGACGCCAAGTAG
  
```

10

Seq. No. 10: Secuencia de aminoácidos

Secuencia de péptidos quimérica (usando genes de ratón). Las áreas subrayadas codifican los dominios intracelulares de mGluR6 (IL1, IL2 (DRIY)), IL3 (versión I de corte y empalme) y CT). AA en negrita forman ELs y los restos Y y K enmarcados participan en la unión al cromóforo.

```

1-60      MDSPSGPRVLSLTDQPSFTTSPALQGIWNGTQNVSVRAQLLSVSPTTSAHQAAAWVPPF
61-120   TVDVPDHAHYTLGTVILLVGLTGMLGNLTVIYTFMRHNDTPIVRASGRELFIIINLAVSDF
121-180  LMSVTQAPVFFASSLYKKWLFGETGCEFYAFCGAVFGITSMITLTAIAMDRYRIFEQGR
181-240  RSVTPPPFISPTSQVLLGVWLYALAWSLPPFFGWSAYVPEGLLTSCSWDYMTFTFPQVRAY
241-300  TMLLFCFVFFLPLLIIFCYIFIFRARGVPETFNEAKVALIVILLFVLSWAPYSTVALVA
301-360  FAGYSHILTPYMSSVPAVIAKASAIHNPIIYAITHPEQNVQKRKRSLKKTSTMAAPPKSE
361-366  NSEDAK
  
```

15

Ejemplos que documentan la activación por luz a la cascada de señalización de mGluR6 por una proteína GPCR quimérica de mGluR6 a modo de ejemplo, en particular por una proteína quimérica mGluR6-melanopsina a modo de ejemplo:

20

En estos primeros experimentos, se realiza un análisis funcional de la quimera mGluR6-melanopsina en células renales embrionarias humanas cultivadas (células HEK293) que expresan establemente un canal de potasio GIRK:

25

Este experimento prueba el acoplamiento funcional de la activación por luz de la quimera según la realización a modo de ejemplo D (Seq. No. 7 / 8) a canales GIRK en células HEK293, una capacidad conocida de mGluR6 funcionalmente activado y requiere la expresión de realizaciones de mGluR6-melanopsina sensible a la luz en células renales embrionarias humanas cultivadas (células HEK293) que expresan establemente un canal de potasio GIRK (células HEK293-GIRK).

En las células HEK293-GIRK, mGluR6 se acopla intracelularmente mediante una proteína G al canal de potasio Kir3.1/3.2 heteromérico (canal GIRK). Por tanto, la satisfactoria activación por luz de la quimera mGluR6-

melanopsina puede ser indirectamente mostrada mediante la activación de canales GIRK, dando corrientes de K⁺ medibles en experimentos electrofisiológicos, como se muestra en la Fig. 2 y la Fig. 3.

5 La **Figura 2** muestra respuestas de corrientes a células completas a rampas de tensión de 1 s entre -150 y +60 mV registradas a partir de células HEK293-GIRK transfectadas con la quimera según realización a modo de ejemplo D (Seq. No. 7 / 8). Cuando la quimera de mGluR6-melanopsina se activa por luz azul (473 nm) (trazo gris oscuro), se activan los canales GIRK. Las corrientes se midieron en ausencia de luz (sin activación de mGluR6-melanopsina, triángulos gris claros) y en presencia de luz (con activación de mGluR6-melanopsina, círculos gris oscuros). El diferencial se muestra como una línea negra gruesa y representa la relación entre corriente-tensión de los canales de GIRK.

10 La **Figura 3** muestra los resultados de experimentos de pinzamiento zonal de células completas en células HEK293-GIRK transfectadas con la misma realización de la quimera de mGluR6-melanopsina según la realización a modo de ejemplo D (Seq. No. 7 / 8). Las corrientes K⁺ salientes a través de los canales de GIRK llegan a ser visibles como corrientes hiperpolarizantes durante el periodo de iluminación a 473.

15 Los resultados mostrados en las Fig. 2 y Fig. 3 realizados con la quimera mGluR6-melanopsina según realización a modo de ejemplo D (Seq. No. 7 / 8) muestran:

- La parte de melanopsina extracelular de la quimera se activa por luz azul y se apaga cuando la luz azul se apaga.
- La parte de mGluR6 intracelular de la quimera se acopla satisfactoriamente mediante una proteína G a los canales de potasio GIRK, de manera que se mide una corriente de K⁺ saliente durante la estimulación con luz, que muestra cinética típica de canales GIRK.

Por tanto, se llega a la conclusión de que la quimera mGluR6-melanopsina es funcional.

25 Se pueden aplicar métodos terapéuticos génicos como se conocen en la técnica para la expresión de la proteína quimérica GPCR sensible a la luz capaz de acoplar la activación por luz a la cascada de señalización de mGluR6. A continuación se describen dos métodos particulares, transducción y electroporación de rAAV, pero la invención no se limita a estos métodos particulares a modo de ejemplo:

La transducción de rAAV es un primer ejemplo de un enfoque aplicable conocido en la técnica:

30 Primero, se perfora cuidadosamente la esclerótica con una aguja hipodérmica y entonces se inyecta por vía subretiniana (Pang JJ et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 49(10):4278-83, 2008) o por vía intravítrea (más segura y probablemente más eficiente - Park et al. Gene Ther 16(7): 916-926, 2009) en el ojo aproximadamente 1 microlitro de rAAV (correspondiente a aproximadamente 10¹⁰ copias de genoma). Después de aproximadamente 4 semanas, se expresa la quimera y se pueden realizar experimentos electrofisiológicos/morfológicos.

Las lanzaderas de rAAV para administración génica mantienen varias ventajas terapéuticas génicas:

35 a) rAAV2s son actualmente los vectores más satisfactorios para terapia génica, muestran inmunogenicidad mínima (Buch PK et al., Gene Ther 15:849-857, 2008).

40 b) Existen varios serotipos con diferente especificidad por célula. La fenilalanina de la cápside (F) para mutaciones de tirosina (F) de serotipo 8 {rAAV2/8 (Y733F)} y serotipo 2 {rAAV2/2 (Y252,272,444,500,704,730F)} son actualmente las lanzaderas de rAAV más prometedoras para transducir células retinianas internas (Pang JJ et al. Gen Ther 19(2):234-242, 2011; Petrs-Silva H et al., Mol Ther 19(2): 293-301, 2011).

c) La administración de rAAV da como resultado la expresión de ADN a largo plazo (varios años o incluso permanentemente) - es suficiente un único tratamiento con rAAV, no es necesario volver a aplicar.

d) La localización de ADN en células bipolares ENCENDIDAS se puede lograr, por ejemplo, por:

45 I) el serotipo de rAAV (rAAV2/8 y rAAV2/2 son actualmente los más prometedores para células retinianas internas),

II) direccionamiento de receptor de rAAV de proteínas bipolares ENCENDIDAS específicas de la superficie celular (es decir, nictalopina, mGluR6, TRPM12),

50 III) promotor o secuencia potenciadora/promotora de célula bipolar ENCENDIDA específica (se usan comúnmente promotores de mGluR6 y mGluR6/sv40, alternativamente la secuencia promotora/potenciadora deriva de la de Ggamma13, la de nictalopina o la de TRPM12),

IV) la presencia de la proteína G específica de mGluR6 G-alfa(o) exclusivamente en células bipolares ENCENDIDAS, así que solo las células bipolares ENCENDIDAS pueden acoplar eficazmente mGluR6 a su cascada enzimática.

5 La electroporación es un segundo ejemplo de un enfoque aplicable conocido en la técnica: se disuelven ADNs que codifican la proteína quimérica bajo el control de un promotor específico de célula bipolar ENCENDIDA en una solución salina estéril y se inyectan por vía subretiniana. La inyección va seguida por la aplicación de impulsos de tensión transretiniana usando un electrodo detrás de la retina y uno enfrente de la retina. La polaridad de las etapas de tensión es positiva en el lado de la célula ganglionar y negativa en el lado del fotorreceptor. Los impulsos de tensión actúan para permeabilizar temporalmente la membrana celular, mientras que al mismo tiempo tira del ADN negativamente cargado hacia el polo positivo y en las células retinianas (Lagali PS et al. Nat Neurosci. 11(6):667-75, 2008, Matsuda T y Cepko CL, PNAS 101(1):16-22, 2004).

10 Los siguientes ejemplos documentan la transducción de rAAV y la expresión de ADN que codifica una proteína quimérica GPCR sensible a la luz a modo de ejemplo capaz de acoplar la activación por luz a la cascada de señalización específicamente en células bipolares ENCENDIDAS de ratón, y en particular de transducción y expresión de ADN que codifica una proteína quimérica de mGluR6-melanopsina a modo de ejemplo:

15 En una primera serie del experimento, se prueba si el gen quimérico mGluR6-melanopsina según la realización a modo de ejemplo D (Seq. No. 8) se administra en las células bipolares ENCENDIDAS de la retina de ratón usando virus recombinante adenoasociado mutado en la cápside de tirosina rAAV2/8(Y733F) y rAAV2/2(Y252, 272,444,500,704,730F).

20 Este experimento también prueba si la expresión de células bipolares ENCENDIDAS específicas de mGluR6-melanopsina (realización D de quimera) se logra usando el elemento del promotor del potenciador sv40 de mGluR6 (Kim DS et al., J Neurosci 28(31):7748-64, 2008).

25 Los resultados se muestran en la **Figura 4** y documentan la transducción satisfactoria y específica de mGluR6-melanopsina de células bipolares ENCENDIDAS de bastones y conos de ratón usando un vector mutante de la cápside de rAAV2/2 seis semanas después de la administración subretiniana o intravítrea, como se detalla a continuación:

30 Una sección a través de una retina de ratón transducida con PRmGluR6/sv40-"mGluR6-melanopsina"-IRES-TurboFP635 usando un vector de rAAV2/2 que contiene seis mutaciones de fenilalanina (F) de la cápside por tirosina (F) (Y252,272,444,500,704,730F; Petrs-Silva H et al., Mol Ther 19(2): 293-301, 2011). El virus se inyectó por vía subretiniana seis semanas antes del análisis anatómico. La expresión del transgén (mGluR6-melanopsina) y el indicador (TurboFP635) fue conducida por el promotor del elemento basal del potenciador sv40 de mGluR6 (Kim DS et al., J Neurosci 28(31):7748-64, 2008). En el primer panel, la tinción nuclear con DAPI muestra la capa nuclear externa (ONL), la capa nuclear interna (INL) y la capa de células ganglionares (GCL) de la retina. En el segundo panel, todas las células bipolares ENCENDIDAS de bastones se marcaron usando un anticuerpo PKC Alfa. El último panel (rAAV) muestra el gen indicador TurboFP635, y, por tanto, indica la satisfactoria transducción con la construcción PRmGluR6/sv40-"mGluR6-melanopsina"-IRES-TurboFP635.

35 Cinco células bipolares ENCENDIDAS de bastones muestran marcado indicador (puntas de flecha sólidas), mientras que cuatro células adicionales marcadas dentro del INL probablemente indican células bipolares ENCENDIDAS de conos (puntas de flecha abiertas). Esto es la prueba de principio de que la proteína activable por luz mGluR6-melanopsina se puede introducir y expresar específicamente en las células diana (células bipolares ENCENDIDAS) usando vectores de rAAV, que son admitidos para tratamiento terapéutico génico clínico en el ojo humano (Jacobson S et al., Arch Ophthalmol 298v1-16, 2011). La barra de escala indica 10 μ m.

40 Se pueden aplicar métodos electrofisiológicos como se conocen en la técnica para probar la función apropiada de la mGluR6-melanopsina expresada en células bipolares ENCENDIDAS retinianas de ratones rd1 (Pde6b^{rd1}) FVB/N ciegos.

45 Por tanto, en una segunda serie de experimentos, un análisis funcional de la quimera mGluR6-melanopsina en la retina de ratón muestra *ex vivo* que la mGluR6-melanopsina introducida en las células bipolares ENCENDIDAS de la retina de un ratón rd1 ciego (sin fotorreceptores) convierte la retina en sensible a la luz.

50 La **Figura 5** muestra tres ejemplos de respuestas a la luz de diferentes tipos de células ganglionares en montajes completos de retina de ratones rd1 ciegos, que han sido tratados con rAAVs que contienen el gen de mGluR6-melanopsina (realización D de quimera Seq. No. 7):

En particular, se registraron las respuestas a la luz de las células ganglionares retinianas en la retina de ratón rd1 de nueve semanas de edad (retina sin células fotorreceptoras), un mes después de introducir mGluR6-melanopsina en las células bipolares ENCENDIDAS retinianas usando un vector de rAAV como se detalló a continuación:

55 Se muestran las respuestas extracelulares de tres tipos de células, una célula ENCENDIDA transitoria (A), una célula APAGADA transitoria (B) y una célula ENCENDIDA sostenida (C). Los gráficos de trama a continuación de

cada trazo (D-F) demuestran que fueron reproducibles las respuestas a la luz al mismo estímulo de luz. Se proyectó luz de 465 nm sobre los montajes completos retinianos durante la duración indicada en gris a continuación de los trazos extracelulares.

5 Y se observa que es poco probable que la respuesta sostenida (B) sea la de una célula ganglionar de melanopsina, que son conocidas por tener una aparición máxima significativamente más lenta (>2,5 s; Schmidt TM et al., Neurophysiol 100(1):371-84, 2008) en ausencia de la entrada de fotorreceptor.

Así, los resultados mostrados en la Figura 5 documentan que la mGluR6-melanopsina expresada en células bipolares ENCENDIDAS es capaz de restaurar la sensibilidad a la luz en la retina ciega.

En resumen, las Figuras 4 y 5 muestran que:

- 10 - rAAVs, que son admitidos para el tratamiento terapéutico génico clínico en el ojo humano (Jacobson S et al., Arch Ophthalmol 298v1-16, 2011), son capaces de suministrar el gen mGluR6-melanopsina a las células bipolares ENCENDIDAS.
- 15 - Se puede usar el serotipo de rAAV, las mutaciones de las cápsides de rAAV y los elementos promotores/potenciadores específicos de célula para dirigir específicamente células bipolares ENCENDIDAS para la expresión de mGluR6-melanopsina.
- La mGluR6-melanopsina expresada es funcional y convierte una retina ciega en sensible a la luz.

Por tanto, se llega a la conclusión de que la mGluR6-melanopsina es funcional en sus células diana, las células bipolares de la retina.

20 Un fotosensor óptimo para células bipolares ENCENDIDAS debe dar una gran diferencial de respuesta a la luz. La mGluR6-melanopsina hiperpolariza las células bipolares ENCENDIDAS tras la estimulación con luz, a diferencia de la canalrodopsina, que es despolarizante. Puesto que las células bipolares ENCENDIDAS en un ratón rd1 ciego están ya en un estado adaptado a la luz (despolarizado), la activación con luz de mGluR6-melanopsina da como resultado un gran diferencial de respuesta a la luz.

25 La **Figura 6** muestra que la retina de un ratón rd1 (Pde6b^{rd1}) FVB/N ciego adaptado a la oscuridad está en un estado adaptado a la luz.

Los paneles A - D muestran secciones a través de la retina de ratón de ratones ciegos y no mutantes inmunomarcados con el anticuerpo de conejo anti-Rab1A para mostrar que la retina adaptada a la oscuridad de un ratón rd1 ciego está de hecho en un estado "adaptado a la luz" (despolarizado), que corresponde al estado "adaptado a la luz" de una retina no mutante. El anticuerpo anti-Rab1A marca células bipolares ENCENDIDAS de la retina interna (capa nuclear interna (INL), terminales en la capa de células ganglionares (GCL)) y su nivel de expresión depende, en una retina sana, de la intensidad de la luz ambiente (Huang W et al., J Vis Neurosci 26(5-6):443-452, 2009). Como era de esperar, el inmunomarcado con anti-Rab1A (estructuras negras) solo fue visible en la retina de ratón no mutante (BL6) adaptada a la luz (B) y no en la adaptada a la oscuridad (A). Sin embargo, los niveles de expresión de anti-Rab1A fueron idénticos en retinas rd1 adaptadas a la oscuridad (C) y adaptadas a la luz (D), faltando la capa nuclear externa (ONL) que contiene los fotorreceptores, y los niveles de expresión de anti-Rab1A fueron similares a la retina de BL6 sanos adaptados a la luz.

35 Así, se llega a la conclusión de que la retina rd1 de un ratón ciego está permanentemente en un estado adaptado a la luz (despolarizado). El sensor de luz óptimo debe, por tanto, hiperpolarizar las células bipolares ENCENDIDAS tras la estimulación con luz para garantizar una gran diferencial de señal de luz, y así hace la mGluR6-melanopsina. Los tiempos de exposición para la obtención de imágenes de todos los paneles fueron idénticos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Haag-Streit Medtech AG

<120> Proteína GPCR quimérica sensible a la luz

45

<130> P167886EP01

<150>US 61/500.863

<151> 24-06-2011

ES 2 766 398 T3

<160> 10

<170>BISSAP 1.0

5

<210> 1

<211> 1092

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10

<220>

<221> fuente

<222> 1..1092

<223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Homo sapiens"

15

<400> 1

```

atgaaccctc cttcggggcc aagagtcccg cccagcccaa cccaagagcc cagctgcatg      60
gccaccccag caccaccag ctggtgggac agctcccaga gcagcatctc cagcctgggc      120
cggcttccat ccatcagtc cccagcacct gggacttggg ctgctgcctg ggtccccctc      180
cccacgggtg atgttccaga ccatgccac tataccctgg gcacagtgat cttgctggtg      240
ggactcacgg ggatgctggg caacctgacg gtcactata ccttctgcag gagcagaagc      300
ctccggacac ctgccaacat gttcattatc aacctcggg tcagcgactt cctcatgtcc      360
ttcaccaggg cccctgtott cttcaccagt agcctctata agcagtggtt ctttggggag      420
acaggctgcg agttctatgc cttctgtgga gctctctttg gcatttcctc catgatcacc      480
ctgacggcca tcgccctgga ccgtatctac cgcacttttg agcagggcaa gcgctcggtc      540
acaccccctc ccttcatcag ccccacctca caggtcctgc tgggcgtttg gctctatgcc      600
ctggcctgga gtctgccacc cttcttcggc tggagcgctt acgtgccca ggggttgctg      660
acatcctgct cctgggacta catgagcttc acgcccggcg tgcgtgcta caccatgctt      720
ctctgctgct tcgtgttctt cctccctctg cttatcatca tctactgcta catcttcatc      780
ttcagggccc gtggcgtgcc cgagacctc aacgaggcca agatcatgct gctggtcatc      840
ctcctcttcg tgctctcctg ggctccctat tccgctgtgg ccctgggtgc ctttgctggg      900
taogcacacg tcctgacacc ctacatgagc tcggtgccag ccgtcatcgc caaggcctct      960
gcaatccaca accccatcat ttacgccatc accaccccg agcagaatgt gcagaagcga     1020
aagcggagcc tcaaggccac ctccacggtg gcagcccac ccaagggcga ggatgcagag     1080
gcccacaagt ag                                           1092

```

ES 2 766 398 T3

<210> 2

<211> 363

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..363

<223> /tipo_mol="proteína" /organismo="Homo sapiens"

10

<400> 2

```

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

```


ES 2 766 398 T3

<210> 3

<211> 1101

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5

<220>

<221> fuente

<222> 1..1101

<223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Homo sapiens"

10

<400> 3

```
atgaaccctc cttcggggcc aagagtcccg cccagcccaa cccaagagcc cagctgcatg      60
gccaccccag caccaccag ctggtgggac agctcccaga gcagcatctc cagcctgggc      120
cggcttccat ccatcagtcc cacagcacct gggacttggg ctgctgcctg ggtccccctc      180
cccacggttg atgttccaga ccatgcccac tataccctgg gcacagtgat cttgctggtg      240
ggactcacgg ggatgctggg caacctgacg gtcattctata ccttctgcag gagcagaagc      300
ctccggacac ctgccaacat gttcattatc aacctcgcgg tcagcgcact cctcatgtcc      360
ttcaccagcgg cccctgtctt cttcaccagt agcctctata agcagtggct ctttggggag      420
acaggctcgc agttctatgc cttctgtgga gctctctttg gcatttcctc catgatcacc      480
ctgacggcca tcgccctgga ccgtatctac cgcattcttg agcagggcaa gcgctcggtc      540
acacccccctc ccttcacag ccccacctca caggctcctgc tgggcggttg gctctatgcc      600
ctggcctgga gtctgccacc cttcttcggc tggagcgcct acgtgccga ggggttgctg      660
acatcctgct cctgggacta catgagcttc acgcggcccg tgcgtgccta caccatgctt      720
ctctgctgct tcgtgttctt cctccctctg cttatcatca tctactgcta catcttcac      780
ttcagggcca tcaaggcccg tggcgtgccc gagacctca acgaggcca gatcatgctg      840
ctggctcatcc tcctcttctg gctctcctgg gctccctatt ccgctgtggc cctggtggcc      900
tttctgctggt acgcacacgt cctgacacct tacatgagct cggtgccagc cgtcatcgcc      960
aaggcctctg caatccacaa ccccatcatt tacgccatca cccaccccga gcagaatgtg     1020
cagaagcgaag agcggagcct caaggccacc tccacggtgg cagccccacc caagggcgag     1080
gatgcagagg cccacaagta g                                     1101
```

<210> 4

15

<211> 366

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..366

<223> /tipo_mol="proteína" /organismo="Homo sapiens"

5

<400> 4

```

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

```

10

<210> 5

<211> 1113

<212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 766 398 T3

<220>

<221> fuente

<222> 1..1113

<223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Homo sapiens"

5

<400> 5

```
atgaaccctc cttcggggcc aagagtcccg cccagcccaa cccaagagcc cagctgcatg      60
gccaccccag caccaccag ctggtgggac agctcccaga gcagcatctc cagcctgggc      120
cggttccat ccatcagtcc cacagcacct gggacttggg ctgctgcctg ggtccccctc      180
cccacgggtg atgttccaga ccatgcccac tataccctgg gcacagtgat cttgctggtg      240
ggactcacgg ggatgctggg caacctgacg gtcactata ccttcgtgcg gtacaacaac      300
acgcccacg tccgggctc gggccgagag ctcttcatta tcaacctcgc ggtcagcgac      360
ttcctcatgt ccttcacca ggcccctgtc ttcttcacca gtagcctcta taagcagtgg      420
ctctttgggg agacaggctg cgagttctat gccttctgtg gagctctctt tggcatttcc      480
tccatgatca ccctgacggc catcgccctg gaccgtatct accgcatctt tgagcagggc      540
aagcgctcgg tcacaccccc tcccttcacg agccccact cacaggctct gctgggcggt      600
tggctctatg ccctggcctg gagtctgcca cccttcttcg gctggagcgc ctacgtgccc      660
gaggggttgc tgacatcctg ctctctgggac tacatgagct tcacgccggc cgtgcgtgcc      720
tacaccatgc ttctctgctg cttcgtgttc ttctccctc tgcttatcat catctactgc      780
tacatcttca tcttcagggc catcaaggcc cgtggcgtgc ccgagacctt caacgaggcc      840
aagatcatgc tgctggtcac cctcctcttc gtgctctcct gggctcccta ttccgctgtg      900
gccctggtgg cctttgctgg gtacgcacac gtcctgacac cctacatgag ctcggtgcca      960
gccgtcatcg ccaaggcctc tgcaatccac aaccocatca tttacgcat caccacccc     1020
gagcagaatg tgcagaagcg aaagcggagc ctcaaggcca cctccacggt ggcagcccca     1080
cccaaggcgg aggatgcaga ggcccacaag tag                                     1113
```

10

<210> 6

<211> 370

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..370

<223> /tipo_mol="proteína" /organismo="Homo sapiens"

<400> 6

```

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

```

5

<210> 7

<211> 1089

<212> ADN

<213> Mus sp.

10

<220>

<221> fuente

<222> 1..1089

ES 2 766 398 T3

<223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Mus <ratón, género>"

<400> 7

atggactctc cttcaggacc aagagtcttg tcaagcttaa ctccaggatcc cagcttcaca 60
accagtcctg ccctgcaagg catcttgaac ggcactcaga acgtctccgt aagagcccag 120
cttctctctg ttagccccac gacatctgca catcaggctg ctgcctgggt ccccttcccc 180
acagtcgatg tcccagacca tgctcactat accctaggca cggatgatcct gctgggtggga 240
ctcacagga tgctgggcaa tctgacggtc atctacacct tctgcaggaa cagaggcctg 300
cggacaccag caaacatggt catcatcaac ctccagctca gcgacttcct catgtcagtc 360
actcaggccc cggctcttct tgccagcagc ctctacaaga agtggctctt tggggagaca 420
ggttgcgagt tctatgcctt ctgcggggct gtctttggca tcacttccat gatcaccctg 480
acagccatag ccatggaccg catctaccgc attttcgagc aaggaagcg ctctgtcacg 540
5 ccgccacct tcatcagccc cacctcgcag gtcctgctag gcgtctggct ttatgcctg 600
gcctggagtc tgccacctt ctttggttgg agtgcctacg tgcccagggg gctgctgaca 660
tctgctcct gggactacat gaccttcaca ccccaggtgc gtgcctacac catgctgctc 720
ttctgcttg tcttcttct cccctgctc atcatcatct tctgctacat ctcatcttc 780
agggcccag gtgtgccaga gaccttcaat gaagccaagg tcgactgat tgtcattctt 840
ctcttcgtgc tgtcctgggc tccctactcc actgtggctc tggggcctt tgctggatac 900
tcgcacatcc tgacgcccta catgagctcg gtgccagccg tcatcgccaa ggcttctgcc 960
atccacaatc ccattatcta cgccatcact caccctcagc agaacgtgca gaagcggag 1020
cgcagcctca agaagacctc cacgatggcg gccccccca agagcgagaa ctccagggac 1080
gccaagtag 1089

<210> 8

<211> 362

10 <212> PRT

<213> Mus sp.

<220>

<221> FUENTE

15 <222> 1..362

<223> /tipo_mol="proteína" /organismo="Mus <ratón, género>"

<400> 8

ES 2 766 398 T3

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

<210> 9

5 <211> 1101

<212> ADN

<213> Mus sp.

<220>

10 <221> fuente

<222> 1..1101

<223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Mus <ratón, género>"

<400> 9

ES 2 766 398 T3

```

atggactctc cttcaggacc aagagtcttg tcaagcttaa ctcaggatcc cagcttcaca      60
accagtcctg ccctgcaagg catttggaac ggcactcaga acgtctccgt aagagcccag     120
cttctctctg ttagccccac gacatctgca catcaggctg ctgcctgggt ccccttcccc     180
acagtcgatg tcccagacca tgctcaactat accctaggca cggtgatcct gctggtggga     240
ctcacagga tgctgggcaa tctgacggtc atctacacct tcatgcgaca caacgacact     300
cccatagtcc ggcctctggt ccgtgagctt ttcacatca acctcgagc cagcgacttc     360
ctcatgtcag tcaactcaggc cccggtcttc tttgccagca gcctctaaa gaagtggctc     420
tttggggaga caggttgcca gttctatgcc ttctgcgggg ctgtctttgg catcacttcc     480
atgatcacc tgacagccat agccatggac cgcactacc gcattttcga gcaaggaag      540
cgctctgtca cgccgccacc ctcatcagc cccacctgc aggtcctgct aggcgtctgg     600
ctttatgcc tggcctggag tctgccacct ttctttggtt ggagtgccta cgtgcccgag     660
gggctgctga catcctgctc ctgggactac atgacctca cccccaggt gcgtgcctac     720
accatgctgc tcttctgctt tgtcttcttc ctccccctgc tcatcatcat cttctgctac     780
atcttcatct tcagggcccg aggtgtgcca gagacctca atgaagcaa ggtcgactg      840
attgtcattc ttctcttctg gctgtcctgg gctccctact ccactgtggc tctggtggcc     900
tttgctggat actcgacat cctgacgcc tacatgagct cggtgccagc cgtcatgcc     960
aaggcttctg ccatccaaa tcccattatc tacgccatca ctcaccccga gcagaacgtg    1020
cagaagcgga agcgcagcct caagaagacc tccacgatgg cggccccgcc caagagcgag    1080
aactcagagg acgccaagta g                                             1101

```

<210> 10

5 <211> 366

<212> PRT

<213> Mus sp.

<220>

10 <221> FUENTE

<222> 1..366

<223> /tipo_mol="proteína" /organismo="Mus <ratón, género>"

<400> 10

15

ES 2 766 398 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Proteína GPCR quimérica,
que es adecuada para acoplar una señal de luz a una cascada de señalización de mGluR6 en células bipolares ENCENDIDAS retinianas internas,
- 5 que comprende dominios derivados de al menos dos miembros de una familia de proteínas del receptor acoplado a la proteína G (GPCR),
en donde un primer miembro de la familia de GPCR es un GPCR sensible a la luz derivado de melanopsina que contribuye a todos los dominios extracelulares que son los tres bucles extracelulares EL1, EL2, EL3 y NT del extremo N y los siete dominios transmembranarios que son TM1 a TM7 y
- 10 en donde un segundo miembro de la familia de GPCR es mGluR6, en donde mGluR6 está contribuyendo a al menos los bucles intracelulares IL2 e IL3 y un CT del extremo C en donde los dominios intracelulares de mGluR6 sustituyen dominios intracelulares correspondientes de la melanopsina y en donde los dominios contribuidos por mGluR6 comprenden al menos algunos de sus dominios que median en el acoplamiento de la activación de la luz con la cascada de señalización de mGluR6 siendo capaces de unirse a una proteína G-alfa(o) específica para la cascada de señalización de mGluR6.
- 15 2. Proteína GPCR quimérica según la reivindicación 1, en donde el primer miembro de GPCR es melanopsina humana.
3. Proteína GPCR quimérica según la reivindicación 1 con una cualquiera de las secuencias de aminoácidos con SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 y 10.
- 20 4. Proteína GPCR quimérica según la reivindicación 3 que comprende variación de secuencia en uno o más sitios de corte y empalme y unión para el intercambio de dominios intracelulares dando la proteína GPCR quimérica funcional.
5. Proteína GPCR quimérica según la reivindicación 3 o 4, en donde la secuencia de aminoácidos comprende sustituciones conservativas de aminoácidos.
- 25 6. Ácido nucleico que lleva información genética que codifica la proteína GPCR quimérica como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. La molécula de ácido nucleico según la reivindicación 6 que comprende una cualquiera de las secuencias con SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 y 9, que incluye secuencias que codifican los mismos aminoácidos y secuencias de aminoácidos con sustituciones de aminoácidos conservativos.
- 30 8. Vector que lleva la información genética que codifica las proteínas GPCR quiméricas definidas en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o que comprende el ácido nucleico como se define en la reivindicación 6 o 7.
9. Vector según la reivindicación 8, en donde el vector es un vector viral de rAAV u otro vector viral.
10. Vector según la reivindicación 8 o 9, en donde el vector comprende una secuencia promotora/potenciadora de una proteína retiniana expresada exclusivamente en células bipolares ENCENDIDAS que controlan la expresión de la información genética que codifica la proteína GPCR quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 35 11. Células de cultivo celular transgénico que comprenden la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 6 o 7 o el vector según una de las reivindicaciones 8 a 10 o que comprende la proteína GPCR quimérica como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 40 12. Medicamento que comprende la proteína GPCR quimérica según una de las reivindicaciones 1 a 5, la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 6 o 7, el vector según una de las reivindicaciones 8 a 10 o las células de cultivo celular transgénico según la reivindicación 11, que comprende dicha proteína GPCR quimérica o molécula de ácido nucleico.
- 45 13. Proteína GPCR quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 6 o 7 o composiciones que comprenden dicha proteína GPCR quimérica o molécula de ácido nucleico opcionalmente dentro de vectores o células para su uso en terapia médica para mejorar la visión, o en particular para el tratamiento de ceguera parcial o completa, o para el tratamiento de retinitis pigmentosa (RP), o para el tratamiento de degeneración macular o para el tratamiento de otras formas de degeneración de fotorreceptores.

Figura 1

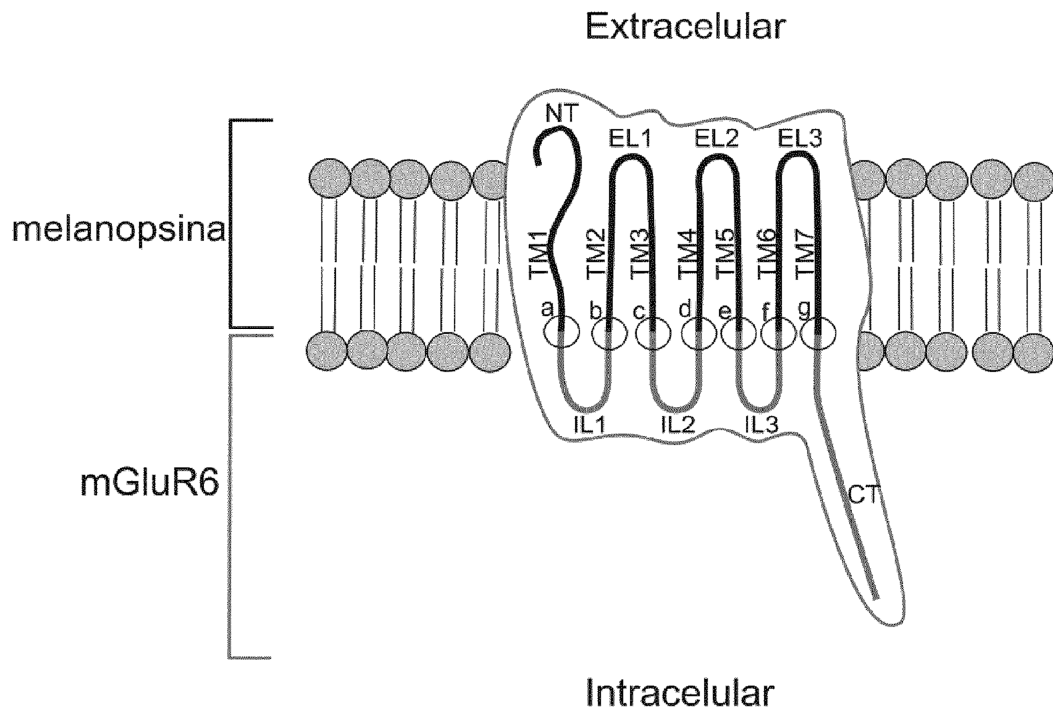


Figura 4

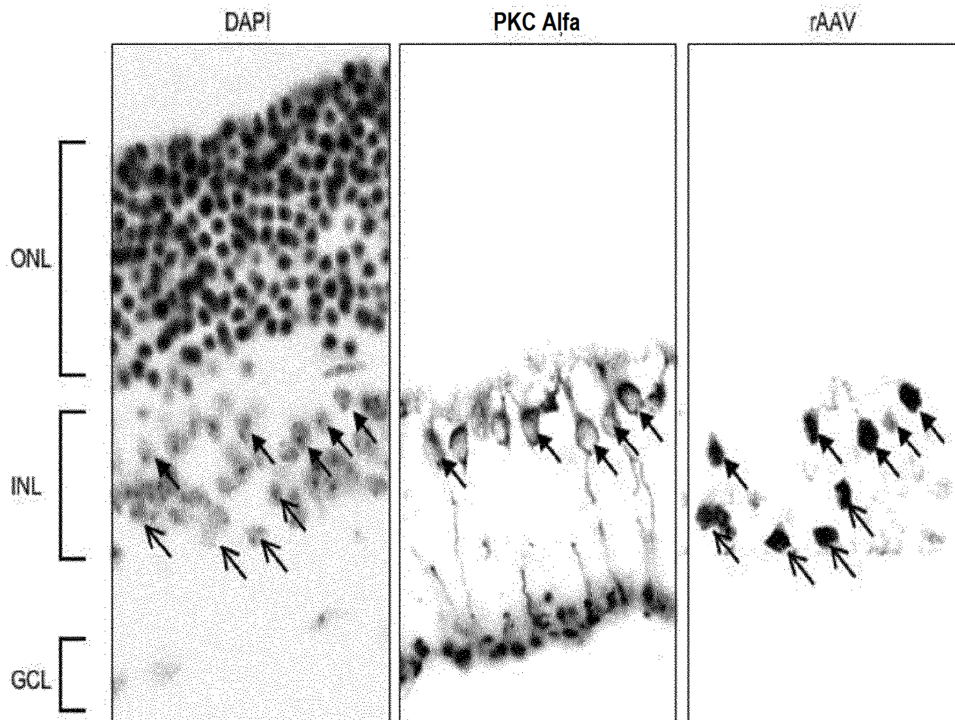


Figura 2

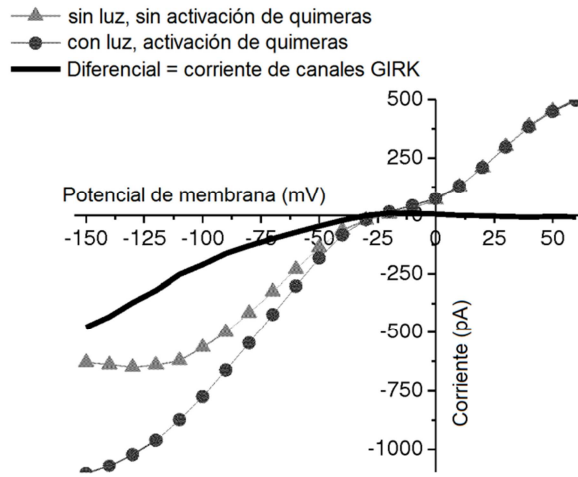
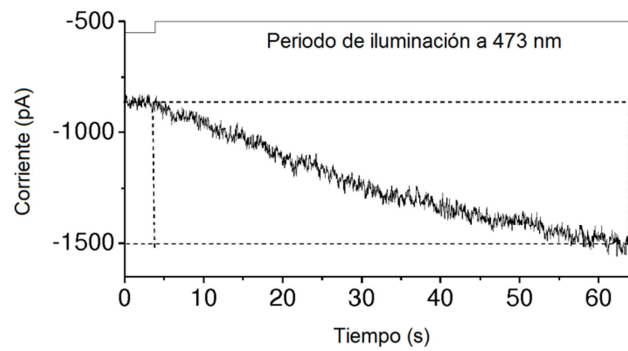


Figura 3



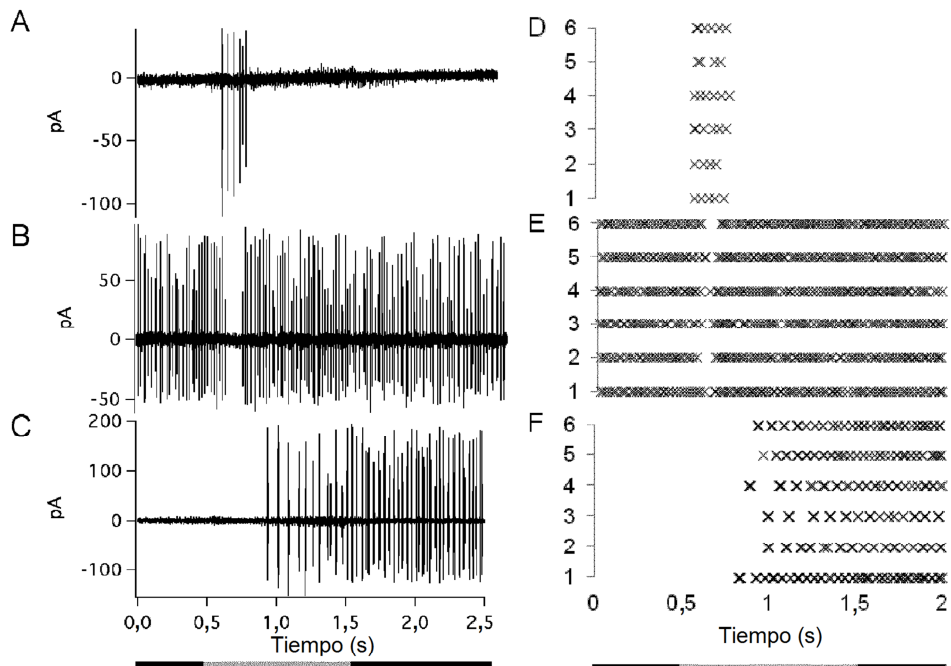


Figura 5

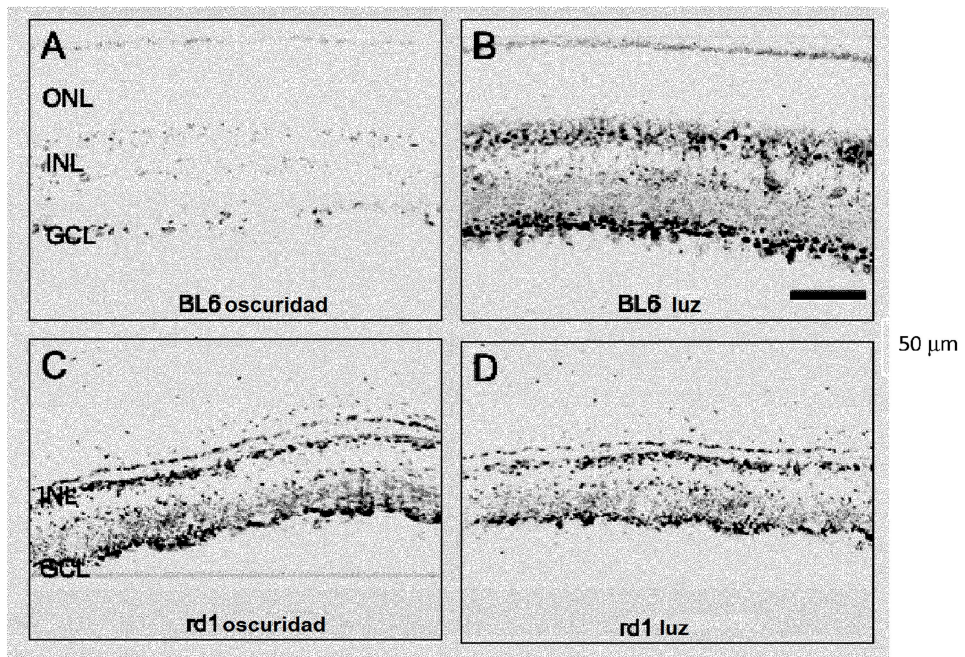


Figura 6