

## REIVINDICACIONES

Se reivindica lo siguiente:

1. Un ácido nucleico aislado que comprende un transgén configurado para expresar al menos un dominio de unión a ADN fusionado con al menos un dominio regulador de la transcripción, donde el dominio de unión a ADN se une a un gen diana o una región reguladora de un gen diana y donde el gen diana codifica un canal de sodio dependiente de voltaje.
2. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, donde el transgén está flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) derivadas de virus adenoasociados (AAV).
3. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 1 o 2, donde el dominio regulador de la transcripción regula al alza la expresión del gen diana.
4. El ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el al menos un dominio de unión a ADN se une a una región no traducida del gen diana.
5. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 4, donde la región no traducida es un potenciador, un promotor, un intrón y/o un represor.
6. El ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, donde el dominio de unión a ADN se une entre 2-2000 pb en dirección 3' o entre 2-2000 pb en dirección 5' con respecto a una región reguladora del gen diana.
7. El ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el al menos un dominio de unión a ADN codifica una proteína de dedos de cinc (ZFP), efectores de tipo activador de la transcripción (TALE), una proteína dCas (p. ej., dCas9 o dCas12a) y/o un homeodominio.
8. El ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el al menos un dominio de unión a ADN se une a una secuencia de ácido nucleico indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 5-7.
9. El ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el al menos un dominio de unión a ADN es una proteína de dedos de cinc que comprende una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico con una secuencia indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 11-16, 23-28 o 35-40.
10. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 9, donde el al menos un dominio de unión a ADN es una proteína de dedos de cinc que comprende una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 11, una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 12, una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 13, una hélice de

reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 14, una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 15 y/o una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 16.

11. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 9, donde el al menos un dominio de unión a ADN es una proteína de dedos de cinc que comprende una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 23, una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 24, una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 25, una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 26, una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 27 y/o una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 28.

12. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 9, donde el al menos un dominio de unión a ADN es una proteína de dedos de cinc que comprende una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 35, una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 36, una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 37, una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 38, una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 39 y/o una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 40.

13. El ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde el al menos un dominio de unión a ADN es una proteína de dedos de cinc que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 17-22, 29-34 o 41-46.

14. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 13, donde el al menos un dominio de unión a ADN es una proteína de dedos de cinc que comprende una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 17, una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 18, una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 19, una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 20, una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 21 y/o una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 22.

15. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 13, donde el al menos un dominio de unión a ADN es una proteína de dedos de cinc que comprende una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 29, una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 30, una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 31, una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 32, una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 33 y/o una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 34.

16. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 13, donde el al menos un dominio de unión a ADN es una proteína de dedos de cinc que comprende una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 41, una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 42, una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 43, una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 44, una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 45 y/o una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 46.
17. El ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el al menos un dominio de unión a ADN es una proteína dCas, opcionalmente una proteína dCas9, y donde el ácido nucleico aislado comprende además al menos un ácido nucleico guía.
18. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 17, donde el ácido nucleico guía comprende una secuencia separadora que se dirige a *SCN1A*.
19. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 17 o 18, donde el ácido nucleico guía comprende una secuencia separadora con una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 85, 86, 89, 90, 93 o 94.
20. El ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 17-19, donde el ácido nucleico guía comprende una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 83-94.
21. El ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, donde el al menos un dominio regulador de la transcripción comprende un transactivador VPR, Rta, p65 o Hsf1, o cualquier combinación de estos.
22. El ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-21, donde el al menos un dominio de transactivación es codificado por la secuencia de ácido nucleico indicada en la SEQ ID NO: 47.
23. El ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-22, donde el al menos un dominio de transactivación es codificado por la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 48.
24. El ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-23, donde el ácido nucleico comprende una ITR de AAV2.
25. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 24, donde la ITR es una  $\Delta$ TR y/o una mTR.
26. El ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-25, donde el transgén está enlazado de manera operativa a un promotor.
27. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 26, donde el promotor es un promotor con especificidad de tejido, donde opcionalmente el promotor es un promotor neuronal tal como SST, NPY, glutaminasa activada por fosfato (PAG), transportador de glutamato vesicular-1 (VGLUT1), descarboxilasa del ácido glutámico 65 y 57 (GAD65, GAD67), Sinapsina I,

a-CamKII, Dock10, Prox1, Parvalbúmina (PV), Somatostatina (SST), Colecistocinina (CCK), Calretinina (CR) o Neuropeptido Y (NPY).

28. El ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-27, donde el al menos un dominio de unión a ADN está fusionado con el al menos un dominio regulador de la transcripción mediante un dominio enlazador.
29. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 28, donde el dominio enlazador es opcionalmente:
  - (i) un enlazador flexible, que opcionalmente comprende glicinas, o
  - (ii) un enlazador escindible.
30. El ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-29, donde el transgén codifica 1 dominio de unión a ADN, 2 dominios de unión a ADN, 3 dominios de unión a ADN, 4 dominios de unión a ADN, 5 dominios de unión a ADN, 6 dominios de unión a ADN, 7 dominios de unión a ADN, 8 dominios de unión a ADN, 9 dominios de unión a ADN o 10 dominios de unión a ADN.
31. El ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-30, donde el transgén codifica 1 dominio regulador de la transcripción, 2 dominios reguladores de la transcripción, 3 dominios reguladores de la transcripción, 4 dominios reguladores de la transcripción, 5 dominios reguladores de la transcripción, 6 dominios reguladores de la transcripción, 7 dominios reguladores de la transcripción, 8 dominios reguladores de la transcripción, 9 dominios reguladores de la transcripción o 10 dominios reguladores de la transcripción.
32. Un AAV recombinante (rAAV) que comprende:
  - (i) un ácido nucleico que comprende un transgén que codifica al menos un dominio de unión a ADN fusionado con al menos un dominio regulador de la transcripción, donde el dominio de unión a ADN se une a un gen diana o una región reguladora de un gen diana, donde el gen diana codifica un canal de sodio dependiente de voltaje,
  - (ii) al menos una proteína de cápside.
33. El rAAV de la reivindicación 32, donde el transgén está flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) derivadas de virus adenoasociados (AAV).
34. El rAAV de la reivindicación 32 o la reivindicación 33, donde el regulador de la transcripción regula al alza la expresión del gen diana.
35. El rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 32-34, donde el al menos un dominio de unión a ADN se unen a una región no traducida del gen diana.
36. El rAAV de la reivindicación 35, donde la región no traducida es un potenciador, un promotor, un intrón y/o un represor.
37. El rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 35-36, donde el dominio de unión a ADN se une entre 2-2000 pb en dirección 3' o entre 2-2000 pb en dirección 5' con respecto a una región

reguladora del gen diana.

38. El rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 32-37, donde el al menos un dominio de unión a ADN codifica una proteína de dedos de cinc (ZFP), un efector de tipo activador de la transcripción (TALE), una proteína dCas (p. ej., dCas9 o dCas12a) y/o un homeodominio.
- 5 39. El rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 32-38, donde el al menos un dominio de unión a ADN se une a una secuencia de ácido nucleico indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 5-7.
40. El rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 32-39, donde el al menos un dominio de unión a ADN son proteínas de dedos de cinc que comprenden una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico con una secuencia indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 11-16, 23-10 28 o 35-40.
41. El rAAV de la reivindicación 40, donde el al menos un dominio de unión a ADN es una proteína de dedos de cinc que comprende una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 11, una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 12, una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 13, una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 14, una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 15 y/o una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 16.
- 15 42. El rAAV de la reivindicación 40, donde el al menos un dominio de unión a ADN es una proteína de dedos de cinc que comprende una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 23, una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 24, una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 25, una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 26, una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 27 y/o una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 28.
- 20 43. El rAAV de la reivindicación 40, donde el al menos un dominio de unión a ADN es una proteína de dedos de cinc que comprende una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 35, una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 36, una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 37, una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 38, una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 39 y/o una hélice de reconocimiento codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 40.
- 25 30

44. El rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 32-43, donde el al menos un dominio de unión a ADN es una proteína de dedos de cinc que comprende la secuencia indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 17-22, 29-34 o 41-46.
- 5 45. El rAAV de la reivindicación 44, donde el al menos un dominio de unión a ADN es una proteínas de dedos de cinc que comprende una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 17, una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 18, una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 19, una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 20, una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 21 y/o una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 22.
- 10 46. El rAAV de la reivindicación 44, donde el al menos un dominio de unión a ADN es una proteína de dedos de cinc que comprende una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 29, una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 30, una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 31, una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 32, una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 33 y/o una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 34.
- 15 47. El rAAV de la reivindicación 44, donde el al menos un dominio de unión a ADN es una proteína de dedos de cinc que comprende una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 41, una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 42, una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 43, una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 44, una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 45 y/o una hélice de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 46.
- 20 48. El rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 32-37, donde el al menos un dominio de unión a ADN es una proteína dCas, opcionalmente una proteína dCas9, y donde el rAAV comprende además al menos un ácido nucleico guía.
- 25 49. El rAAV de la reivindicación 48, donde el ácido nucleico guía comprende una secuencia separadora que se dirige a *SCN1A*.
50. El rAAV de la reivindicación 48 o 49, donde el ácido nucleico guía comprende una secuencia separadora con una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 85, 86, 89, 90, 93 o 94.
- 30 51. El rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 48-50, donde el ácido nucleico guía comprende una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 83-94.
52. El rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 32-47, donde el al menos un dominio regulador de la transcripción es un transactivador derivado de VPR, Rta, p65, Hsf1, o cualquier combinación de estos.

53. El rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 32-52, donde el transgén que codifica el al menos un transgén regulador de la transcripción comprende la secuencia indicada en la SEQ ID NO: 47.
54. El ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 32-53, donde el al menos un dominio regulador de la transcripción es codificado por la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 48.
55. El rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 32-54, donde el al menos un dominio de unión a ADN está fusionado con el al menos un dominio regulador de la transcripción mediante un dominio enlazador.
56. El rAAV de la reivindicación 55, donde el dominio enlazador es opcionalmente:
  - (i) un enlazador flexible, que opcionalmente comprende glicinas, o
  - (ii) un enlazador escindible.
57. El rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 32-56, donde el transgén codifica 1 dominio de unión a ADN, 2 dominios de unión a ADN, 3 dominios de unión a ADN, 4 dominios de unión a ADN, 5 dominios de unión a ADN, 6 dominios de unión a ADN, 7 dominios de unión a ADN, 8 dominios de unión a ADN, 9 dominios de unión a ADN o 10 dominios de unión a ADN.
58. El rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 32-57, donde el transgén codifica 1 dominio regulador de la transcripción, 2 dominios reguladores de la transcripción, 3 dominios reguladores de la transcripción, 4 dominios reguladores de la transcripción, 5 dominios reguladores de la transcripción, 6 dominios reguladores de la transcripción, 7 dominios reguladores de la transcripción, 8 dominios reguladores de la transcripción, 9 dominios reguladores de la transcripción o 10 dominios reguladores de la transcripción.
59. El rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 32-58, donde el serotipo de cápside de AAV se selecciona dentro del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAV9, AAV10, AAVrh10 o AAV.PHPB.
60. El rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 32-59, donde el serotipo de cápside de AAV es AAV9.
61. El rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 32-59, donde el serotipo de cápside de AAV es AAV.PHPB.
62. El rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 32-61, donde el ácido nucleico comprende una ITR de AAV2.
63. El rAAV de la reivindicación 62, donde la ITR es una  $\Delta$ TR y/o una mTR.
64. El rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 32-63, donde el transgén está enlazado de manera operativa a un promotor.

65. El rAAV de la reivindicación 64, donde el promotor es un promotor con especificidad de tejido.
66. El rAAV de la reivindicación 64 o 65, donde el promotor con especificidad de tejido es un promotor neuronal, tal como SST, NPY, glutaminasa activada por fosfato (PAG), transportador de glutamato vesicular-1 (VGLUT1), descarboxilasa del ácido glutámico 65 y 57 (GAD65, GAD67), Sinapsina I,  $\alpha$ -CamKII, Dock10, Prox1, Parvalbúmina (PV), Somatostatina (SST), Colecistocinina (CCK), Calretinina (CR) o Neuropeptido Y (NPY).
67. Un método de aumento de la expresión de un gen diana, el método comprende administrar a una célula o un sujeto que comprende el gen diana el ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-31 o el rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 32-66.
68. El método de la reivindicación 57, donde el sujeto presenta una haploinsuficiencia del gen diana.
69. El método de la reivindicación 67 o 68, donde el gen diana es SCN1A.
70. El método de cualquiera de las reivindicaciones 67-69, donde la célula es una neurona, opcionalmente una neurona gabaérgica.
71. El método de cualquiera de las reivindicaciones 67-70, donde la administración del ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-31 o el rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 32-66 provoca que la expresión del gen diana aumente al menos 2 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces, al menos 60 veces, al menos 70 veces, al menos 80 veces, al menos 90 veces o al menos 100 veces, en relación con la expresión del transgén en el sujeto antes de la administración.
72. Un método de tratamiento del síndrome de Dravet en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que expresa un gen diana el ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-31 o el rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 32-66 se administra a un sujeto que expresa un gen diana.
73. El método de la reivindicación 72, donde la expresión del gen diana en el sujeto disminuye en comparación con la de un sujeto normal.
74. El método de la reivindicación 72 o la reivindicación 73, donde el sujeto tiene, o se presume que tiene, una haploinsuficiencia en la expresión del gen diana con respecto a un sujeto normal.
75. El método de cualquiera de las reivindicaciones 72-74, donde el sujeto tiene, o se presume que tiene, una afección provocada por una expresión haploinsuficiente del gen diana.
76. El método de cualquiera de las reivindicaciones 72-75, donde el gen diana es SCN1A.
77. El método de cualquiera de las reivindicaciones 72-76, donde el ácido nucleico aislado el rAAV se administra mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular, inhalación, inyección

subcutánea y/o inyección intracraneal.

78. El método de cualquiera de las reivindicaciones 72-77, donde la administración del ácido nucleico aislado o el rAAV provoca que la expresión del gen diana aumente al menos 2 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces, al menos 60 veces, al menos 70 veces, al menos 80 veces, al menos 90 veces o al menos 100 veces en relación con la expresión del transgén en el sujeto antes de la administración.
79. Una composición que comprende el ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-31 o el rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 32-66.
80. La composición de la reivindicación 79, que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.
81. Un kit que comprende:  
un recipiente que alberga un ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-31 o el rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 32-66.
82. El kit de la reivindicación 81, donde el kit comprende además un recipiente que alberga un portador farmacéuticamente aceptable.
83. El kit de la reivindicación 81 o la reivindicación 82, donde el ácido nucleico aislado del rAAV y el portador farmacéuticamente aceptable se albergan en el mismo recipiente.
84. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 81-83, donde el recipiente es una jeringa.
85. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-31 o el rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 32-66.
86. La célula hospedadora de la reivindicación 85, donde la célula hospedadora es una célula eucariota.
87. La célula hospedadora de la reivindicación 85, donde la célula hospedadora es una célula de un mamífero.
88. La célula hospedadora de la reivindicación 87, donde la célula hospedadora es una célula humana, opcionalmente una neurona, opcionalmente una neurona gabaérgica.