COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA REGULACIÓN GÉNICA SELECTIVA

Referencia Cruzada

[001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de Patente de Estados Unidos No. 62/854,238, presentada el 29 de mayo de 2019; Solicitud Provisional de Patente de Estados Unidos No. 62/857,727, presentada el 5 de junio de 2019; y Solicitud Provisional de Patente de Estados Unidos No. 63/008,569, presentada el 10 de abril de 2020, cada una de las cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

Listado de Secuencias

[002] La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato ASCII y por este medio se incorpora como referencia en su totalidad. Esta copia ASCII, creada el jueves, 28 de mayo de 2020, se nombra 46482-724_601_SL.txt y tiene un tamaño de 418,483 bytes.

Antecedentes de la Invención

[003] Una amplia variedad de enfermedades humanas está asociada con la expresión anormal de genes. En algunos casos, una mutación genética en un gen provoca que se desregule, se regule por disminución o no se exprese para nada, dando por resultado haploinsuficiencia. En algunos casos, una mutación genética en un gen provoca que se regule por aumento, dando

por resultado la sobreexpresión del gen. Existen muchos desafíos en el tratamiento de trastornos o enfermedades genéticas. Un planteamiento es la terapia génica, la cual implica la administración terapéutica de un ácido nucleico en las células de un paciente. Sin embargo, siguen sin resolverse varios desafíos asociados con la terapia génica, tal como indeseada respuesta inmunitaria provocada por la terapia génica, efectos fuera de diana, limitaciones en la capacidad de clonación de vehículos de terapia génica (por ejemplo, virus), sustentación del efecto terapéutico durante un período de tiempo más prolongado, etc. El sistema nervioso central (CNS) plantea muchos desafíos únicos para el desarrollo de una terapia que afronte el deterioro subyacente en una expresión génica y/o proteica. Si bien existen fármacos que ayudan a manejar los síntomas de las enfermedades/trastornos del CNS, muchas enfermedades/trastornos del CNS, por ejemplo, el síndrome de Dravet, carecen de tratamientos específicos o de una cura. De esta manera, existe la necesidad de nuevas composiciones y métodos capaces de modular la expresión de cualquier gen endógeno para ayudar a revertir los efectos de una enfermedad o trastorno, en particular, una terapia con inmunogenicidad reducida, efectos reducidos fuera de diana, especificidad incrementada para un gen diana y/o eficacia terapéutica incrementada.

Breve Descripción de la Invención

[004] En un aspecto, la solicitud proporciona un casete de expresión que comprende una secuencia que codifica para un factor de transcripción de origen no natural que incrementa la expresión del gen SCN1A en una célula, en donde el factor de transcripción que no se presenta de manera natural comprende un dominio de unión al ADN (DBD) unido de manera operativa a al menos dos dominios de activación de la transcripción (TAD) de la siguiente manera: TAD1-TAD2-DBD, DBD-TAD3-TAD4, o TAD1-TAD2-DBD-TAD3-TAD4. En ciertas modalidades, TAD1, TAD2, TAD3 y TAD4 se seleccionan independientemente de lo siguiente: VP16, VP64, Viper, CITED2, CITED4, CREB3 o fragmentos funcionales de las mismas. En ciertas modalidades, TAD1 y TAD2 son el mismo TAD. En ciertas modalidades, TAD1 y TAD2 son CITED2, o un fragmento funcional del mismo. En ciertas modalidades, TAD1 y TAD2 son CITED4, o un fragmento funcional del mismo. En ciertas modalidades, TAD3 y TAD4 son el mismo TAD. En ciertas modalidades, TAD3 y TAD4 son CITED2, o un fragmento funcional del mismo. En ciertas modalidades, TAD3 y TAD4 son CITED4, o un fragmento funcional del mismo. En ciertas modalidades, TAD1, TAD2, TAD3 y TAD4 son el mismo TAD. En ciertas modalidades, TAD1, TAD2, TAD3 y TAD4 son CITED2, o un fragmento funcional del mismo. En ciertas modalidades, TAD1, TAD2, TAD3 y TAD4 son CITED4, o un fragmento funcional del

mismo.

[005] En ciertas modalidades, no hay ligador entre los al menos dos dominios TAD.

[006] En ciertas modalidades, hay un ligador entre los al menos dos dominios TAD. En ciertas modalidades, el ligador comprende o consiste de GGSGGSG (SEQ ID NO: 177) o GGSGGGSGGSGGSGGSG (SEQ ID NO: 178).

[007] En ciertas modalidades, el DBD se une a una región genómica que tiene 18-27 nucleótidos.

[008] En ciertas modalidades, el DBD comprende al menos 80% de identidad de secuencia con su contraparte humana más cercana. En ciertas modalidades, la DBD comprende al menos 90% de identidad de secuencia con su contraparte humana más cercana. En ciertas modalidades, el DBD y los al menos dos TAD comprenden cada uno al menos 80% de identidad de secuencia con sus contrapartes humanas más cercanas. En ciertas modalidades, el DBD y los al menos dos TAD comprenden cada uno al menos 90% de identidad de secuencia con sus contrapartes humanas más cercanas. En ciertas modalidades, el DBD comprende un ARN guía y una proteína Cas inactivada por nucleasa. En ciertas modalidades, la proteína Cas inactivada por nucleasa es una Cas9 inactivada por nucleasa.

[009] En ciertas modalidades, el DBD comprende un dominio de dedo de zinc. En ciertas modalidades, el DBD comprende de seis a nueve dominios de dedos de zinc. En ciertas

modalidades, el DBD comprende seis dedos de zinc. En ciertas modalidades, el DBD se une a una región genómica que tiene 18 nucleótidos. En ciertas modalidades, el DBD comprende nueve dedos de zinc. En ciertas modalidades, el DBD se une a una región genómica que tiene 27 nucleótidos.

[0010] En ciertas modalidades, el DBD comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad de secuencia a cualquiera de SEQ ID NO: 148-151. En ciertas modalidades, el DBD comprende una secuencia que tiene cualquiera de SEQ ID NO: 148-151.

[0011] En ciertas modalidades, el DBD se deriva de EGR1 humano o EGR3 humano.

[0012] En ciertas modalidades, el DBD comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 77-98. En ciertas modalidades, el DBD comprende SEQ ID NO: 77-98.

[0013] En ciertas modalidades, el DBD comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 92. En ciertas modalidades, el DBD comprende SEQ ID NO: 92.

[0014] En ciertas modalidades, el factor de transcripción de origen no natural comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 130 o 131. En ciertas modalidades, el factor de transcripción de origen no natural comprende SEQ ID NO: 130 o 131.

[0015] En ciertas modalidades, el casete de expresión

comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 90% de identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 72 o 73. En ciertas modalidades, el casete de expresión comprende una secuencia de nucleótidos de cualquiera de SEQ ID NO: 72 o 73.

[0016] En ciertas modalidades, el casete de expresión comprende además un elemento regulador que impulsa la expresión del factor de transcripción a un nivel más alto en neuronas de PV que en otros tipos de células. En ciertas modalidades, el elemento regulador comprende cualquiera de SEQ ID NO: 1-4. En ciertas modalidades, el elemento regulador comprende SEQ ID NO: 2 o 3.

[0017] En ciertas modalidades, el casete de expresión comprende además un sitio de unión de microARN selectivo de PV. En ciertas modalidades, el sitio de unión de microARN selectivo de PV comprende al menos 90% de identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 7, 14 o 15. En ciertas modalidades, el sitio de unión de microARN selectivo de PV comprende cualquiera de una de SEQ ID NO: 7, 14 o 15

[0018] En ciertas modalidades, el casete de expresión es parte de un vector viral. En ciertas modalidades, el vector viral es un virus AAV. En ciertas modalidades, el virus AAV es un virus AAV9 o un virus scAAV9. En ciertas modalidades, el vector viral es un Lentivirus.

[0019] En otro aspecto, la solicitud proporciona un casete de expresión que comprende una secuencia que codifica para un

factor de transcripción de origen no natural que incrementa la expresión del gen SCN1A en una célula, en donde el factor de transcripción de origen no natural comprende un dominio de unión al ADN unido de manera operativa a un dominio de activación de la transcripción, en donde el dominio de unión al ADN es una proteína de dedo de zinc que comprende la secuencia LEPGEKP – [YKCPECGKSFS X HQRTH TGEKP]n - YKCPECGKSFS X HQRTH - TGKKTS (SEQ ID NO: 147), y en donde no hay etiqueta HA (SEQ ID NO: 303) entre el dominio de unión a ADN y el dominio de activación de transcripción. En ciertas modalidades, el dominio de activación de transcripción comprende una secuencia VP16, VPR o VP64, o un fragmento funcional del mismo. En ciertas modalidades, el dominio de activación de transcripción comprende VP64.

[0020] En ciertas modalidades, el dominio de unión al ADN se une a una región genómica que tiene 18-27 nucleótidos. En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN es un dominio de dedo de zinc que comprende SEQ ID NO: 147 en donde n = 6 a 9. En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN es un dominio de dedo de zinc que comprende SEQ ID NO: 147 en donde n = 6. En ciertas modalidades, el dominio de unión al ADN se une a una región genómica que tiene 18 nucleótidos. En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN es un dominio de dedo de zinc que comprende SEQ ID NO: 147 en donde n = 9. En ciertas modalidades, el dominio de unión al ADN se une a

una región genómica que tiene 27 nucleótidos.

[0021] En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad de secuencia a cualquiera de SEQ ID NO: 148-151. En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN comprende una secuencia que tiene cualquiera de SEQ ID NO: 148-151.

[0022] En ciertas modalidades, el dominio de unión al ADN comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 77-91. En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN comprende cualquiera de SEQ ID NO: 77-91.

[0023] En ciertas modalidades, el casete de expresión comprende además un elemento regulador que impulsa la expresión del factor de transcripción a un nivel más alto en neuronas de PV que en otros tipos de células. En ciertas modalidades, el elemento regulador comprende cualquiera de SEQ ID NO: 1-4. En ciertas modalidades, el elemento regulador comprende SEQ ID NO: 2 o 3.

[0024] En ciertas modalidades, el factor de transcripción de origen no natural comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 127. En ciertas modalidades, el factor de transcripción de origen no natural comprende SEQ ID NO: 127.

[0025] En ciertas modalidades, el casete de expresión comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 90%

de identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 93 o 71. En ciertas modalidades, el casete de expresión comprende una secuencia de nucleótidos de cualquiera de SEQ ID NO: 93 o 71.

[0026] En ciertas modalidades, el casete de expresión comprende además un sitio de unión de microARN selectivo de PV. En ciertas modalidades, el sitio de unión de microARN selectivo de PV comprende al menos 90% de identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 7, 14 o 15. En ciertas modalidades, el sitio de unión de microARN selectivo de PV comprende cualquiera de una de SEQ ID NO: 7, 14 o 15.

[0027] En ciertas modalidades, el casete de expresión es parte de un vector viral. En ciertas modalidades, el vector viral es un virus AAV. En ciertas modalidades, el virus AAV es un virus AAV9 o un virus scAAV9. En ciertas modalidades, el vector viral es un Lentivirus.

[0028] En otro aspecto, la solicitud proporciona un polinucleótido que comprende un sitio de unión de microARN selectivo de PV que comprende una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 14 o 15, en donde el sitio de unión de microARN reduce la expresión del transgén en las neuronas excitatorias. En ciertas modalidades, el sitio de unión de microARN selectivo de PV comprende SEQ ID NO: 14. En ciertas modalidades, el sitio de unión de microARN selectivo de PV comprende SEQ ID NO: 15. En otro aspecto, la solicitud proporciona un casete de expresión

de n que comprende el sitio de unión de microARN selectivo de PV y un promotor y/o intensificador. En ciertas modalidades, el promotor y/o intensificador es un elemento regulador selectivo de PV que impulsa la expresión del transgén a un nivel más alto en neuronas de parvalbúmina (PV) que en otros tipos de células. En ciertas modalidades, el elemento regulador selectivo de PV se une operativamente a un transgén.

[0029] En otro aspecto, la solicitud proporciona un casete de expresión que comprende un elemento regulador unido operativamente a un transgén y al menos un sitio de unión de microARN, en donde el elemento regulador impulsa la expresión del transgén a un nivel más alto en neuronas de parvalbúmina (PV) que en otros tipos de células, y en donde el sitio de unión de microARN reduce la expresión del transgén en neuronas excitatorias. En ciertas modalidades, el casete de expresión no comprende SEQ ID NO: 67. En ciertas modalidades, el sitio de unión de microARN comprende al menos un sitio de unión para MIR128 (SEQ ID NO: 9). En ciertas modalidades, el sitio de unión de microARN comprende al menos un sitio de unión para MIR221 (SEQ ID NO: 11). En ciertas modalidades, el sitio de unión de microARN comprende al menos un sitio de unión para MIR222 (SEQ ID NO: 13). En ciertas modalidades, el sitio de unión de microARN comprende al menos un sitio de unión para MIR128 (SEQ ID NO: 9) y al menos un

sitio de unión para MIR221 (SEQ ID NO: 11). En ciertas modalidades, el sitio de unión de microARN comprende al menos un sitio de unión para MIR128 (SEQ ID NO: 9), al menos un sitio de unión para MIR221 (SEQ ID NO: 11) y al menos un sitio de unión para MIR222 (SEQ ID NO: 13). En ciertas modalidades, el sitio de unión de microARN comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 7, 14 o 15. En ciertas modalidades, el sitio de unión de microARN comprende SEQ ID NO: 7, 14 o 15.

[0030] En ciertas modalidades, el transgén codifica para un polipéptido que comprende un factor de transcripción de origen no natural que incrementa la expresión del gen SCN1A en una célula. En ciertas modalidades, el factor de transcripción se une a una región genómica que tiene 18-27 nucleótidos. En ciertas modalidades, el factor de transcripción comprende un dominio de unión a ADN. En ciertas modalidades, el factor de transcripción comprende un dominio de unión a ADN y un dominio de activación de transcripción.

[0031] En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN comprende al menos 80% de identidad de secuencia con su contraparte humana más cercana. En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN comprende al menos 90% de identidad de secuencia con su contraparte humana más cercana. En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN y el dominio de activación de transcripción comprenden al menos 80% de

identidad de secuencia con sus contrapartes humanas más cercanas. En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN y el dominio de activación de transcripción comprenden al menos 90% de identidad de secuencia con sus contrapartes humanas más cercanas.

[0032] En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN comprende un ARN guía y una proteína Cas inactivada por nucleasa. En ciertas modalidades, la proteína Cas inactivada por nucleasa es una Cas9 inactivada por nucleasa.

[0033] En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN comprende un dominio de dedo de zinc. En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN comprende de seis a nueve dominios de dedos de zinc. En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN comprende seis dedos de zinc. En ciertas modalidades, el dominio de unión al ADN se une a una región genómica que tiene 18 nucleótidos. En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN comprende nueve dedos de zinc. En ciertas modalidades, el dominio de unión al ADN se une a una región genómica que tiene 27 nucleótidos.

[0034] En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad de secuencia a cualquiera de SEQ ID NO: 148-151. En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN comprende una secuencia que tiene cualquiera de SEQ ID NO: 148-151. En ciertas modalidades, el dominio de unión al ADN comprende una

secuencia que tiene al menos 90% de identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 92-98. En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN comprende cualquiera de SEQ ID NO: 92-98.

[0035] En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN es una proteína de dedo de zinc que comprende la secuencia LEPGEKP – [YKCPECGKSFS X HQRTHTGEKP]n - YKCPECGKSFS X HQRTH – TGKKTS (SEQ ID NO: 147).

[0036] En ciertas modalidades, el dominio de unión al ADN comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 77-91. En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN comprende cualquiera de SEQ ID NO: 77-91.

[0037] En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN se deriva de EGR1 humano o EGR3 humano.

[0038] En ciertas modalidades, el dominio de activación de transcripción comprende una secuencia VP16, VPR, VP64, CITED2, CITED4 o CREB3, o un fragmento funcional de la misma. En ciertas modalidades, el dominio de activación de transcripción comprende una secuencia CITED2, CITED4 o CREB3 humana, o un fragmento funcional de la misma.

[0039] En ciertas modalidades, el elemento regulador comprende una secuencia que tiene cualquiera de SEQ ID NO: 1-4. En ciertas modalidades, el elemento regulador comprende una secuencia que tiene SEQ ID NO: 2 o 3.

[0040] En ciertas modalidades, el factor de transcripción de

origen no natural comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 105, 106 y 127-129. En ciertas modalidades, el factor de transcripción de origen no natural comprende cualquiera de cualquiera de SEQ ID NO: 105, 106 y 127-129.

[0041] En ciertas modalidades, el transgén comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 90% de identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 71, 74, 75, 76 o 184. En ciertas modalidades, el transgén comprende cualquiera de SEQ ID NO: 71, 74, 75, 76 o 184.

[0042] En ciertas modalidades, el casete de expresión es parte de un vector viral. En ciertas modalidades, el vector viral es un virus AAV. En ciertas modalidades, el virus AAV es un virus AAV9 o un virus scAAV9. En ciertas modalidades, el vector viral es un Lentivirus.

[0043] En otro aspecto, la solicitud proporciona un método para la expresión selectiva de un transgén en las neuronas de parvalbúmina (PV) de un primate que comprende administrarle a un primate un vector viral que comprende un transgén y al menos un sitio de unión de microARN, en donde el sitio de unión de microARN reduce la expresión del transgén en las neuronas excitatorias.

[0044] En ciertas modalidades, el vector viral comprende además un elemento regulador unido operativamente al transgén, en donde el elemento regulador impulsa la expresión

del transgén a un nivel más alto en neuronas de parvalbúmina (PV) que en otros tipos de células.

[0045] En ciertas modalidades, el sitio de unión de microARN comprende al menos un sitio de unión para MIR128 (SEQ ID NO: 9). En ciertas modalidades, el sitio de unión de microARN comprende al menos un sitio de unión para MIR221 (SEQ ID NO: 11). En ciertas modalidades, el sitio de unión de microARN comprende al menos un sitio de unión para MIR222 (SEQ ID NO: 13). En ciertas modalidades, el sitio de unión de microARN comprende al menos un sitio de unión para MIR128 (SEQ ID NO: 9) y al menos un sitio de unión para MIR221 (SEQ ID NO: 11). En ciertas modalidades, el sitio de unión de microARN comprende al menos un sitio de unión para MIR128 (SEQ ID NO: 9), al menos un sitio de unión para MIR221 (SEQ ID NO: 11) y al menos un sitio de unión para MIR222 (SEQ ID NO: 13). En ciertas modalidades, el sitio de unión de microARN comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 7, 14 o 15. En ciertas modalidades, el sitio de unión de microARN comprende SEQ ID NO: 7, 14 o 15.

[0046] En ciertas modalidades, el transgén comprende una secuencia que codifica para un factor de transcripción de origen no natural que incrementa la expresión del gen SCN1A en una célula.

[0047] En ciertas modalidades, el factor de transcripción se

une a una región genómica que tiene 18-27 nucleótidos.

[0048] En ciertas modalidades, el factor de transcripción comprende un dominio de unión a ADN.

[0049] En ciertas modalidades, el factor de transcripción comprende un dominio de unión a ADN y un dominio de activación de transcripción.

[0050] En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN comprende al menos 80% de identidad de secuencia con su contraparte humana más cercana. En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN comprende al menos 90% de identidad de secuencia con su contraparte humana más cercana. En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN y el dominio de activación de transcripción comprenden al menos 80% de identidad de secuencia con sus contrapartes humanas más cercanas. En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN y el dominio de activación de transcripción comprenden al menos 90% de identidad de secuencia con sus contrapartes humanas más cercanas.

[0051] En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN comprende un ARN guía y una proteína Cas inactivada por nucleasa. En ciertas modalidades, la proteína Cas inactivada por nucleasa es una Cas9 inactivada por nucleasa.

[0052] En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN comprende un dominio de dedo de zinc. En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN comprende de seis a nueve dominios

de dedos de zinc. En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN comprende seis dedos de zinc. En ciertas modalidades, el dominio de unión al ADN se une a una región genómica que tiene 18 nucleótidos. En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN comprende nueve dedos de zinc. En ciertas modalidades, el dominio de unión al ADN se une a una región genómica que tiene 27 nucleótidos.

[0053] En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad de secuencia a cualquiera de SEQ ID NO: 148-151. En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN comprende una secuencia que tiene cualquiera de SEQ ID NO: 148-151.

[0054] En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN se deriva de EGR1 humana o EGR3 humana.

[0055] En ciertas modalidades, el dominio de unión al ADN comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 92-98. En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN comprende cualquiera de SEQ ID NO: 92-98.

[0056] En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN es una proteína de dedo de zinc que comprende la secuencia LEPGEKP – [YKCPECGKSFS X HQRTHTGEKP]n - YKCPECGKSFS X HQRTH – TGKKTS (SEQ ID NO: 147).

[0057] En ciertas modalidades, el dominio de unión al ADN comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad

con cualquiera de SEQ ID NO: 77-91. En ciertas modalidades, el dominio de unión a ADN comprende cualquiera de SEQ ID NO: 77-91.

[0058] En ciertas modalidades, el dominio de activación de transcripción comprende una secuencia VP16, VPR, VP64, CITED2, CITED4 o CREB3, o un fragmento funcional del mismo. En ciertas modalidades, el dominio de activación de transcripción comprende una secuencia CITED2, CITED4 o CREB3 humana, o un fragmento funcional de la misma.

[0059] En ciertas modalidades, el elemento regulador comprende una secuencia que tiene cualquiera de SEQ ID NO: 1-4. En ciertas modalidades, el elemento regulador comprende una secuencia que tiene SEQ ID NO: 2 o 3.

[0060] En ciertas modalidades, el factor de transcripción de origen no natural comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 105, 106 y 127-129. En ciertas modalidades, el factor de transcripción de origen no natural comprende cualquiera de cualquiera de SEQ ID NO: 105, 106 y 127-129.

[0061] En ciertas modalidades, el transgén comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 90% de identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 71, 74, 75, 76 o 184. En ciertas modalidades, el transgén comprende cualquiera de SEQ ID NO: 71, 74, 75, 76 o 184.

[0062] En ciertas modalidades, el vector viral es un virus

AAV. En ciertas modalidades, el virus AAV es un virus AAV9 o un virus scAAV9. En ciertas modalidades, el vector viral es un Lentivirus.

[0063] En ciertas modalidades, el primate es un humano. En ciertas modalidades, el primate es un primate no humano. En ciertas modalidades, el primate no humano es un mono del viejo mundo, un orangután, un gorila, un chimpancé, un titi, un macaco cangrejero, un macaco rhesus o un macaco de cola de cerdo.

[0064] En otro aspecto, la solicitud proporciona un casete de expresión que comprende una secuencia que codifica para un factor de transcripción de origen no natural que incrementa la expresión del gen SCN1A en una célula, en donde el factor de transcripción que no se presenta de manera natural comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 128 o 129. En ciertas modalidades, el factor de transcripción de origen no natural comprende SEQ ID NO: 128 o 129.

[0065] En otro aspecto, la solicitud proporciona un método para incrementar la expresión de SCN1A en una célula al administrar cualquiera de los casetes de expresión proporcionados en la presente. En ciertas modalidades, la célula es una célula neuronal. En ciertas modalidades, la célula neuronal se selecciona del grupo que consiste de neuronas unipolares, bipolares, multipolares o

pseudounipolares. En ciertas modalidades, la célula es una neurona GABAérgica. En ciertas modalidades, la célula es una neurona de PV. En ciertas modalidades, la célula es una célula no neuronal. En ciertas modalidades, la célula es una célula glial. En ciertas modalidades, la célula glial se selecciona del grupo que consiste de astrocitos, oligodendrocitos, células ependimarias, células de Schwann y células satélite. En ciertas modalidades, la célula está dentro de un sujeto. En ciertas modalidades, el sujeto es un mamífero. En ciertas modalidades, el paciente es un humano. En ciertas modalidades, el incremento de la expresión de SCN1A trata una enfermedad, trastorno o síntoma. En ciertas modalidades, el trastorno es un trastorno del sistema nervioso central. En ciertas modalidades, el trastorno es epilepsia asociada con haploinsuficiencia de SCN1A. En ciertas modalidades, la haploinsuficiencia es el resultado de que el sujeto sea heterocigoto para una pérdida de mutación de función del gen SCN1A. En ciertas modalidades, el trastorno es epilepsia asociada con una inserción, deleción o sustitución en el gen SCN1A. En ciertas modalidades, el trastorno es epilepsia asociada con una mutación puntual en el gen SCN1A. En ciertas modalidades, el trastorno es síndrome de Dravet. En ciertas modalidades, un síntoma del trastorno del sistema nervioso central es hiperactividad neuronal. En ciertas modalidades, el tratamiento del

trastorno del sistema nervioso central comprende reducir la hiperactividad neuronal. En ciertas modalidades, un síntoma del trastorno del sistema nervioso central son convulsiones. En ciertas modalidades, el tratamiento del trastorno del sistema nervioso central comprende reducir la frecuencia de las convulsiones. En ciertas modalidades, el tratamiento del trastorno del sistema nervioso central comprende reducir la gravedad de las convulsiones.

[0066] En otro aspecto, la solicitud proporciona un método para incrementar la expresión de SCN1A en el CNS al administrar cualquiera de los casetes de expresión proporcionados en la presente. En ciertas modalidades, el casete de expresión se administra a través de administración intracerebroventricular (ICV) unilateral. En ciertas modalidades, el casete de expresión se administra a través de administración intracerebroventricular (ICV) bilateral. En ciertas modalidades, el aumento de la expresión de SCN1A se produce en el cerebro. En ciertas modalidades, el aumento de la expresión de SCN1A se produce en la corteza frontal, corteza parietal, corteza temporal, hipocampo, médula y/u corteza occipital. En ciertas modalidades, el aumento de la expresión de SCN1A se produce en la columna vertebral. En ciertas modalidades, el aumento de la expresión de SCN1A se produce en la médula espinal y/o el ganglio de la raíz dorsal.

Incorporación por referencia

[0067] Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente mencionadas en esta especificación se incorporan en la presente por referencia al mismo grado como si cada publicación, solicitud o solicitud de patente individual se indicara de manera específica e individualmente que se va a incorporar por referencia.

Breve Descripción de las Figuras

[0068] Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones anexas. Se obtendrá un mejor entendimiento de las características y ventajas de la presente invención por referencia a la siguiente descripción detallada que expone casos ilustrativos, en los cuales se utilizan los principios de la invención, y las figuras anexas de las cuales:

[0069] La Figura 1 ilustra la regulación por aumento de la expresión de SCN1A endógeno usando factores de transcripción modificados que se unen a varias regiones en el cromosoma 2 (con referencia a GRCh38.p12). Los datos se presentan como veces de cambio en la expresión de SCN1A con respecto a la condición de control (EGFP-KASH).

[0070] La Figura 2A, Figura 2B y Figura 2C ilustran la expresión relativa de SCN1A endógeno en células HEK293 usando activadores transcripcionales específicos de SCN1A (ver TABLA 1). Los datos se presentan como veces de cambio con respecto

a condiciones de control y se muestran en una escala Log_{10}.

[0071] La Figura 3A ilustra la expresión relativa de SCN1A endógeno en neuronas GABA usando un activador transcripcional específico de SCN1A (Construcción 30). Los datos se presentan como veces de cambio con respecto a condiciones de control (CBA-EGFP).

[0072] La Figura 3B ilustra la expresión relativa de SCN1A endógeno en neuronas GABA usando activadores transcripcionales específicos de SCN1A (Construcciones 25 y 16). Los datos se presentan como veces de cambio con respecto a condiciones de control (CBA-EGFP) en Log_{10}.

[0073] La Figura 4 ilustra la expresión relativa de SCN1A endógeno y los 40 genes vecinos más cercanos impulsados por un factor de transcripción específico de SCN1A (Construcción 30). Los datos se presentan como veces de cambio con respecto a condiciones de control (CBA-EGFP-KASH) en Log_{10}.

[0074] La Figura 5A y Figura 5B ilustran la expresión de un activador transcripcional específico de *SCN1A in vivo en* comparación con un casete de expresión de control que expresó eGFP. La Figura 5A ilustra la expresión relativa del gen SCN1A en ratones inyectados con eGFP de control o construcción 4 que comprende un activador transcripcional de SCN1A. La Figura 5B ilustra el cambio en la expresión de SCN1A en términos de porcentaje medio de eGFP. Estos experimentos indican que la activación transcripcional por la

construcción 4 dio por resultado aproximadamente 20-30% de regulación por aumento de la expresión de SCN1A.

[0075] La Figura 6A, la figura 6B, la figura 6C, la figura 6D, la figura 6E, la figura 6F y la figura 6G ilustran el efecto en convulsiones hipertérmicas en el modelo en ratón inactivado Scn1a^{tm1Kea} del síndrome de Dravet usando varios factores de transcripción específicos de SCN1A en comparación con un control. Se les aplicó una infusión a ratones P1 Scn1a +/- (heterocigotos; HET) con AAV9-EGFP o un vector AAV9 que expresa un factor de transcripción específico a SCN1A (una de las Construcciones 31-34, 42 y 43). A P26-P28, los ratones infundidos se corrieron a través del ensayo de convulsiones inducidas por hipertermia y se registró la temperatura interna a la cual experimentaron una convulsión tónico-clónica. La Figura 6D muestra una comparación directa entre la construcción 32, que contiene una etiqueta HA ubicada entre el DBD y TAD, y la construcción 34, que no contiene una etiqueta HA. La Figura 6E muestra una comparación directa entre la Construcción 31, que contiene el sitio de unión de microARN m1 ubicado entre la región codificante y la extremidad de poliA, y la Construcción 32, que no contiene el sitio de unión de microARN m1. La Figura 6H ilustra el efecto en convulsiones hipertérmicas en el modelo en ratón mutante Scn1a^{RX} del síndrome de Dravet usando la construcción 31 (en comparación con el control inyectado con PBS).

[0076] La Figura 7A, figura 7B, figura 7C y figura 7D ilustran la supervivencia en el modelo en ratón inactivado Scn1a^{tm1Kea} del síndrome de Dravet bajo diferentes condiciones. La Figura 7A ilustra la comparación entre ratones de tipo silvestre (PBS WT) y Scn1a +/- (PBS HET) en un ensayo de supervivencia. Se les aplicó una infusión con PBS a ratones P1 Scn1a +/- (N=53) y Scn1a +/+ (N=54). Se observaron los ratones en su jaula hogar diariamente y en el caso de cualquier mortalidad, se registró la fecha. Hubo una diferencia significativa en la supervivencia entre animales Scn1a +/- y Scn1a +/+ ($P<0.0001$). Las figuras 7B-D ilustran el efecto en la supervivencia en un modelo en ratón del síndrome de Dravet para ratones tratados con varios factores de transcripción específicos de SCN1A en comparación con un control. A ratones P1 Scn1a +/- se les aplicó una infusión con PBS o un vector AAV9 que expresa un factor de transcripción específico a SCN1A (Construcciones 31 o 33). Se observaron los ratones en su jaula hogar diariamente y en el caso de cualquier mortalidad, se registró la fecha. La Figura 7D muestra una comparación directa entre la Construcción 31, que contiene el sitio de unión de microARN m1 ubicado entre la región codificante y la extremidad de poliA, y la Construcción 33, que no contiene el sitio de unión de microARN m1. La Figura 7E ilustra la supervivencia en el modelo en ratón mutante Scn1a^{RX} del síndrome de Dravet usando

la construcción 31 (en comparación con el control inyectado con PBS).

[0077] La Figura 8 ilustra la expresión relativa de ARNm de Scn1A en diferentes tejidos cerebrales después del suministro intraparenquimatoso de un vector AAV9 que codifica para un factor de transcripción específico a SCN1A (Construcción 33), administrado a dos macacos cynomolgus a $1.2x10^{12}$ gc/animal, normalizado a dos animales de control no tratados. Todos los animales se sacrificaron 28 días después de la inyección y se cuantificó el ARNm de Scn1A en las muestras de tejido por PCR Taqman. Los datos se reportan como expresión normalizada de ARNm diana en diferentes secciones de tejido del cerebro. También se registraron resultados similares con un diferente conjunto de cebadores/sonda derivados del gen Scn1a.

[0078] Las figuras 9A-9F muestran el patrón de expresión de EGFP en la región de circunvolución dentada de hipocampo en titíes después del tratamiento con vectores de AAV9 que comprenden un transgén de EGFP bajo el control del promotor EF1a, promotor RE 2 (SEQ ID NO: 2), o promotor RE 2 (SEQ ID NO: 2) con un sitio de unión de microARN m1 (SEQ ID NO: 7) ubicado entre la región codificante de EGFP y el sitio de poliA. Se muestra una región representativa de la región de la circunvolución dentada del hipocampo para cada tratamiento del vector. La fila superior muestra los núcleos celulares teñidos con DAPI y la fila inferior muestra las regiones

positivas para GFP teñidas con un anticuerpo anti-GFP. En la figura 9A (tratamiento de EF1a) la región de hilo de CA4 de hipocampo se describe en amarillo y las flechas apuntan a la capa de cuerpo celular de gránulo de célula dentada (DG). La Figura 9B y la Figura 9C se centran en la misma región. La región CA4, que es una mezcla de interneuronas excitadoras e inhibitorias, se destaca ya que fue la única región de expresión significativa en la condición RE 2 + m1. Con la expresión transgénica impulsada por EF1a y RE 2, la expresión de GFP fue más generalizada e incluyó otras regiones del hipocampo. Se cree que la capa de células DG contiene principalmente neuronas excitatorias. La expresión de GFP impulsada por EF1a y RE 2 es visible en la capa de células DG (Figura 9D y figura 9E) aún no está presente en animales tratados con RE 2 + m1 (Figura 9F) (puntas de flecha blancas).

[0079] Las figuras 10A-10L muestra que el patrón de expresión de EGFP en la región de circunvolución dentada de hipocampo en titíes después del tratamiento con vectores de AAV9 que comprenden un transgén de EGFP bajo el control del promotor EF1a, promotor RE 2 (SEQ ID NO: 2), o promotor RE 2 (SEQ ID NO: 2) con un sitio de unión de microARN m1 (SEQ ID NO: 7) ubicado entre la región codificadora de EGFP y el sitio de poliA se localiza principalmente en células positivas para parvalbúmina (PV) en los animales tratados con

RE 2 y RE 2 + m1. Se muestra una región representativa de la región de la circunvolución dentada del hipocampo para cada tratamiento del vector. La fila superior muestra las regiones positivas para GFP y la siguiente fila inferior muestra las mismas regiones teñidas con el marcador interneurónico inhibidor para PV. La región encajonada en las Figuras 10A-F se muestra en un aumento más alto en las Figuras 10G-L. La expresión de GFP impulsada por RE 2 y RE 2 + m1 se co-localiza principalmente con el marcador interneurónico inhibidor PV (Figuras 10H y 10K, 10I y 10L puntas de flecha blancas), mientras que en EG-EF1a la expresión de GFP no se localiza tan fácilmente en células positivas para PV (Figuras 10G y 10J puntas de flecha blancas). Además, las células positivas para GFP tienen una morfología claramente interneurónica de células altamente ramificadas con un cuerpo celular piramidal en animales tratados con RE 2 y RE 2 + m1 (Figuras 10H y 10I puntas de flecha amarillas) en comparación con una morfología de cuerpo celular menos distinta en los animales tratados con EF1a (Figura 10G puntas de flecha amarillas).

[0080] La Figura 11 muestra el genoma VG/diploide en muestras de tejido de corteza frontal (FC), corteza parietal rostral (PC rostral), corteza temporal (TC), corteza parietal caudal (PC caudal), hipocampo (Hip), médula (Med) y corteza occipital (OC) para animales tratados con AAV9-RE ^{GABA} -eTF ^{SCN1A}

administrado a 4.8E+13 u 8E+13 vg/animal a través de administración intracerebroventricular (ICV) unilateral (Ejemplo 10 y Ejemplo 11). Cada punto de datos representa el genoma VG/diploide para la muestra de tejido y las barras horizontales representan el genoma VG/diploide promedio para todas las muestras de tejido para cada animal.

[0081] La Figura 12 muestra los transcritos/µg de ARN en muestras de tejido de corteza frontal (FC), corteza parietal rostral (PC rostral), corteza temporal (TC), corteza parietal caudal (PC caudal), hipocampo (Hip), médula (Med) y corteza occipital (OC) para animales tratados con AAV9-RE ^{GABA} -eTF ^{SCN1A} administrado a 4.8E+13 u 8E+13 vg/animal a través de administración intracerebroventricular (ICV) unilateral (Ejemplo 10 y Ejemplo 11). Cada punto de datos representa el genoma VG/diploide para la muestra de tejido y las barras horizontales representan el genoma VG/diploide promedio para todas las muestras de tejido para cada animal. Los transcritos promedio para *ARFGAP2* fueron 1.85E+6/µg de ARN, y se indican por la línea de límite superior punteada. El límite de detección se indica por la línea de límite inferior punteada.

[0082] La Figura 13 muestra la biodistribución del vector (genoma VG/diploide) y la expresión del transgén (transcritos/µg de ARN) en muestras de tejido periférico fuera del cerebro. Las muestras de tejido periférico que se

muestran son médula espinal C2/L4 (SC C2/L4), ganglio de la raíz dorsal C2/L4 (DRG C2/L4), hígado, bazo, corazón, riñón, pulmón, páncreas y testículos/ovario. La VCN promedio (biodistribución del vector) y el transcrito (expresión del transgén) en el cerebro del primate se indican por una línea punteada.

Descripción Detallada de la Invención

[0083] En la presente se proporcionan factores de transcripción modificados, o los eTF, de origen no natural y se han diseñado para unirse a un sitio diana genómico y modular la expresión de un gen endógeno de interés. Estos eTF se pueden diseñar para regular por aumento o regular por disminución (la expresión de ARN y/o proteína) de un gen de interés. También se proporcionan en la presente sitios de unión de microARN que se pueden incorporar en un vector viral y proporcionan la expresión selectiva de un transgén en neuronas de parvalbúmina (PV).

[0084] En un aspecto, la solicitud proporciona eTF que son capaces de regular por aumento la expresión del gen de canal de sodio regulado por voltaje subunidad alfa 1 (SCN1A) y aumentar la expresión de su producto proteico correspondiente Nav1.1 y métodos de uso de los mismos para tratar enfermedades o trastornos asociados con una deficiencia en Nav1.1, tal como, por ejemplo, síndrome de Dravet.

[0085] En otro aspecto, la solicitud proporciona sitios de

unión de microARN que reducen la expresión de un ARNm que contiene el sitio de unión de microARN en las neuronas excitatorias, lo que conduce a la expresión selectiva del gen en las neuronas GABAérgicas o de parvalbúmina (PV) y métodos de uso de las mismas para la expresión selectiva de un gen de interés en las neuronas PV.

Definiciones

[0086] Como se usa en la presente, las formas singulares "una", "un" y "la/el" se propone que incluyan también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, al grado en que los términos "que incluye", "incluye", "que tiene", "tiene", "con" o variantes de los mismos se usan en la descripción detallada y/o las reivindicaciones, se propone que estos términos sean inclusivos de una manera similar al término "que comprende".

[0087] El término "aproximadamente" o "aproximadamente" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular como se determina por un experto en la técnica, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar dentro de una o más desviaciones estándar, por la práctica en la técnica. De manera alternativa, "aproximadamente" puede significar un intervalo de hasta 20%, hasta 15%, hasta 10%, hasta 5% o hasta 1% de un valor dado.

[0088] Los términos “que determina”, “que mide”, “que evalúa”, “que valora”, “que ensaya”, “que analiza” y sus equivalentes gramaticales se pueden usar indistintamente en la presente para referirse a cualquier forma de medición e incluyen la determinación de si un elemento está presente o no (por ejemplo, detección). Estos términos pueden incluir tanto determinaciones cuantitativas y/o cualitativas. La valoración puede ser relativa o absoluta.

[0089] El término “expresión” se refiere al proceso por el cual una secuencia de ácido nucleico o un polinucleótido se transcribe de una plantilla de ADN (tal como en ARNm u otro transcrito de ARN) y/o el proceso por el cual un ARNm transcrito se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos o proteínas. Los transcritos y polipéptidos codificados se pueden referir de manera colectiva como “producto génico”. Si el polinucleótido se deriva de ADN genómico, la expresión puede incluir el empalme del ARNm en una célula eucariota.

[0090] Como se usa en la presente, “operativamente unido”, “enlace operativo", "operativamente unido” o equivalentes gramaticales de los mismos se refieren a la yuxtaposición de elementos genéticos, por ejemplo, un promotor, un intensificador, una secuencia de poliadenilación, etc., en donde los elementos están en una relación que les permite operar de la manera esperada. Por ejemplo, un elemento

regulador, que puede comprender secuencias promotoras y/o intensificadoras, se une de manera operativa a una región codificadora si el elemento regulador ayuda a iniciar la transcripción de la secuencia codificadora. Pueden haber residuos intermedios entre el elemento regulador y la región codificadora siempre y cuando se mantenga esta relación funcional.

[0091] Un "vector" como se usa en la presente se refiere a una macromolécula o asociación de macromoléculas que comprende o se asocia con un polinucleótido y que se puede usar para mediar el suministro del polinucleótido a una célula. Los ejemplos de vectores incluyen plásmidos, vectores virales, liposomas y otros vehículos de suministro de genes. El vector en general comprende elementos genéticos, por ejemplo, elementos reguladores, unidos operativamente a un gen para facilitar la expresión del gen en una diana.

[0092] Como se usa en la presente, "un casete de expresión" y "un casete de ácido nucleico" se usan indistintamente para referirse a una combinación de secuencias o elementos de ácido nucleico que se expresan conjuntamente o se unen operativamente para la expresión. En algunos casos, un casete de expresión se refiere a la combinación de elementos reguladores y un gen o genes a los que están unidos operativamente para la expresión.

[0093] El término "AAV" es una abreviatura de virus

adenoasociado, y se puede usar para referirse al virus mismo o un derivado del mismo. El término abarca todos los serotipos, subtipos y formas tanto de origen natural como recombinantes, excepto cuando se requiera lo contrario. La abreviación "rAAV" se refiere a virus adenoasociado recombinante, también se refiere a vector AAV recombinante (o "vector rAAV"). El término "AAV" incluye AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, rh10 e híbridos de los mismos, AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV equino, AAV primate, AAV no primate y AAV ovino. Las secuencias genómicas de varios serotipos de AAV, así como las secuencias de las repeticiones terminales nativas (TR), proteínas Rep y subunidades cápside se conocen en la técnica. Estas secuencias se pueden encontrar en la literatura o en bases de datos públicas tal como GenBank. Un "vector de rAAV" como se usa en la presente se refiere a un vector de AAV que comprende una secuencia de polinucleótido no de origen AAV (es decir, un polinucleótido heterólogo a AAV), habitualmente una secuencia de interés para la transformación genética de una célula. En general, el polinucleótido heterólogo está flanqueado por al menos una, y en general por dos, secuencias de repetición terminal invertida (ITR) de AAV. Un vector de rAAV puede ser ya sea hebra individual (ssAAV) o autocomplementario (scAAV). Un "virus AAV" o "partícula viral de AAV" se refiere a una partícula viral compuesta de al

menos una proteína cápside de AAV y un vector de rAAV de polinucleótido en cápside. Si la partícula comprende un polinucleótido heterólogo (es decir, un polinucleótido distinto de un genoma de AAV tipo silvestre tal como un transgén que se va a administrar a una célula de mamífero), se denomina habitualmente "partícula de vector rAAV" o simplemente "partícula de rAAV". De esta manera, la producción de la partícula de rAAV necesariamente incluye la producción del vector de rAAV, puesto que este vector está contenido dentro de una partícula de rAAV.

[0094] Como se usa en la presente, los términos "tratar", "tratamiento", "terapia" y similares se refieren a aliviar, retrasar o desacelerar la progresión, profilaxis, atenuación, reducir los efectos o síntomas, impedir el inicio, inhibir o mejorar el inicio de las enfermedades o trastornos. Los métodos de la presente descripción se pueden usar con cualquier mamífero. Mamíferos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a ratas, gatos, perros, caballos, vacas, ovejas, cerdos y más preferentemente humanos. Un beneficio terapéutico incluye la erradicación o mejora del trastorno subyacente que se trata. Además, se logra un beneficio terapéutico con la erradicación o mejora de uno o más de los síntomas fisiológicos asociados con el trastorno subyacente de modo que se observa una mejora en el sujeto, a pesar de que el sujeto puede estar todavía afectado con el trastorno

subyacente. En algunos casos, para beneficio profiláctico, se puede administrar un producto terapéutico a un sujeto en riesgo de desarrollar una enfermedad particular, o a un sujeto que reporta uno o más de los síntomas fisiológicos de una enfermedad, incluso aunque no se haya realizado un diagnóstico de esta enfermedad. Los métodos de la presente descripción se pueden usar con cualquier mamífero. En algunos casos, el tratamiento puede dar por resultado una disminución o cese de síntomas (por ejemplo, una reducción en la frecuencia, duración y/o severidad de convulsiones). Un efecto profiláctico incluye retrasar o eliminar la aparición de una enfermedad o condición, retrasar o eliminar el inicio de síntomas de una enfermedad o condición, desacelerar, detener o invertir la progresión de una enfermedad o condición, o cualquier combinación de los mismos.

[0095] El término "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a esa cantidad de una composición descrita en la presente que es suficiente para afectar la aplicación propuesta, incluyendo pero no limitado a tratamiento de enfermedad, como se define a continuación. La cantidad terapéuticamente efectiva puede variar dependiendo de la aplicación de tratamiento propuesta (*in vivo*), o el sujeto y la condición de enfermedad que se trata, por ejemplo, el peso y edad del sujeto, la severidad de la condición de enfermedad, la forma de administración y

similares, que se pueden determinar fácilmente por un experto en la técnica. El término también se aplica a una dosis que inducirá una respuesta particular en una célula diana. La dosis específica variará dependiendo de la composición particular elegida, el régimen de dosificación que se va a seguir, si se administra en combinación con otros compuestos, programación de administración, el tejido al cual se administra y el sistema de administración física en el cual se porta.

[0096] Un "fragmento" de una secuencia de nucleótidos o péptidos se refiere a una secuencia que es más corta que una secuencia de referencia o "longitud completa".

[0097] Una "variante" de una molécula se refiere a variaciones alélicas de estas secuencias, es decir, una secuencia sustancialmente similar en estructura y actividad biológica a ya sea la molécula completa o a un fragmento de la misma.

[0098] Un "fragmento funcional" de una secuencia de proteína o ADN se refiere a un fragmento que retiene una actividad biológica (ya sea funcional o estructural) que es sustancialmente similar a una actividad biológica de la secuencia de proteína o ADN de longitud completa. Una actividad biológica de una secuencia de ADN puede ser su capacidad para tener influencia en la expresión de una manera conocida que se va a atribuir a la secuencia de longitud

completa.

[0099] Los términos "sujeto" e "individuo" se usan indistintamente en la presente para referirse a un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente un humano. Los métodos descritos en la presente pueden ser útiles en productos terapéuticos para humano, aplicaciones veterinarias y/o estudios preclínicos en modelos animales de una enfermedad o condición.

[00100] El término "*in vivo*" se refiere a un evento que tiene lugar en el cuerpo de un sujeto.

[00101] El término "*in vitro*" se refiere a un evento que tiene lugar fuera del cuerpo de un sujeto. Por ejemplo, un ensayo *in vitro* abarca cualquier ensayo ejectuado fuera de un sujeto. Los ensayos *in vitro* abarcan ensayos basados en células en los cuales se emplean células vivas o muertas. Los ensayos *in vitro* también abarcan un ensayo sin células en el cual no se emplean células intactas.

[00102] En general, "identidad de secuencia" u "homología de secuencia", que se puede usar indistintamente, se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido de dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos, respectivamente. Habitualmente, las técnicas para determinar la identidad de secuencia incluyen comparar dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos y determinar su porcentaje de identidad. Las comparaciones de secuencia, tal

como para el propósito de valorar identidades, se pueden realizar por cualquier algoritmo adecuado de alineación, incluyendo pero no limitado, el algoritmo Needleman-Wunsch (ver, por ejemplo, el alineador EMBOSS Needle disponible en www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/, opcionalmente con ajustes predeterminados), el algoritmo BLAST (ver, por ejemplo, la herramienta de alineación BLAST disponible en blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, opcionalmente con ajustes predeterminados) y el algoritmo Smith-Waterman (ver, por ejemplo, el alineador EMBOSS Water disponible en www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/, opcionalmente con ajustes predeterminados). La alineación óptima se puede valorar usando cualquier parámetro adecuado de un algoritmo elegido, incluyendo los parámetros predeterminados. El "porcentaje de identidad", también referido como "porcentaje de homología", entre dos secuencias se puede calcular como el número de coincidencias exactas entre dos secuencias alineadas de manera óptima divididas por la longitud de la secuencia de referencia y multiplicadas por 100. El porcentaje de identidad también se puede determinar, por ejemplo, al comparar información de secuencia usando el programa de computadora avanzado BLAST, que incluye la versión 2.2.9, disponible de National Institutes of Health. El programa BLAST se basa en el método de alineación de Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 87:2264-2268

(1990) y como se analiza en Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990); Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 90:5873-5877 (1993); y Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997). Brevemente, el programa BLAST define la identidad como el número de símbolos alineados idénticos (es decir, nucleótidos o aminoácidos), dividido por el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. El programa se puede usar para determinar el por ciento de identidad sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Se proporcionan parámetros predeterminados para optimizar búsquedas con secuencias cortas de consulta, por ejemplo, con el programa Blastp. El programa también permite el uso de un filtro SEG para enmascarar segmentos de las secuencias de consulta como se determina por el programa SEG de Wootton y Federhen, Computers and Chemistry 17: 149-163(1993). La alta identidad de secuencia en general incluye intervalos de identidad de secuencia de aproximadamente 80% a 100% y valores enteros entre los mismos.

[00103] Como se usa en la presente, “modificado” con referencia a una proteína se refiere a una proteína de origen no natural, que incluye, pero no se limita a, una proteína que se deriva de una proteína que se presenta de manera natural, o donde una proteína de origen natural se ha modificado o reprogramado para tener una cierta propiedad.

[00104] Como se usa en la presente, "sintético" y "artificial" se usan indistintamente para referirse a una proteína o un dominio de la misma que tiene baja identidad de secuencia (por ejemplo, menos del 50% de identidad de secuencia) a una proteína humana que es de origen natural. Por ejemplo, los dominios VPR y VP64 son dominios de transactivación sintéticos.

[00105] Como se usa en la presente, un "factor de transcripción modificado" o "eTF" se refiere como una proteína de unión a ADN de origen no natural o un modulador de transcripción de origen no natural que se ha modificado o reprogramado para unirse a un sitio de unión a diana específico y/o para incluir un dominio efector de transcripción modificado o reemplazado.

[00106] Como se usa en la presente, un "dominio de unión a ADN" se puede utilizar para hacer referencia a uno o más motivos de unión a ADN, tal como un dedo de zinc o un motivo de hélice-bucle-hélice básico (bHLH), individual o colectivamente como parte de una proteína de unión a ADN.

[00107] Los términos "dominio de activación de transcripción", "dominio de activación transcripcional", "dominio de transactivación", "dominio de transactivación" y "TAD" se utilizan indistintamente en la presente y se refieren a un dominio de una proteína que, junto con un dominio de unión a ADN, puede activar la transcripción de un

promotor al poner en contacto la maquinaria transcripcional (por ejemplo, factores de transcripción generales y/o ARN-polimerasa) ya sea directamente o a través de otras proteínas conocidas como co-activadores.

[00108] Los términos "dominio represor transcripcional", "dominio represor de transcripción" y "TRD" se usan indistintamente en la presente y se refieren a un dominio de una proteína que junto con un dominio de unión a ADN puede reprimir la transcripción de un promotor al poner en contacto la maquinaria transcripcional (por ejemplo, factores de transcripción generales y/o ARN polimerasa) ya sea directamente o a través de otras proteínas conocidas como co-represores.

[00109] El término "GRCh38.p12" se refiere a la liberración de parche 12 de Genome Reference Consortium Human Build 38 (GRCh38.p12) que tiene el No. de acceso a GenBank Assembly GCA_000001405.27 y fecha de 21/12/2017.

[00110] A menos que se indique lo contrario, todos los términos usados en la presente tienen el mismo significado como lo tendrían para un experto en la técnica y la práctica de la presente invención empleará técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y tecnología de ADN recombinante, que están dentro del conocimiento de los expertos en la técnica.

Factores de Transcripción Modificados (eTF) que Regulan por Aumento SCN1A

[00111] En un aspecto, la solicitud proporciona los eTF que son capaces de regular por aumento la expresión del gen del canal de sodio regulador por voltaje subunidad alfa 1 (SCN1A) y aumentar la expresión de su producto proteico correspondiente Nav1.1. El gen SCN1A pertenece a una familia de genes que codifican para subunidades usadas para montar canales de sodio. Estos canales, que transportan iones de sodio positivamente cargados a las células, juegan un papel clave en la capacidad de una célula para generar y transmitir señales eléctricas. El gen SCN1A codifica una parte (la subunidad alfa) de un canal de sodio llamado Nav1.1. Estos canales se encuentran principalmente en el cerebro, donde controlan el flujo de iones de sodio en las células. Los canales Nav1.1 se implican al transmitir señales de una célula nerviosa (o neurona) a otra. Se ha encontrado que varias mutaciones en el gen SCN1A provocan epilepsia genética con convulsiones febriles positivo (GEFS+), que es un espectro de trastornos convulsivos de diversa gravedad. Estas condiciones incluyen convulsiones febriles simples (asociadas con fiebre), que comienzan en la infancia y usualmente se detienen a los 5 años, y convulsiones febriles positivo (FS+). FS+ implica convulsiones febriles y otros tipos de

convulsiones, incluyendo aquellas no relacionadas con fiebres (convulsiones afebriles), que continúan más allá de la infancia. El espectro GEFS+ también incluye otras condiciones, tal como síndrome de Dravet (también conocido como epilepsia mioclónica grave de la infancia o SMEI), que provocan convulsiones más serias que duran más tiempo y pueden ser difíciles de controlar. Estas convulsiones recurrentes (epilepsia) pueden empeorar con el paso del tiempo y frecuentemente se acompañan por un deterioro de función cerebral. Muchas otras mutaciones se han asociado con migraña hemipléjica familiar, una forma de dolor de cabeza por migraña que se presenta en familias y al menos una mutación se ha asociado con la eficacia de ciertos medicamentos anticonvulsivos. Por lo tanto, un eTF proporcionado en la presente que incrementa la expresión de SCN1A se puede usar para tratar una variedad de enfermedades o trastornos asociados con mutaciones en el canal Nav1.1.

[00112] Los factores de transcripción (TF) son proteínas que se unen a secuencias específicas en el genoma y controlan la expresión de genes. Los factores de transcripción modificados o eTF proporcionados en la presente que regulan por aumento SCN1A son proteínas de origen no natural que comprenden un dominio de unión a ADN (DBD) y al menos un dominio que es un modulador transcripcional, por ejemplo, ya sea un dominio de activación transcripcional (TAD) o un dominio represor

transcripcional (TRD). En una modalidad, un eTF que regula por aumento SCN1A puede comprender un DBD y un TAD (por ejemplo, TAD-DBD o DBD-TAD), en donde el DBD y TAD se pueden derivar de la misma proteína o de diferentes proteínas. En otra modalidad, un eTF que regula por aumento SCN1A puede comprender un DBD y dos TAD, en donde el DBD y los TAD se derivan de la misma proteína, el DBD se deriva de una primera proteína y ambos TAD se derivan de una segunda proteína, el DBD y un TAD se derivan de una primera proteína y el segundo TAD se deriva de una segunda proteína, o el DBD se deriva de una primera proteína, un TAD se deriva de una segunda proteína y el segundo TAD se deriva de una tercera proteína (por ejemplo, TAD1-DBD-TAD1, TAD1-DBD-TAD2, TAD1-TAD1-DBD, TAD1-TAD2-DBD, DBD-TAD1-TAD1 o DBD-TAD1-TAD2). En otra modalidad, un eTF que regula por aumento SCN1A puede comprender un DBD y tres TAD, en donde el DBD y los TAD se derivan de la misma proteína, el DBD se deriva de una primera proteína y los TAD se derivan de una o más proteínas diferentes, o en donde el DBD y todos los TAD se derivan de diferentes proteínas, por ejemplo TAD_X-TAD_X-TAD_X-DBD, TAD_X-TAD_X-DBD-TAD_X, TAD_X-DBD-TAD_X-TAD_X, or DBD-TAD_X-TAD_X-TAD_X, en donde cada X se selecciona independientemente y puede ser igual o diferente de uno o todos los otros TAD. Los ejemplos incluyen, por ejemplo,AD1-TAD1-DBD-TAD1, TAD1-TAD1-DBD-TAD2, TAD1-TAD2-DBD-TAD1, TAD1-TAD2-DBD-TAD2, TAD1-TAD2-DBD-TAD3,

TAD1-DBD-TAD1-TAD1, TAD1- DBD-TAD2-TAD2, TAD1-DBD-TAD1-TAD2, TAD2-DBD-TAD1-TAD2, TAD1-DBD-TAD2-TAD3, TAD1-TAD1-TAD1-DBD, TAD1-TAD2-TAD2-DBD, TAD1-TAD2-TAD2-DBD, TAD1-TAD2-TAD3-DBD, DBD-TAD1-TAD1-TAD1, DBD-TAD1-TAD1-TAD2, DBD-TAD1-TAD2-TAD2, o DBD-TAD1-TAD2-TAD3, etc. En otra modalidad, un eTF que regula por aumento SCN1A puede comprender un DBD y cuatro TAD, en donde el DBD y los TAD se derivan de la misma proteína, el DBD se deriva de una primera proteína y los TAD se derivan de una o más proteínas diferentes, o en donde el DBD y todos los Tad se derivan de diferentes proteínas, por ejemplo, $TTAD_X$-TAD_X-TAD_X-TAD_X-DBD, TAD_X-TAD_X-TAD_X-DBD-TAD_X, TAD_X-TAD_X-DBD-TAD_X-TAD_X, TAD_X- DBD-TAD_X-TAD_X-TAD_X or DBD-TAD_X-TAD_X-TAD_X-TAD_X, en donde cada X se selecciona independientemente y puede ser igual o diferente de uno o todos los otros TAD. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, AD1-TAD1-DBD-TAD1-TAD1, TAD1-TAD1-DBD-TAD2-TAD2, TAD1-TAD2-DBD-TAD1-TAD2, TAD1-TAD2-DBD-TAD2-TAD1, TAD1-TAD2-DBD-TAD1-TAD3, TAD1-TAD3-DBD-TAD1-TAD2, TAD1-TAD2-DBD-TAD3-TAD4, TAD1-TAD1-TAD1-DBD-TAD2, TAD1-TAD2-TAD3-DBD-TAD4, TAD1-DBD-TAD1-TAD1-TAD2, TAD1-DBD-TAD2-TAD3-TAD4, TAD1-DBD-TAD1-TAD2-TAD3, TAD2-DBD-TAD1-TAD2-TAD3, TAD1-DBD-TAD2-TAD3-TAD4, TAD1-TAD1-TAD1-TAD1-DBD, TAD1-TAD2-TAD2-TAD3-DBD, TAD1-TAD2-TAD3-TAD4-DBD, DBD-TAD1-TAD1-TAD1-TAD1, DBD-TAD1-TAD1-TAD2-TAD2, DBD-TAD1-TAD2-TAD3-TAD4, o DBD-TAD1-TAD2-TAD3-TAD3, En una modalidad, un eTF que regula por aumento SCN1A comprende un DBD y dos TAD que se ubican en el mismo

extremo del DBD (por ejemplo, extremo N-terminal o extremo C-terminal) en donde el DBD se deriva de una primera proteína y ambos TAD se derivan de una segunda proteína, o el DBD se deriva de una primera proteína, un TAD se deriva de una segunda proteína y el segundo TAD se deriva de una tercera proteína (por ejemplo, TAD1-TAD1-DBD, TAD1-TAD2-DBD, DBD-TAD1-TAD1, or DBD-TAD1-TAD2). En ciertas modalidades, el DBD puede ser una construcción sintética que contiene dominios de múltiples proteínas.

[00113] En ciertas modalidades, un DBD y un TAD y/o dos TAD se pueden conjugar directamente, por ejemplo, sin secuencia de aminoácidos intermedia, un DBD y un TAD y/o dos TAD se pueden conjugar usando un ligador peptídico, o combinaciones de los mismos. En ciertas modalidades, un DBD se conjuga con un TAD y/o un TAD se conjuga con un segundo TAD mediante un ligador que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, o 100 aminoácidos, o de 1-5, 1-10, 1-20, 1-30, 1-40, 1-50, 1-75, 1-100, 5-10, 5-20, 5-30, 5-40, 5-50, 5-75, 5-100, 10-20, 10-30, 10-40, 10-50, 10-75, 10-100, 20-30, 20-40, 20-50, 20-75, o 20-100 aminoácidos. En algunos casos, el DBD y el TAD y/o dos TAD se conjugan mediante residuos intermedios de origen natural encontrados en las proteínas que se presentan de forma natural de las cuales se derivan los dominios. En otras modalidades, el DBD y TAD y/o dos TAD se

conjugan mediante una secuencia ligadora sintética o exógena. Los ligadores adecuados pueden ser flexibles, escindibles, no escindibles, hidrófilos e/o hidrófobos. En ciertas modalidades, un DBD y un TAD y/o dos TAD se pueden fusionar conjuntamente mediante un ligador que comprende una pluralidad de residuos de glicina y/o serina. Ejemplos de ligadores peptídicos de glicina/serina incluyen [GS]n, [GGGS]n (SEQ ID NO: 179), [GGGGS]n (SEQ ID NO: 180), [GGSG]n (SEQ ID NO: 181), en donde n es un número entero igual a o mayor que 1. En ciertas modalidades, un ligador útil para conjugar un DBD y un TAD y/o dos TAD es GGSGGGGG (SEQ ID NO: 177). En ciertas modalidades, un ligador útil para conjugar un DBD y un TAD y/o dos TAD es GGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 178). En ciertas modalidades, cuando un DBD se conjuga con dos TAD, el primer y segundo TAD se pueden conjugar con el DBD con el mismo o diferentes ligadores, o un TAD se puede conjugar con el DBD con un ligador y el otro TAD se conjuga directamente con el DBD (por ejemplo, sin una secuencia ligadora intermedia), o ambos TAD se pueden conjugar directamente con el DBD (por ejemplo, sin secuencias ligadoras intermedias). En ciertas modalidades, cuando un DBD se conjuga con dos TAD en el mismo extremo (por ejemplo, extremo N-terminal o extremo C-terminal), el ligador que conecta los dos TAD puede ser el mismo o diferente del ligador que conecta los TAD con el DBD, o los TAD se pueden

conjugar entre sí con un ligador pero los TAD se conjugan directamente con el DBD (por ejemplo, sin una secuencia ligadora intermedia), o los TAD se pueden conjugar directamente entre sí (por ejemplo, sin secuencias ligadoras intermedias) pero los TAD se conjugan con el DBD con un ligador. En ciertas modalidades, los eTF proporcionados en la presente que regulan por aumento SCN1A no comprenden una o más etiquetas HA (por ejemplo, SEQ ID NO: 171) ubicado entre el DBD y el uno o más TAD.

[00114] Los eTF proporcionados en la presente que regulan por aumento SCN1A tienen diferentes propiedades de los factores de transcripción de origen natural. En ciertas modalidades, un eTF que regula por aumento SCN1A comprende un DBD derivado de una proteína de origen natural que se ha modificado de modo que el DBD se une a un sitio diana diferente en comparación con la proteína de origen natural de la que se derivó y el eTF que comprende este DBD modificado modula la expresión de un gen diferente (por ejemplo, SCN1A) en comparación con la proteína de origen natural de la que se derivó el DBD (por ejemplo, un gen que no es SCN1A). En otras modalidades, un eTF proporcionado en la presente que regula por aumento SCN1A comprende un TAD derivado de una proteína de origen natural que se ha modificado de modo que el eTF que comprende este TAD modificado modula la expresión de un gen diferente (por ejemplo, SCN1A) en comparación con la proteína

de origen natural de la que se derivó el TAD (por ejemplo, un gen que no es SCN1A), y/o el eTF que comprende este TAD modificado modula de manera diferente la expresión de SCN1A (por ejemplo, regulación por aumento versus regulación por disminución) en comparación con la proteína de origen natural de la que se derivó el TAD. En ciertas modalidades, un eTF proporcionado en la presente que regula por aumento SCN1A comprende un DBD derivado de una proteína de origen natural y un TAD derivado de una proteína de origen natural (ya sea la misma o diferentes proteínas), en donde tanto el DBD como TAD se han modificado. En estas modalidades, el DBD se puede unir a un sitio diana diferente en comparación con la proteína de origen natural de la que se derivó, el eTF que comprende este TAD y DBD modificado modula la expresión de un gen diferente (por ejemplo, SCN1A) en comparación con las proteínas que se presentan de forma natural de las cuales se derivaron los dominios (por ejemplo, genes que no son SCN1A), y/o el eTF que comprende este TAD y DBD modificado modula de manera diferente la expresión de SCN1A (por ejemplo, regula por aumento vs. disminución) en comparación con las proteínas que se presentan de forma natural de las cuales se derivaron los dominios DBD y TAD.

Dominios de unión a ADN (DBD)

[00115] Los eTF proporcionados en la presente que regulan por aumento SCN1A pueden comprender cualquier DBD adecuado que se

une a un sitio diana de interés (por ejemplo, un sitio diana que da como resultado la regulación por aumento de SCN1A cuando se une por un eTF proporcionado en la presente). En ciertas modalidades, el DBD puede ser un DBD sintéticamente diseñado. En otras modalidades, el DBD se puede derivar de una proteína de origen natural. Las familias de DBD incluyen hélice-bucle-hélice básico (bHLH) (por ejemplo, c-Myc), cremallera de leucina básica (por ejemplo, C/EBP), hélice-giro-hélice (por ejemplo, Oct-1) y dedos de zinc (por ejemplo, EGR1 o EGR3). Estas familias exhiben un amplio intervalo de especificidades de unión a ADN y dianas génicas. Como se contempla en la presente, cualquiera de las proteínas de factor de transcripción de humano conocidas puede servir como una plataforma de proteínas para modificar y/o reprogramar un DBD para reconocer un sitio diana específico que da por resultado la modulación de expresión de un gen SCN1A endógeno. En modalidades de ejemplo, un DBD proporcionado en la presente comprende un dominio de dedo de zinc, un dominio de unión a TALEN o un complejo de ARNg/Cas.

[00116] El DBD proporcionado en la presente se puede diseñar para reconocer cualquier sitio diana que dé como resultado una regulación por aumento de SCN1A. En modalidades de ejemplo, un DBD se diseña para reconocer una ubicación genómica y regular por aumento la expresión de un gen SCN1A endógeno cuando se une por un eTF. Los sitios de unión

capaces de modular la expresión de un gen SCN1A endógeno cuando se unen por un eTF proporcionado en la presente se pueden ubicar en cualquier parte en el genoma que da por resultado la modulación de la expresión génica de SCN1A. En varias modalidades, el sitio de unión se puede ubicar en un cromosoma diferente de SCN1A, en el mismo cromosoma como SCN1A, ascendente al sitio de inicio transcripcional (TSS) del gen SCN1A, descendente al TSS del gen SCN1A, próximo al TSS del gen SCN1A, distal al gen SCN1A, dentro de la región codificadora del gen SCN1A, dentro de un intrón del gen SCN1A, descendente a la extremidad poliA del gen SCN1A, dentro de una secuencia promotora que regula el gen SCN1A, o dentro de una secuencia intensificadora que regula el gen SCN1A.

[00117] El DBD se puede diseñar para unirse a un sitio de unión a diana de cualquier longitud en tanto que proporcione reconocimiento específico de la secuencia de sitio de unión a diana por el DBD, por ejemplo, con mínima o sin unión fuera de diana. En ciertas modalidades, el sitio de unión a diana puede modular la expresión de SCN1A cuando se une por un eTF a un nivel que es al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces, 150 veces, 200 veces, 250 veces, 500 veces o más en comparación con todos los otros genes. En ciertas modalidades, el sitio de unión a diana puede modular la expresión de SCN1A cuando se une por un eTF

a un nivel que es al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces, 150 veces, 200 veces, 250 veces, 500 veces o mayor en comparación con los 40 genes vecinos más cercanos (por ejemplo, los 40 genes ubicados más cerca en el cromosoma, ya sea en la ascendente o descendente a la secuencia codificadora de SCN1A). En ciertas modalidades, el sitio de unión a diana puede ser al menos 5 pb, 10 pb, 15 pb, 20 pb, 25 pb, 30 pb, 35 pb, 40 pb, 45 pb o 50 pb, o más. La longitud específica del sitio de unión se informará por el tipo de DBD en el eTF. En general, mientras más larga sea la longitud del sitio de unión, mayor será la especificidad para unión y modulación de la expresión génica (por ejemplo, sitios de unión más largos tienen menos efectos fuera de diana). En ciertas modalidades, un eTF que tiene un DBD que reconoce un sitio de unión a diana más largo tiene menos efectos fuera de diana asociados con unión no específica (tal como, por ejemplo, modulación de expresión de un gen fuera de diana o gen diferente de SCN1A) con respecto a los efectos fuera de diana observados con un eTF que tiene un DBD que se une a un sitio diana más corto. En algunos casos, la reducción en la unión fuera de diana es al menos 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces menor en comparación con un eTF comparable que tiene un DBD que reconoce un sitio de unión a diana más corto.

[00118] En ciertas modalidades, un DBD proporcionado en la

presente se puede modificar para que tenga afinidad de unión incrementada de modo que se una a un sitio de unión a diana durante un período de tiempo más largo de modo que un TAD conjugado con el DBD es capaz de reclutar más factores de transcripción y/o reclutar este factor de transcripción durante un período de tiempo más largo para ejercer un mayor efecto en el nivel de expresión del gen SCN1A endógeno. En ciertas modalidades, un DBD se puede modificar para incrementar su unión específica (o unión en diana) a un sitio diana deseado y/o modificado para disminuir su unión no específica o fuera diana.

[00119] En varias modalidades, se puede determinar la unión entre un DBD o eTF y un sitio de unión a diana usando varios métodos. En ciertas modalidades, la unión específica entre un DBD o eTF y un sitio de unión a diana se puede determinar usando un ensayo de desplazamiento de movilidad, ensayo de protección de DNasa o cualquier otro método *in vitro* conocido en la técnica para valorar la unión proteína-ADN. En otras modalidades, la unión específica entre un eTF y un sitio de unión a diana se puede determinar usando un ensayo funcional, por ejemplo, al medir la expresión (de ARN o proteína) de un gen (por ejemplo, SCN1A) cuando el sitio de unión a diana se une por el eTF. Por ejemplo, un sitio de unión a diana se puede colocar ascendente a un gen indicador (tal como, por ejemplo, eGFP) o el gen SCN1A en un vector contenido en una

célula o integrado en el genoma de la célula, en donde la célula expresa el eTF. De manera alternativa, se puede introducir un vector que expresa el eTF en un tipo de célula que contiene naturalmente el gen SCN1A. Los mayores niveles de expresión del gen indicador (o SCN1A) en presencia del eTF en comparación con un control (por ejemplo, ningún eTF o eTF que reconoce un sitio diana diferente) indican que el DBD del eTF se une al sitio diana. Los sistemas transcripcionales y traduccionales *in vitro* adecuados (por ejemplo, no basados en células) también se pueden usar de manera similar. En ciertas modalidades, un eTF que se une a un sitio diana puede tener al menos 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces, 150 veces o más expresión del gen indicador o SCN1A en comparación con un control (por ejemplo, ningún eTF o eTF que reconoce un sitio diana diferente).

[00120] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que favorece la expresión de SCN1A reconoce un sitio de unión a diana que tiene al menos 9pb, 12pb, 15pb, 18pb, 21pb, 24pb, 27pb, 30pb, 33pb o 36pb de tamaño; más de 9 bp, 12 bp, 15 bp, 18 bp, 21 bp, 24 bp, 27 bp, or 30bp; or from 9-33 bp, 9-30 bp, 9-27 bp, 9-24 bp, 9-21 bp, 9-18 bp, 9-15 bp, 9-12 bp, 12-33 bp, 12-30 bp, 12-27 bp, 12-24 bp, 12-21 bp, 12-18 bp, 12-15 bp, 15-33 bp, 15-30 bp, 15-27 bp, 15-24 bp, 15-21 bp, 15-18 bp, 18-33 bp, 18-30 bp, 18-27 bp, 18-24 bp,

18-21 bp, 21-33 bp, 21-30 bp, 21-27 bp, 21-24 bp, 24-33 bp, 24-30 bp, 24-27 bp, 27-33 bp, 27-30 bp, o 30-33bp. En modalidades de ejemplo, un eTF descrito en la presente que favorece la expresión de SCN1A reconoce un sitio de unión a diana que es 18-27pb, 18pb o 27pb.

[00121] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que favorece la expresión de SCN1A reconoce un sitio de unión a diana que se ubica en el cromosoma 2. En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que regula por aumento SCN1A reconoce un sitio de unión a diana que se ubica en el cromosoma 2 dentro de 110 kb, 100 kb, 90 kb, 80 kb, 70 kb, 60 kb, 50 kb, 40 kb, 30 kb, 20 kb, 10 kb, 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb o 1 kb ascendente o descendente al TSS de SCN1A. En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que favorece la expresión de SCN1A reconoce un sitio de unión a diana que se ubica en el cromosoma 2 dentro de 110 kb ascendente al TSS de SCN1A. En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que regula por aumento SCN1A reconoce un sitio de unión a diana que se ubica en el cromosoma 2 dentro de 110 kb descendente al TSS de SCN1A. En modalidades de ejemplo, estos sitios de unión a diana son 18-27 pb, 18 pb o 27 pb.

[00122] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que favorece la expresión de SCN1A reconoce un sitio de unión a diana que se ubica en el cromosoma 2 dentro de las

posiciones 166179652-165989571, dentro de las posiciones 166128050-166127958, dentro de las posiciones 166155414-166140590, dentro de las posiciones 166179652-1661777272 o dentro de las posiciones 1659990246-165989592 (todas con referencia a GRCh38.p12). En modalidades de ejemplo, estos sitios de unión a diana son 18-27 pb, 18 pb o 27 pb.

[00123] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que regula por aumento el SCN1A reconoce un sitio de unión a diana que es (i) 18-27 pb, 18 pb o 27 pb, (ii) se superpone con una posición en el cromosoma 2 seleccionada de 166178880, 166177369, 166177362, 166177299, 166177299, 166155393, 166155264, 166149373, 166149176, 166149165, 166149118, 166148953, 166148565, 166142396, 166142391, 166142344, 166142239, 166141162, 166140928, 166140590, 165990076, 165989684, 165989571, 166155255, 166155099, 166148843, 166148361, 166142219, 166141090, 165990246, 165990193, 166149168, 166127991, 166128002, 166128037, o 166128025 (todas con referencia a GRCh38.p12), y (iii) es capaz de producir al menos un aumento de 1.2 veces en la expresión de SCN1A cuando se une a un eTF descrito en la presente.

[00124] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que favorece la expresión de SCN1A (i) se une a un sitio diana que comprende o que consiste en cualquiera de SEQ ID NO: 18, 25, 30, 31 o 35-66 y (ii) es capaz de producir al

menos un incremento de 1.2 veces en la expresión de SCN1A cuando se une por un eTF descrito en la presente.

[00125] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que regula por aumento SCN1A reconoce un sitio de unión a diana que es (i) 18-27 pb, 18 pb o 27 pb, (ii) se traslapa con una posición en el cromosoma 2 seleccionada de 166155255, 166155099, 166148843, 166148361, 166142219, 166141090, 165990246, 165990193, 166149168, 166127991, 166128002, 166128037 o 166128025 (todas con referencia a GRCh38.p12), y (iii) es capaz de producir al menos un incremento de 2 veces en la expresión de SCN1A cuando se une por un eTF descrito en la presente.

[00126] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que favorece la expresión de SCN1A (i) se une a un sitio diana que comprende o que consiste en cualquiera de SEQ ID NO: 18, 30, 31, 37, 38, 45, 47, 48, 49, 55, 61, 62 o 64, y (ii) es capaz de producir al menos un incremento de 2 veces en la expresión de SCN1A cuando se une por un eTF descrito en la presente.

[00127] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que regula por aumento SCN1A reconoce un sitio de unión a diana que es (i) 18-27 pb, 18 pb o 27 pb, y (ii) se traslapa con una posición en el cromosoma 2 seleccionada de 166149168, 166127991, 166128002, 166128037 o 166128025 (todas con referencia a GRCh38.p12), y (iii) es capaz de producir al

menos un incremento de 5 veces en la expresión de SCN1A cuando se une por un eTF descrito en la presente.

[00128] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que favorece la expresión de SCN1A (i) se une a un sitio diana que comprende o que consiste en cualquiera de SEQ ID NO: 18, 30, 31, 37 o 38 y (ii) es capaz de producir al menos un incremento de 5 veces en la expresión de SCN1A cuando se une por un eTF descrito en la presente.

[00129] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que regula por aumento SCN1A reconoce un sitio de unión a diana que es (i) 18-27 pb, 18 pb o 27 pb, (ii) se traslapa con una posición en el cromosoma 2 seleccionada de 166128002, 166128037 o 166128025 (todas con referencia a GRCh38.p12), y (iii) es capaz de producir al menos un incremento de 15 veces en la expresión de SCN1A cuando se une por un eTF descrito en la presente.

[00130] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que favorece la expresión de SCN1A (i) se une a un sitio diana que comprende o que consiste en cualquiera de SEQ ID NO: 30, 37 o 38 y (ii) es capaz de producir al menos un incremento de 15 veces en la expresión de SCN1A cuando se une por un eTF descrito en la presente.

[00131] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que regula por aumento SCN1A reconoce un sitio de unión a diana que es (i) 18-27 pb, 18 pb o 27 pb, (ii) se

traslapa con una posición en el cromosoma 2 seleccionada de 166128037 o 166128025 (todas con referencia a GRCh38.p12), y (iii) es capaz de producir al menos un incremento de 20 veces en la expresión de SCN1A cuando se une por un eTF descrito en la presente.

[00132] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que favorece la expresión de SCN1A (i) se une a un sitio diana que comprende o que consiste en cualquiera de SEQ ID NO: 30 o 38 y (ii) es capaz de producir al menos un incremento de 20 veces en la expresión de SCN1A cuando se une por un eTF descrito en la presente.

[00133] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que regula por aumento SCN1A reconoce un sitio de unión a diana que es (i) 18-27 pb, 18 pb o 27 pb, (ii) se traslapa con una posición en el cromosoma 2 en la posición 166128025, y (iii) es capaz de producir al menos un incremento de 25 veces en la expresión de SCN1A cuando se une por un eTF descrito en la presente.

[00134] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que favorece la expresión de SCN1A (i) se une a un sitio diana que comprende o que consiste de SEQ ID NO: 38 y (ii) es capaz de producir al menos un incremento de 25 veces en la expresión de SCN1A cuando se une por un eTF descrito en la presente.

[00135] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la

presente que regula por aumento SCN1A reconoce un sitio de unión a diana que es (i) 18-27 pb, 18 pb o 27 pb, y (ii) se une a una región genómica que está dentro de al menos 1 kb, 750 pb, 500 pb, 400 pb, 300 pb, 200 pb, 100 pb o 50 pb de una ubicación genómica que tiene una secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 18, 25, 30, 31 o 35-66. En ciertas modalidades, el sitio de unión a diana es capaz de producir al menos un incremento de 1.2 veces, 2 veces, 5 veces, 15 veces, 20 veces o 25 veces en la expresión de SCN1A cuando se une por un eTF descrito en la presente.

[00136] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que favorece la expresión de SCN1A reconoce un sitio de unión a diana que es (i) 18-27 pb, 18 pb o 27 pb, y (ii) se une a una región genómica que se traslapa al menos parcialmente con una ubicación genómica que tiene una secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 18, 25, 30, 31 o 35-66. En ciertas modalidades, el sitio de unión a diana es capaz de producir al menos un incremento de 1.2 veces, 2 veces, 5 veces, 15 veces, 20 veces o 25 veces en la expresión de SCN1A cuando se une por un eTF descrito en la presente.

[00137] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que favorece la expresión de SCN1A reconoce un sitio de unión a diana que tiene cualquiera de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 18, 25, 30, 31 o 35-66. En ciertas modalidades, el sitio de unión a diana es capaz de producir

al menos un incremento de 1.2 veces, 2 veces, 5 veces, 15 veces, 20 veces o 25 veces en la expresión de SCN1A cuando se une por un eTF descrito en la presente.

[00138] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que regula por aumento SCN1A da por resultado al menos 1.5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 50 veces, 100 veces o más, o al menos un 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% o 500% o más regulación por aumento de la expresión de SCN1A (ARN de SCN1A y/o proteína Nav1.1) en una célula o *in vivo en* comparación con un control (por ejemplo, ningún eTF o eTF que no reconoce el sitio diana). En varias modalidades, se puede detectar regulación por aumento de la expresión de SCN1A usando métodos PCR, transferencia Western o inmunoensayos.

[00139] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que regula por aumento SCN1A se une a un sitio diana que es capaz de incrementar la expresión de SCN1A por al menos 1.2 veces, 1.3 veces, 1.4 veces, 1.5 veces, 1.6 veces, 1.7 veces, 1.8 veces, 1.9 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 8 veces, 10 veces, 12 veces, 15 veces, 18 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces o más o por al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% o 500% o más con respecto a un control en un ensayo de activación

transcripcional. Un ensayo de activación transcripcional de SCN1A de ejemplo se proporciona en la presente en el Ejemplo 3. Brevemente, HEK293 se transfectan con un plásmido que porta un eTF o una construcción indicadora de eGFP de control. 48 horas después de la transfección, se recolectan células, se aísla el ARN y se transcribe de manera inversa y las muestras de ADNc resultantes se analizan por qPCR (por ejemplo, usando cebadores que tienen SEQ ID NO: 185 y 186) para cuantificar los niveles de transcripto SCN1A endógeno. GAPDH se puede usar como un gen de referencia para determinar niveles relativos de expresión de SCN1A.

[00140] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que favorece la expresión de SCN1A tiene efectos mínimos fuera de diana, por ejemplo, efectos fuera de diana asociados con unión no específica tal como, por ejemplo, modulación de expresión de un gen fuera de diana o gen diferente de SCN1A. En una modalidad, un eTF descrito en la presente que favorece la expresión de SCN1A, favorece específicamente la expresión de SCN1A en comparación con un control por al menos 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces o 50 veces más que la expresión producida por el eTF para uno o más genes fuera de la diana en comparación con un control. En una modalidad de ejemplo, un eTF descrito en la presente que regula por aumento la SCN1A regula por aumento específicamente la transcripción del

gen SCN1A en comparación con un control por al menos 15 veces mayor que la transcripción de los 40 genes vecinos más cercanos (por ejemplo, los 40 genes más cercanos ubicados a la secuencia codificante de SCN1A en el cromosoma 2) producidos por el eTF con respecto a un control, por ejemplo, PLA2R1, ITGB6, RBMS1, TANK, PSMD14, TBR1, SLC4A10, DPP4, FAP, IFIH1, GCA, FIGN, GRB14, COBLL1, SLC38A11, SCN3A, SCN2A, CSRNP3, GALNT3, TTC21B, SCN9A, SCN7A, B3GALT1, STK39, CERS6, NOSTRIN, SPC25, ABCB11, DHRS9, BBS5, KLHL41, FASTD1, PPIG, CCDC3, PHOSPHO2, KLH2, MET5, UBR3 y MYO3B (ver **TABLA 14**). En varias modalidades, se puede detectar la regulación por aumento de la transcripción del gen SCN1A usando métodos PCR.

[00141] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que favorece la expresión de SCN1A es capaz de reducir la frecuencia de convulsiones en un ensayo de convulsiones hipertérmicas (HTS) en el modelo en ratón Scn1a^{tm1kea} de síndrome de Dravet. En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente es capaz de reducir la frecuencia de convulsiones a 42.6° C en un ensayo HTS por al menos 1.2 veces, 1.3 veces, 1.4 veces, 1.5 veces, 1.6 veces, 1.7 veces, 1.8 veces, 1.9 veces, 2.0 veces o más o por al menos 20%, 30% 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o más en comparación con un control (por ejemplo, tratado con PBS o tratamiento con un vector AAV que comprende una

secuencia que codifica para eGFP). En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente puede ser capaz de reducir la frecuencia de convulsiones a 42.6° C en un ensayo HTS de tal forma que al menos 60%, 62%, 65%, 70%, 75%, 76%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de la corrida de ratones en el ensayo está libre de convulsiones a 42.6° C. Un ensayo HTS de ejemplo se describe en la presente en el Ejemplo 6. Brevemente, las camadas de crías producidas de ratones Scn1a +/- machos cruzados con ratones C57Bl/6J hembra se pueden dosificar con un vector AAV9 que codifica para un eTF que favorece la expresión de SCN1A como se proporciona en la presente o un vector de control que codifica para eGFP a través de ICV bilateral a P1. Los ratones se pueden dosificar con ~ 1.0E10-5.0E12 gc/ratón. El ensayo HTS se realiza en ratones heterocigotos SCN1A P26-P28 y ratones tipo silvestre SCN1A en un fondo 129Stac X C57BL/6 mezclado al incrementar la temperatura corporal de los ratones (en condiciones controladas y con monitoreo de temperatura corporal) en ~ 0.5° C cada 2 minutos hasta el inicio de la primera convulsión tónica-clónica acompañada de pérdida de postura o hasta que se alcanza una temperatura corporal de 43° C. Un ratón se considera libre de convulsiones si no se detecta ninguna convulsión con pérdida de postura durante todo el transcurso del experimento.

[00142] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que favorece la expresión de SCN1A es capaz de incrementar la supervivencia de un ratón que es heterocigoto para SCN1A, por ejemplo, una línea de ratones Scn1a^{tm1kea}. En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente es capaz de incrementar la tasa de supervivencia de ratones heterocigotos SCN1A en P100 por al menos 1.2 veces, 1.3 veces, 1.4 veces, 1.5 veces, 1.6 veces, 1.7 veces, 1.8 veces, 1.9 veces, 2.0 veces o más o por al menos 20%, 30% 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o más en comparación con un control (por ejemplo, tratado con PBS o tratamiento con un vector AAV que comprende una secuencia que codifica para eGFP). En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente es capaz de incrementar la tasa de supervivencia de ratones heterocigotos a SCN1A a P100 de modo que al menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de la corrida de ratones en el ensayo todavía estén vivos a P100. Un ensayo de supervivencia de ejemplo se describe en la presente en el Ejemplo 7. Brevemente, las camadas de crías producidas a partir de ratones Scn1a +/- machos cruzados con ratones C57Bl/6J hembra pueden dosificarse con vector AAV9 mediante ICV bilateral en P1. Los ratones se pueden dosificar con ~ 1.0E10-5.0E12 gc/ratón. Se determina el número de ratones que han sobrevivido a P100.

[00143] En ciertas modalidades, un eTF proporcionado en la presente que regula por aumento SCN1A puede comprender un DBD de una proteína de dedo de zinc, derivada de una proteína de dedo de zinc, o que es una nucleasa es una proteína de dedo de zinc inactivada. Un dedo de zinc es un pequeño motivo estructural proteico que se caracteriza por la coordinación de uno o más iones de zinc (Zn^{2+}) a fin de estabilizar el doblez. Los dominios de dedo de zinc (Znf) son motivos proteicos relativamente pequeños que contienen múltiples protuberancias tipo dedo que hacen contactos en tándem con un sitio diana de ADN. La naturaleza modular del motivo de dedo de zinc permite que un gran número de combinaciones de secuencias de ADN se unan con un alto grado de afinidad y especificidad, y por lo tanto es ideal para modificar proteínas que se pueden dirigir a y unir a secuencias de ADN específicas. Muchos arreglos de dedos de zinc diseñados se basan en el dominio de dedo de zinc del factor de transcripción murino Zif268. Zif268 tiene tres motivos de dedos de zinc individuales que se unen colectivamente a una secuencia de 9 pb con alta afinidad. Se ha identificado una amplia variedad de proteínas de dedos de zinc y se caracterizan en diferentes tipos con base en la estructura como se describe adicionalmente en la presente. Cualquier proteína de dedo de zinc de este tipo es útil en conexión con los DBD descritos en la presente.

[00144] Están disponibles varios métodos para diseñar proteínas de dedos de zinc. Por ejemplo, se describen métodos para diseñar proteínas de dedo de zinc para unirse a una secuencia de ADN diana de interés, ver, por ejemplo, Liu Q, et al., Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes, Proc Natl Acad Sci USA. 94 (11): 5525-30 (1997); Wright DA et al., Standardized reagents and protocols for engineering zinc finger nucleases by modular assembly, Nat Protoc. Nat Protoc. 2006;1(3):1637-52; y CA Gersbach y T Gaj, Synthetic Zinc Finger Proteins: The Advent of Targeted Gene Regulation and Genome Modification Technologies, Am Chem Soc 47: 2309-2318 (2014). Además, varias herramientas basadas en web para diseñar proteínas de dedos de zinc para unirse a una secuencia diana de ADN de interés están disponibles públicamente, ver, por ejemplo, las Herramientas de software de diseño de nucleasa de dedos de zinc y el sitio web de análisis de datos de ingeniería de genomas OmicX disponibles en la telaraña mundial en omictools.com/zfns-category; y el sitio web de diseño de herramientas de dedos de zinc de Scripps disponible en la telaraña mundial en scripps.edu/barbas/zfdesign/zfdesignhome.php. Además, se encuentran disponibles varios servicios disponibles comercialmente para diseñar proteínas de dedos de zinc para unirse a una secuencia diana de ADN de interés, ver, por

ejemplo, los servicios o kits disponibles comercialmente ofrecidos por Creative Biolabs (telaraña mundial en creative-biolabs.com/Design-and-Synthesis-of-Artificial-Zinc-Finger-Proteins.html), el Kit de montaje modular de Zinc Finger Consortium disponible en Addgene (telaraña mundial en addgene.org/kits/zfc-modular-assembly/), o el Servicio ZFN personalizado CompoZr de Sigma Aldrich (telaraña mundial en sigmaaldrich.com/life-science/zinc-finger-nuclease-technology/custom-zfn.html).

[00145] En ciertas modalidades, los eTF proporcionados en la presente que regulan por aumento SCN1A comprenden un DBD que comprende uno o más dedos de zinc o se deriva de un DBD de una proteína de dedo de zinc. En algunos casos, el DBD comprende múltiples dedos de zinc, en donde cada dedo de zinc está unido a otro dedo de zinc u otro dominio ya sea en su extremo N-terminal o extremo C-terminal, o ambos mediante un ligador de aminoácido. En algunos casos, un DBD proporcionado en la presente comprende uno o más dedos de zinc de uno o más de los tipos de dedos de zinc descritos en la **TABLA 9**. En algunos casos, un DBD proporcionado en la presente comprende una pluralidad de estructuras o motivos de dedos de zinc o múltiples dedos de zinc que tienen una o más SEQ ID NO: 152-167, o cualquier combinación de los mismos. En ciertas modalidades, un DBD comprende X—[ZF—X]n y/o [X—ZF]n—X, en donde ZF es un dominio de dedo de zinc que tiene cualquiera

de los motivos enumerados en la **TABLA 9** (por ejemplo, cualquiera de SEQ ID NO: 136-146), X es un ligador de aminoácidos que comprende 1-50 aminoácidos, y n es un número entero de 1-15, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, en donde cada ZF puede tener independientemente la misma secuencia o una secuencia diferente de las otras secuencias ZF en el DBD, y en donde cada ligador X puede tener independientemente la misma secuencia o una secuencia diferente de las otras secuencias X en el DBD. Cada dedo de zinc se puede unir a otra secuencia, dedo de zinc o dominio en su extremo C-terminal, extremo N-terminal o ambos. En un DBD, cada ligador X puede ser idéntico en secuencia, longitud y/o propiedad (por ejemplo, flexibilidad o carga), o ser diferente en secuencia, longitud y/o propiedad. En algunos casos, dos o más ligadores pueden ser idénticos, en tanto que otros ligadores son diferentes. En modalidades de ejemplo, el ligador se puede obtener o derivar de las secuencias que conectan los dedos de zinc que se encuentran en una o más proteínas de dedos de zinc de origen natural proporcionadas en la **TABLA 9**. En otras modalidades, las secuencias ligadoras adecuadas incluyen, por ejemplo, ligadores de 5 o más aminoácidos de longitud. Ver, también, patentes de Estados Unidos No. 6,479,626; 6,903,185; y 7,153,949 para ejemplos de secuencias ligadoras de 6 o más aminoácidos de longitud, cada una de las cuales se incorpora

a la presente en su totalidad. Las proteínas de DBD proporcionadas en la presente pueden incluir cualquier combinación de ligadores adecuados entre los dedos de zinc individuales de la proteína. Las proteínas de DBD descritas en la presente pueden incluir cualquier combinación de ligadores adecuados entre los dedos de zinc individuales de la proteína.

[00146] En ciertas modalidades, los eTF proporcionados en la presente que regulan por aumento SCN1A comprenden un DBD que comprende uno o más dedos de zinc clásicos. Un dedo de zinc C2H2 clásico tiene dos cisteínas en una cadena y dos residuos de histidina en otra cadena, coordinados por un ion de zinc. Un dominio de dedo de zinc clásico tiene dos láminas β y una hélice α, en donde la hélice α interactúa con una molécula de ADN y forma la base de la unión de DBD a un sitio diana y se puede denominar "hélice de reconocimiento". En modalidades de ejemplo, la hélice de reconocimiento de un dedo de zinc comprende al menos una sustitución de aminoácido en la posición -1, 2, 3 o 6, cambiando de esta manera la especificidad de unión del dominio de dedo de zinc. En otras modalidades, un DBD proporcionado en la presente comprende uno o más dedos de zinc no clásicos, por ejemplo, C2-H2, C2-CH y C2–C2.

[00147] En otra modalidad, un eTF proporcionado en la presente que regula por aumento SCN1A comprende un DBD que

comprende un motivo de dedo de zinc que tiene la siguiente estructura: LEPGEKP – [YKCPECGKSFS X HQRTH TGEKP]n - YKCPECGKSFS X HQRTH – TGKKTS (SEQ ID NO: 147), en donde n es un número entero de 1-15, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, y cada X independientemente es una secuencia de reconocimiento (por ejemplo, una hélice de reconocimiento) capaz de unirse a 3 pb de la secuencia diana. En modalidades de ejemplo, n es 3, 6 o 9. En una modalidad particularmente preferida, n es 6. En diferentes modalidades, cada X puede tener independientemente la misma secuencia de aminoácidos o una secuencia de aminoácidos diferente en comparación con otras secuencias X en el DBD. En una modalidad de ejemplo, cada X es una secuencia que comprende 7 aminoácidos que se ha diseñado para interactuar con 3 pb del sitio de unión a diana de interés usando la herramienta de diseño de dedos de zinger de Scripps ubicada en una telaraña mundial en scripps.edu/barbas/zfdesign/zfdesignhome.php.

[00148] Puesto que cada dedo de zinc dentro de un DBD reconoce 3 bp, el número de dedos de zinc incluidos en el DBD informa de la longitud del sitio de unión reconocido por el DBD, por ejemplo, un DBD con 1 dedo de zinc reconocerá un sitio de unión a diana que tiene 3 bp, un DBD con 2 dedos de zinc reconocerá un sitio de unión a diana que tiene 6 bp, un DBD con 3 dedos de zinc reconocerá un sitio de unión a diana que tiene 9 bp, un DBD con 4 dedos de zinc reconocerá un

sitio de unión a diana que tiene 12 bp, un DBD con 5 dedos de zinc reconocerá un sitio de unión a diana que tiene 15 bp, un DBD con 6 dedos de zinc reconocerá un sitio de unión a diana que tiene 18 bp, un DBD con 9 dedos de zinc reconocerá un sitio de unión a diana que tiene 27 bp, etc. En general, el DBD que reconoce los sitios de unión a diana más largos exhibirá mayor especificidad de unión (por ejemplo, menos unión fuera de diana o no específica).

[00149] En otras modalidades, un eTF proporcionado en la presente que regula por aumento SCN1A comprende un DBD que se deriva de una proteína de dedo de zinc de origen natural al realizar una o más sustituciones de aminoácidos en una o más hélices de reconocimiento de los dominios de dedos de zinc para cambiar la especificidad de unión del DBD (por ejemplo, cambiar el sitio diana reconocido por el DBD). El DBD proporcionado en la presente se puede derivar de cualquier proteína de dedo de zinc de origen natural. En varias modalidades, este DBD se puede derivar de una proteína de dedo de zinc de cualquier especie, por ejemplo, un ratón, rata, humano, etc. En una modalidad de ejemplo, un DBD proporcionado en la presente se deriva de una proteína de dedo de zinc humano. En ciertas modalidades, un DBD proporcionado en la presente se deriva de una proteína de origen natural enumerada en la **TABLA 9**. En una modalidad de ejemplo, una proteína de DBD proporcionada en la presente se

deriva de una proteína de dedo de zinc de EGR humana, por ejemplo, EGR1, EGR2, EGR3 o EGR4.

[00150] En ciertas modalidades, un eTF proporcionado en la presente que regula por aumento SCN1A comprende un DBD que se deriva de una proteína de origen natural al modificar el DBD para aumentar el número de dominios de dedos de zinc en la proteína de DBD al repetir uno o más dedos de zinc dentro del DBD de la proteína que se presenta de manera natural. En ciertas modalidades, estas modificaciones incluyen duplicación, triplicación, cuadruplicación o multiplicación adicional de los dedos de zinc dentro del DBD de la proteína de origen natural. En algunos casos, un dedo de zinc de un DBD de una proteína humana se multiplica, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más copias del mismo motivo de dedo de zinc se repite en el DBD del eTF. En algunos casos, un conjunto de dedos de zinc de un DBD de una proteína de origen natural se multiplica, por ejemplo, un conjunto de 3 dedos de zinc de un DBD de una proteína de origen natural se duplica para proporcionar un eTF que tiene un DBD con 6 dedos de zinc, se triplica para proporcionar un DBD de un eTF con 9 dedos de zinc, o se cuadruplica para proporcionar un DBD de un eTF con 12 dedos de zinc, etc. En algunos casos, un conjunto de dedos de zinc de un DBD de una proteína de origen natural se replica parcialmente para formar un DBD de un eTF que tiene un mayor número de dedos de zinc, por ejemplo, un

DBD de un eTF comprende cuatro dedos de zinc en donde los dedos de zinc representan una copia del primer dedo de zinc, una copia del segundo dedo de zinc y dos copias de un tercer dedo de zinc de una proteína de origen natural para un total de cuatro dedos de zinc en el DBD del eTF. Este DBD luego se modifica adicionalmente al realizar una o más sustituciones de aminoácidos en una o más hélices de reconocimiento de los dominios de dedos de zinc para cambiar la especificidad de unión del DBD (por ejemplo, cambiar el sitio diana reconocido por el DBD). En modalidades de ejemplo, el DBD se deriva de una proteína humana de origen natural, tal como una proteína de dedo de zinc de EGR humana, por ejemplo, EGR1, EGR2, EGR3 o EGR4.

[00151] EGR1 y EGR3 humanos se caracterizan por un DBD de dedo de zinc C2H2 de tres dedos. Las reglas de unión genéricas para dedos de zinc preevé que los tres dedos interactúan con su secuencia de ADN cognada con geometría similar, usando los mismos aminoácidos en la hélice alfa de cada dedo de zinc para determinar la especificidad o reconocimiento de la secuencia de sitio de unión a diana. Estas reglas de unión permiten modificar el DBD de EGR1 o EGR3 para modificar un DBD que reconoce un sitio de unión a diana deseado. En algunos casos, la hélice de reconocimiento de ADN de 7 aminoácidos en un motivo de dedo de zinc de EGR1 o EGR3 se modifica de acuerdo con las reglas publicadas de

diseño de dedo de zinc. En ciertas modalidades, cada dedo de zinc en el DBD de tres dedos de EGR1 o EGR3 se modifica, por ejemplo, al alterar la secuencia de una o más hélices de reconocimiento y/o al aumentar el número de dedos de zinc en el DBD. En ciertas modalidades, EGR1 o EGR3 se reprograma para reconocer un sitio de unión a diana de al menos 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36 o más pares de bases en un sitio diana deseado. En ciertas modalidades, este DBD derivado de ERG1 o EGR3 comprende al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más dedos de zinc. En una modalidad de ejemplo, uno o más de los dedos de zinc en el DBD comprende al menos una sustitución de aminoácido en la posición -1, 2, 3 o 6 de la hélice de reconocimiento.

[00152] En diferentes modalidades, un eTF que regula por aumento SCN1A que comprende un DBD derivado de EGR1 o EGR3 tiene una especificidad de unión a ADN que es diferente de la especificidad de unión de EGR1 o EGR3 de origen natural, por ejemplo, el DBD reconoce un sitio de unión a diana que tiene una secuencia diferente de la secuencia del sitio de unión reconocido por EGR1 o EGR3 no modificada: (GCG(T/G)GGGCG) (SEQ ID NO: 182).

[00153] En otras modalidades, un eTF proporcionado en la presente que regula por aumento SCN1A comprende un DBD que es un complejo de ARNg/Cas. CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas entrelazadas regularmente agrupadas)/Cas9 es una

herramienta de edición de genoma que permite el direccionamiento genómico específico del sitio. El sistema CRISPR/Cas tipo II es un sistema de respuesta inmunitaria adaptativa procariota que utiliza ARN no codificantes para guiar la nucleasa Cas9 para inducir la escisión de ADN específica del sitio. El sistema CRISPR/Cas9 se ha aprovechado para crear un método simple programable por ARN para mediar la edición del genoma en células de mamíferos. Se puede generar un ARN guía simple (ARNsg) para dirigir la nucleasa Cas9 a una ubicación genómica específica que luego se une por el complejo de ARNg/Cas9. Un ARNg se puede diseñar para unirse a un sitio diana de interés usando varios métodos y herramientas. Por ejemplo, los métodos para diseñar ARNg para unirse a una secuencia de ADN diana de interés se describen en Aach, et al. Flexible algorithm for identifying specific Cas9 targets in genomes. BioRxiv, Cold Spring Harbor Labs. doi: http://dx.doi.org/10.1101/005074 (2014); Bae, et al. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. Bioinformatics. 30(10):1473–1475 (2014); Doench, J. G. et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. Nat Biotech 34, 184–191 (2016); Gratz, et al. Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in Drosophila. Genetics. 196(4):961–971 (2014); Heigwer, et al.

E-CRISP: fast CRISPR target site identification. Nat Methods. 11(2):122–123 (2014); Ma, et al. A guide RNA sequence design platform for the CRISPR/Cas9 system for model organism genomes. Biomed Res Int. doi:http://doi.org/10.1155/2013/270805 (2013); Montague, et al. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. Nucleic Acids Res. 42(W1):W401–W407 (2014); Liu, et al. CRISPR-ERA: a comprehensive design tool for CRISPR-mediated gene editing, repression and activation. Bioinformatics. 31(22):3676–3678 (2015); Ran, et al. *In vivo* genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. Nature. 520(7546):186–191 (2015); Wu, et al. Target specificity of the CRISPR-Cas9 system. Quant Biol. 2(2):59–70 (2015); Xiao, et al. CasOT: a genome-wide Cas9/gRNA off-target searching tool. Bioinformatics. 30(8):1180–1182 (2014); Zetsche, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. Cell. 163(3):759–771 (2015). Además, varias herramientas basadas en la web para diseñar ARNg para unirse a una secuencia diana de ADN de interés están disponibles públicamente, ver, por ejemplo, la herramienta de diseño de ARNg CRISPR disponible de AUTM en la telaraña mundial en atum.bio/eCommerce/cas9/input?multipleContacts=false; la herramienta de diseño de ARNg CRISPRa/i disponible en el Broad Institute en la telaraña mundial en portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-

design-crisprai; la herramienta de diseño de E-CRISP disponible de DKFZ German Cancer Research Center disponible en la telaraña mundial en e-crisp.org/E-CRISP/; y la herramienta de diseño de guía de inactivación disponible de Synthego en la telaraña mundial en design.synthego.com/#/. Además, se encuentran disponibles varios servicios disponibles comercialmente para diseñar ARNg para unirse a una secuencia diana de ADN de interés, ver, por ejemplo, los servicios disponibles comercialmente ofrecidos por IDT (telaraña mundial en idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_SEQUENCE), ThermoFisher (telaraña mundial en thermofisher.com/order/custom-oligo/crispr), y GenScript (telaraña mundial en genscript.com/gRNA-design-tool.html).

[00154] En modalidades de ejemplo, un DBD que es un complejo de ARNg/Cas comprende una proteína Cas desactivada por nucleasa o dCas, tal como, por ejemplo, una dCas9, tal como Cas9 de *Staphylococcus aureus* desactivada por nucleasa (dSaCas9) o de *Streptococcus pyogenes* desactivada por nucleasa (dSpCas9). El ARNg se proporciona como una secuencia que comprende una región de direccionamiento, que dirige el complejo de ARNg/Cas a un sitio diana deseado, y una región de andamio, que facilita la interacción con la proteína Cas. Cualquier andamio de ARNg adecuado se puede usar en conexión con los ARNg proporcionados en la presente. En una modalidad

de ejemplo, el ARNg es un ARNg individual o ARNsg y comprende la siguiente secuencia de andamio: 5'-GTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGA-3' (SEQ ID NO: 183). La región de direccionamiento del ARN guía se une al extremo 5'de la secuencia de andamio para formar el ARNsg completo. En ciertas modalidades, un ARNg y una proteína dCas se pueden expresar a partir del mismo casete de expresión. En ciertas modalidades, se usa un promotor U6 para expresar el ARNg. En otras modalidades, un ARNg se puede expresar en una célula que se ha modificado para expresar de forma estable la proteína dCas-TAD, por ejemplo, ya sea al integrar de manera estable la dCas en el genoma o en un plásmido que se mantiene de forma estable extracromosómicamente.

[00155] En otras modalidades, un eTF proporcionado en la presente que regula por aumento SCN1A puede comprender un DBD de una TALEN, derivado de una TALEN, o que es una TALEN inactivada por nucleasa. Las nucleasas efectoras tipo activador de transcripción (TALEN) son enzimas de restricción que contienen un DBD y un dominio de nucleasa que se pueden modificar para cortar secuencias específicas de ADN. Las TALEN se crean conjugando un dominio de unión a ADN efector TAL a un dominio de escisión de ADN (por ejemplo, una nucleasa). Los efectores tipo activador de transcripción (los TALE) se pueden modificar para unirse a una secuencia de ADN

diana deseada, dirigiendo de este modo el dominio de nucleasa a una ubicación específica.

[00156] Los efectores TAL son proteínas bacterianas de la bacteria *Xanthomonas*. El dominio de unión a ADN contiene una secuencia de 33-34 aminoácidos altamente conservada repetida con el 12o y 13o aminoácidos divergentes. Estas dos posiciones, referidas Diresiduo Variable Repetido (RVD), son altamente variables y muestran una fuerte correlación con el reconocimiento de nucleótidos específicos. Esta relación directa entre la secuencia de aminoácidos y el reconocimiento de ADN permite la modificación de DBD que se dirigen específicamente a una secuencia deseada mediante la selección de una combinación de segmentos de repetición que contienen los RVD adecuados.

[00157] Están disponibles varios métodos para diseñar TALE. Por ejemplo, los métodos para diseñar TALE para unirse a una secuencia de ADN diana de interés se describen en T. Cermak et al., *Nucleic Acids Research*. **39** (12): e82 (2011); F. Zhang F et al., *Nature Biotechnology*. **29** (2): 149-53 (2011); R. Morbitzer et al., *Nucleic Acids Research*. **39** (13): 5790-9 (2011); T. Li et al., *Nucleic Acids Research*. **39** (14): 6315-25 (2011); R. Geissler et al., *PLOS One*. **6**(5): e19509 (2011); and E. Weber et al., *PLOS One*. **6** (5): e19722 (2011). Además, varias herramientas basadas en la web para diseñar TALE para unirse a una secuencia diana de ADN de interés están

disponibles públicamente, ver, por ejemplo, el E-Talen disponible en la web mundial en e-talen.org/E-TALEN/TAL y la herramienta Effector Nucleotide Targeter 2.0 disponible en la web mundial en tale-nt.cac.cornell.edu/node/add/single-tale. Además, se encuentran disponibles varios servicios comercialmente disponibles para diseñar TALE para unirse a una secuencia diana de ADN de interés, ver, por ejemplo, los servicios comercialmente disponibles ofrecidos por OmicX (telaraña mundial en omictools.com/), Addgene (telaraña mundial en addgene.org/talen/guide/), o ThermoFisher (telaraña mundial en thermofisher.com/us/en/home/life-science/genome-editing/geneart-tals/tal-design-tool.html). Además, el programa de software disponible públicamente (DNAWorks) se puede usar para diseñar oligonucleótidos adecuados para montar los TALE, ver, por ejemplo, D. Hoover D *Methods in Molecular Biology*. **852**: 215-23(2012).

Dominios de modulación transcripcional

[00158] Los eTF proporcionados en la presente que regulan por aumento SCN1A pueden comprender cualquier dominio adecuado que es capaz de reclutar uno o más factores de proteína que pueden modular la transcripción (por ejemplo, ARN polimerasa II, CBP/p300, CREB o KRAB) o el nivel de expresión génica de un gen de interés cuando el eTF se une a un sitio diana mediante el DBD (por ejemplo, un DBD de dedo de zinc, DBD de ARNg/Cas o DBD de TALE). En ciertas modalidades, este dominio

recluta factores de proteína que incrementan el nivel de transcripción o expresión génica de un gen de interés y es un dominio de activación transcripcional (TAD). En otras modalidades, este dominio recluta factores de proteína que disminuyen el nivel de transcripción o expresión génica de un gen de interés y es un dominio represor transcripcional (TRD). En ciertas modalidades, el dominio de modulación transcripcional (TAD o TRD) puede ser un dominio sintéticamente diseñado. En otras modalidades, el dominio de modulación transcripcional (TAD o TRD) se puede derivar de una proteína de origen natural, por ejemplo, un factor de transcripción, un co-activador transcripcional, un co-represor transcripcional o una proteína silenciadora. En varias modalidades, el dominio de modulación transcripcional (TAD o TRD) se puede derivar de una proteína de cualquier especie, por ejemplo, un ratón, rata, mono, virus o humano.

[00159] En una modalidad de ejemplo, un TAD adecuado para uso en los eTF proporcionados en la presente que regulan por aumento SNC1A se deriva de una proteína viral. Los TAD de ejemplo derivados de proteínas virales incluyen, por ejemplo, un dominio TAD de VP64 (SEQ ID NO: 133), VPR (SEQ ID NO: 132), VP16, VP128, p65, p300, o cualquier fragmento funcional o variante de las mismas, o una secuencia que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a las mismas.

[00160] En otra modalidad de ejemplo, un TAD adecuado para uso en los eTF proporcionados en la presente que regulan por aumento SCN1A se deriva de una proteína humana. Los TAD de ejemplo derivados de proteínas humanas incluyen, por ejemplo, un dominio TAD del transactivador 2 que interactúa con CBP/p300 (CITED2) (SEQ ID NO: 134), el transactivador 4 que interactúa con CBP/p300 (CITED4) (SEQ ID NO: 135), EGR1 (SEQ ID NO: 176), CREB3 (SEQ ID NO: 224), o EGR3 (SEQ ID NO: 175), o cualquier fragmento funcional o variante de las mismas, o una secuencia que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a las mismas.

[00161] En ciertas modalidades, un eTF que regula por aumento SCN1A comprende un DBD de dedo de zinc que se conjuga a un dominio de activación transcripcional o TAD. En diferentes modalidades, el DBD de dedo de zinc se puede conjugar a un TAD de una proteína viral, tal como VP64 o VPR, o un TAD de una proteína humana, tal como CITED2, CITED4 o CREB3. En ciertas modalidades, un DBD de dedo de zinc derivado de una proteína humana, por ejemplo, EGR1 o EGR3, se conjuga a un TAD derivado de una proteína humana, por ejemplo, CITED2, CITED4 o CREB3. En ciertas modalidades, un DBD de dedo de zinc derivado de una proteína humana, por ejemplo, EGR1 o EGR3, se conjuga a un TAD de VP64 o VPR. En ciertas modalidades, un DBD de dedo de zinc sintético o DBD de dedo

de zinc que tiene menos de 75% de identidad de secuencia a una proteína humana, por ejemplo, EGR1 o EGR3, se conjuga a un TAD derivado de una proteína humana, por ejemplo, CITED2, CITED4 o CREB3. En ciertas modalidades, un DBD de dedo de zinc sintético o DBD de dedo de zinc que tiene menos de 75% de identidad de secuencia a una proteína humana, por ejemplo, EGR1 o EGR3, se conjuga a un TAD de VP64 o VPR.

[00162] En ciertas modalidades, una proteína dCas se conjuga a TAD. En diferentes modalidades, el dCas9 se puede conjugar a un TAD de una proteína viral, tal como VP64 o VPR, o un TAD de una proteína humana, tal como CITED2, CITED4 o CREB3. En modalidades de ejemplo, una dCas9 se conjuga a un TAD de VP64 o VPR.

[00163] En ciertas modalidades, una proteína TALE se conjuga a TAD. En diferentes modalidades, el TALE se puede conjugar a un TAD de una proteína viral, tal como VP64 o VPR, o un TAD de una proteína humana, tal como CITED2, CITED4 o CREB3. En modalidades de ejemplo, TALE se conjuga a un TAD de VP64 o VPR.

<u>eTF que regulan por aumento SCNLA y son altamente homólogos a proteínas humanas</u>

[00164] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que regula por aumento SCN1A tiene un alto por ciento de identidad a una o más proteínas humanas (como se describe adicionalmente a continuación). En ciertas

modalidades, estos eTF tienen al menos 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia total a una o más proteínas humanas. En ciertas modalidades, estos eTF exhiben inmunogenicidad reducida en comparación con un eTF que tiene un porcentaje de identidad de secuencia total menor a una o más proteínas humanas. En varias modalidades, se puede medir una reducción de inmunogenicidad usando un ensayo elispot, un inmunoensayo o un método in silico. En ciertas modalidades, estos eTF pueden comprender un DBD derivado de EGR1 o EGR3 humana y un TAD derivado de EGR1, EGR3, CITED2, CITED4 o CREB3 humano. Estos eTF tienen poca o ninguna inmunogenicidad cuando se administran a un sujeto o tienen inmunogenicidad reducida en comparación con los eTF que tienen menor porcentaje de identidad a secuencias de proteínas humanas.

[00165] En ciertas modalidades, un eTF proporcionado en la presente que regula por aumento SNC1A tiene al menos 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%,87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a una o más proteínas humanas. Cuando un eTF proporcionado en la presente que regula por aumento SCN1A comprende un DBD y un TAD derivado de la misma proteína, el porcentaje de identidad a una proteína humana se puede determinar al calcular el número total de residuos de aminoácidos en el eTF que coinciden con la proteína humana de

la cual se derivó (por ejemplo, EGR1 o EGR3), dividido por el número total de residuos de aminoácidos en el eTF. Cuando un eTF proporcionado que regula por aumento SCN1A comprende un DBD de una proteína humana y un TAD derivado de una proteína humana diferente, el por ciento de identidad a humano se puede determinar al calcular por separado el por ciento de identidad a humano de cada dominio y al sumar los dos conjuntamente, por ejemplo, (i) calcular el número total de residuos de aminoácidos en el DBD que coinciden con la proteína humana de la cual se derivó (por ejemplo, EGR1 o EGR3), dividido por el número total de residuos de aminoácidos en el eTF; (ii) calcular el número total de residuos de aminoácidos en el TAD que coinciden con la proteína humana de la cual se derivó (por ejemplo, CITED2, CITED4 o CREB3), dividido por el número total de residuos de aminoácidos en el eTF; y (iii) sumar el total de (i) y (ii). En esta modalidad, los dominios se dividen como sigue: el primer dominio se extiende desde el extremo N- terminal del eTF hasta el inicio de la secuencia codificadora para el segundo dominio, y el segundo dominio se extiende desde el inicio de la secuencia codificadora para el segundo dominio hasta el extremo C-terminal del eTF (por ejemplo, para un eTF que tiene la configuración NLS-DBD-ligador-NLS-TAD, el primer dominio sería NLS-DBD-ligador y el segundo dominio sería NLS-TAD). Cuando un eTF proporcionado en la presente que regula

por aumento SNC1A comprende un DBD de una proteína humana y dos TAD derivados de una o más proteínas humanas diferentes, el por ciento de identidad a humano se puede determinar al calcular por separado el por ciento de identidad a humano de cada dominio y al sumar los tres conjuntamente, por ejemplo, (i) calcular el número total de residuos de aminoácidos en el DBD que coinciden con la proteína humana de la cual se derivó (por ejemplo, EGR1 o EGR3), dividido por el número total de residuos de aminoácidos en el eTF; (ii) calcular el número total de residuos de aminoácidos en el primer TAD que coinciden con la proteína humana de la cual se derivó (por ejemplo, CITED2, CITED4 o CREB3), dividido por el número total de residuos de aminoácidos en el eTF; (iii) calcular el número total de residuos de aminoácidos en el segundo TAD que coinciden con la proteína humana de la cual se derivó (por ejemplo, CITED2, CITED4, CREB3), dividido por el número total de residuos de aminoácidos en el eTF; y (iv) sumar el total de (i), (ii) y (iii). En esta modalidad, los dominios se dividen de la siguiente manera: el primer dominio se extiende desde el extremo N- terminal del eTF hasta el inicio de la secuencia codificadora para el segundo dominio, el segundo dominio se extiende desde el inicio de la secuencia codificadora para el segundo dominio hasta el inicio de la secuencia codificadora para el tercer dominio, y el tercer dominio se extiende desde el inicio de la secuencia

codificadora para el tercer dominio a través del extremo C-terminal del eTF (por ejemplo, para un eTF que tiene la configuración NLS-TAD1-ligador-NS-DBD-ligador-NLS-TAD2, el primer dominio sería NLS-TAD1-ligador, el segundo dominio sería NLS-DBD-lligador y el tercer dominio sería NLS-TAD2). El porventaje de identidad a una o más proteínas humanas como se describe en esta sección se puede determinar usando el porcentaje de salida de identidad obtenido usando la herramienta BLAST de proteínas estándar disponible del NCBI (por ejemplo, la herramienta de alineación de la suite blastp, utilizando el algoritmo blast (proteína -> proteína) con parámetros predeterminados) disponible en la telaraña mundial desde el sitio web de NCBI en blast.ncbi.nlm.nih.gov/.

[00166] En ciertas modalidades, un eTF proporcionado en la presente que regula por aumento SCN1A tiene el beneficio de provocar poca, mínima o ninguna respuesta inmunitaria adversa en un sujeto humano debido a un alto grado de identidad de secuencia a proteínas humanas de origen natural. En ciertas modalidades, un eTF proporcionado en la presente que regula por aumento SCN1A produce inmunogenicidad reducida, por ejemplo, al menos una reducción de 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 veces o mayor en inmunogenicidad en comparación con la inmunogenicidad observada con un eTF que comprende un menor

por ciento de identidad a una o más proteínas humanas, por ejemplo, un eTF que comprende menos de 50%, 55%, 65% o 70% de identidad de secuencia a una o más proteínas humanas. En algunos casos, se puede medir la reducción en inmunogenicidad usando un ensayo elispot, un inmunoensayo o un método in silico. Una terapia génica que tiene una baja o mínima inmunogenicidad tiene varias ventajas, incluyendo tolerancia mejorada de paciente, dosificación disminuida necesaria para lograr un efecto terapéutico, efectos terapéuticos prolongados después de una administración, capacidad para administrarse múltiples veces o en múltiples dosis como sea necesario, eficacia terapéutica sostenida durante un período de tiempo más largo por administración, seguridad incrementada y/o eficacia incrementada de una terapia génica.

[00167] En ciertas modalidades, los eTF proporcionados en la presente que regulan por aumento SCN1A y tienen un alto por ciento de identidad de secuencia a una o más proteínas humanas comprenden un DBD y un TAD derivado de una o más proteínas humanas de origen natural. En ciertas modalidades, estos eTF pueden comprender un DBD derivado de cualquier proteína humana de origen natural que comprende un DBD. En modalidades de ejemplo, un eTF proporcionado en la presente que regula por aumento SCN1A y tiene un alto por ciento de identidad de secuencia a una o más proteínas humanas comprende un DBD derivado de una proteína de dedo de zinc de

origen natural, tal como, por ejemplo, cualquiera de las construcciones 5-27, 36-41 o 44-53 listadas en la **TABLA 1**. En ciertas modalidades, un eTF proporcionado en la presente que regula por aumento SCN1A y tiene un alto por ciento de identidad de secuencia a una o más proteínas humanas comprende un DBD derivado de una proteína EGR humana, tal como EGR1, EGR2, EGR3 o EGR4. En modalidades de ejemplo, un eTF proporcionado en la presente que regula por aumento SCN1A y tiene un alto por ciento de identidad de secuencia a una o más proteínas humanas comprende un DBD derivado de un EGR1 o EGR3 humana. En varias modalidades, un eTF proporcionado en la presente que regula por aumento SCN1A y tiene un alto por ciento de identidad de secuencia a una o más proteínas humanas comprende un DBD derivado de una proteína de dedo de zinc humana en donde se han realizado cambios mínimos de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 3-4, 3-5, 36 o 3-7 cambios de aminoácidos) en uno o más dominios de dedos de zinc del DBD para alterar la especificidad de unión del DBD para reconocer un sitio de unión a diana de interés. Estas modificaciones de secuencia se realizan preferentemente en las hélices de reconocimiento de los dominios de dedos de zinc del DBD, en tanto que el resto de la proteína o DBD de dedo de zinc humano (incluyendo el TAD) permanece sin modificar para conservar tanta identidad de secuencia a la

proteína humana de origen natural como sea posible.

[00168] En ciertas modalidades, los eTF proporcionados en la presente que regulan por aumento SCN1A y tienen un alto porcentaje de identidad de secuencia a una o más proteínas humanas comprenden uno o más dominios de modulación transcripcional (por ejemplo, un TAD) derivados de una proteína humana conjugada a un DBD derivado de una proteína humana. En varias modalidades, el dominio de modulación transcripcional se puede derivar de cualquier proteína humana de origen natural que tiene un dominio capaz de reclutar uno o más factores de proteína que pueden modular la transcripción (por ejemplo, ARN polimerasa II, una proteína co-activadora o una proteína co-represora) o el nivel de expresión génica de un gen de interés cuando el eTF se une a un sitio diana mediante el DBD. En modalidades de ejemplo, el TAD se deriva de una proteína EGR humana, tal como por ejemplo, EGR1, EGR2, EGR3 o EGR4 humana, o una proteína citada humana, tal como, por ejemplo, una proteína CITED2 o CITED4 humana. En una modalidad de ejemplo, un eTF proporcionado en la presente que regula por aumento SCN1A y tiene un alto porcentaje de identidad de secuencia a una o más proteínas humanas comprende un TAD de una proteína EGR1 o EGR3 humana. En otra modalidad de ejemplo, un eTF proporcionado en la presente que regula por aumento SCN1A y tiene un alto por ciento de identidad de secuencia a una o

más proteínas humanas comprende un TAD de una proteína CITED2 o CITED4 humana.

[00169] En una modalidad, un eTF proporcionado en la presente que regula por aumento SCN1A y que tiene un alto por ciento de identidad de secuencia a una o más proteínas humanas puede comprender un DBD humano (hDBD) y un TAD humano (hTAD) (por ejemplo, hTAD-hDBD o hDBD-hTAD), en donde el hDBD y hTAD se pueden derivar de la misma proteína humana o de diferentes proteínas humanas. En otra modalidad, un eTF proporcionado en la presente que tiene un alto por ciento de identidad de secuencia a una o más proteínas humanas puede comprender un hDBD y dos hTAD, en donde el hDBD y los hTAD se derivan de la misma proteína humana, el hDBD se deriva de una primera proteína humana y ambos hTAD se derivan de una segunda proteína humana, el hDBD y un hTAD se derivan de una primera proteína humana y el segundo hTAD se deriva de una segunda proteína humana, o el hDBD se deriva de una primera proteína humana, un hTAD se deriva de una segunda proteína humana, y el segundo hTAD se deriva de una tercera proteína humana (por ejemplo, hTAD1-hDBD-hTAD1, hTAD1-hDBD-hTAD2, hTAD1-hTAD1-hDBD, hTAD1-hTAD2-hDBD, hDBD-hTAD1-hTAD1, o hDBDD-hTAD1-hTAD2).

[00170] En modalidades de ejemplo, un eTF proporcionado en la presente que tiene un alto porcentaje de identidad de secuencia a una o más proteínas humanas comprende cualquiera

de las siguientes configuraciones: (i) un hDBD y un hTAD ambos derivados de EGR1 humano; (ii) un hDBD y un hTAD ambos derivados de EGR3 humano; (iii) un hDBD derivado de EGR1 humano y un hTAD derivado de CITED2 (por ejemplo, hEGR1 DBD-hCITED2 TAD o hCITED2 TAD-hEGR1 DBD); (iv) un hDBD derivado de EGR1 humana y un hTAD derivado de CITED4 humano (por ejemplo, hEGR1 DBD-hCITED4 TAD o hCITED4 TAD-hEGR1 DBD); (v) un hDBD derivado de EGR3 humano y un hTAD derivado de CITED2 (por ejemplo, hEGR3 DBD-hCITED2 TAD o hCITED2 TAD-hEGR3 DBD); (vi) un hDBD derivado de EGR3 humano y un hTAD derivado de CITED4 humano (por ejemplo, hEGR3 DBD-hCITED4 TAD o hCITED4 TAD-hEGR3 DBD); (vii) un hDBD derivado de EGR1 humano y dos hTAD derivados de CITED2 (por ejemplo, hCITED2 TAD-hEGR1 DBD-hCITED2 TAD, hCITED2 TAD-hCITED2 TAD-hEGR1 DBD o hEGR1 DBD-hCITED2 TAD-hCITED2 TAD); (viii) un hDBD derivado de EGR1 humano y dos hTAD derivados de CITED4 humano (por ejemplo, hCITED4 TAD-hEGR1 DBD-hCITED4 TAD, hCITED4 TAD-hCITED4 TAD-hEGR1 DBD o hEGR1 DBD-hCITED4 TAD-hCITED); (ix) un hDBD derivado de EGR3 humano y dos hTAD derivados de CITED2 humano (por ejemplo, hCITED2 TAD-hEGR3 DBD-hCITED2 TAD, hCITED2 TAD-hCITED2 TAD-hEGR3 DBD o hEGR3 DBD-hCITED2 TAD2 TAD-hCITED); (x) un hDBD derivado de EGR3 humano y dos hTAD derivados de CITED4 humano (por ejemplo, hCITED4 TAD-hEGR3 DBD-hCITED4 TAD, hCITED4 TAD-hCITED4 TAD-hEGR3 DBD o hEGR3 DBD-hCITED4 TAD-hCITED4); (xi) un hDBD derivado de EGR1 humano, un primer

hTAD derivado de CITED2 humano, un segundo hTAD derivado de CITED4 humano (por ejemplo, hCITED2 TAD-hEGR1 DBD-hCITED4 TAD, hCITED4 TAD-hEGR1 DBD-hCITED2 TAD, hCITED2 TAD TAD-hEGR1 DBD, hCITED4 TAD-hCITED2 TAD-hEGR1 DBD, hEGR1 DBD-hCITED4 TAD- hCITED2 TAD, o hEGR1 DBD-hCITED2 TAD- hCITED4 TAD); o (xii) un hDBD derivado de EGR3 humano, un primer hTAD derivado de CITED2 humano, un segundo hTAD derivado de CITED4 humano (por ejemplo, hCITED2 TAD-hEGR3 DBD-hCITED4 TAD, hCITED4 TAD-hEGR3 DBD-hCITED2 TAD, hCITED2 TAD- hCITED4 TAD-hEGR3 DBD, hCITED4 TAD-hCITED2 TAD-hEGR3 DBD, hEGR3 DBD-hCITED4 TAD-hCITED2 TAD o hEGR3 DBD-hCITED2 TAD-hCITED4 TAD).

[00171] En ciertas modalidades, un eTF proporcionado en la presente que regula por aumento SCN1A y tiene un alto por ciento de identidad de secuencia a una o más proteínas humanas comprende cualquiera de: (i) una secuencia que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 103-124, 128-131, 205, 207, 209, 213, 217, 219, 221 o 223; (ii) una secuencia que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 92-98; (iii) una secuencia que comprende al menos 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de las secuencias de (i) o (ii); o (iv) un fragmento funcional o variante de cualquiera de las secuencias de (i), (ii) o (iii). En modalidades de ejemplo, estos eTF son capaces de favorecer la expresión de SCN1A por al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25

veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces o más en comparación con un control, o por al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% o 500% o más en comparación con un control. En modalidades de ejemplo, estos eTF tienen al menos 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia total a una o más proteínas humanas. En ciertas modalidades, estos eTF exhiben inmunogenicidad reducida en comparación con un eTF que tiene un porcentaje de identidad de secuencia total menor a una o más proteínas humanas. En varias modalidades, se puede medir una reducción de inmunogenicidad usando un ensayo elispot, un inmunoensayo o un método in silico.

[00172] En ciertas modalidades, un eTF proporcionado en la presente que regula por aumento SCN1A y tiene un alto porcentaje de identidad de secuencia a una o más proteínas humanas puede comprender además uno o más dominios o secuencias de aminoácidos además de los dominios DBD y TAD, tal como una señal de localización nuclear o un ligador, etc. Además, un polinucleótido que codifica un eTF proporcionado en la presente que tiene un alto por ciento de identidad de secuencia a una o más proteínas humanas puede comprender además una o más secuencias de ácido nucleico además de la secuencia codificadora para el eTF tal como un promotor, intensificador, extremidad de poliA, etc. En estas

modalidades, una o más de las secuencias de aminoácidos y/o secuencias de ácido nucleico adicionales son preferentemente secuencias humanas, derivadas de secuencias humanas, o tienen al menos 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a una proteína humana.

SCN1A eTF de ejemplo

[00173] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que favorece la expresión de SCN1A comprende un dominio de unión a ADN que tiene uno o más dominios de dedo de zinc que comprenden una hélice de reconocimiento que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 152-167. En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que favorece la expresión de SCN1A comprende un dominio de unión a ADN que tiene al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce dominios de dedo de zinc, en donde cada dominio de dedo de zinger comprende independientemente una hélice de reconocimiento que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 152-167. En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que favorece la expresión de SCN1A comprende un dominio de unión a ADN que tiene seis dominios de dedo de zinc, en donde cada dominio de dedo de zinc comprende independientemente una hélice de reconocimiento que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 152-167. En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente

que favorece la expresión de SCN1A comprende un dominio de unión a ADN que tiene nueve dominios de dedo de zinc, en donde cada dominio de dedo de zinc comprende independientemente una hélice de reconocimiento que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 152-167. En modalidades de ejemplo, estos eTF comprenden un dominio de unión a ADN que tiene SEQ ID NO: 147, en donde cada X se selecciona independientemente de cualquiera de SEQ ID NO: 152-167, y n es 6 o 9.

[00174] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que favorece la expresión de SCN1A comprende un dominio de unión a ADN que tiene cualquiera de: (i) una secuencia que comprende RSDNLVR x REDNLHT x RSDELVR x QSGNLTE x TSGHLVR x QNSTLTE (SEQ ID NO: 148), en donde x puede ser un ligador de 1-50 aminoácidos, (ii) una secuencia que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 148, o (ii) un fragmento funcional de (i) o (ii). En ciertas modalidades, este eTF comprende además uno o más TAD seleccionados de VP64, VPR, CITED2, CITED4 o CREB3. En una modalidad, este eTF comprende un dominio TAD de VPR conjugado con el extremo C-terminal del DBD. En ciertas modalidades, este eTF comprende un TAD de CITED2 conjugado con el extremo N-terminal, el extremo C-terminal o el extremo N-terminal y el extremo C-terminal del DBD. En ciertas modalidades, este eTF comprende un TAD de CITED4 conjugado con el extremo N-terminal, el extremo C-terminal o el extremo

N-terminal y el extremo C-terminal del DBD. En ciertas modalidades, este eTF comprende dos TAD de CITED4 conjugados con el extremo N-terminal o el extremo C-terminal del DBD. En ciertas modalidades, este eTF es capaz de unirse a un sitio diana que tiene SEQ ID NO: 18 y favorecer la expresión de SCN1A por al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces o más en comparación con un control, o por al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% o 500% o más en comparación con un control.

[00175] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que favorece la expresión de SCN1A comprende un dominio de unión a ADN que tiene cualquiera de: (i) una secuencia que comprende RSDNLVR x HRTTLTN x REDNLHT x TSHSLTE x QSSSLVR x REDNLHT (SEQ ID NO: 149), en donde x puede ser un ligador de 1-50 aminoácidos, (ii) una secuencia que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 149, o (ii) un fragmento funcional de (i) o (ii). En ciertas modalidades, este eTF comprende además uno o más TAD seleccionados de VP64, VPR, CITED2, CITED4 o CREB3. En una modalidad, este eTF comprende un dominio TAD de VPR conjugado con el extremo C-terminal del DBD. En ciertas modalidades, este eTF comprende un TAD de CITED2 conjugado con el extremo N-terminal, el extremo C-terminal o el extremo N-terminal y el extremo C-terminal del DBD. En ciertas

modalidades, este eTF comprende un TAD de CITED4 conjugado con el extremo N-terminal, el extremo C-terminal o el extremo N-terminal y el extremo C-terminal del DBD. En ciertas modalidades, este eTF comprende dos TAD de CITED4 conjugados con el extremo N-terminal o el extremo C-terminal del DBD. En ciertas modalidades, este eTF es capaz de unirse a un sitio diana que tiene SEQ ID NO: 30 y favorecer la expresión de SCN1A por al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces o más en comparación con un control, o por al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% o 500% o más en comparación con un control.

[00176] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que favorece la expresión de SCN1A comprende un dominio de unión a ADN que tiene cualquiera de: (i) una secuencia que comprende RRDELNV x RSDHLTN x RSDDLVR x RSDNLVR x HRTTLTN x REDNLHT x TSHSLTE x QSSSLVR x REDNLHT (SEQ ID NO: 151), (ii) una secuencia que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 151, o (ii) un fragmento funcional de (i) o (ii). En ciertas modalidades, este eTF comprende además uno o más TAD seleccionados de VP64, VPR, CITED2, CITED4 o CREB3. En una modalidad, este eTF comprende un dominio TAD de VPR conjugado con el extremo C-terminal del DBD. En ciertas modalidades, este eTF comprende un TAD de CITED2 conjugado con el extremo

N-terminal, el extremo C-terminal o el extremo N-terminal y el extremo C-terminal del DBD. En ciertas modalidades, este eTF comprende un TAD de CITED4 conjugado con el extremo N-terminal, el extremo C-terminal o el extremo N-terminal y el extremo C-terminal del DBD. En ciertas modalidades, este eTF comprende dos TAD de CITED4 conjugados con el extremo N-terminal o el extremo C-terminal del DBD. En ciertas modalidades, este eTF es capaz de unirse a un sitio diana que tiene SEQ ID NO: 32 y favorecer la expresión de SCN1A por al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces o más en comparación con un control, o por al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% o 500% o más en comparación con un control.

[00177] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que favorece la expresión de SCN1A comprende un dominio de unión a ADN que tiene cualquiera de: (i) una secuencia que comprende DPGALVR x RSDNLVR x QSGDLRR x THLDLIR x TSGNLVR x RSDNLVR (SEQ ID NO: 150), (ii) una secuencia que tiene al menos 89%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 150, o (ii) un fragmento funcional de (i) o (ii). En ciertas modalidades, este eTF comprende además uno o más TAD seleccionados de VP64, VPR, CITED2, CITED4 o CREB3. En una modalidad, este eTF comprende un dominio TAD de VPR conjugado con el extremo C-terminal del

DBD. En ciertas modalidades, este eTF comprende un TAD de CITED2 conjugado con el extremo N-terminal, el extremo C-terminal o el extremo N-terminal y el extremo C-terminal del DBD. En ciertas modalidades, este eTF comprende un TAD de CITED4 conjugado con el extremo N-terminal, el extremo C-terminal o el extremo N-terminal y el extremo C-terminal del DBD. En ciertas modalidades, este eTF comprende dos TAD de CITED4 conjugados con el extremo N-terminal o el extremo C-terminal del DBD. En ciertas modalidades, este eTF es capaz de unirse a un sitio diana que tiene SEQ ID NO: 31 y favorecer la expresión de SCN1A por al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces o más en comparación con un control, o por al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% o 500% o más en comparación con un control.

[00178] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que regula por aumento SCN1A comprende cualquiera de: (i) una secuencia que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 99-131, 205, 207, 209, 213, 217, 219, 221 o 223; (ii) una secuencia que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 77-98; (iii) una secuencia que comprende al menos 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de las secuencias de (i) o (ii); o (iv) un fragmento funcional o variante de

cualquiera de las secuencias de (i), (ii) o (iii). En modalidades de ejemplo, estos eTF son capaces de favorecer la expresión de SCN1A por al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces o más en comparación con un control, o por al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% o 500% o más en comparación con un control.

[00179] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que regula por aumento SCN1A comprende cualquiera de: (i) una secuencia que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 99-102 o 125-127; (ii) una secuencia que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 77-91; (iii) una secuencia que comprende al menos 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de las secuencias de (i) o (ii); o (iv) un fragmento funcional o variante de cualquiera de las secuencias de (i), (ii) o (iii). En modalidades de ejemplo, estos eTF son capaces de favorecer la expresión de SCN1A por al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces o más en comparación con un control, o por al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% o 500% o más en comparación con un control.

[00180] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la

presente que regula por aumento SCN1A comprende cualquiera de: (i) una secuencia que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 103-124, 128-131, 205, 207, 209, 213, 217, 219, 221 o 223; (ii) una secuencia que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 92-98; (iii) una secuencia que comprende al menos 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de las secuencias de (i) o (ii); o (iv) un fragmento funcional o variante de cualquiera de las secuencias de (i), (ii) o (iii). En modalidades de ejemplo, estos eTF son capaces de favorecer la expresión de SCN1A por al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces o más en comparación con un control, o por al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% o 500% o más en comparación con un control. En modalidades de ejemplo, estos eTF tienen al menos 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia total a una o más proteínas humanas. En ciertas modalidades, estos eTF exhiben inmunogenicidad reducida en comparación con un eTF que tiene un porcentaje de identidad de secuencia total menor a una o más proteínas humanas. En varias modalidades, se puede medir una reducción de inmunogenicidad usando un ensayo elispot, un inmunoensayo o un método in silico.

[00181] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la

presente que regula por aumento SCN1A comprende cualquiera de: (i) una secuencia que comprende SEQ ID NO: 127; (ii) una secuencia que comprende al menos 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 127; o (iii) un fragmento funcional o variante de cualquiera de las secuencias de (i) o (ii). En modalidades de ejemplo, estos eTF comprenden SEQ ID NO: 77 y se unen a un sitio diana que tiene SEQ ID NO: 18. En modalidades de ejemplo, estos eTF son capaces de favorecer la expresión de SCN1A por al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces o más en comparación con un control, o por al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% o 500% o más en comparación con un control.

[00182] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que regula por aumento SCN1A comprende cualquiera de: (i) una secuencia que comprende SEQ ID NO: 128; (ii) una secuencia que comprende al menos 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 128; o (iii) un fragmento funcional o variante de cualquiera de las secuencias de (i) o (ii). En modalidades de ejemplo, estos eTF comprenden SEQ ID NO: 92 y se unen a un sitio diana que tiene SEQ ID NO: 18. En modalidades de ejemplo, estos eTF son capaces de favorecer la

expresión de SCN1A por al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces o más en comparación con un control, o por al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% o 500% o más en comparación con un control. En modalidades de ejemplo, estos eTF tienen al menos 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia total a una o más proteínas humanas. En ciertas modalidades, estos eTF exhiben inmunogenicidad reducida en comparación con un eTF que tiene un porcentaje de identidad de secuencia total menor a una o más proteínas humanas. En varias modalidades, se puede medir una reducción de inmunogenicidad usando un ensayo elispot, un inmunoensayo o un método in silico.

[00183] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que regula por aumento SCN1A comprende cualquiera de: (i) una secuencia que comprende SEQ ID NO: 129; (ii) una secuencia que comprende al menos 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 129; o (iii) un fragmento funcional o variante de cualquiera de las secuencias de (i) o (ii). En modalidades de ejemplo, estos eTF comprenden SEQ ID NO: 92 y se unen a un sitio diana que tiene SEQ ID NO: 18. En modalidades de ejemplo, estos eTF son capaces de favorecer la expresión de SCN1A por al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces,

15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces o más en comparación con un control, o por al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% o 500% o más en comparación con un control. En modalidades de ejemplo, estos eTF tienen al menos 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia total a una o más proteínas humanas. En ciertas modalidades, estos eTF exhiben inmunogenicidad reducida en comparación con un eTF que tiene un porcentaje de identidad de secuencia total menor a una o más proteínas humanas. En varias modalidades, se puede medir una reducción de inmunogenicidad usando un ensayo elispot, un inmunoensayo o un método in silico.

[00184] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que regula por aumento SCN1A comprende cualquiera de: (i) una secuencia que comprende SEQ ID NO: 130; (ii) una secuencia que comprende al menos 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 130; o (iii) un fragmento funcional o variante de cualquiera de las secuencias de (i) o (ii). En modalidades de ejemplo, estos eTF comprenden SEQ ID NO: 92 y se unen a un sitio diana que tiene SEQ ID NO: 18. En modalidades de ejemplo, estos eTF son capaces de favorecer la expresión de SCN1A por al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces o

más en comparación con un control, o por al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% o 500% o más en comparación con un control. En modalidades de ejemplo, estos eTF tienen al menos 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia total a una o más proteínas humanas. En ciertas modalidades, estos eTF exhiben inmunogenicidad reducida en comparación con un eTF que tiene un porcentaje de identidad de secuencia total menor a una o más proteínas humanas. En varias modalidades, se puede medir una reducción de inmunogenicidad usando un ensayo elispot, un inmunoensayo o un método in silico.

[00185] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que regula por aumento SCN1A comprende cualquiera de: (i) una secuencia que comprende SEQ ID NO: 131; (ii) una secuencia que comprende al menos 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 131; o (iii) un fragmento funcional o variante de cualquiera de las secuencias de (i) o (ii). En modalidades de ejemplo, estos eTF comprenden SEQ ID NO: 92 y se unen a un sitio diana que tiene SEQ ID NO: 18. En modalidades de ejemplo, estos eTF son capaces de favorecer la expresión de SCN1A por al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces o más en comparación con un control, o por al menos 20%, 30%,

40%, 50%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% o 500% o más en comparación con un control. En modalidades de ejemplo, estos eTF tienen al menos 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia total a una o más proteínas humanas. En ciertas modalidades, estos eTF exhiben inmunogenicidad reducida en comparación con un eTF que tiene un porcentaje de identidad de secuencia total menor a una o más proteínas humanas. En varias modalidades, se puede medir una reducción de inmunogenicidad usando un ensayo elispot, un inmunoensayo o un método in silico.

[00186] En ciertas modalidades, un eTF descrito en la presente que favorece la expresión de SCN1A comprende un DBD que comprende un complejo de ARNg/Cas, en donde el ARNg comprende una secuencia de direccionamiento que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 35-66. La secuencia diana del ARNg se une al extremo 5'de una secuencia de andamio que tiene la secuencia: 5'-GTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGA-3' (SEQ ID NO: 183). En modalidades de ejemplo, la proteína Cas es una proteína Cas9 desactivada por nucleasa. En ciertas modalidades, este eTF comprende además uno o más TAD conjugados con la proteína Cas, en donde el TAD se selecciona de VP64, VPR, CITED2, CITED4 o CREB3. En una modalidad, este eTF comprende un dominio TAD de VPR conjugado

con el extremo C-terminal de la proteína Cas. En ciertas modalidades, este eTF comprende un TAD de CITED2 conjugado con el extremo N-terminal, el extremo C-terminal, o el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de la proteína Cas. En ciertas modalidades, este eTF comprende un TAD de CITED4 conjugado con el extremo N-terminal, el extremo C-terminal, o el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de la proteína Cas. En modalidades de ejemplo, estos eTF son capaces de favorecer la expresión de SCN1A por al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces o más en comparación con un control.

Polinucleótidos

[00187] En otro aspecto, la solicitud proporciona polinucleótidos que codifican para cualquiera de los eTF que regulan por aumento SNC1A descritos en la presente. En otro aspecto, la solicitud proporciona polinucleótidos que comprenden un sitio de unión de microARN selectivo de PV. En ciertas modalidades, la solicitud proporciona polinucleótidos que comprenden un elemento regulador selectivo de PV unido operativamente a un transgén y un sitio de unión de microARN selectivo de PV. En ciertas modalidades, la solicitud proporciona polinucleótidos que comprenden una secuencia que codifica para un eTF que favorece la expresión de SCN1A como se describe en la presente y un sitio de unión de microARN

selectivo de PV. En ciertas modalidades, la solicitud proporciona un elemento regulador selectivo de PV unido operativamente a un transgén que codifica para un eTF que favorece la expresión de SCN1A y un elemento regulador selectivo de PV.

Polinucleótidos que codifican para eTF que favorecen SCN1A

[00188] En ciertas modalidades, la solicitud proporciona un polinucleótido que comprende cualquiera de lo siguiente: (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica para un eTF que regula por aumento SCN1A que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 77-131, 205, 207, 209, 213, 217, 219, 221 o 223, o una variante o un fragmento funcional de las mismas; (ii) un ácido nucleico que codifica para un fragmento funcional de un eTF que regula por aumento SCN1A que tiene cualquiera de SEQ ID NO: 77-131, 205, 207, 209, 213, 217, 219, 221 o 223; o (iii) un ácido nucleico que codifica para un eTF que regula por aumento SCN1A que tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia a un eTF que regula por aumento SCN1A que tiene cualquiera de SEQ ID NO: 77-131, 205, 207, 209, 213, 217, 219, 221 o 223, o una variante o un fragmento funcional de la misma.

[00189] En ciertas modalidades, la solicitud proporciona un polinucleótido que comprende cualquiera de lo siguiente: (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica para un DBD que

comprende cualquiera de SEQ ID NO: 92-98, o una variante o fragmento funcional de las mismas; (ii) un ácido nucleico que codifica un fragmento funcional de un DBD que tiene cualquiera de SEQ ID NO: 92-98; o (iii) un ácido nucleico que codifica un DBD que tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia a un DBD que tiene cualquiera de SEQ ID NO: 92-98, o una variante o fragmento funcional del mismo, en donde el DBD es capaz de unirse a un sitio diana unido por cualquiera de SEQ ID NO: 92-98.

[00190] En ciertas modalidades, la solicitud proporciona un polinucleótido que codifica para un eTF que favorece la expresión de SCN1A endógeno, en donde el polinucleótido comprende cualquiera de lo siguiente: (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica para un eTF que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 103-124, 128-131, 205, 207, 209, 213, 217, 219, 221 o 223; (ii) un ácido nucleico que codifica un fragmento funcional de un eTF que tiene cualquiera de SEQ ID NO: 103-124, 128-131, 205, 207, 209, 213, 217, 219, 221 o 223; o (iii) un ácido nucleico que codifica para un eTF que tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia a un eTF que tiene cualquiera de SEQ ID NO: 103-124, 128-131, 205, 207, 209, 213, 217, 219, 221 o 223, en donde el eTF es capaz de regular por aumento SCN1A.

[00191] En ciertas modalidades, la solicitud proporciona un polinucleótido que codifica para un DBD que se une a un sitio diana genómico capaz de favorecer la expresión de SCN1A endógeno cuando se une a un eTF descrito en la presente, en donde el polinucleótido comprende cualquiera de lo siguiente: (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica para un DBD que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 77-98; (ii) un ácido nucleico que codifica para un fragmento funcional de un DBD que tiene cualquiera de SEQ ID NO: 77-98; o (iii) un ácido nucleico que codifica un eTF que tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia a un DBD que tiene cualquiera de SEQ ID NO: 77-98, en donde el DBD es capaz de unirse a un sitio diana unido por cualquiera de SEQ ID NO: 77-98.

[00192] En ciertas modalidades, la solicitud proporciona un polinucleótido que codifica para un DBD que se une a un sitio diana genómico capaz de favorecer la expresión de SCN1A endógeno cuando se une a un eTF descrito en la presente, en donde el polinucleótido comprende cualquiera de lo siguiente: (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica para un DBD que comprende cualquiera de SEQ ID NO: 148-151; (ii) un ácido nucleico que codifica para un fragmento funcional de un DBD que tiene cualquiera de SEQ ID NO: 148-151; o (iii) un ácido nucleico que codifica un eTF que tiene al menos 70%, 75%,

80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia a un DBD que tiene cualquiera de SEQ ID NO: 148-151, en donde el DBD es capaz de unirse a un sitio diana unido por cualquiera de SEQ ID NO: 92-98.

[00193] En ciertas modalidades, la solicitud proporciona un polinucleótido que codifica para un eTF capaz de regular la expresión de SCN1A endógena, en donde el polinucleótido comprende cualquiera de lo siguiente: (i) una secuencia de ácido nucleico que tiene cualquiera de SEQ ID NO: 70-76 o 184; (ii) un ácido nucleico que tiene un fragmento funcional de cualquiera de las secuencias de (i); o (iii) un ácido nucleico que tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia a cualquiera de las secuencias de (i) o (ii), en donde el polinucleótido codifica para un eTF que es capaz de favorecer la expresión de SCN1A.

[00194] En ciertas modalidades, la solicitud proporciona un polinucleótido que codifica para un eTF capaz de regular la expresión de SCN1A endógena, en donde el polinucleótido comprende cualquiera de lo siguiente: (i) una secuencia de ácido nucleico que tiene SEQ ID NO: 70; (ii) un ácido nucleico que tiene un fragmento funcional de SEQ ID NO: 70; o (iii) un ácido nucleico que tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia a cualquiera de las secuencias de (i) o (ii). En modalidades de ejemplo, estos polinucleótidos codifican para un eTF que tiene SEQ ID NO: 127, o un fragmento funcional o variante de la misma que es capaz de favorecer la expresión de SCN1A.

[00195] En ciertas modalidades, la solicitud proporciona un polinucleótido que codifica para un eTF capaz de regular la expresión de SCN1A endógena, en donde el polinucleótido comprende cualquiera de lo siguiente: (i) una secuencia de ácido nucleico que tiene SEQ ID NO: 71; (ii) un ácido nucleico que tiene un fragmento funcional de SEQ ID NO: 71; o (iii) un ácido nucleico que tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia a cualquiera de las secuencias de (i) o (ii). En modalidades de ejemplo, estos polinucleótidos codifican para un eTF que tiene SEQ ID NO: 127, o un fragmento funcional o variante de la misma que es capaz de favorecer la expresión de SCN1A.

[00196] En ciertas modalidades, la solicitud proporciona un polinucleótido que codifica para un eTF capaz de regular la expresión de SCN1A endógena, en donde el polinucleótido comprende cualquiera de lo siguiente: (i) una secuencia de ácido nucleico que tiene SEQ ID NO: 72; (ii) un ácido nucleico que tiene un fragmento funcional de SEQ ID NO: 72; o (iii) un ácido nucleico que tiene al menos 70%, 75%, 80%,

85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia a cualquiera de las secuencias de (i) o (ii). En modalidades de ejemplo, estos polinucleótidos codifican para un eTF que tiene SEQ ID NO: 130, o un fragmento funcional o variante de la misma que es capaz de favorecer la expresión de SCN1A.

[00197] En ciertas modalidades, la solicitud proporciona un polinucleótido que codifica para un eTF capaz de regular la expresión de SCN1A endógena, en donde el polinucleótido comprende cualquiera de lo siguiente: (i) una secuencia de ácido nucleico que tiene SEQ ID NO: 73; (ii) una secuencia de ácido nucleico que tiene un fragmento funcional de SEQ ID NO: 73; o (iii) un ácido nucleico que tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia a cualquiera de las secuencias de (i) o (ii). En modalidades de ejemplo, estos polinucleótidos codifican para un eTF que tiene SEQ ID NO: 131, o un fragmento funcional o variante de la misma que es capaz de favorecer la expresión de SCN1A.

[00198] En ciertas modalidades, la solicitud proporciona un polinucleótido que codifica para un eTF capaz de regular la expresión de SCN1A endógena, en donde el polinucleótido comprende cualquiera de lo siguiente: (i) una secuencia de ácido nucleico que tiene SEQ ID NO: 74; (ii) una secuencia de ácido nucleico que tiene un fragmento funcional de SEQ ID NO:

74; o (iii) un ácido nucleico que tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia a cualquiera de las secuencias de (i) o (ii). En modalidades de ejemplo, estos polinucleótidos codifican para un eTF que tiene SEQ ID NO: 127, o un fragmento funcional o variante de la misma que es capaz de favorecer la expresión de SCN1A.

[00199] En ciertas modalidades, la solicitud proporciona un polinucleótido que codifica para un eTF capaz de regular la expresión de SCN1A endógena, en donde el polinucleótido comprende cualquiera de lo siguiente: (i) una secuencia de ácido nucleico que tiene SEQ ID NO: 75; (ii) una secuencia de ácido nucleico que tiene un fragmento funcional de SEQ ID NO: 75; o (iii) un ácido nucleico que tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia a cualquiera de las secuencias de (i) o (ii). En modalidades de ejemplo, estos polinucleótidos codifican para un eTF que tiene SEQ ID NO: 127, o un fragmento funcional o variante de la misma que es capaz de favorecer la expresión de SCN1A.

[00200] En ciertas modalidades, la solicitud proporciona un polinucleótido que codifica para un eTF capaz de regular la expresión de SCN1A endógena, en donde el polinucleótido comprende cualquiera de lo siguiente: (i) una secuencia de ácido nucleico que tiene SEQ ID NO: 76; (ii) una secuencia de

ácido nucleico que tiene un fragmento funcional de SEQ ID NO: 76; o (iii) un ácido nucleico que tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia a cualquiera de las secuencias de (i) o (ii). En modalidades de ejemplo, estos polinucleótidos codifican para un eTF que tiene SEQ ID NO: 106, o un fragmento funcional o variante de la misma que es capaz de favorecer la expresión de SCN1A.

[00201] En ciertas modalidades, la solicitud proporciona un polinucleótido que codifica para un eTF capaz de regular la expresión de SCN1A endógena, en donde el polinucleótido comprende cualquiera de lo siguiente: (i) una secuencia de ácido nucleico que tiene SEQ ID NO: 184; (ii) una secuencia de ácido nucleico que tiene un fragmento funcional de SEQ ID NO: 184; o (iii) un ácido nucleico que tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia a cualquiera de las secuencias de (i) o (ii). En modalidades de ejemplo, estos polinucleótidos codifican para un eTF que tiene SEQ ID NO: 106, o un fragmento funcional o variante de la misma que es capaz de favorecer la expresión de SCN1A.

<u>Polinucleótidos que comprenden sitios de unión de microARN para la expresión selectiva en neuronas PV</u>

[00202] En otro aspecto, la solicitud proporciona polinucleótidos que comprenden sitios de unión de microARN

que conducen a la expresión selectiva de un gen de interés en neuronas de parvalbúmina (PV). Los microARN o miARN son pequeños ARN no codificantes (~20 nucleótidos) que regulan la expresión génica después de la transcripción mediante la hibridación con sitios de reconocimiento complementarios dentro de una molécula de ARNm y conducen a la inhibición de la expresión génica mediante la promoción de la degradación de la transcripción de ARNm o mediante la represión de la traducción de la proteína codificada por el ARNm. Los sitios de unión de microARN proporcionados en la presente inhiben la expresión de un gen de interés en las neuronas excitatorias, lo que promueve la expresión selectiva de un gen de interés en las neuronas PV (por ejemplo, sitios de unión de microARN selectivo de PV). En ciertas modalidades, las neuronas excitadoras son neuronas que expresan uno o más de STAC, Slc17a7, Car12, Syt17, ITPKA, Col6a1, CamKII, Sv2b, INHBA y/o DKK3. En una modalidad de ejemplo, las neuronas excitadoras son neuronas que expresan CamKII.

[00203] En ciertas modalidades, la solicitud proporciona polinucleótidos que comprenden uno o más sitios de unión de microARN para uno o más microARN que promueven la expresión selectiva de PV, por ejemplo, promueven la degradación de un ARNm que comprende el sitio de unión de microARN en neuronas excitatorias. Los microARN de ejemplo que promueven la expresión selectiva de PV incluyen, por ejemplo, miR-128,

miR-221 y miR-222. En ciertas modalidades, la solicitud proporciona polinucleótidos que comprenden al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sitios de unión a microARN selectivo de PV. En una modalidad, la solicitud proporciona polinucleótidos que comprenden al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sitios de unión a miR-128 (SEQ ID NO: 9). En una modalidad, la solicitud proporciona polinucleótidos que comprenden al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sitios de unión a miR-221 (SEQ ID NO: 11). En una modalidad, la solicitud proporciona polinucleótidos que comprenden al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sitios de unión a miR-222 (SEQ ID NO: 13). En una modalidad, la solicitud proporciona polinucleótidos que comprenden al menos 1 sitio de unión a miR-128, al menos un sitio de unión a miR-221 y al menos un sitio de unión a miR-222. En una modalidad, la solicitud proporciona polinucleótidos que comprenden al menos un sitio de unión a miR-128 y al menos un sitio de unión a miR-222. En una modalidad, la solicitud proporciona polinucleótidos que comprenden al menos un sitio de unión a miR-221 y al menos un sitio de unión a miR-222. En una modalidad de ejemplo, la solicitud proporciona polinucleótidos que comprenden al menos un sitio de unión a miR-128 (SEQ ID NO: 9) y al menos un sitio de unión de miR-221 (SEQ ID NO: 11). En una modalidad, la solicitud proporciona polinucleótidos que comprenden al menos 2 sitios

de unión a miR-128 (SEQ ID NO: 9) y al menos 2 sitios de unión de miR-221 (SEQ ID NO: 11). En una modalidad, la solicitud proporciona polinucleótidos que comprenden al menos 3 sitios de unión a miR-128 (SEQ ID NO: 9) y al menos 3 sitios de unión de miR-221 (SEQ ID NO: 11). En una modalidad, la solicitud proporciona polinucleótidos que comprenden al menos 4 sitios de unión a miR-128 (SEQ ID NO: 9) y al menos 4 sitios de unión de miR-221 (SEQ ID NO: 11). En una modalidad, la solicitud proporciona polinucleótidos que comprenden al menos 5 sitios de unión a miR-128 (SEQ ID NO: 9) y al menos 5 sitios de unión de miR-221 (SEQ ID NO: 11). En estas modalidades, los sitios de unión se pueden disponer en cualquier orden. Por ejemplo, para una construcción que contiene 2 sitios de unión a miR-128 y 2 sitios de unión a miR-221, los sitios de unión se pueden disponer en cualquiera de las siguientes configuraciones: miR-128 – miR-128 – miR-221 – miR221, miR-128 – miR-221 - miR-128 – miR-221, miR-128 – miR221 – miR-128, miR-221 – miR128 - miR221 – miR128, miR-221 – miR128 – miR128 – miR221, o miR221 – miR221- miR128 – miR128. En una modalidad de ejemplo, los polinucleótidos proporcionados en la presente comprenden una secuencia que tiene 4 sitios de unión a miR-128 (SEQ ID NO: 9) seguido de cuatro sitios de unión de miR-221 (SEQ ID NO: 11), por ejemplo, miR-128 – miR-128 – miR128 – miR-128 – miR221 – miR221 – miR-221 – miR221. En otra modalidad de ejemplo, los

polinucleótidos proporcionados en la presente comprenden una secuencia que tiene 1 secuencia de miR-221 (SEQ ID NO: 11), secuencia de 1 miR-222 (SEQ ID NO: 13) y 1 sitio de unión de miR-128 (SEQ ID NO: 9), por ejemplo, miR-221 – miR222 – miR128. En otra modalidad de ejemplo, los polinucleótidos proporcionados en la presente comprenden una secuencia que tiene 2 secuencias de miR-221 (SEQ ID NO: 11), secuencias de 2 miR-222 (SEQ ID NO: 13) y 2 sitio de unión de miR-128 (SEQ ID NO: 9) dispuestos en el siguiente orden: miR-221 – miR222 – miR128 - miR-221 – miR222 – miR128.

[00204] En polinucleótidos que tienen más de un sitio de unión de microARN, los sitios de unión pueden ser directamente adyacentes entre sí en la secuencia de polinucleótidos (por ejemplo, ningún enlazador o secuencia intermedia entre los sitios de unión) o pueden estar separados entre sí por al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleótidos, o de 1-20, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, o 1-2 nucleótidos. En modalidades de ejemplo, los sitios de unión a microARN están separados por aproximadamente 5 nucleótidos o por 5 nucleótidos. En modalidades de ejemplo, las secuencias que separan los sitios de unión de microARN (así como las uniones formadas entre sitios de unión de microARN o uniones formadas entre sitios de unión de microARN y las secuencias que separan los sitios de unión de microARN)

no son complementarias a ningún otro microARN o cualquier otro microARN neuronal.

[00205] En ciertas modalidades, los polinucleótidos proporcionados en la presente comprenden un sitio de unión a microARN que tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad a SEQ ID NO: 7. En una modalidad de ejemplo, los polinucleótidos proporcionados en la presente comprenden un sitio de unión a microARN que comprende la SEQ ID NO: 7.

[00206] En ciertas modalidades, los polinucleótidos proporcionados en la presente comprenden un sitio de unión a microARN que tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad a SEQ ID NO: 14. En una modalidad de ejemplo, los polinucleótidos proporcionados en la presente comprenden un sitio de unión a microARN que comprende la SEQ ID NO: 14.

[00207] En ciertas modalidades, los polinucleótidos proporcionados en la presente comprenden un sitio de unión a microARN que tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad a SEQ ID NO: 15. En una modalidad de ejemplo, los polinucleótidos proporcionados en la presente comprenden un sitio de unión a microARN que comprende la SEQ ID NO: 15.

[00208] En ciertas modalidades, los sitios de unión de microARN proporcionados en la presente se ubican dentro de la

región 3’ no traducida de un transcrito de ARNm, por ejemplo, después del codón de terminación de traducción (es decir, TAA, TGA o TAG) y antes de la extremidad de poliA. El sitio de unión de microARN puede estar ubicado directamente adyacente al codón de terminación de traducción o puede estar separado del codón de terminación de traducción por al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleótidos, o de 1-20, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3 o 1-2 nucleótidos y/o puede estar ubicado adyacente a la extremidad de poliA o puede estar separado de la extremidad de poliA por al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleótidos, o de 1-20, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3 o 1-2 nucleótidos.

[00209] En ciertas modalidades, un sitio de unión a microARN proporcionado en la presente da por resultado la expresión génica selectiva en una célula de PV en comparación con los tipos de células fuera de diana. En algunos casos, los tipos de células fuera de diana incluyen, pero no se limitan a, neuronas excitadoras tipos de células de CNS sin PV y tipos de células CNS no neuronales. En ciertas modalidades, los sitios de unión a microARN selectivo de PV dan como resultado la expresión génica selectiva en neuronas de PV en al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o más tipos de células de CNS de no PV. En algunos casos, una célula de CNSde no PV es una

neurona excitadora, una neurona dopaminérgica, un astrocito, una microglia, una neurona motora, una célula vascular o una neurona no GABAérgica (por ejemplo, una célula que no expresa uno o más de GAD2, GAD1, NKX2.1, DLX1, DLX5, SST y VIP), una neuronade no PV (por ejemplo, una neurona GABAérgica que no expresa parvalbumina) u otras células del CNS (por ejemplo, tipos de células del CNS que nunca han expresado ninguno de PV, GAD2, GAD1, NKX2.1, DLX1, DLX5, SST y VIP). En una modalidad de ejemplo, un sitio de unión de microARN selectivo de PV proporcionado en la presente da como resultado un aumento de selectividad en la expresión génica en neuronas de PV en comparación con neuronas excitadoras (por ejemplo, neuronas que expresan uno o más de STAC, Slc17a7, Car12, Syt17, ITPKA, Col6a1, CamKII, Sv2b, INHBA y/o DKK3) al disminuir la expresión en las neuronas excitadoras. En algunos casos, los tipos celulares se distinguen por tener un marcador, morfología, fenotipo, genotipo, función celular y/o cualquier otro medio diferente para clasificar tipos de células.

[00210] La selectividad de expresión activada por un sitio de unión de microARN selectivo de PV se puede medir de varias maneras. En una modalidad, la selectividad de la expresión génica en una célula de PV con respecto a célulasde no PV se puede medir al comparar el número de células de PV que expresan un nivel detectable de una transcripción de un gen

que contiene un sitio de unión de microARN selectivo de PV con la cantidad total de células que expresan el gen (por ejemplo, la relación de células de PV versus células totales (células de PV + no de PV) que expresan el gen). Por ejemplo, la selectividad para neuronas PV se puede determinar usando un ensayo de co-localización basado en inmunohistoquímica usando un casete de expresión que comprende un gen que codifica para una proteína fluorescente (por ejemplo, eGFP) y un sitio de unión a microARN selectivo de PV para medir la expresión génica y un anticuerpo que identifica células PV (por ejemplo, un anticuerpo anti-PV que interactúa específicamente con neuronas PV) unidas a una segunda marca de fluorescencia (por ejemplo, proteína fluorescente roja). La selectividad de expresión en células de PV se puede calcular al dividir el número de células que expresan tanto PV como eGFP (por ejemplo, células de PV) por el número total de células que expresan eGFP (por ejemplo, células de PV y células de no PV), y al multiplicar por 100 para convertir a un porcentaje. En otro ejemplo, la selectividad para neuronas PV se puede determinar usando un ensayo de co-localización basado en inmunohistoquímica usando un casete de expresión que comprende un gen que codifica para una proteína fluorescente (por ejemplo, eGFP) y un sitio de unión a microARN selectivo de PV para medir la expresión génica y un primer anticuerpo que identifica células PV (por ejemplo, un

anticuerpo anti-PV que interactúa específicamente con neuronas PV) unidas a una segunda marca de fluorescencia (por ejemplo, proteína fluorescente roja) y un segundo anticuerpo que identifica células excitatorias (por ejemplo, un anticuerpo anti-CamKII que interactúa específicamente con neuronas excitatorias). La selectividad de expresión en células de PV se puede calcular al dividir el número de células que expresan tanto PV como eGFP (por ejemplo, células de PV) por el número de células que expresan eGFP + PV y eGFP + CamKII (por ejemplo, células de PV y células excitadoras), y al multiplicar por 100 para convertir a un porcentaje. Mientras mas grande sea el porcentaje de células de PV que expresan el transgén, más selectivo será el sitio de unión de microARN para las células de PV. En ciertas modalidades, un sitio de unión a microARN selectivo de PV proporcionado en la presente puede ser altamente selectivo para la expresión en células de PV. Por ejemplo, un sitio de unión de microARN selectivo de PV proporcionado en la presente puede exhibir aproximadamente 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de aproximadamente 99% de selectividad para neuronas de PV (por ejemplo, neuronas de PV/células totales x 100 o neuronas de PV/neuronas excitatorias de PV + x 100).

[00211] En algunos casos, un sitio de unión de microARN selectivo de PV proporcionado en la presente es corto. En

algunos casos, el tamaño del sitio de unión de microARN selectivo de PV es compatible con la capacidad de clonación de un vector, por ejemplo, un vector viral o rAAV, de modo que el tamaño combinado de un transgén, un promotor (y potenciador opcional) y un sitio de unión de microARN no exceda la capacidad de clonación de un vector. En algunos casos, un sitio de unión de microARN selectivo de PV tiene una longitud de hasta aproximadamente 500 bp, 400 bp, 300 bp, 250 bp, 225 bp, 215 bp, 210 bp, 200 bp, 150 bp, 140 bp, 135 bp, 130 bp, 125 bp, 120 bp, 115 bp, 110 bp, 100 bp, 90 bp, 80 bp, 75 bp, 70 bp, 65 bp, 60 bp o 50 bp. En algunos casos, un sitio de unión de microARN selectivo de PV es de entre aproximadamente 50-500 bp, 50-400 bp, 50-300 bp, 50-250 bp, 50-200 bp, 50-100 bp, 50-75 bp, 50-70 bp, 100-500 bp, 100-400 bp, 100-300 bp, 100-250 bp, 100-200 bp, 100-150 bp, 100-140 bp, 100-135 bp, 200-500 bp, 200-400 bp, 200-300 bp o 200-250 bp.

[00212] En modalidades de ejemplo, un polinucleótido proporcionado en la presente que comprende uno o más sitios de unión a microARN selectivo de PV no comprende SEQ ID NO: 67.

Casetes de Expresión

[00213] En otro aspecto, la solicitud proporciona casetes de expresión que comprenden un polinucleótido proporcionado en la presente (por ejemplo, un polinucleótido que comprende una

secuencia que codifica para un eTF que favorece la expresión de SCN1A y/o contiene un sitio de unión de microARN selectivo de PV) y uno o más elementos reguladores. En ciertas modalidades, la solicitud proporciona casetes de expresión que comprenden un polinucleótido proporcionado en la presente (por ejemplo, un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica para un eTF que favorece la expresión de SCN1A y/o contiene un sitio de unión de microARN selectivo de PV) y un promotor selectivo de PV.

[00214] En ciertas modalidades, un polinucleótido proporcionado en la presente (por ejemplo, un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica para un eTF que favorece la expresión de SCN1A y/o contiene un sitio de unión de microARN selectivo de PV) es parte de un casete de expresión que comprende uno o más elementos reguladores además de la secuencia que codifica para el eTF. En modalidades de ejemplo, un polinucleótido proporcionado en la presente (por ejemplo, un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica para un eTF que regula por aumento SCN1A y/o contiene un sitio de unión de microARN selectivo de PV) es parte de un casete de expresión que comprende un promotor colocado ascendente a la secuencia de transgén para que sea capaz de activar la expresión del transgén (por ejemplo, un eTF que regula por aumento SCN1A) en una célula.

[00215] En ciertas modalidades, un casete de expresión

descrito en la presente comprende un polinucleótido proporcionado en la presente (por ejemplo, un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica para un eTF que regula por aumento SCN1A y/o contiene un sitio de unión de microARN selectivo de PV) y un promotor constitutivo colocado ascendente a la secuencia que codifica para el transgén para que sea capaz de activar la expresión del transgén (por ejemplo, un eTF que regula por aumento el SCN1A) en una célula. Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen, un promotor GAD2, un promotor de sinapsina humana, promotor CBA, un promotor CMV, un promotor minCMV, una caja TATA, un promotor super núcleo o un promotor EF1α, o una combinación de los mismos.

[00216] En ciertas modalidades, un casete de expresión descrito en la presente comprende un polinucleótido proporcionado en la presente (por ejemplo, un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica para un eTF que regula por aumento SCN1A y/o contiene un sitio de unión de microARN selectivo de PV) y un promotor corto capaz de impulsar la expresión del transgén (por ejemplo, un eTF que regula por aumento SCN1A) en una célula. En ciertas modalidades, un promotor corto adecuado para uso de acuerdo con las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente comprende menos de 500 pb, 450 pb, 400 pb, 350 pb, 300 pb, 250 pb, 225 pb, 200 pb, 175 pb, 150 pb, 145 pb, 140 pb, 135

pb, 130 pb, 125 pb, 120 pb, 115 pb, 110 pb, 105 pb, 100 pb, 95 pb, 90 pb, 85 pb, 80 pb o 75 pb, o de aproximadamente 80-300 pb, 80-275 pb, 80-250 pb, 80-200 pb, 80-150 pb, 80-125 pb, 80-120 pb, 80-115 pb, 80-110 pb, 80-105 pb, 80-100 pb, 85-300 pb, 85-275 pb, 85-250 pb, 85-200 pb, 85-150 pb, 85-125 pb, 85-120 pb, 85-115 pb, 85-110 pb, 85-105 pb, 85-100 pb, 90-300 pb, 90-275 pb, 90-250 pb, 90-200 pb, 90-150 pb, 90-125 pb, 90-120 pb, 90-115 pb, 90-110 pb, 90-105 pb, 90-100 pb, 95-300 pb, 95-275 pb, 95-250 pb, 95-200 pb, 95-150 pb, 95-125 pb, 95-120 pb, 95-115 pb, 95-110 pb, 95-105 pb, 95-100 pb, 100-300 pb, 100-275 pb, 100-250 pb, 100-200 pb, 100-150 pb, 100-125 pb, 100-120 pb, 100-115 pb, 100-110 pb o 100-105 pb. En modalidades de ejemplo, un promotor corto adecuado para uso de acuerdo con los casetes de expresión descritos en la presente comprende de aproximadamente 100-120 pb, aproximadamente 117 pb o aproximadamente 100 pb.

[00217] En ciertas modalidades, un casete de expresión descrito en la presente comprende un promotor corto que comprende o que consiste en cualquiera de (i) SEQ ID NO: 1; (ii) una variante o fragmento funcional de las mismas; o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii) unida de manera operativa a un polinucleótido que codifica para cualquiera de los eTF que

regulan por aumento selectivo SCN1A como se describe en la presente, y que contiene opcionalmente un sitio de unión a microARN como se describe en la presente. Otros ejemplos de secuencia promotora corta se pueden encontrar en la Publicación PCT No. WO 2018/213786.

[00218] En ciertas modalidades, un casete de expresión descrito en la presente comprende un polinucleótido proporcionado en la presente (por ejemplo, un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica para un eTF que regula por aumento SCN1A y/o contiene un sitio de unión de microARN selectivo de PV) y un promotor selectivo de tipo celular colocado ascendente a la secuencia que codifica para el transgén (por ejemplo, un eTF que regula por aumento el SCN1A) para que sea capaz de activar la expresión del transgén de forma selectiva en una célula de interés. En ciertas modalidades, un promotor selectivo tipo celular puede ser selectivo para (por ejemplo, activar de manera selectiva la expresión en) cualquier tipo de célula de interés, tal como, por ejemplo, una célula cardíaca, célula hepática, célula muscular, célula ósea, neurona o subpoblaciones de las mismas. En una modalidad de ejemplo, un casete de expresión descrito en la presente comprende un polinucleótido que codifica para un eTF que regula por aumento de manera selectiva SCN1A y un elemento regulador selectivo de PV (por ejemplo, un promotor, intensificador y/o promotor e

intensificador) colocado ascendente a la secuencia que codifica para el eTF para que sea capaz de activar la expresión del eTF de manera selectiva en una célula de PV, y opcionalmente un sitio de unión de microARN selectivo de PV. Un elemento regulador selectivo de PV se refiere a un elemento regulador que modula específicamente la expresión génica en una neurona de PV. En ciertas modalidades, los elementos reguladores selectivos de PV mejoran la expresión en una neurona de PV con respecto a uno o más diferentes tipos de células de SNC. En ciertas modalidades, un elemento regulador selectivo de PV suprime los procesos de transcripción y/o traducción en tipos de células fuera de diana.

[00219] En ciertas modalidades, un elemento regulador selectivo de PV proporcionado en la presente da por resultado la expresión génica selectiva en una célula de PV en comparación con los tipos de células fuera de diana. En algunos casos, los tipos de células fuera de diana incluyen, pero no se limitan a, neuronas excitadoras tipos de células de CNS sin PV y tipos de células CNS no neuronales. En ciertas modalidades, los elementos reguladores selectivos de PV dan como resultado la expresión génica selectiva en neuronas de PV en al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o más tipos de células de CNS de no PV. En algunos casos, una célula de CNSde no PV es una neurona excitadora, una neurona

dopaminérgica, un astrocito, una microglia, una neurona motora, una célula vascular o una neurona no GABAérgica (por ejemplo, una célula que no expresa uno o más de GAD2, GAD1, NKX2.1, DLX1, DLX5, SST y VIP), una neuronade no PV (por ejemplo, una neurona GABAérgica que no expresa parvalbumina) u otras células del CNS (por ejemplo, tipos de células del CNS que nunca han expresado ninguno de PV, GAD2, GAD1, NKX2.1, DLX1, DLX5, SST y VIP). En algunos casos, un elemento regulador selectivo de PV proporcionado en la presente da como resultado un aumento de selectividad en la expresión génica en neuronas de PV en comparación con células GABAérgicas de no PV. En algunos casos, los tipos celulares se distinguen por tener un marcador, morfología, fenotipo, genotipo, función celular y/o cualquier otro medio diferente para clasificar tipos de células.

[00220] La selectividad de expresión activada por un elemento regulador selectivo de PV se puede medir de varias maneras. En una modalidad, la selectividad de la expresión génica en una célula de PV con respecto a células no de PV se puede medir al comparar l número de células de PV que expresan un nivel detectable de una transcripción de un gen que está unido operativamente a un elemento regulador selectivo de PV con l número total de células que expresan el gen (por ejemplo, la relación de células de PV versus células totales (células de PV + de no PV) que expresan el gen). Por ejemplo,

la selectividad para neuronas PV se puede determinar usando un ensayo de co-localización basado en inmunohistoquímica usando un gen que codifica para una proteína fluorescente (por ejemplo, eGFP) unida operativamente a un elemento regulador selectivo de PV para medir la expresión génica y un anticuerpo que identifica células PV (por ejemplo, un anticuerpo anti-PV que interactúa específicamente con neuronas PV) unidas a una segunda marca de fluorescencia (por ejemplo, proteína fluorescente roja). La selectividad de expresión en células de PV se puede calcular al dividir el número de células que expresan tanto PV como eGFP (por ejemplo, células de PV) por el número total de células que expresan eGFP (por ejemplo, células de PV y células de no PV), y al multiplicar por 100 para convertir a un porcentaje. Mientras mas grande sea el porcentaje de células de PV que expresan el transgén, más selectivo será el elemento regulador para las células de PV. En ciertas modalidades, un elemento regulador selectivo de PV proporcionado en la presente puede ser altamente selectivo para la expresión en células de PV. Por ejemplo, un elemento regulador selectivo de PV proporcionado en la presente puede exhibir aproximadamente 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de aproximadamente 99% de selectividad para neuronas de PV (por ejemplo, neuronas de PV/células totales x 100).

[00221] En algunos casos, un elemento regulador selectivo de PV proporcionado en la presente es corto. En algunos casos, el tamaño del elemento regulador selectivo de PV es compatible con la capacidad de clonación de un vector, por ejemplo, un vector viral o rAAV, de modo que el tamaño combinado de un transgén y uno o más elementos reguladores selectivos de PV no exceda la capacidad de clonación de un vector. En algunos casos, un elemento regulador selectivo de PV tiene una longitud de hasta aproximadamente 22050 bp, 2000 bp, 1900 bp, 1800 bp, 1700 bp, 1600 bp, 1500 bp, 1400 bp, 1300 bp, 1200 bp, 1100 bp, 1000 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, o 100bp. En algunos casos, un elemento regulador selectivo de PV es de entre aproximadamente 500-600 bp, 500-700 bp, 500-800 bp, 500-900 bp, 500-1000 bp, 500-1500 bp, 500-2000 bp, o 500-2050bp.

[00222] En ciertas modalidades, un elemento regulador selectivo de PV proporcionado en la presente comprende o consiste de cualquiera de (i) SEQ ID NO: 2-4; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas; o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii). En algunos casos, un elemento regulador comprende cualquiera de SEQ ID NO: 2-4. Otros ejemplos de elementos reguladores selectivos de PV se

pueden encontrar en la Publicación PCT No. WO 2018/187363.

[00223] En modalidades de ejemplo, la solicitud proporciona casetes de expresión que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica para un eTF que regula por aumento selectivamente SCN1A bajo el control de un elemento regulador selectivo de PV. En ciertas modalidades, la solicitud proporciona casetes de expresión que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica para un eTF que regula por aumento selectivamente SCN1A que comprende un DBD que tiene cualquiera de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 77-98 bajo el control de un elemento regulador selectivo de PV que tiene cualquiera de SEQ ID NO: 2-4. En ciertas modalidades, la solicitud proporciona casetes de expresión que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica para un eTF que regula por aumento selectivamente SCN1A que comprende cualquiera de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 99-131, 205, 207, 209, 213, 217, 219, 221 o 223 bajo el control de un elemento regulador selectivo de PV que tiene cualquiera de SEQ ID NO: 2-4. En ciertas modalidades, la solicitud proporciona casetes de expresión que comprenden una secuencia de ácido nucleico que comprende cualquiera de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 67-73 bajo el control de un elemento regulador selectivo de PV que tiene cualquiera de SEQ ID NO: 2-4. En ciertas modalidades, la solicitud proporciona casetes de expresión que comprenden una secuencia de ácido nucleico

que codifica para un eTF que regula por aumento selectivamente SCN1A que comprende un DBD que tiene cualquiera de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 148-151 bajo el control de un elemento regulador selectivo de PV que tiene cualquiera de SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades, la solicitud proporciona casetes de expresión que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica para un eTF que regula por aumento selectivamente SCN1A que comprende cualquiera de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 99-131, 205, 207, 209, 213, 217, 219, 221 o 223 bajo el control de un elemento regulador selectivo de PV que tiene cualquiera de SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades, la solicitud proporciona casetes de expresión que comprenden una secuencia de ácido nucleico que comprende cualquiera de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 67-76 o 316 bajo el control de un elemento regulador selectivo de PV que tiene cualquiera de SEQ ID NO: 2.

[00224] En ciertas modalidades, la solicitud proporciona casetes de expresión que comprenden un sitio de unión de miroARN selectivo de PV y una secuencia promotora y/o potenciadora. Cualquiera de los promotores descritos en la presente se puede incluir en el casete de expresión. En una modalidad de ejemplo, un casete de expresión proporcionado en la presente comprende un sitio de unión de microARN selectivo de PV y un elemento regulador selectivo de PV. En ciertas

modalidades, un casete de expresión proporcionado en la presente comprende un sitio de unión de microARN selectivo de PV y un elemento regulador selectivo de PV que comprende (i) cualquiera de SEQ ID NO: 2-4; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas; o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii). En ciertas modalidades, un casete de expresión proporcionado en la presente comprende (1) un sitio de unión de microARN selectivo de PV que comprende (i) cualquiera de SEQ ID NO: 7, 14 o 15; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii), y (2) un elemento regulador selectivo de PV que comprende (i) cualquiera de las SEQ ID NO: 2-4; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii). En ciertas modalidades, un casete de expresión proporcionado en la presente comprende (1) un sitio de unión

de microARN selectivo de PV que comprende (i) SEQ ID NO: 7; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii), y (2) un elemento regulador selectivo de PV que comprende (i) SEQ ID NO: 2; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii). En una modalidad, un casete de expresión proporcionado en la presente comprende un sitio de unión a microARN que comprende SEQ ID NO: 7 y un elemento regulador selectivo de PV que comprende SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades, un polinucleótido proporcionado en la presente comprende (1) un sitio de unión de microARN selectivo de PV que comprende (i) SEQ ID NO: 14; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii), y (2) un elemento regulador selectivo de PV que comprende (i) SEQ ID NO: 2; (ii) una

variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii). En una modalidad, un casete de expresión proporcionado en la presente comprende un sitio de unión a microARN que comprende SEQ ID NO: 15 y un elemento regulador selectivo de PV que comprende SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades, un casete de expresión proporcionado en la presente comprende (1) un sitio de unión de microARN selectivo de PV que comprende (i) SEQ ID NO: 15; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii), y (2) un elemento regulador selectivo de PV que comprende (i) SEQ ID NO: 2; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii). En una modalidad, un casete de expresión proporcionado en la presente comprende un sitio de unión a microARN que comprende SEQ ID NO: 15 y un elemento regulador

selectivo de PV que comprende SEQ ID NO: 2.

[00225] En ciertas modalidades, un casete de expresión proporcionado en la presente comprende un sitio de unión de microARN selectivo de PV y una secuencia que codifica para un eTF que regula por aumento la expresión de SCN1A como se proporciona en la presente. En una modalidad de ejemplo, la solicitud proporciona un casete de expresión que comprende un elemento regulador selectivo de PV, un eTF que regula por aumento la expresión de SCN1A como se proporciona en la presente y un sitio de unión de miroARN selectivo de PV. En una modalidad de ejemplo, la solicitud proporciona un casete de expresión que comprende (1) un elemento regulador selectivo de PV que comprende (i) cualquiera de SEQ ID NO: 2-4; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii), (2) una secuencia que codifica para un eTF que regula por aumento SCN1A que comprende (i) cualquiera de las SEQ ID NO: 77-131, 205, 207, 209, 213, 217, 219, 221 o 223; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia

a cualquiera de (i) o (ii), y (3) un sitio de unión a microARN selectivo de PV que comprende (i) cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 14 o 15; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii). En otra modalidad de ejemplo, la solicitud proporciona un casete de expresión que comprende (1) un elemento regulador selectivo de PV que comprende (i) SEQ ID NO: 2; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii), (2) una secuencia que codifica para un eTF que regula por aumento SCN1A que comprende (i) cualquiera de las SEQ ID NO: 77 o 127; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii), y (3) un sitio de unión a microARN selectivo de PV que comprende (i) SEQ ID NO: 7; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una

secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii). En otra modalidad de ejemplo, la solicitud proporciona un casete de expresión que comprende (1) un elemento regulador selectivo de PV que comprende (i) SEQ ID NO: 2; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii), (2) una secuencia que codifica para un eTF que regula por aumento SCN1A que comprende (i) cualquiera de las SEQ ID NO: 77 o 127; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii), y (3) un sitio de unión a microARN selectivo de PV que comprende (i) SEQ ID NO: 14; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii). En otra modalidad de ejemplo, la

solicitud proporciona un casete de expresión que comprende (1) un elemento regulador selectivo de PV que comprende (i) SEQ ID NO: 2; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii), (2) una secuencia que codifica para un eTF que regula por aumento SCN1A que comprende (i) cualquiera de las SEQ ID NO: 77 o 127; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii), y (3) un sitio de unión a microARN selectivo de PV que comprende (i) SEQ ID NO: 15; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii). En otra modalidad de ejemplo, la solicitud proporciona un casete de expresión que comprende (1) un elemento regulador selectivo de PV que comprende (i) SEQ ID NO: 2; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de

ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii), (2) una secuencia que codifica para un eTF que regula por aumento SCN1A que comprende (i) cualquiera de las SEQ ID NO: 92 o 106; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii), y (3) un sitio de unión a microARN selectivo de PV que comprende (i) SEQ ID NO: 7; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii). En otra modalidad de ejemplo, la solicitud proporciona un casete de expresión que comprende (1) un elemento regulador selectivo de PV que comprende (i) SEQ ID NO: 2; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii), (2) una secuencia que codifica para un eTF que regula

por aumento SCN1A que comprende (i) cualquiera de las SEQ ID NO: 92 o 106; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii), y (3) un sitio de unión a microARN selectivo de PV que comprende (i) SEQ ID NO: 14; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii). En otra modalidad de ejemplo, la solicitud proporciona un casete de expresión que comprende (1) un elemento regulador selectivo de PV que comprende (i) SEQ ID NO: 2; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii), (2) una secuencia que codifica para un eTF que regula por aumento SCN1A que comprende (i) cualquiera de las SEQ ID NO: 92 o 106; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%,

85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii), y (3) un sitio de unión a microARN selectivo de PV que comprende (i) SEQ ID NO: 15; (ii) una variante, fragmento funcional o una combinación de las mismas de (i); o (iii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a cualquiera de (i) o (ii).

[00226] En ciertas modalidades, un casete de expresión proporcionado en la presente que comprende un elemento regulador selectivo de PV y un sitio de unión de microARN selectivo de PV es menor que 5 kb, 4.9 kb, 4.8 kb, 4.7 kb, 4.6 kb, 4.5 kb, 4.4 kb, 4.3 kb, 4.2 kb, 4.1 kb, 4.0 kb, 3.9 kb, 3.8 kb, 3.7 kb, 3.6 kb, 3.5 kb, 3.4 kb, 3.3 kb, 3.2 kb, 3.1 kb, 3.0 kb, 2.9 kb, 2.8 kb, 2.7 kb, 2.6 kb, 2.5 kb, 2.4 kb, 2.3 kb, 2.2 kb, 2.1 kb, 2.0 kb, 1.9 kb, 1.8 kb, 1.7 kb, 1.6 kb, o 1.5 kb o menos, o es de aproximadamente 1.5-5 kb, 1.5-4.7 kb, 1.5-4.5 kb, 1.5-4.0 kb, 1.5-3.5 kb, 1.5-3.0 kb, 1.5-2.5 kb, 1.5-2.0 de tamaño.

[00227] En ciertas modalidades, un casete de expresión proporcionado en la presente puede comprender uno más elementos reguladores adicionales en una adición a un promotor, tal como, por ejemplo, secuencias asociadas con iniciación o terminación de transcripción, secuencias

intensificadoras y señales de procesamiento de ARN eficientes. Los ejemplos de elementos reguladores incluyen, por ejemplo, un intrón, un intensificador, UTR, elemento de estabilidad, secuencia WPRE, una secuencia de consenso Kozak, elemento de respuesta postraduccional, un sitio de unión de microARN o una secuencia de poliadenilación (poliA), o una combinación de los mismos. Los elementos reguladores pueden funcionar para modular la expresión génica en la fase transcripcional, en la fase post-transcripcional o en la fase de traducción de la expresión génica. A nivel de ARN, la regulación puede presenntarse a nivel de traducción (por ejemplo, elementos de estabilidad que estabilizan el ARNm para la traducción), escisión de ARN, empalme de ARN y/o terminación transcripcional. En varias modalidades, los elementos reguladores pueden reclutar factores de transcripción a una región codificadora que aumentan la selectividad de expresión génica en un tipo celular de interés, aumentan la velocidad a la que se producen transcripciones de ARN, aumentan la estabilidad del ARN producido y/o aumentan la velocidad de síntesis de proteínas a partir de transcripciones de ARN. En una modalidad de ejemplo, un casete de expresión proporcionado en la presente comprende al menos un sitio de unión de microARN selectivo de PV como se proporciona en la presente.

[00228] En ciertas modalidades, los casetes de expresión

descritos en la presente comprenden además una secuencia poliA. Las secuencias poliA adecuadas incluyen, por ejemplo, una poliA artificial que es de aproximadamente 75 pb de longitud (PA75) (ver, por ejemplo, WO 2018/126116), la hormona de crecimiento bovina poliA, señal de poliA temprana SV40, señal de poliA tardía SV40, poliA de beta globina de conejo, poliA de timidina cinasa de HSV, poliA de gen de protamina, poliA de adenovirus 5 EIb, poliA de hormona de crecimiento o poliA de PBGD. En modalidades de ejemplo, una secuencia poliA adecuada para uso en los casetes de expresión proporcionados en la presente es una poliA de hGH (SEQ ID NO: 17) o una poliA sintética (SEQ ID NO: 16). Habitualmente, la secuencia poliA se coloca descendente al polinucleótido que codifica para el eTF en los casetes de expresión descritos en la presente.

[00229] En ciertas modalidades, los casetes de expresión proporcionados en la presente comprenden además una o más secuencias de ácido nucleico que codifican para una o más señales de localización nuclear (NLS). Se puede usar cualquier péptido NLS que facilita la importación de la proteína a la cual se une en el núcleo celular. Ejemplos de NLS incluyen, por ejemplo, la NLS de antígeno T grande de SV40, la NLS de nucleoplasmina, la NLS de EGL-13, la NLS de c-Myc y la NLS de proteína TUS. Ver, por ejemplo, C. Dingwall et al., J. Cell Biol. 107: 841-9 (1988); J.P. Makkerh et al.,

Curr Biol. 6: 1025-7 (1996); and M. Ray et al., Bioconjug. Chem. 26: 1004-7(2015). Las NLS se pueden ubicar en cualquier parte de la secuencia de proteína eTF, pero en modalidades preferidas se conjuga con el extremo N-terminal del eTF o un dominio del eTF. En modalidades de ejemplo, los casetes de ácido nucleico proporcionados en la presente codifican para un eTF con una NLS fusionada al extremo N-terminal del eTF. En otras modalidades, los casetes de ácido nucleico proporcionados en la presente codifican para un eTF con una primera NLS fusionada al extremo N-terminal del eTF y una segunda NLS ubicada entre el DBD y el dominio TAD del eTF.

Vectores de expresión

[00230] En ciertas modalidades, los casetes de expresión descritos en la presente se pueden incorporar en un vector de expresión. Se pueden usar vectores de expresión para administrar un casete de expresión a una célula diana mediante transfección o transducción. Un vector puede ser un vector integrante o no integrante, que se refiere a la capacidad del vector para integrar el casete de expresión o transgén en el genoma de la célula hospedadora. Ejemplos de vectores de expresión incluyen, pero no se limitan a, (a) vectores no virales tal como vectores de ácido nucleico que incluyen oligonucleótidos lineales y plásmidos circulares; cromosomas artificiales tal como cromosomas artificiales

humanos (HAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC) y cromosomas artificiales bacterianos (BAC o PAC); vectores episomales; transposones (por ejemplo, PiggyBac); y (b) vectores virales tal como vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores adenovirales y vectores virales adenoasociados.

[00231] Los vectores de expresión pueden ser oligonucleótidos lineales o plásmidos circulares y se pueden administrar a una célula mediante diferentes métodos de transfección, incluyendo métodos físicos y químicos. Los métodos físicos en general se refieren a métodos de administración que emplean una fuerza física para contrarrestar la barrera de membrana celular al facilitar la administración intracelular de material genético. Ejemplos de métodos físicos incluyen el uso de una aguja, ADN balístico, electroporación, sonoporación, fotoporación, magnetoinfección e hidroporación. Los métodos químicos en general se refieren a métodos en los cuales los portadores químicos administran una molécula de ácido nucleico a una célula y pueden incluir partículas inorgánicas, vectores basados en lípidos, vectores basados en polímeros y vectores basados en péptidos.

[00232] En algunas modalidades, se administra un vector de expresión a una célula diana usando un lípido catiónico (por ejemplo, liposoma catiónico). Se han investigado varios tipos de lípidos para administración génica, tal como, por ejemplo,

una nanoemulsión lipídica (por ejemplo, que es una dispersión de un líquido inmiscible en otro estabilizado por agente emulsionador) o una nanopartícula lipídica sólida.

[00233] En algunas modalidades, se administra un vector de expresión a una célula diana usando un vehículo de administración basado en péptido. Los vehículos de administración basados en péptidos pueden tener ventajas de proteger el material genético que se administrará, dirigirse a receptores celulares específicos, romper las membranas endosomales y administrar el material genético en un núcleo. En algunas modalidades, se administra un vector de expresión a una célula diana usando un vehículo de administración basado en polímero. Los vehículos de administración basados en polímeros pueden comprender proteínas naturales, péptidos y/o polisacáridos o polímeros sintéticos. En una modalidad, un vehículo de administración basado en polímero comprende polietilenimina (PEI). PEI puede condensar ADN en partículas positivamente cargadas que se unen a residuos de superficie celular aniónica y se ponen en la célula mediante endocitosis. En otras modalidades, un vehículo de administración basado en polímero puede comprender poli-L-lisina (PLL), poli- (ácido DL-láctico) (Pla), poli- (DL-lactido-co-glicósido) (PLGA), poliornitina, poliarginina, histonas, protaminas, dendrímeros, quitosanos, derivados amino sintéticos de dextrano y/o polímeros acrílicos

catiónicos. En ciertas modalidades, los vehículos de administración basados en polímero pueden comprender una mezcla de polímeros, tal como, por ejemplo, PEG y PLL.

[00234] En ciertas modalidades, un vector de expresión puede ser un vector viral adecuado para terapia génica. Las características preferidas de vectores de terapia génica viral o vectores de administración génica pueden incluir la capacidad de propagarse y purificarse de forma reproducible y estable hasta altos títulos; mediar la administración dirigida (por ejemplo, administrar el transgén específicamente al tejido u órgano de interés sin diseminación generalizada del vector en otra parte); y mediar la administración génica y la expresión transgénica sin inducir efectos secundarios perjudiciales.

[00235] Varios tipos de virus, por ejemplo, el parvovirus no patógeno al que se hace referencia como virus adenoasociado, se han diseñado para fines de terapia génica mediante el aprovechamiento de la vía de infección viral, pero evitando la posterior expresión de genes virales que pueden conducir a la replicación y toxicidad. Estos vectores virales se pueden obtener borrando todas, o algunas, de las regiones codificadoras del genoma viral, pero dejando intactas aquellas secuencias (por ejemplo, secuencias de repetición terminales) que pueden ser necesarias para funciones tal como empaquetar el genoma del vector en la cápside del virus o la

integración de ácido nucleico del vector (por ejemplo, ADN) en la cromatina hospedadora.

[00236] En varias modalidades, los vectores virales adecuados incluyen retrovirus (por ejemplo, virus de tipo A, tipo B, tipo C y tipo D), adenovirus, parvovirus (por ejemplo, virus adenoasociados o AAV), coronavirus, virus de ARN de cadena negativa tal como ortomixovirus (por ejemplo, virus de influenza), rabdovirus (por ejemplo, virus de la rabia y estomatitis vesicular), paramixovirus (por ejemplo, sarampión y Sendai), virus de ARN de hebra positiva tal como picornavirus y alfavirus, y virus de ADN de hebra doble que incluyen adenovirus, herpesvirus (por ejemplo, virus del herpes simple tipos 1 y 2, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus) y poxvirus (por ejemplo, vaccinia, viruela aviar y viruela del canario). Ejemplos de retrovirus incluyen virus de leucosis-sarcoma aviar, virus linfotrópico T humano tipo 1 (HTLV-1), virus de leucemia bovina (BLV), lentivirus y spumavirus. Otros virus incluyen, por ejemplo, virus Norwalk, togavirus, flavivirus, reovirus, papovavirus, hepadnavirus y virus de hepatitis. Los vectores virales se pueden clasificar en dos grupos de acuerdo con su capacidad para integrarse en el genoma hospedador – integrante y no integrante. Los oncoretrovirus y lentivirus se pueden integrar en la cromatina celular hospedadora, en tanto que los adenovirus, virus adenoasociados y virus de herpes persisten

predominantemente en el núcleo celular como episomas extracromosómicos.

[00237] En ciertas modalidades, un vector viral adecuado es un vector retroviral. Los retrovirus se refieren a virus de la familia Retroviridae. Los ejemplos de retrovirus incluyen oncoretrovirus, tal como virus de leucemia murina (MLV), y lentivirus, tal como virus de inmunodeficiencia humana 1 (HIV-1). Los genomas retrovirales son ARN de una sola hebra (ss) y comprenden diferentes genes que se pueden proporcionar en cis o trans. Por ejemplo, el genoma retroviral puede contener secuencias de acción cis tal como dos repeticiones terminales largas (LTR), con elementos para la expresión génica, transcripción inversa e integración en los cromosomas hospedadores. Otros componentes incluyen la señal de empaquetado (psi or ψ), para el empaquetado de ARN específico en viriones recién formados y el tracto de polipurina (PPT), el sitio de inicio de la síntesis de ADN de hebra positiva durante la transcripción inversa. Además, el genoma retroviral puede comprender los genes gag, pol y env. El gen gag codifica para las proteínas estructurales, el gen pol codifica para las enzimas que acompañan al ARNcs y realizan la transcripción inversa del ARN viral al ADN, y el gen env codifica para la envoltura viral. En general, el gag, pol y env se proporcionan en trans para replicación viral y empaquetado.

[00238] En ciertas modalidades, un vector retroviral proporcionado en la presente puede ser un vector lentiviral. Se reconocen al menos cinco serogrupos o serotipos de lentivirus. Los virus de los diferentes serotipos pueden infectar de manera diferencial ciertos tipos de células y/o hospedadores. Los lentivirus, por ejemplo, incluyen retrovirus primates y retrovirus no primates. Los retrovirus primates incluyen HIV y virus de inmunodeficiencia de simios (SIV). Los retrovirus no primates incluyen virus de inmunodeficiencia felina (FIV), virus de inmunodeficiencia bovina (BiV), virus de artritis-encefalitis caprina (CAEV), virus de anemia infecciosa equina (EIAV) y visnavirus. Los lentivirus o lentivectores pueden ser capaces de transducir células quiescentes. Como con los vectores oncoretrovirales, el diseño de lentivectores se puede basar en la separación de secuencias que actúa en cis y en trans.

[00239] En ciertas modalidades, la solicitud proporciona vectores de expresión que se han diseñado para suministrar por un vector retroviral terapéutico optimizado. El vector retroviral puede ser un lentivirus que comprende una LTR izquierda (5’); secuencias que ayudan al empaquetado y/o importación nuclear del virus; un promotor; opcionalmente uno o más elementos reguladores adicionales (tal como, por ejemplo, una secuencia intensificadora o poliA); opcionalmente un elemento de respuesta inversa lentiviral

(RRE); una construcción que comprende un elemento regulador selectivo de PV unido operativamente a una secuencia que codifica para un eTF; opcionalmente un aislante; y una LTR retroviral derecha (3').

[00240] En modalidades de ejemplo, un vector viral proporcionado en la presente es un virus adenoasociado (AAV). El AAV es un virus animal pequeño, de replicación defectuosa, sin envoltura, que infecta a humanos y a algunas otras especies de primates. No se sabe que AAV provoque enfermedad humana e induzca una respuesta inmunitaria leve. Los vectores de AAV también pueden infectar tanto células que se dividen como células inactivas sin integrarse en el genoma de la célula hospedadora.

[00241] El genoma AAV consiste en un ADN lineal de una hebra individual de ~ 4.7 kb de longitud. El genoma consiste en dos marcos de lectura abiertos (ORF) flanqueados por una secuencia de repetición terminal invertida (ITR) de aproximadamente 145 pb de longitud. La ITR consiste en una secuencia de nucleótidos en el extremo 5'(ITR 5') y una secuencia de nucleótidos ubicada en el extremo 3'(ITR 3') que contienen secuencias palindrómicas. Las ITR funcionan en cis al plegarse para formar estructuras de horquilla en forma de T mediante el emparejamiento complementario de bases que funcionan como cebadores durante el inicio de la replicación de ADN para la síntesis de la segunda hebra. Los dos marcos

de lectura abiertos codifican para los genes rep y cap que intervienen en la replicación y empaquetado del virión. En una modalidad de ejemplo, un vector AAV proporcionado en la presente no contiene los genes rep o cap. Estos genes se pueden proporcionar en trans para producir viriones como se describe adicionalmente a continuación.

[00242] En ciertas modalidades, un vector AAV puede incluir un ácido nucleico de relleno. En algunas modalidades, el ácido nucleico de relleno puede codificar para una proteína fluorescente verde o gen de resistencia a antibióticos tal como kanamicina o ampicilina. En ciertas modalidades, el ácido nucleico de relleno se puede ubicar fuera de las secuencias ITR (por ejemplo, en comparación con la secuencia de transgén eTF y secuencias reguladoras, que se ubican entre las secuencias ITR 5’ y 3’).

[00243] Existen varios serotipos de AAV, incluyendo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 y AAV13. Estos serotipos difieren en su tropismo, o en los tipos de células que infectan. Los AAV pueden comprender el genoma y cápside de múltiples serotipos (por ejemplo, pseudotipos). Por ejemplo, un AAV puede comprender el genoma de serotipo 2 (por ejemplo, ITR) empaquetado en la cápside del serotipo 5 o serotipo 9. Los pseudotipos pueden mejorar la eficiencia de la transducción, así como alterar el tropismo.

[00244] En algunos casos, se prefiere un serotipo de AAV que pueda cruzar la barrera hematoencefálica o infectar células del CNS. En algunos casos, se utiliza AAV9 o una variante del mismo para suministrar un casete de expresión de esta descripción, que comprende un elemento regulador selectivo de PV unido operativamente a un transgén que codifica para un eTF que regula por aumento selectivamente SCN1A. En algunos casos, se utiliza AAV9 o una variante del mismo para suministrar un casete de expresión de esta descripción, que comprende un sitio de unión de microARN selectivo de PV. En algunos casos, se utiliza AAV9 o una variante del mismo para suministrar un casete de expresión de esta descripción, que comprende un elemento regulador selectivo de PV unido operativamente a un transgén que codifica para un eTF que regula por aumento selectivamente SCN1A, y un sitio de unión de microARN selectivo de PV.

[00245] En modalidades de ejemplo, la solicitud proporciona vectores de expresión que se han diseñado para suministro por un AAV. El AAV puede ser cualquier serotipo, por ejemplo, AAV1, AAV2, AAV3, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV-DJ o un AAV quimérico, híbrido o variante. El AAV también puede ser un AAV auto-complementario (scAAV). En ciertas modalidades, un vector de expresión diseñado para suministro por un AAV comprende una ITR 5’y una ITR 3’. En ciertas modalidades, un vector de expresión

diseñado para suministro por un AAV comprende una ITR 5', un promotor, un transgén que codifica para un eTF y una ITR 3'. En ciertas modalidades, un vector de expresión diseñado para sumiistro por un AAV comprende un ITR 5', un intensificador, un promotor, un transgén que codifica para un eTF, una secuencia de poliA y una ITR 3'.

Células Hospedadoras

[00246] En otro aspecto, la invención se refiere a una célula hospedadora que comprende un casete de expresión o vector de expresión como se describe en la presente. Las células hospedadoras pueden ser una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula de insecto o una célula de mamífero. En una modalidad de ejemplo, una célula hospedadora se refiere a cualquier línea celular que es susceptible a infección por un virus de interés y tratable para cultivar *in vitro*.

[00247] En ciertas modalidades, una célula hospedadora proporcionada en la presente se puede usar para propósitos de terapia génica *ex vivo*. En estas modalidades, las células se transfectan con una molécula de ácido nucleico o vector de expresión que comprende un sitio de unión de microARN selectivo de PV y/o una secuencia que codifica para un eTF que favorece selectivamente la expresión de SCN1A como se describe en la presente y posteriormente se trasplantan al paciente o sujeto. Las células trasplantadas pueden tener un origen autólogo, alogénico o heterólogo. Para uso clínico, el

aislamiento celular en general se llevará a cabo bajo condiciones de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP). Habitualmente. antes del trasplante, se comprueban la calidad celular y ausencia de contaminantes microbianos u otros contaminantes y se puede llevar a cabo un preacondicionamiento, tal como con radiación y/o un tratamiento inmunosupresor. Adicionalmente, las células hospedadoras se pueden trasplantar conjuntamente con factores de crecimiento para estimular la proliferación y/o diferenciación celular.

[00248] En ciertas modalidades, una célula hospedadora se puede usar para terapia génica *ex vivo*. Preferentemente, estas células son células eucariotas tal como células de mamífero, estas incluyen, pero no se limitan a, humanos, primates no humanos tal como simios; chimpancés; monos y orangutanes, animales domésticos, incluyendo perros y gatos, así como ganado tal como caballos, ganado vacuno, cerdos, ovejas y cabras, u otras especies de mamíferos incluyendo, pero no limitado a, ratones, ratas, conejillos de indias, conejos, hámsters y similares. Un experto en la técnica elegirá las células más apropiadas de acuerdo con el paciente o sujeto a trasplantar.

[00249] En ciertas modalidades, una célula hospedadora proporcionada en la presente puede ser una célula con propiedades de autorrenovación y pluripotencia, tal como

células madre o células madre pluripotentes inducidas. Las células madre son preferentemente células madre mesenquimales. Las células madre mesenquimales (MSC) son capaces de diferenciarse en al menos uno de un osteoblasto, un condrocito, un adipocito o un miocito y se pueden aislar de cualquier tipo de tejido. En general, las MSC se aislarán de la médula ósea, tejido adiposo, cordón umbilical o sangre periférica. Los métodos para obtener lo mismo son bien conocidos por un experto en la técnica. Las células madre pluripotentes inducidas (también conocidas como células iPS o iPSC) son un tipo de célula madre pluripotente que se puede generar directamente a partir de células adultas. Yamanaka et al. indujeron células iPS al transferir los genes Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc en fibroblastos de ratón y humanos, y forzando a las células a expresar los genes (WO 2007/069666). Thomson et al. produjeron posteriormente células iPS humanas usando Nanog y Lin28 en lugar de Klf4 y c-Myc (WO 2008/118820).

[00250] En una modalidad de ejemplo, una célula hospedadora proporcionada en la presente es una célula de empaquetado. Estas células pueden ser células adherentes o en suspensión. La célula empaquetadora y vector auxiliar o virus o construcciones de ADN proporcionan conjuntamente en trans todas las funciones ausentes que son necesarias para la replicación y empaquetado completos del vector viral.

[00251] Preferentemente, estas células de empaquetado son células eucariotas tal como células de mamífero, incluyendo células de simio, humano, perro y roedor. Los ejemplos de células humanas son células PER.C6 (WO01/38362), MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), células HEK-293 (ATCC CRL-1573), células HeLa (ATCC CCL2) y células pulmonares fetales de rhesus (ATCC CL-160). Ejemplos de células de primates no humanos son células Vero (ATCC CCL81), células COS-1 (ATCC CRL-1650) o células COS-7 (ATCC CRL-1651). Ejemplos de células de perro son células MDCK (ATCC CCL-34). Ejemplos de células de roedor son células de hámster, tal como células BHK21-F, HKCC o células CHO.

[00252] Como alternativa a las fuentes mamíferas, las líneas celulares para uso en la invención se pueden derivar de fuentes aviares tal como pollo, pato, ganso, codorniz o faisán. Los ejemplos de líneas celulares de aves incluyen células madre embrionarias de aves (WO01/85938 y WO03/076601), células de retina de pato inmortalizadas (WO2005/042728) y células derivadas de células madre embrionarias de aves, incluyendo células de pollo (WO2006/108846) o células de pato, tal como la línea celular EB66 (WO2008/129058 y WO2008/142124).

[00253] En otra modalidad, esta célula hospedadora son células insectiles, tal como células SF9 (ATCC CRL-1711), células Sf21 (IPLB-Sf21), células MG1 (BTI-TN-MG1) o células

High Five™ (BTI-TN-5B1-4).

[00254] En ciertas modalidades, las células hospedadoras proporcionadas en la presente que comprenden el vector/genoma de AAV recombinante de la invención (por ejemplo, que comprende un sitio de unión de microARN selectivo de PV y/o una secuencia que codifica un eTF que regula por aumento selectivo SCN1A) pueden comprender además una o más construcciones de ácido nucleico adicionales, tal como, por ejemplo (i) una construcción de ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido auxiliar de AAV) que codifica genes de rep y cap, pero no lleva secuencias de ITR; y/o (ii) una construcción de ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido) que proporciona las funciones adenovirales necesarias para la replicación de AAV. En una modalidad de ejemplo, una célula hospedadora proporcionada en la presente comprende: i) un vector de expresión que comprende un sitio de unión de microARN selectivo de PV y/o una secuencia que codifica para un eTF que regula por aumento selectivo SCN1A como se proporciona en la presente (es decir, el genoma de AAV recombinante); ii) una construcción de ácido nucleico que codifica para genes rep y cap de AAV que no porta las secuencias de ITR; y iii) una construcción de ácido nucleico que comprende genes auxiliares adenovirales (como se describe adicionalmente más adelante).

[00255] En ciertas modalidades, los genes adenovirales

auxiliares y rep, cap se pueden combinar en un plásmido individual (Blouin V et al. J Gene Med. 2004; 6(suppl): S223-S228; Grimm D. et al. Hum. Gene Ther. 2003; 7: 839-850). Por lo tanto, en otra modalidad de ejemplo, una célula hospedadora proporcionada en la presente comprende: i) un vector de expresión que comprende un sitio de unión de microARN selectivo de PV y/o una secuencia que codifica para un eTF que regula por aumento selectivo SCN1A tal como se describe en la presente (es decir, el genoma de AAV recombinante); y ii) un plásmido que codifica para genes rep y cap de AAV que no porta las secuencias de ITR y que comprende además genes auxiliares adenovirales.

[00256] En otra modalidad, una célula hospedadora proporcionada en la presente comprende: a) un vector de expresión que comprende un sitio de unión de microARN selectivo de PV y/o una secuencia que codifica para un eTF que regula por aumento selectivamente SCN1A como se describe en la presente (es decir, el genoma de AAV recombinante); b) un plásmido que codifica para genes rep y cap de AAV que no porta las secuencias de ITR; y c) un plásmido que comprende genes auxiliares adenovirales E2a, E4 y ARN VA; en donde la cotransfección se realiza en células, preferentemente células de mamífero, que expresan y transcompletan constitutivamente el gen E1 adenoviral, como células HEK-293 (ATCC CRL-1573).

[00257] En ciertas modalidades, una célula hospedadora

adecuada para la producción a gran escala de vectores AAV es una célula insectil que se puede infectar con una combinación de baculovirus recombinantes (Urabe et al. Hum. Gene Ther. 2002; 13: 1935-1943). Por ejemplo, las células SF9 se pueden coinfectar con tres vectores de baculovirus que expresan respectivamente AAV rep, AAV cap y el vector AAV a empaquetar. Los vectores de baculovirus recombinantes proporcionarán las funciones génicas auxiliares virales necesarias para la replicación y/o empaquetado del virus.

[00258] Se puede encontrar una guía adicional para la construcción y producción de viriones para terapia génica de acuerdo con la invención en: Viral Vectors for Gene Therapy, Methods and Protocols. Serie: Methods in Molecular Biology, Vol. 737. Merten y Al-Rubeai (Eds.); 2011 Humana Press (Springer); Gene Therapy. M. Giacca. 2010 Springer-Verlag; Heilbronn R. y Weger S. Viral Vectors for Gene Transfer: Current Status of Gene Therapeutics. En: Drug Delivery, Handbook of Experimental Pharmacology 197; M. Schafer-Korting (Ed.). 2010 Springer-Verlag; pp. 143-170; Adeno-Associated Virus: Methods and Protocols. R. O. Snyder y P. Moulllier (Eds). 2011 Humana Press (Springer); Bunning H. et al. Recent developments in adeno-associated virus technology. J. Gene Med. 2008; 10:717-733; y Adenovirus: Methods and Protocols. M. Chillon y A. Bosch (Eds.); Third. Edition. 2014 Humana Press (Springer).

Viriones y métodos para producir Viriones

[00259] En ciertas modalidades, la solicitud proporciona partículas virales que comprenden un vector viral que comprende un sitio de unión de microARN selectivo de PV y/o una secuencia que codifica para un eTF que regula por aumento selectivo SCN1A como se describe en la presente. Los términos "partícula viral" y "virión" se usan en la presente indistintamente y se refieren a una partícula de virus infecciosa y habitualmente defectuosa de replicación que comprende el genoma viral (por ejemplo, el vector de expresión viral) empaquetado dentro de una cápside y, como sea el caso, por ejemplo, para retrovirus, una envoltura lipídica que circunda la cápside. Una "cápside" se refiere a la estructura en la cual se empaqueta el genoma viral. Una cápside consiste en varias subunidades estructurales oligoméricas elaboradas de proteínas. Por ejemplo, AAV tiene una cápside icosaédrica formada por la interacción de tres proteínas cápside: VP1, VP2 y VP3. En una modalidad, un virión proporcionado en la presente es un virión AAV recombinante o virión rAAV obtenido al empaquetar un vector AAV que comprende un elemento regulador selectivo de PV y un sitio de unión de microARN selectivo de PV. En otra modalidad, un virión proporcionado en la presente es un virión AAV recombinante o virión rAAV obtenido al envasar un vector AAV que comprende un elemento regulador selectivo de

PV unido de manera operativa a una secuencia que codifica para un eTF que regula por aumento selectivo SCN1A como se describe en la presente en una cubierta de proteína. En otra modalidad, un virión proporcionado en la presente es un virión AAV recombinante o virión rAAV obtenido al empaquetar un vector AAV que comprende un elemento regulador selectivo de PV unido de manera operativa a una secuencia que codifica para un eTF que regula por aumento selectivo SCN1A como se describe en la presente y un sitio de unión de microARN selectivo de PV en una cubierta de proteína.

[00260] En ciertas modalidades, un virus AAV recombinante proporcionado en la presente se puede preparar al encapsular un genoma AAV derivado de un serotipo AAV particular en una partícula viral formada por proteínas Cap naturales que corresponden a un AAV del mismo serotipo particular. En otras modalidades, una partícula viral AAV proporcionada en la presente comprende un vector viral que comprende ITR de un serotipo AAV dado envasado en proteínas de un serotipo diferente. Ver, por ejemplo, Bunning H et al. J Gene Med 2008; 10: 717-733. Por ejemplo, un vector viral que tiene las ITR de un serotipo AAV dado se puede empaquetar en: a) una partícula viral constituida por proteínas cápside derivadas de un serotipo AAV igual o diferente (por ejemplo, ITR AAV2 y proteínas cápside AAV9; ITR AAV2 y proteínas cápside AAV8; etc.); b) una partícula viral mosaica constituida por una

mezcla de proteínas cápside de serotipos AAV diferentes o mutantes (por ejemplo, ITR AAV2 con proteínas cápside AAV1 y AAV9); c) una partícula viral quimérica constituida por proteínas cápside que se han truncado mediante intercambio de dominio entre diferentes serotipos AAV o variantes (por ejemplo, ITR AAV2 con proteínas cápside AAV8 con dominios AAV9); o d) una partícula viral dirigida modificada para mostrar dominios de unión selectivos, lo que permite una interacción rigurosa con receptores específicos de células diana (por ejemplo, ITR AAV5 con proteínas cápside AAV9 truncadas genéticamente mediante inserción de un ligando peptídico; o proteínas cápside AAV9 no modificadas genéticamente al acoplar un ligando peptídico a la superficie de cáspide).

[00261] El experto en la técnica apreciará que un virus AAV proporcionado en la presente puede comprender proteínas cápside de cualquier serotipo AAV. En una modalidad, la partícula viral comprende proteínas cápside de un serotipo AAV seleccionado del grupo que consiste de un AAV1, un AAV2, un AAV5, un AAV8 y un AAV9, que son más adecuados para la administración al CNS (M. Hocquemiller et al., Hum Gene Ther 27(7): 478-496 (2016)). En una modalidad particular, la partícula viral comprende un casete de expresión de la invención en donde las secuencias 5'ITR y 3'ITR del casete de expresión son de un serotipo AAV2 y las proteínas cápside son

de un serotipo AAV9.

[00262] Se conocen numerosos métodos en la técnica para la producción de viriones de rAAV, que incluyen transfección, producción de líneas celulares estables y sistemas de producción de virus híbridos infecciosos que incluyen híbridos de adenovirus AV, híbridos de herpesvirus AV (Conway, J E et ál., (1997) J. Virology 71(11): 8780-8789) e híbridos de baculovirus AV. Todos los cultivos de producción de rAAV para la producción de partículas de virus de rAAV requieren; 1) células hospedadoras adecuadas, que incluyen, por ejemplo, líneas celulares derivadas de seres humanos tal como células HeLa, A549 o 293, o líneas celulares derivadas de insectos tal como SF-9, en el caso de sistemas de producción de baculovirus; 2) función de virus auxiliar adecuada, proporcionada por adenovirus mutante o tipo silvestre (tal como adenovirus sensible a la temperatura), virus de herpes, baculovirus o una construcción de plásmido que proporciona funciones auxiliares; 3) genes rep y cap de AAV y productos génicos; 4) un transgén (por ejemplo, que comprende uno o más de: un sitio de unión de microARN selectivo de PV, una secuencia que codifica un eTF que regula positivamente SCN1A como se describe en la presente, y/o un promotor selectivo de PV) flanqueado por secuencias ITR de AAV; y 5) medios y componentes de medios adecuados para respaldar la producción de rAAV.

[00263] En varias modalidades, las células hospedadoras descritas en la presente comprenden los siguientes tres componentes: (1) un gen rep y un gen cap, (2) genes que proporcionan funciones auxiliares y (3) un transgén (por ejemplo, que comprende uno o más de: un sitio de unión de microARN selectivo de PV, una secuencia que codifica para un eTF que regula por aumento selectivamente SCN1A como se describe en la presente y/o un promotor selectivo de PV) flanqueado por las ITR. El gen rep de AAV, gen cap de AAV y genes que proporcionan funciones auxiliares se pueden introducir en la célula al incorporar estos genes en un vector tal como, por ejemplo, un plásmido y al introducir este vector en la célula hospedadora. Los genes de función rep, cap y auxiliar se pueden incorporar en el mismo plásmido o en diferentes plásmidos. En una modalidad preferida, los genes rep y cap de AAV se incorporan en un plásmido y los genes que proporcionan funciones auxiliares se incorporan en otro plásmido. Los varios plásmidos para la creación de una célula hospedadora para la producción de viriones (por ejemplo, que comprenden genes rep y cap de AAV, funciones auxiliares o un transgén) se pueden introducir en la célula mediante al usar cualquier método adecuado bien conocido en la técnica. Los ejemplos de métodos de transfección incluyen, pero no se limitan a, co-precipitación con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, polibreno, electroporación, microinyección,

fusión mediada por liposomas, lipofección, infección por retrovirus y transfección biológica. En ciertas modalidades, los plásmidos que proporcionan los genes rep y cap, las funciones auxiliares y el transgén flanqueado por las ITR se pueden introducir en la célula simultáneamente. En otra modalidad, los plásmidos que proporcionan los genes rep y cap y las funciones auxiliares se pueden introducir en la célula antes o después de la introducción del plásmido que comprende el transgén. En una modalidad de ejemplo, las células se transfectan simultáneamente con tres plásmidos (por ejemplo, un método de triple transfección): (1) un plásmido que comprende el transgén (por ejemplo, que comprende uno o más de: un sitio de unión de microARN selectivo de PV, una secuencia que codifica para un eTF que regula por aumento selectivamente SCN1A como se describe en la presente y/o un promotor selectivo de PV) flanqueado por las ITR, (2) un plásmido que comprende los genes rep y cap de AAV y (3) un plásmido que comprende los genes que proporcionan las funciones auxiliares. Los ejemplos de células hospedadoras pueden ser células 293, A549 o HeLa.

[00264] En otras modalidades, uno o más de (1) los genes rep y cap de AAV, (2) genes que proporcionan funciones auxiliares y (3) el transgén (por ejemplo, que comprende uno o más de: un sitio de unión de microARN selectivo de PV, una secuencia que codifica para un eTF que regula por aumento

selectivamente SCN1A como se describe en la presente y/o un promotor selectivo de PV) flanqueado por las ITR, pueden ser portados por la célula de empaquetado, ya sea episómicamente y/o integrados en el genoma de la célula de empaquetado. En una modalidad, las células hospedadoras pueden ser células de empaquetado en las que los genes rep y cap de AAV y las funciones auxiliares se mantienen establemente en la célula hospedadora y la célula hospedadora se transfecta transitoriamente con un plásmido que contiene un transgén (por ejemplo, que comprende uno o más de: un sitio de unión de microARN selectivo de PV, una secuencia que codifica para un eTF que regula por aumento selectivamente SCN1A como se describe en la presente y/o un promotor selectivo de PV) flanqueado por las ITR. En otra modalidad, las células hospedadoras son células de empaquetado en las que los genes rep y cap de AAV se mantienen establemente en la célula hospedadora y la célula hospedadora se transfecta transitoriamente con un plásmido que contiene un transgén (por ejemplo, que comprende uno o más de: un sitio de unión de microARN selectivo de PV, una secuencia que codifica para un eTF que regula por aumento selectivamente SCN1A como se describe en la presente y/o un promotor selectivo de PV) flanqueado por las ITR y un plásmido que contiene las funciones auxiliares. En otra modalidad, las células hospedadoras pueden ser células de empaquetado en las que las

funciones auxiliares se mantienen establemente en la célula hospedadora y la célula hospedadora se transfecta transitoriamente con un plásmido que contiene un transgén (por ejemplo, que comprende uno o más de: un sitio de unión de microARN selectivo de PV, una secuencia que codifica para un eTF que regula por aumento selectivamente SCN1A como se describe en la presente y/o un promotor selectivo de PV) flanqueado por las ITR y un plásmido que contiene los genes rep y cap. En otra modalidad, las células hospedadoras pueden ser líneas celulares productoras que se transfectan establemente con los genes rep y cap, funciones auxiliares y la secuencia de transgén (por ejemplo, que comprende uno o más de: un sitio de unión de microARN selectivo de PV, una secuencia que codifica para un eTF que regula por aumento selectivamente SCN1A como se describe en la presente y/o un promotor selectivo de PV) flanqueado por las ITR. Los ejemplos de células productoras y de empaquetado pueden derivar de células 293, A549 o HeLa.

[00265] En otra modalidad, la línea de células productoras es una línea de células insectiles (habitualmente células Sf9) que se infecta con vectores de expresión de baculovirus que proporcionan proteínas Rep y Cap. Este sistema no requiere genes auxiliares de adenovirus (Ayuso E, et al., Curr. Gene Ther. 2010, 10:423-436).

[00266] El término “proteína cap”, como se usa en la

presente, se refiere a un polipéptido que tiene al menos una actividad funcional de una proteína Cap de AAV nativa (por ejemplo, VP1, VP2, VP3). Los ejemplos de actividades funcionales de proteínas cap incluyen la capacidad de inducir la formación de una cápside, facilitar la acumulación de ADN monocatenario, facilitar el empaquetado de ADN de AAV en cápsides (es decir, encapsidación), unirse a receptores celulares y facilitar la entrada del virión en células hospedadoras. En principio, se puede usar cualquier proteína Cap en el contexto de la presente invención.

[00267] Se ha reportado que las proteínas cap tienen efectos en el tropismo del hospedador, la especificidad celular, tisular u orgánica, el uso del receptor, la eficiencia de infección e inmunogenicidad de virus AAV. Por consiguiente, un cap de AAV para uso en un rAAV se puede seleccionar teniendo en cuenta, por ejemplo, la especie del sujeto (por ejemplo, humano o no humano), el estado inmunológico del sujeto, la idoneidad del sujeto para el tratamiento a largo o corto plazo, o una aplicación terapéutica particular (por ejemplo, tratamiento de una enfermedad o trastorno particular, o suministro a células, tejidos u órganos particulares). En ciertas modalidades, la proteína cap se deriva del AAV del grupo que consiste de serotipos AAV1, AAV2, AAV5, AAV8 y AAV9. En una modalidad de ejemplo, la proteína cap se deriva de AAV9.

[00268] En algunas modalidades, una Cap de AAV para uso en el método de la invención se puede generar por mutagénesis (es decir, por inserciones, deleciones o sustituciones) de una de las cap de AAV mencionadas anteriormente o su ácido nucleico codificador. En algunas modalidades, la cap de AAV es al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% o más similar a una o más de las cap de AAV mencionadas anteriormente.

[00269] En algunas modalidades, la cap de AAV es quimérica, que comprende dominios de dos, tres, cuatro o más de las cap de AAV mencionadas anteriormente. En algunas modalidades, la cap de AAV es un mosaico de monómeros VP1, VP2 y VP3 que se originan de dos o tres AAV diferentes o un AAV recombinante. En algunas modalidades, una composición de rAAV comprende más de una de las cap mencionadas anteriormente.

[00270] En algunas modalidades, una cap de AAV para uso en un virión rAAV se modifica para contener una secuencia heteróloga u otra modificación. Por ejemplo, una secuencia de péptidos o proteínas que confiere direccionamiento selectivo o evasión inmunitaria se puede modificar en una proteína cap. De manera alternativa o adicional, la cap se puede modificar químicamente de modo que la superficie del rAAV esté polietilenglicolada (es decir, pegilada), que puede facilitar la evasión inmunitaria. La proteína cap también se puede mutagenizar (por ejemplo, para retirar su unión natural al receptor o para enmascarar un epítopo inmunogénico).

[00271] El término "proteína rep", como se usa en la presente, se refiere a un polipéptido que tiene al menos una actividad funcional de una proteína rep de AAV nativa (por ejemplo, rep 40, 52, 68, 78). Los ejemplos de actividades funcionales de una proteína rep incluyen cualquier actividad asociada con la función fisiológica de la proteína, incluyendo facilitar la replicación del ADN a través del reconocimiento, unión y corte del origen AAV de replicación del ADN, así como la actividad de ADN-helicasa. Las funciones adicionales incluyen la modulación de la transcripción de promotores de AAV (u otros heterólogos) y la integración específica del sitio del ADN de AAV en un cromosoma hospedador. En una modalidad particular, los genes rep de AAV pueden ser de los serotipos AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 o AAVrh10; más preferentemente de un serotipo de AAV seleccionado del grupo que consiste de AAV1, AAV2, AAV5, AAV8 y AAV9.

[00272] En algunas modalidades, una proteína rep de AAV para uso en el método de la invención se puede generar por mutagénesis (es decir, por inserciones, deleciones o sustituciones) de una de las rep de AAV mencionadas anteriormente o su ácido nucleico codificador. En algunas modalidades, la rep de AAV es al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% o más similar a una o más de las rep de AAV mencionadas anteriormente.

[00273] Las expresiones "funciones auxiliares" o "genes auxiliares", como se usan en la presente, se refieren a proteínas virales de las cuales el AAV depende para la replicación. Las funciones auxiliares incluyen aquellas proteínas necesarias para la replicación de AAV que incluyen, sin limitación, aquellas proteínas implicadas en la activación de la transcripción génica de AAV, empalme de ARNm de AAV específico de etapa, replicación de ADN de AAV, síntesis de productos de expresión de cap y montaje de cápside de AAV. Las funciones accesorias basadas en virus se pueden derivar de cualquiera de los virus auxiliares conocidos, tal como adenovirus, herpesvirus (distinto del virus de herpes simple tipo 1) y virus de vaccinia. Las funciones auxiliares incluyen, sin limitación, adenovirus E1, E2a, VA y E4 o herpesvirus UL5, ULB, UL52 y UL29, y polimerasa de herpesvirus. En una modalidad preferida, las proteínas de las cuales el AAV depende para la replicación se derivan de adenovirus.

[00274] En algunas modalidades, una proteína viral de la cual el AAV depende para la replicación para uso en el método de la invención se puede generar por mutagénesis (es decir, por inserciones, deleciones o sustituciones) de una de las proteínas virales mencionadas anteriormente o su ácido nucleico codificador. En algunas modalidades, la proteína viral es al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% o

más similar a una o más de las proteínas virales mencionadas anteriormente.

[00275] Los métodos para evaluar las funciones de las proteínas cap, proteínas rep y proteínas virales de las cuales el AAV depende para la replicación son bien conocidos en la técnica.

[00276] Las células hospedadoras para expresar un transgén de interés (por ejemplo, que comprende uno o más de: un sitio de unión de microARN selectivo de PV, una secuencia que codifica para un eTF que regula por aumento selectivamente SCN1A como se describe en la presente y/o un promotor selectivo de PV) se pueden cultivar en condiciones adecuadas para el montaje de los viriones de AAV. En ciertas modalidades, las células hospedadoras se cultivan durante un período de tiempo adecuado para promover el montaje de los virus AAV y la liberación de los virus en el medio. En general, las células se pueden cultivar durante aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días o hasta aproximadamente 10 días. Después de aproximadamente 10 días (o antes, dependiendo de las condiciones de cultivo y la célula hospedadora particular usada), el nivel de producción en general disminuye

significativamente. En general, el tiempo de cultivo se mide del punto de producción viral. Por ejemplo, en el caso de AAV, la producción viral en general comienza al suministrar la función del virus auxiliar en una célula hospedadora adecuada como se describe en la presente. En general, las células se recolectan aproximadamente 48 a aproximadamente 100, preferentemente aproximadamente 48 a aproximadamente 96, preferentemente aproximadamente 72 a aproximadamente 96, preferentemente aproximadamente 68 a aproximadamente 72 horas después de la infección por el virus auxiliar (o después de que comienza la producción viral).

[00277] Los cultivos de producción de rAAV se pueden hacer crecer en una variedad de condiciones (en un amplio intervalo de temperatura, durante diferentes períodos de tiempo y similares) adecuadas para la célula hospedadora particular que se utiliza. Los cultivos de producción de rAAV incluyen cultivos dependientes de la unión que se pueden cultivar en recipientes dependientes de la unión adecuados tal como, por ejemplo, botellas de rodillo, filtros de fibra hueca, microportadores y biorreactores de lecho empaquetado o lecho fluidizado. Los cultivos de producción del vector rAAV también pueden incluir células hospedadoras adaptadas a la suspensión tal como células HeLa, 293 y SF-9 que se pueden cultivar en una variedad de maneras que incluyen, por ejemplo, matraces giratorios, biorreactores de tanque agitado

y sistemas desechables tal como el sistema de bolsa Wave.

[00278] Se pueden usar medios adecuados conocidos en la técnica para la producción de viriones de rAAV. Estos medios incluyen, sin limitación, medios producidos por Hyclone Laboratories y JRH que incluyen medio Eagle modificado (MEM), medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), cada uno de los cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. En ciertas modalidades, los medios de cultivo de producción de rAAV se pueden complementar con proteínas recombinantes de suero o derivadas de suero a un nivel de 0.5%-20% (v/v o p/v). De manera alternativa, los vectores de rAAV se pueden producir en condiciones libres de suero que también se pueden referir como medios sin productos derivados de animales.

[00279] Después de cultivar las células hospedadoras para permitir la producción de viriones de AAV, los viriones resultantes se pueden recolectar y purificar. En ciertas modalidades, los virus AAV se pueden obtener de (1) las células hospedadoras del cultivo de producción mediante lisis de las células hospedadoras y/o (2) el medio de cultivo de estas células después de un período de tiempo posterior a la transfección, preferentemente 72 horas. Los viriones de rAAV se pueden recolectar del medio agotado del cultivo de producción, siempre que las células se cultiven bajo condiciones que provoquen la liberación de los viriones de

rAAV en el medio a partir de células intactas (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 6,566,118). Los métodos adecuados de lisis celular también se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, múltiples ciclos de congelación/descongelación, tratamiento con ultrasonido, microfluidización y tratamiento con productos químicos, tal como detergentes y/o proteasas.

[00280] Después de la recolección, se pueden purificar los viriones de rAAV. El término "purificado" como se usa en la presente incluye una preparación de viriones de rAAV desprovistos de al menos algunos de los otros componentes que también pueden estar presentes donde los viriones de rAAV son de origen natural o donde se preparan inicialmente. De esta manera, por ejemplo, los viriones de rAAV purificados se pueden preparar usando una técnica de aislamiento para enriquecerlos de una mezcla fuente, tal como un lisado de cultivo o sobrenadante de cultivo de producción. El enriquecimiento se puede medir en una variedad de maneras, tal como, por ejemplo, por la proporción de partículas resistentes a DNasa (DRP) o copias genómicas (gc) presentes en una solución, o por infectividad, o se puede medir con relación a una segunda sustancia potencialmente interferente presente en la mezcla fuente, tal como contaminantes, incluyendo contaminantes de cultivo de producción o contaminantes durante el proceso, incluyendo virus auxiliar,

componentes de medios y similares.

[00281] En ciertas modalidades, la recolección de cultivo de producción de rAAV se puede clarificar para retirar los desechos de células hospedadoras. En algunas modalidades, la recolección de cultivo de producción se puede clarificar usando una variedad de técnicas estándar, tal como centrifugación o filtración a través de un filtro de 0.2 µm o mayor tamaño de poro (por ejemplo, un filtro de acetato de celulosa o una serie de filtros de profundidad).

[00282] En ciertas modalidades, la recolección de cultivo de producción de rAAV se trata adicionalmente con Benzonasa™ para digerir cualquier ADN de alto peso molecular presente en el cultivo de producción. En algunas modalidades, la digestión de Benzonasa™ se realiza en condiciones estándar, por ejemplo, una concentración final de 1-2.5 unidades/ml de Benzonasa™ a una temperatura que varía de ambiente a 37°C durante un período de 30 minutos a varias horas.

[00283] En ciertas modalidades, los viriones de rAAV se pueden aislar o purificar usando una o más de los siguientes pasos de purificación: centrifugación de equilibrio; filtración de intercambio aniónico de flujo continuo; filtración de flujo tangencial (TFF) para concentrar las partículas de rAAV; captura de rAAV mediante cromatografía de apatita; inactivación térmica del virus auxiliar; captura de rAAV mediante cromatografía de interacción hidrófoba;

intercambio de amortiguador mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC); nanofiltración; y captura de rAAV mediante cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico o cromatografía de afinidad. Estos pasos se pueden usar solos, en varias combinaciones o en órdenes diferentes. Los métodos para purificar partículas de rAAV se encuentran, por ejemplo, en Xiao et al., (1998) Journal of Virology 72: 2224-2232; patente de Estados Unidos No. 6,989,264 y 8,137,948; y WO 2010/148143.

[00284] En ciertas modalidades, los viriones de AAV purificados se pueden dializar contra PBS, filtrar y almacenar a −80°C. Los títulos de genomas virales se pueden determinar por PCR cuantitativa usando ADN de plásmido linealizado como curva estándar (ver, por ejemplo, Bloqueo M, et al., Hum. Gene Ther. 2010; 21:1273-1285).

Composiciones Farmacéuticas

[00285] En ciertas modalidades, la solicitud proporciona composiciones que comprenden un sitio de unión de microARN selectivo de PV y/o una secuencia que codifica para un eTF que favorece selectivamente la expresión de SCN1A y un portador farmacéuticamente aceptable. En otras modalidades, la solicitud proporciona viriones que comprenden un sitio de unión de microARN selectivo de PV y/o una secuencia que codifica para un eTF que regula por aumento selectivamente SCN1A y un portador farmacéuticamente aceptable. En

modalidades de ejemplo, estas composiciones son adecuadas para aplicaciones de terapia génica. Las composiciones farmacéuticas son preferentemente estériles y estables bajo condiciones de fabricación y almacenamiento. Las soluciones estériles se pueden lograr, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles.

[00286] Los portadores y excipientes aceptables en las composiciones farmacéuticas son preferentemente no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas. Los portadores y excipientes aceptables pueden incluir amortiguadores tal como fosfato, citrato, HEPES y TAE, antioxidantes tal como ácido ascórbico y metionina, conservadores tal como cloruro de hexametonio, cloruro de octadecildimetilbencil-amonio, resorcinol y cloruro de benzalconio, proteínas tal como albúmina de suero humano, gelatina, dextrano e inmunoglobulinas, polímeros hidrófilos tal como polivinilpirrolidona, aminoácidos tal como glicina, glutamina, histidina y lisina, y carbohidratos tal como glucosa, manosa, sacarosa y sorbitol. Composiciones farmacéuticas de la descripción se pueden administrar de manera parenteral en forma de una formulación inyectable. Las composiciones farmacéuticas para inyección se pueden formular usando una solución estéril o cualquier líquido farmacéuticamente aceptable como un vehículo. Vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a,

agua estéril y solución salina fisiológica.

[00287] Las composiciones farmacéuticas de la descripción se pueden preparar en microcápsulas, tal como hidroxilmetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de polimetilmetacrilato. Las composiciones farmacéuticas de la descripción también se pueden preparar en otros sistemas de suministro de fármacos tal como liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas. La composición farmacéutica para terapia génica puede estar en un diluyente aceptable o puede comprender una matriz de liberación lenta en la cual se incrusta el vehículo de sumistro génico.

[00288] Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente se pueden formular para administración parenteral, administración subcutánea, administración intravenosa, administración intramuscular, administración intraarterial, administración intraparenquimatosa, administración intratecal, administración intra-cisterna magna, administración intracerebroventricular o administración intraperitoneal. La composición farmacéutica también se puede formular o administrar mediante administración nasal, por rociamiento, oral, en aerosol, rectal o vaginal. En una modalidad, una composición farmacéutica proporcionada en la presente se administra al CNS o fluido cefalorraquídeo (CSF), es decir, por inyección intraparenquimatosa, inyección

intratecal, inyección intra-cisterna magna o inyección intracerebroventricular. La diana de tejido puede ser específica, por ejemplo, el CNS, o puede ser una combinación de varios tejidos, por ejemplo, el músculo y los tejidos de CNS. Tejido de ejemplo u otras dianas pueden incluir hígado, músculo esquelético, músculo cardíaco, depósitos adiposos, riñón, pulmón, endotelio vascular, epitelial, células hematopoyéticas, CNS y/o CSF. En una modalidad preferida, una composición farmacéutica proporcionada en la presente que comprende un sitio de unión de microARN selectivo de PV y/o un eTF que favorece selectivamente la expresión de SCN1A se administra a la inyección de CNS o CSF, es decir, por inyección intraparenquimatosa, inyección intratecal, inyección intra-cisterna magna o inyección intracerebroventricular. Uno o más de estos métodos se pueden usar para administrar una composición farmacéutica de la descripción.

[00289] En ciertas modalidades, una composición farmacéutica proporcionada en la presente comprende una “cantidad efectiva” o una "cantidad terapéuticamente efectiva.” Como se usa en la presente, estas cantidades se refieren a una cantidad efectiva, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios para lograr el resultado terapéutico deseado, tal como incrementar el nivel de expresión de SCN1A y/o disminuir la frecuencia y/o duración de convulsiones.

[00290] La dosificación de las composiciones farmacéuticas de la descripción depende de factores que incluyen la ruta de administración, la enfermedad que se va a tratar y características físicas (por ejemplo, edad, peso, salud general) del sujeto. La dosificación se puede ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Habitualmente, una dosificación puede ser una cantidad que trata de manera efectiva la enfermedad sin inducir toxicidad significativa. En una modalidad, un vector AAV proporcionado en la presente se puede administrar al paciente para el tratamiento de una deficiencia de SCN1A (incluyendo, por ejemplo, síndrome de Dravet) en una cantidad o dosis dentro de un intervalo de $5x10^{11}$ a $1x10^{14}$ gc/kg (copias genómicas por kilogramo de peso corporal del paciente (gc/kg)). En una modalidad más particular, el vector AAV se administra en una cantidad comprendida dentro de un intervalo de aproximadamente $5x10^{11}$ gc/kg to aproximadamente $3x10^{13}$ gc/kg, o aproximadamente $1x10^{12}$ a aproximadamente $1x10^{14}$ gc/kg, o aproximadamente $1x10^{12}$ a aproximadamente $1x10^{13}$ gc/kg, o aproximadamente $5x10^{11}$ gc/kg, $1x10^{12}$ gc/kg, $1.5x10^{12}$ gc/kg, $2.0x10^{12}$ gc/kg, $2.5x10^{12}$ gc/kg, $3x10^{12}$ gc/kg, $3.5x10^{12}$ gc/kg, $4x10^{12}$ gc/kg, $4.5x10^{12}$ gc/kg, $5x10^{12}$ gc/kg, $5.5x10^{12}$ gc/kg, $6x10^{12}$ gc/kg, $6.5x10^{12}$ gc/kg, $7x10^{12}$ gc/kg, $7.5x10^{12}$ gc/kg, $8x10^{12}$ gc/kg, $8.5x10^{12}$ gc/kg, $9x10^{12}$ gc/kg o $9.5x10^{12}$ gc/kg. Se puede determinar gc/kg, por ejemplo, por qPCR o PCR de gota digital (ddPCR)

(ver, por ejemplo, M. Lock et al, Hum Gene Ther Methods. 2014 Apr;25(2): 115-25). En otra modalidad, se puede administrar un vector AAV proporcionado en la presente al paciente para el tratamiento de una deficiencia de SCN1A (incluyendo, por ejemplo, síndrome de Dravet) en una cantidad o dosis dentro de un intervalo de $1x10^9$ a $1x10^{11}$ iu/kg (unidades infecciosas del vector (iu)/peso corporal del sujeto o paciente (kg)). En ciertas modalidades, la composición farmacéutica se puede formar en una dosis unitaria como sea necesario. Estas unidades de dosis individual pueden contener aproximadamente $1x10^9$ gc a aproximadamente $1x10^{15}$ gc.

[00291] Las composiciones farmacéuticas de la descripción se pueden administrar a un sujeto en necesidad de lo mismo, por ejemplo, una o más veces (por ejemplo, 1-10 veces o más) diariamente, semanalmente, mensualmente, bianualmente, anualmente o como sea médicamente necesario. En una modalidad de ejemplo, una administración individual es suficiente. En una modalidad, una composición farmacéutica que comprende un casete de expresión que codifica para un sitio de unión de microARN selectivo de PV y/o un eTF que favorece la expresión de SCN1A es adecuada para su uso en sujetos humanos y se administra por inyección intraparenquimatosa, inyección intratecal, inyección intra-cisterna magna o inyección intracerebroventricular. En una modalidad, la composición farmacéutica se suministra mediante una vena periférica por

inyección en bolo. En otras modalidades, la composición farmacéutica se suministra mediante una vena periférica por infusión durante aproximadamente 10 minutos (±5 minutos), durante aproximadamente 20 minutos (±5 minutos), durante aproximadamente 30 minutos (±5 minutos), durante aproximadamente 60 minutos (±5 minutos) o durante aproximadamente 90 minutos (±10 minutos).

[00292] En otro aspecto, la solicitud proporciona además un kit que comprende una molécula de ácido nucleico, vector, célula hospedadora, virión o composición farmacéutica como se describe en la presente en uno o más recipientes. Un kit puede incluir instrucciones o materiales de empaquetado que describen cómo administrar una molécula de ácido nucleico, vector, célula hospedadora o virión contenido dentro del kit a un paciente. Los recipientes del kit pueden ser de cualquier material adecuado, por ejemplo, vidrio, plástico, metal, etc., y de cualquier tamaño, forma o configuración adecuada. En ciertas modalidades, los kits pueden incluir una o más ampollas o jeringas que contienen una molécula de ácido nucleico, vector, célula hospedadora, virión o composición farmacéutica en una forma líquida o solución adecuada.

Métodos de Tratamiento

[00293] En un aspecto, la solicitud proporciona métodos para usar los eTF que regulan por aumento selectivamente SCN1A como se describe en la presente. En ciertas modalidades, la

solicitud proporciona métodos para administrar un casete de expresión, un vector de expresión o una partícula viral que comprende un polinucleótido que codifica para un eTF que regula por aumento selectivamente SCN1A como se describe en la presente para regular por aumento la expresión de SCN1A en una célula. En diferentes modalidades, un eTF que regula por aumento de forma selectiva SCN1A tal como se describe en la presente se puede usar para modular la expresión de SCN1A *en una célula in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

[00294] En ciertas modalidades, la solicitud proporciona métodos para tratar una enfermedad o trastorno asociado con SCN1A al administrar un casete de expresión, un vector de expresión o una partícula viral que comprende un polinucleótido que codifica para un eTF que regula por aumento selectivamente SCN1A como se describe en la presente a un sujeto en necesidad de lo mismo. En ciertas modalidades, el trastorno es un trastorno del sistema nervioso central. En modalidades de ejemplo, la enfermedad o trastorno se asocia con haploinsuficiencia de SCN1A. En ciertas modalidades, el trastorno es epilepsia asociada con haploinsuficiencia de SCN1A. En ciertas modalidades, la haploinsuficiencia es el resultado de que el sujeto sea heterocigoto para una pérdida de mutación de función del gen SCN1A. En ciertas modalidades, el trastorno es epilepsia asociada con una inserción, deleción o sustitución en el gen SCN1A. En ciertas

modalidades, el trastorno es epilepsia asociada con una mutación puntual en el gen SCN1A. En ciertas modalidades, un método para tratar una enfermedad o trastorno comprende administrar un casete de expresión, un vector de expresión o una partícula viral que comprende un polinucleótido que codifica para un eTF que regula por aumento selectivo SCN1A tal como se describe en la presente de modo que se corrije la subexpresión de SCN1A, se coloque dentro de un nivel de un individuo sano o se coloque dentro de un intervalo normal tal como lo define una norma de cuidado médico. En ciertas modalidades, los métodos descritos en la presente se usan para tratar una enfermedad o trastorno asociado con SCN1A endógeno que comprende una o más mutaciones que dan por resultado la expresión anormal de SCN1A.

[00295] En ciertas modalidades, la solicitud proporciona métodos para mejorar un síntoma asociado con una enfermedad o trastorno al administrar un casete de expresión, un vector de expresión o una partícula viral que comprende un polinucleótido que codifica para un eTF que regula por aumento selectivamente SCN1A como se describe en la presente a un sujeto en necesidad de lo mismo.

[00296] En una modalidad de ejemplo, la solicitud proporciona métodos para tratar una enfermedad, trastorno o síntoma asociado con una mutación en SCN1A (por ejemplo, mutación puntual, sustitución, deleción, inversión, etc.), una

deficiencia en Nav1.1 y/o actividad reducida de Nav1.1 al administrar a un sujeto en necesidad de lo mismo un casete de expresión, un vector de expresión o una partícula viral que comprende un polinucleótido que codifica para un eTF que favorece selectivamente la expresión del gen SCN1A o su producto de proteína Nav1.1. Los canales iónicos de sodio bloqueados por voltaje son importantes para la generación y propagación de potenciales de acción en músculos estriados y tejidos neuronales. Los canales iónicos de sodio bloqueados por voltaje son complejos heteroméricos que consisten en una subunidad alfa grande glicosilada formadora de poros central y 2 subunidades beta auxiliares más pequeñas. La subunidad alfa grande Nav1.1, codificada por el gen SCN1A, es pertinente para una variedad de enfermedades o trastornos tal como el síndrome de Dravet. Nav1.1 se expresa en neuronas y se puede ensamblar con varias subunidades beta, incluyendo Navβ1 expresada por el gen SCN1B.

[00297] En ciertas modalidades, la solicitud proporciona métodos para tratar enfermedades asociadas con una mutación en SCN1A (por ejemplo, deleción, inserción, inversión, mutación puntual (por ejemplo, mutación finalizadora, mutación de sentido erróneo), etc.) o actividad reducida de Nav1.1 usando un eTF que favorece selectivamente la expresión del gen SCN1A endógeno. Las enfermedades y trastornos asociados con mutaciones de SCN1A incluyen, pero no se

limitan a: Síndrome de Dravet, síndrome de Ohtahara, epilepsia, encefalopatía epiléptica infantil temprana 6 (EIEE6), convulsiones febriles familiares 3A (FEB3A), epilepsia infantil intratable con convulsiones tónico-clónicas generalizadas (ICEGTC), migraña, migrañana hemipléjica familiar 3 (FHM3), síndrome de Panayiotopoulos, fibrilación auricular familiar 13 (ATFB13), epilepsia generalizada con convulsiones febriles más tipo 1 (gefs + tipo 1), síndrome de Brugada, defecto de conducción cardíaca no específico, epilepsia generalizada con convulsiones febriles positivas, convulsiones infantiles familiares benignas, encefalopatía epiléptica infantil temprana 11 (EIEE11), epilepsia infantil familiar benigna, neurodegeneración, tauopatías y enfermedad de Alzheimer. En algunos casos, la condición neurológica es síndrome de Dravet. Las mutaciones o anormalidades en SCN1A también se han asociado con trastornos convulsivos, epilepsia, autismo, migraña hemipléjica familiar tipo 3 (FHM3), epilepsia genética con convulsiones febriles positivas (GEFS+) y eficacia de ciertos medicamentos anticonvulsivos. Por ejemplo, la mutación ICS5N+5G>A en SCN1A se asocia con la cantidad (dosis) máxima segura de los fármacos anticonvulsivos, fenitoína y carbamazepina.

[00298] En ciertas modalidades, la solicitud proporciona un método para tratar a un sujeto con, o en riesgo de

desarrollar, síndrome de Dravet al administrar un casete de expresión, vector de expresión o partícula viral que comprende un polinucleótido que codifica para un eTF que favorece selectivamente la expresión de SCN1A. El síndrome de Dravet se ha caracterizado por convulsiones febriles y no febriles prolongadas durante el primer año de vida de un niño. Esta enfermedad progresa a otros tipos de convulsiones como convulsiones mioclónicas y parciales, retraso psicomotor y ataxia. Se caracteriza por deterioro cognitivo, trastornos de comportamiento y déficits motores. Los déficits de comportamiento frecuentemente incluyen hiperactividad e impulsividad, y en casos más raros, comportamientos autistas. El síndrome de Dravet también se asocia con trastornos del sueño incluyendo somnolencia e insomnio. En muchos pacientes, el síndrome de Dravet es provocado por mutaciones genéticas que conducen a la producción de proteínas no funcionales. Existen muchos desafíos al tratar trastornos asociados con causas genéticas. Por lo tanto, la mayoría de los tratamientos existentes se han centrado al manejo médico profiláctico de convulsiones y otros síntomas.

[00299] En 70-90% de los pacientes, el síndrome de Dravet se provoca por mutaciones finalizadoras en el gen SCN1A que dan por resultado un codón de finalización prematuro y por lo tanto, una proteína no funcional. Habitualmente, una mutación de sentido erróneo ya sea en el segmento S5 o S6 del poro de

canal de sodio da por resultado una pérdida de función de canal y el desarrollo del síndrome de Dravet. Una herencia heterocigota de una mutación de SCN1A, por ejemplo, una mutación sin sentido, una mutación sin sentido, deleción, inserción, inversión, etc., es todo lo que es necesario para desarrollar un canal de sodio defectuoso; los pacientes con síndrome de Dravet todavía tendrán una copia normal del gen. Por lo tanto, la enfermedad se caracteriza como una de haploinsuficiencia y, por lo tanto, el incremento de la expresión de la copia funcional de SCN1A puede restaurar los niveles normales de producción de Nav1.1.

[00300] Los síntomas asociados con el síndrome de Dravet incluyen convulsiones, defectos de memoria, retraso en el desarrollo, tono muscular deficiente y/o problemas cognitivos. El tratamiento con un casete de expresión, vector de expresión o partícula virial descrita en la presente puede dar por resultado una mejora de uno o más síntomas, tal como una reducción en número, duración y/o intensidad de convulsiones. La administración de una terapia génica como se describe en la presente a un sujeto en riesgo de desarrollar síndrome de Dravet puede impedir el desarrollo de o desacelerar la progresión de uno o más síntomas de Dravet.

[00301] En ciertas modalidades, el tratamiento con un casete de expresión, vector de expresión o partícula viral que comprende un polinucleótido que codifica para un eTF que

favorece selectivamente la expresión de SCN1A como se describe en la presente reduce la duración y/o frecuencia de convulsiones, por ejemplo, convulsiones asociadas con síndrome de Dravet, por al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más en comparación con un control no tratado o en comparación con el nivel antes de tratamiento.

[00302] En algunos pacientes con Alzheimer, la producción de β amiloide (Aβ) que implica muchos péptidos y proteasas que pueden afectar la excitabilidad de neuronas, provocando convulsiones y regulación por disminución el canal de sodio de Nav1.1 en neuronas de PV. En otra modalidad, la solicitud proporciona métodos para tratar a un sujeto que padece de enfermedad de Alzheimer al administrar un casete de expresión, vector de expresión o partícula viral descrita en la presente que comprende un polinucleótido que codifica para un eTF que favorece selectivamente la expresión de SCN1A. Los síntomas asociados con la enfermedad de Alzheimer incluyen pérdida de memoria a corto plazo, dificultades cognitivas, convulsiones y dificultades con el lenguaje, funciones ejecutivas, percepción (agnosia) y ejecución de movimientos (apraxia). El tratamiento con un casete de expresión, vector

de expresión o partícula viral que comprende un polinucleótido que codifica para un eTF que favorece selectivamente la expresión de SCN1A puede dar por resultado una mejora de uno o más síntomas de la enfermedad de Alzheimer, tal como una reducción en la progresión de pérdida de memoria o la prevención de uno o más síntomas. En algunos casos, el tratamiento puede dar por resultado una corrección de actividad cerebral de alto potencia gamma. El tratamiento puede dar por resultado una disminución en la frecuencia de convulsiones y/o severidad de convulsiones, o una disminución en la actividad de alta potencia gamma por al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% o más en comparación a sin tratamiento. En algunos casos, el tratamiento puede dar por resultado una mejora en la función cognitiva. El aprendizaje y/o memoria se pueden mejorar por al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más de 100% en comparación a sin tratamiento, o antes del tratamiento con un polinucleótido que codifica para un eTF que favorece selectivamente la expresión de SCN1A como se describe en la presente.

[00303] En algunos casos, el tratamiento con un casete de expresión, vector de expresión o partícula viral que comprende un polinucleótido que codifica para un eTF que aumenta selectivamente la SCN1A reduce la actividad de alta potencia gamma (por ejemplo, actividad de alta potencia gamma

asociada con enfermedad de Alzheimer) por al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% en comparación con un control no tratado o en comparación con el nivel antes de tratamiento.

[00304] El parkinsonismo se refiere a una recolección de signos y síntomas encontrados en la enfermedad de Parkinson (PD), incluyendo lentitud (bradicinesia), inflexibilidad (rigidez), temblor y desequilibrio (inestabilidad postural). En algunos casos, la administración de un casete de expresión, vector de expresión o partícula viral que comprende un polinucleótido que codifica para un eTF que favorece selectivamente la expresión de SCN1A como se describe en la presente a un sujeto en riesgo de desarrollar o padecer de enfermedad de Parkinson puede impedir el desarrollo de uno o más síntomas de la misma o desacelerar la progresión de la enfermedad de Parkinson por al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90% en comparación a sin tratamiento.

[00305] En ciertas modalidades, la solicitud proporciona métodos que se pueden usar para tratar a un sujeto que está en riesgo de desarrollar una enfermedad. Se puede saber que

el sujeto está predispuesto a una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad neurológica o una enfermedad asociada con epilepsia, convulsiones y/o encefalopatía. El sujeto puede estar predispuesto a una enfermedad debido a un evento genético o debido a factores de riesgo conocidos. Por ejemplo, un sujeto puede portar una mutación en SCN1A que se asocia con epilepsia (tal como, por ejemplo, síndrome de Dravet). Cualquier mutación en el gen SCN1A que reduce su actividad (al reducir los niveles de expresión, afectar la función de la proteína o una combinación de ambos) puede predisponer a un sujeto a una enfermedad, que incluye cualquiera de una o más de inserciones, deleciones, inversiones, translocaciones o sustituciones (por ejemplo, mutaciones puntuales que incluyen mutaciones sin sentido y/o mutaciones sin sentido) en el gen SCN1A. En algunos casos, el sujeto puede estar predispuesto a una enfermedad tal como enfermedad de Alzheimer debido a la edad del sujeto. En algunos casos, el sujeto puede tener una cantidad insuficiente de proteína SCN1A y el tratamiento de una enfermedad asociada con SCN1A implica administrar un casete de expresión, vector de expresión o partícula viral que comprende un polinucleótido que codifica para un eTF que favorece selectivamente la expresión de SCN1A endógeno como se describe en la presente.

[00306] En ciertas modalidades, los tratamientos que usan un

casete de expresión, vector de expresión o partícula viral que comprende un polinucleótido que codifica para un eTF que favorece selectivamente la expresión de SCN1A endógeno proporcionado en la presente puede dar por resultado una disminución o cese de síntomas asociados con Dravet u otra enfermedad o trastornos asociados con SCN1A, por ejemplo, epilepsia asociada con la haploinsuficiencia de SCN1A. Por ejemplo, el tratamiento puede mejorar el aprendizaje, memoria, función cognitiva y/o función motora; reducir la frecuencia y/o duración de las convulsiones; y/o reducir la sensibilidad a temperatura (o incrementar el umbral de temperatura para provocar una convulsión).

[00307] En otro aspecto, la solicitud proporciona métodos para la expresión selectiva de un transgén en neuronas PV al administrar un casete de expresión, un vector de expresión o una partícula viral que comprende al menos un sitio de unión de microARN selectivo de PV. En ciertas modalidades, la solicitud proporciona métodos para la expresión selectiva de un transgén en las neuronas PV de un primate al administrar un casete de expresión, un vector de expresión o una partícula viral que comprende un transgén y al menos un sitio de unión de microARN selectivo de PV. En ciertas modalidades, la solicitud proporciona métodos para la expresión selectiva de un transgén en neuronas PV al administrar un casete de expresión, un vector de expresión o una partícula viral que

comprende un elemento regulador selectivo de PV unido operativamente a un transgén y al menos un sitio de unión de microARN selectivo de PV. En modalidades de ejemplo, el transgén comprende una secuencia que codifica para cualquiera de los eTF que regulan por aumento selectivamente SCN1A como se describe en la presente.

[00308] En ciertas modalidades, la solicitud proporciona un método para la terapia génica que comprende administrar a un sujeto un casete de expresión, un vector de expresión o una partícula viral que comprende un transgén y al menos un sitio de unión de microARN selectivo de PV. En ciertas modalidades, la solicitud proporciona métodos para la terapia génica que comprenden administrar a un sujeto un casete de expresión, un vector de expresión o una partícula viral que comprende un elemento regulador selectivo de PV unido operativamente a un transgén y al menos un sitio de unión de microARN selectivo de PV. En modalidades de ejemplo, el transgén comprende una secuencia que codifica para cualquiera de los eTF que regulan por aumento selectivamente SCN1A como se describe en la presente.

[00309] En ciertas modalidades, la solicitud proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno que comprende administrar a un casete de expresión, un vector de expresión o una partícula viral que comprende un transgén y al menos un sitio de unión de microARN selectivo de PV. En ciertas

modalidades, la solicitud proporciona métodos para tratar una enfermedad o trastorno que comprenden administrar a un sujeto un casete de expresión, un vector de expresión o una partícula viral que comprende un elemento regulador selectivo de PV unido operativamente a un transgén y al menos un sitio de unión de microARN selectivo de PV. En modalidades de ejemplo, el transgén comprende una secuencia que codifica para cualquiera de los eTF que regulan por aumento selectivamente SCN1A como se describe en la presente. En ciertas modalidades, el casete de expresión, vector de expresión o partícula viral que comprende un transgén y un sitio de unión de microARN selectivo de PV y opcionalmente un elemento regulador selectivo de PV se puede usar para tratar una enfermedad o trastorno en el cual las neuronas PV están implicadas. En ciertas modalidades, el casete de expresión, vector de expresión o partícula viral que comprende un transgén y un sitio de unión de microARN selectivo de PV y opcionalmente un elemento regulador selectivo de PV se utilizan para tratar una condición neuronal. Las enfermedades o trastornos neuronales apropiados para el tratamiento incluyen, pero no se limitan a, síndrome de Dravet, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), atrofia muscular espinal (SMA), epilepsia, trastornos neurodegenerativos, trastornos motores, trastornos del

movimiento, trastornos del estado de ánimo, enfermedades de las neuronas motoras, atrofia muscular progresiva (PMA), parálisis bulbar progresiva, parálisis pseudobulbar, esclerosis lateral primaria, consecuencias neurológicas del SIDA, trastornos del desarrollo, esclerosis múltiple, trastornos neurogenéticos, accidente cerebrovascular, lesión de médula espinal, lesión cerebral traumática, tauopatía, hipoexcitabilidad neuronal y/o convulsiones. En algunas modalidades, se utilizan un vector viral, partícula viral o composición farmacéutica que comprende un transgén y un sitio de unión de microARN selectivo de PV y opcionalmente un elemento regulador selectivo de PV para tratar un trastorno psiquiátrico (por ejemplo, esquizofrenia, trastorno obsesivo compulsivo, adicción, depresión, ansiedad, psicosis); un trastorno del espectro autista (por ejemplo, síndrome X frágil, síndrome de Rett); epilepsia (por ejemplo, síndrome de Dravet, encefalopatía traumática crónica, epilepsia generalizada con convulsiones febriles más (GEFS+), encefalopatía epiléptica, epilepsia del lóbulo temporal, epilepsia focal, esclerosis tuberosa, epilepsia asociada con haploinsuficiencia de SCN1A); y/o neurodegeneración (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson). Las enfermedades asociadas con neuronas PV disfuncionales, como las debidas a la pérdida de mutaciones funcionales en SCN1A o Nav1.1 incluyen: Síndrome de Dravet, síndrome de

Ohtahara, epilepsia, encefalopatía epiléptica infantil temprana 6 (EIEE6), convulsiones febriles familiares 3A (FEB3A), epilepsia infantil intratable con convulsiones tónico-clónicas generalizadas (ICEGTC), migraña, migrañana hemipléjica familiar 3 (FHM3), síndrome de Panayiotopoulos, fibrilación auricular familiar 13 (ATFB13), epilepsia generalizada con convulsiones febriles más tipo 1 (gefs + tipo 1), síndrome de Brugada, defecto de conducción cardíaca no específico, epilepsia generalizada con convulsiones febriles positivas, convulsiones infantiles familiares benignas, encefalopatía epiléptica infantil temprana 11 (EIEE11), epilepsia infantil familiar benigna, neurodegeneración, tauopatías y enfermedad de Alzheimer.

[00310] En ciertas modalidades, el tratamiento usando un casete de expresión, un vector de expresión o una partícula viral que comprende un transgén y un sitio de unión de microARN selectivo de PV y opcionalmente un elemento regulador selectivo de PV descrito en la presente resulta en síntomas mejorados asociados con una enfermedad o trastorno neuronal. Por ejemplo, se puede monitorear sintomáticamente a un paciente de Parkinson para detectar funciones motoras mejoradas que indiquen una respuesta positiva al tratamiento. La administración de una terapia mediante el uso de un método como se describe en la presente a un sujeto en riesgo de desarrollar un trastorno neuronal puede impedir el desarrollo

de o desacelerar la progresión de uno o más síntomas.

[00311] En ciertas modalidades, un casete de expresión, un vector de expresión o una partícula viral que comprende un transgén y un sitio de unión de microARN selectivo de PV y opcionalmente un elemento regulador selectivo de PV proporcionado en la presente se puede usar para tratar a un sujeto que ha sido diagnosticado con una enfermedad neuronal, por ejemplo, epilepsia asociada con la haploinsuficiencia de SCN1A tal como, por ejemplo, síndrome de Dravet. En varias modalidades, cualquiera de las enfermedades o trastornos neuronales descritos en la presente se provocan por un evento genético conocido (*por ejemplo*, cualquiera de las mutaciones *SCN1A* conocidas en la técnica) o tienen una causa desconocida.

[00312] En ciertas modalidades, un casete de expresión, un vector de expresión o una partícula viral que comprende un transgén y un sitio de unión de microARN selectivo de PV y opcionalmente un elemento regulador selectivo de PV proporcionado en la presente se puede usar para tratar a un sujeto que está en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno. En algunas modalidades, se puede saber que el sujeto está predispuesto a una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad neuronal (*por ejemplo*, epilepsia asociada con la haploinsuficiencia de SCN1A tal como, por ejemplo, síndrome de Dravet). En algunas modalidades, el sujeto puede estar

predispuesto a una enfermedad debido a un evento genético o debido a factores de riesgo conocidos. Por ejemplo, un sujeto puede portar una mutación en *SCN1A* que se asocia con epilepsia o síndrome de Dravet, por ejemplo, una inserción, deleción, inversión, translocación o sustitución (por ejemplo, una mutación puntual que incluye una mutación finalizadora y/o una mutación de sentido erróneo).

[00313] En ciertas modalidades, un casete de expresión, un vector de expresión o una partícula viral que comprende un transgén y un sitio de unión de microARN selectivo de PV y opcionalmente un elemento regulador selectivo de PV proporcionado en la presente se puede usar para reducir uno o más síntomas asociados con una enfermedad o trastorno. Por ejemplo, los síntomas asociados con el síndrome de Dravet incluyen convulsiones, defectos de memoria, retraso en el desarrollo, tono muscular deficiente y/o problemas cognitivos. El tratamiento con un vector viral, partícula viral o composición farmacéutica que comprende un transgén y un sitio de unión de microARN selectivo de PV y opcionalmente un elemento regulador selectivo de PV proporcionado en la presente puede dar por resultado una mejora de uno o más síntomas, tal como una reducción en número, duración y/o intensidad de convulsiones.

[00314] En ciertas modalidades, los métodos descritos en la presente se usan para aumentar la expresión de un transgén en

una neurona de PV, terapia génica o tratar una enfermedad o trastorno en un primate. En ciertas modalidades, el primate es un humano. En ciertas modalidades, el primate es un primate no humano. En ciertas modalidades, el primate no humano es un mono del viejo mundo, un orangután, un gorila, un chimpancé, un macaco cangrejero, un macaco rhesus o un macaco de cola de cerdo.

[00315] Los términos "sujeto" e "individuo" se usan indistintamente en la presente para referirse a un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente un humano. Los métodos descritos en la presente pueden ser útiles en productos terapéuticos para humano, aplicaciones veterinarias y/o estudios preclínicos en modelos animales de una enfermedad o condición. En varias modalidades, un sujeto que se puede tratar de acuerdo con los métodos descritos en la presente es un mamífero, tal como, por ejemplo, un ratón, rata, hámster, conejillo de indias, jerbo, vaca, oveja, cerdo, cabra, burro, caballo, perro, gato, llama, mono (por ejemplo, un mono del viejo mundo, un titi o un macaco tal como un macaco Rhesus, un macaco de cola de cerdo o un macaco cangrejero (es decir, un mono cynomolgus)), mono (por ejemplo, un orangután, gorila o chimpancé) o humano. En una modalidad de ejemplo, un sujeto es un humano.

[00316] Las siguientes tablas proporcionan secuencias descritas en la presente.

TABLA 1. Factores de transcripción modificados de ejemplo descritos en la presente. Las secuencias de los elementos reguladores (RE) se describen a continuación en las TABLAS 2 y **8**. Para el RE, cuando se indica m1 significa que el sitio de unión de microARN m1 (SEQ ID NO: 7, TABLA 8) se incluye entre la región codificadora y la extremidad de poliA. Las secuencias para los dominios de unión a ADN (DBD) se describen a continuación en la TABLA 3. Para la DBD, el dedo de zinc modificado (eZF) indica que la construcción tiene la fórmula expuesta en SEQ ID NO: 147 (TABLA 10); EGR1 indica que el DBD se deriva de EGR1 humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 176; TABLA 12); y EGR3 indica que el DBD se deriva de EGR3 humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 175, TABLA 12). Las secuencias para los sitios diana (por ejemplo, las secuencias unidas por las DBD) se proporcionan en la TABLA 4 a continuación. Las secuencias para los dominios de activación transcripcional (TAD) se describen a continuación en la TABLA 5. Para el TAD, (c) indica que el TAD está ubicado en el extremo c-terminal del DBD, (n) indica que el TAD está ubicado en el extremo n-terminal del DBD, (n/c) significa que hay un TAD ubicado tanto en el extremo n-terminal como en el extremo c-terminal del DBD, y 2x CITED4 (n) indica que hay 2 copias del TAD CITED4 ubicadas en el extremo n-terminal del DBD. Las secuencias para los factores de transcripción modificados de longitud completa (DBD + TAD) se proporcionan

en la TABLA 6 posterior.

Construcción	RE	DBD	Sitio diana	TAD (ubicación)	SEQ ID NO (DBD)	SEQ ID NO (DBD + TAD)
1	RE 1	eZF	Z13	VPR (c)	89	99
2	RE 1	eZF	Z1	VPR (c)	77	100
3	RE 1	eZF	Z13	VP64 (c)	89	101
4	RE 1	eZF	Z1	VP64 (c)	77	102
5	RE 1	EGR1	Z13	CITED4 (n/c)	93	103
6	RE 1	EGR1	Z13	CITED4 (n)	93	104
7	RE 1	EGR1	Z1	CITED4 (n/c)	92	105
8	RE 1	EGR1	Z1	CITED4 (n)	92	106
9	RE 1	EGR1	Z1	CITED4 (c)	92	107
10	RE 1	EGR1	Z1	CITED2 (c)	92	108
11	RE 1	EGR1	Z1	CITED2 (n)	92	109
12	RE 1	EGR3	Z1	CITED4 (n/c)	96	110
13	RE 1	EGR3	Z1	CITED4 (c)	96	111
14	RE 1	EGR3	Z1	CITED2 (c)	96	112
15	RE 1	EGR3	Z1	CITED2 (n)	96	113
16	CBA	EGR3	Z15	N/A	98	114
17	RE 1	EGR1	Z13	N/A	93	115
18	RE 1	EGR1	Z15	N/A	94	116
19	RE 1	EGR1	Z13	N/A	93	117

Construc-ción	RE	DBD	Sitio diana	TAD (ubicación)	SEQ ID NO (DBD)	SEQ ID NO (DBD + TAD)
20	RE 1	EGR1	Z13	N/A	93	115
721	RE 1	EGR1	Z1	N/A	92	118
22	CBA	EGR3	Z13	N/A	97	119
23	RE 1	EGR1	Z17	N/A	95	120
24	RE 1	EGR1	Z13	N/A	93	121
25	CBA	EGR3	Z1	N/A	96	122
26	RE 1	EGR1	Z1	N/A	92	123
27	RE 1	EGR1	Z1	N/A	92	124
28	RE 1	eZF	Z8	VP64 (c)	84	125
29	RE 1	eZF	Z14	VP64 (c)	90	126
30	CBA	eZF	Z13	VPR (c)	89	99
31	RE 2 (m1)	eZF	Z1	VP64 (c)	77	102
32	RE 2	eZF	Z1	VP64 (c)	77	102
33	RE 2	eZF	Z1	VPR (c)	77	100
34	RE 2	eZF	Z1	VP64 (c)	77	127
35	RE 2 (m1)	eZF	Z1	VP64 (c)	77	127
36	RE 2	EGR1	Z1	CITED4 (n)	92	128
37	RE 2 (m1)	EGR1	Z1	CITED4 (n)	92	106
38	RE 2 (m1)	EGR1	Z1	CITED4 (n)	92	129

Construcción	RE	DBD	Sitio diana	TAD (ubicación)	SEQ ID NO (DBD)	SEQ ID NO (DBD + TAD)
39	RE 2 (m1)	EGR1	Z1	CITED4 (n/c)	92	105
40	RE 2 (m1)	EGR1	Z1	2x CITED4 (n)	92	130
41	RE 2 (m1)	EGR1	Z1	2x CITED4 (n)	92	131
42	RE 2 (m2)	eZF	Z1	VP64 (c)	77	102
43	RE 2 (m3)	eZF	Z1	VP64 (c)	77	102
44	RE 2 (m2)	EGR1	Z1	CITED4 (n)	92	106
45	RE 2 (m3)	EGR1	Z1	CITED4 (n)	92	106
46	RE 1	EGR1	Z1	CITED4 (n)	92	205
47	RE 1	EGR1	Z1	2x CITED4 (n)	92	207
48	RE 1	EGR1	Z1	2x CITED4 (n)	92	209
49	CBA	eZF	Z1	CREB3 (n)	77	213
50	CBA	EGR1	Z1	CREB3 (n)	92 (sin C-term Lys)	217
51	CBA	EGR1	Z13	CREB3 (n)	93 (sin	219

Construcción	RE	DBD	Sitio diana	TAD (ubicación)	SEQ ID NO (DBD)	SEQ ID NO (DBD + TAD)
					C-term Lys)	
52	CBA	eZF	Z1	CREB3 (n); sin dominio TM en (c)	77	221
53	CBA	EGR1	Z1	CREB3 (n); sin dominio TM en (c)	92 (sin C-term Lys)	223

TABLA 2. Secuencias de ácido nucleico para diversos elementos reguladores (RE) descritos en la presente.

RE	SECUENCIA	SEQ ID NO
RE 1	GTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTACCGTGTGTATGCTCAGGGGCTGGGAAAGGAGGGGAGGGAGCTCCGGCTCAG	1
RE 2	ggaggaagccatcaactaaactacaatgactgtaagatacaaaattgggaatggtaacatattttgaagttctgttgacataaagaatcatgatattaatgcccatggaaatgaaagggcgatcaacactat	2

RE	SECUENCIA	SEQ ID NO
	ggtttgaaaaggggggaaattgtagagcacagatgtgttcgtgtg gcagtgtgctgtctctagcaatactcagagaagagagagaacaa tgaaattctgattggccccagtgtgagcccagatgaggttcagc tgccaactttctctttcacatcttatgaaagtcatttaagcaca actaactttttttttttttttttttttgagacagagtcttgc tctgttgcccaggacagagtgcagtagtgactcaatctcggctc actgcagcctccacctcctaggctcaaacggtcctcctgcatca gcctcccaagtagctggaattacaggagtggcccaccatgccca gctaatttttgtatttttaatagatacgggggtttcaccatatc acccaggctggtctcgaactcctggcctcaagtgatccacctgc ctcggcctcccaaagtgctgggattataggcgtcagccactatg cccaacccgaccaacctttttttaaaataaatatttaaaaaattg gtatttcacatatatactagtatttacatttatccacacaaaac ggacgggcctccgctgaaccagtgaggccccagacgtgcgcata aataacccctgcgtgctgcaccacctggggagaggggggaggacc acggtaaatggagcgagcgcatagcaaaagggacgcggggtcct tttctctgccggtggcactgggtagctgtggccaggtgtggtac tttgatggggcccagggctggagctcaaggaagcgtcgcagggt cacagatctgggggaaccccggggaaaagcactgaggcaaaacc gccgctcgtctcctacaatatatgggaggggggaggttgagtacg ttctggattactcataagacctttttttttttccttccgggcgca aaaccgtgagctggatttataatcgccctataaagctccagagg	

RE	SECUENCIA	SEQ ID NO
	cggtcaggcacctgcagaggagccccgccgctccgccgactagc tgcccccgcgagcaacggcctcgtgatttccccgccgatccggt ccccgcctccccactctgcccccgcctaccccggagccgtgcag ccgcctctccgaatctctctcttctcctggcgctcgcgtgcgag agggaactagcgagaacgaggaagcagctggaggtgacgccggg cagattacgcctgtcagggccgagccgagcggatcgctgggcgc tgtgcagaggaaaggcgggagtgcccggctcgctgtcgcagagc cgaggtgggtaagctagcgaccacctggacttcccagcgcccaa ccgtggcttttcagccaggtcctctcctcccgcggcttctcaac caaccccatcccagcgccggccacccaacctcccgaaatgagtg cttcctgccccagcagccgaaggcgctactaggaacggtaacct gttacttttccaggggccgtagtcgacccgctgcccgagttgct gtgcgactgcgcgcgcggggctagagtgcaaggtgactgtggtt cttctctggccaagtccgagggagaacgtaaagatatgggcctt tttccccctctcaccttgtctcaccaaagtccctagtccccgga gcagttagcctctttctttccagggaattagccagacacaacaa cgggaaccagacaccgaaccagacatgcccgccccgtgcgccct ccccgctcgctgcctttcctccctcttgtctctccagagccgga tcttcaaggggagcctccgtgcccccggctgctcagtccctccg gtgtgcaggaccccggaagtcctccccgcacagctctcgcttct ctttgcagcctgtttctgcgccggaccagtcgaggactctggac agtagaggccccgggacgaccgagctg	

RE	SECUENCIA	SEQ ID NO
RE 3	TCAACAGGGGGACACTTGGGAAAGAAGGATGGGGACAGAGCCGA GAGGACTGTTACACATTAGAGAAACATCAGTGACTGTGCCAGCT TTGGGGTAGACTGCACAAAAGCCCTGAGGCAGCACAGGCAGGAT CCAGTCTGCTGGTCCCAGGAAGCTAACCGTCTCAGACAGAGCAC AAAGCACCGAGACATGTGCCACAAGGCTTGTGTAGAGAGGTCAG AGGACAGCGTACAGGTCCCAGAGATCAAACTCAACCTCACCAGG CTTGGCAGCAAGCCTTTACCAACCCACCCCCACCCCACCCACCC TGCACGCGCCCCTCTCCCCTCCCCATGGTCTCCCATGGCTATCT CACTTGGCCCTAAAATGTTTAAGGATGACACTGGCTGCTGAGTG GAAATGAGACAGCAGAAGTCAACAGTAGATTTTAGGAAAGCCAG AGAAAAAGGCTTGTGCTGTTTTTAGAAAGCCAAGGGACAAGCTA AGATAGGGCCCAAGTAATGCTAGTATTTACATTTATCCACACAA AACGGACGGGCCTCCGCTGAACCAGTGAGGCCCCAGACGTGCGC ATAAATAACCCCTGCGTGCTGCACCACCTGGGGAGAGGGGGAGG ACCACGGTAAATGGAGCGAGCGCATAGCAAAAGGGACGCGGGGT CCTTTTCTCTGCCGGTGGCACTGGGTAGCTGTGGCCAGGTGTGG TACTTTGATGGGGCCCAGGGCTGGAGCTCAAGGAAGCGTCGCAG GGTCACAGATCTGGGGGAACCCCGGGGAAAAGCACTGAGGCAAA ACCGCCGCTCGTCTCCTACAATATATGGGAGGGGGAGGTTGAGT ACGTTCTGGATTACTCATAAGACCTTTTTTTTTTCCTTCCGGGC GCAAAACCGTGAGCTGGATTTATAATCGCCCTATAAAGCTCCAG	3

RE	SECUENCIA	SEQ ID NO
	AGGCGGTCAGGCACCTGCAGAGGAGCCCCGCCGCTCCGCCGACT AGCTGCCCCCGCGAGCAACGGCCTCGTGATTTCCCCGCCGATCC GGTCCCCGCCTCCCCACTCTGCCCCCGCCTACCCCGGAGCCGTG CAGCCGCCTCTCCGAATCTCTCTCTTCTCCTGGCGCTCGCGTGC GAGAGGGAACTAGCGAGAACGAGGAAGCAGCTGGAGGTGACGCC GGGCAGATTACGCCTGTCAGGGCCGAGCCGAGCGGATCGCTGGG CGCTGTGCAGAGGAAAGGCGGGAGTGCCCGGCTCGCTGTCGCAG AGCCGAGGTGGGTAAGCTAGCGACCACCTGGACTTCCCAGCGCC CAACCGTGGCTTTTCAGCCAGGTCCTCTCCTCCCGCGGCTTCTC AACCAACCCCATCCCAGCGCCGGCCACCCAACCTCCCGAAATGA GTGCTTCCTGCCCCAGCAGCCGAAGGCGCTACTAGGAACGGTAA CCTGTTACTTTTCCAGGGGCCGTAGTCGACCCGCTGCCCGAGTT GCTGTGCGACTGCGCGCGCGGGGCTAGAGTGCAAGGTGACTGTG GTTCTTCTCTGGCCAAGTCCGAGGGAGAACGTAAAGATATGGGC CTTTTTCCCCCTCTCACCTTGTCTCACCAAAGTCCCTAGTCCCC GGAGCAGTTAGCCTCTTTCTTTCCAGGGAATTAGCCAGACACAA CAACGGGAACCAGACACCGAACCAGACATGCCCGCCCCGTGCGC CCTCCCCGCTCGCTGCCTTTCCTCCCTCTTGTCTCTCCAGAGCC GGATCTTCAAGGGGAGCCTCCGTGCCCCCGGCTGCTCAGTCCCT CCGGTGTGCAGGACCCCGGAAGTCCTCCCCGCACAGCTCTCGCT TCTCTTTGCAGCCTGTTTCTGCGCCGGACCAGTCGAGGACTCTG GACAGTAGAGGCCCCGGGACGACCGAGCTG	

RE	SECUENCIA	SEQ ID NO
RE 4	GCCCTCTAGGCCACCTGACCAGGTCCCCTCAGTCCCCCCCTTCC CACACTCCCACACTCAGCCCCCCTCCCCCCCCCCCCGACCCCTGC AGGATTATCCTGTCTGTGTTCCTGACTCAGCCTGGGAGCCACCT GGGCAGCAGGGGCCAAGGGTGTCCTAGAAGGGACCTGGAGTCCA CGCTGGGCCAAGCCTGCCCTTTCTCCCTCTGTCTTCCGTCCCTG CTTGCGGTTCTGCTGAATGTGGTTATTTCTCTGGCTCCTTTTAC AGAGAATGCTGCTGCTAATTTTATGTGGAGCTCTGAGGCAGTGT AATTGGAAGCCAGACACCCTGTCAGCAGTGGGCTCCCGTCCTGA GCTGCCATGCTTCCTGCTCTCCTCCCGTCCCGGCTCCTCATTTC ATGCAGCCACCTGTCCCAGGGAGAGAGGAGTCACCCAGGCCCCT CAGTCCGCCCCTTAAATAAGAAAGCCTCCGTTGCTCGGCACACA TACCAAGCAGCCGCTGGTGCAATCT	4
CBA (potenciador de CMV + promotor de beta actina de pollo)	CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCA ACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATA GTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTA TTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATA TGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTAC TTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGggtc gaggtgagccccacgttctgcttcactctccccatctcccccccc ctccccacccccaattttgtatttatttatttttttaattatttt gtgcagcgatgggggcgggggggggggggcgcgcgccaggcgg	5

RE	SECUENCIA	SEQ ID NO
	ggcggggcggggcgaggggcggggcggggcgaggcggagaggtg	
	cggcggcagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtttccttttt	
	atggcgaggcggcggcggcggcggccctataaaaagcgaagcgc	
	gcggcgggcgggagtcgctgcgttgccttcgccccgtgccccgc	
	tccgcgccgcctcgcgccgcccgccccggctctgactgaccgcg	
	ttactcccacaggtgagcgggcgggacggcccttctcctccggg	
	ctgtaattagcgcttggtttaatgacggctcgtttcttttctgt	
	ggctgcgtgaaagccttaaagggctccgggagggccctttgtgc	
	gggggggagcggctcgggggtgcgtgcgtgtgtgtgtgcgtgg	
	ggagcgccgcgtgcggcccgcgctgcccggcggctgtgagcgct	
	gcgggcgcggcgcggggctttgtgcgctccgcgtgtgcgcgagg	
	ggagcgcggccgggggcggtgccccgcggtgcgggggggctgcg	
	aggggaacaaaggctgcgtgcggggtgtgtgcgtgggggggtga	
	gcaggggtgtgggcgcggcggtcgggctgtaacccccccctgc	
	acccccctccccgagttgctgagcacggcccggcttcgggtgcg	
	gggctccgtgcggggcgtggcgcggggctcgccgtgccgggcgg	
	ggggtggcggcaggtgggggtgccgggcggggcggggccgcctc	
	gggccggggagggctcgggggaggggcgcggcggccccggagcg	
	ccggcggctgtcgaggcgcggcgagccgcagccattgcctttta	
	tggtaatcgtgcgagagggcgcagggacttcctttgtcccaaat	
	ctggcggagccgaaatctgggaggcgccgccgcacccccctctag	
	cgggcgcgggcgaagcggtgcggcgccggcaggaaggaaatggg	

RE	SECUENCIA	SEQ ID NO
	cggggagggccttcgtgcgtcgccgcgccgccgtcccccttctcc atctccagcctcggggctgccgcaggggacggctgccttcggg ggggacggggcagggcggggttcggcttctggcgtgtgaccggc ggctctagagcctctgctaaccatgttcatgccttcttcttttt cctacagctcctgggcaacgtgctggttgttgtgctgtctcatc attttggcaaagaatt	
EF1alpha	GAGTAATTCATACAAAAGGACTCGCCCCTGCCTTGGGGAATCCC AGGGACCGTCGTTAAACTCCCACTAACGTAGAACCCAGAGATCG CTGCGTTCCCGCCCCCTCACCCGCCCGCTCTCGTCATCACTGAG GTGGAGAAGAGCATGCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCA GAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGT CGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACT GGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGT GGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCT TTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGT GTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGC GTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCCTGGCTGCAGTACGTGATTC TTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGG CCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGC CTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACC TTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAA AATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAG	6

RE	SECUENCIA	SEQ ID NO
	TCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTT TTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACA TGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGG ACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCC TCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCC CGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGG CCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAG AGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCG TCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCC GTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGT CTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCAC ACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGAT GTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGT TCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCA TTTCAGGTGTCGTGA	

TABLA 3. Secuencias de aminoácidos para dominios de unión a ADN (DBD) de ejemplo proporcionados en la presente. Para la DBD, el dedo de zinc modificado (eZF) indica que la construcción tiene la fórmula expuesta en SEQ ID NO: 147 (TABLA 10); EGR1 indica que el DBD se deriva de EGR1 humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 176; TABLA 12); y EGR3 indica

que el DBD se deriva de EGR3 humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 175, TABLA 12). Los sitios diana son las secuencias unidas por la DBD y se proporcionan en la TABLA 4 a continuación.

DBD/Sitio diana	**SECUENCIA**	**SEQ ID NO**
eZF/z1	LEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDELVRHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSQSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTS GHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQNSTLTEHQRTHTGKKTS	77
eZF/z2	LEPGEKPYKCPECGKSFSTKNSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSTKNSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQA GHLASHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTHLDLIRHQRTHTGKKTS	78
eZF/z3	LEPGEKPYKCPECGKSFSQAGHLASHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGNLTEHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSTHLDLIRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQK SSLIAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQAGHLASHQRTHTGKKTS	79
eZF/z4	LEPGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSTSGELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSTSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQS SSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGKKTS	80
eZF/z5	LEPGEKPYKCPECGKSFSSRRTCRAHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSTTGALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDELVRHQRTHTG	81

DBD/Sitio diana	SECUENCIA	SEQ ID NO
	EKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQS GDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSHSLTEHQRTHTGKKTS	
eZF/z6	LEPGEKPYKCPECGKSFSRKDNLKNHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSDPGALVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSDPGALVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTS GELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRKDNLKNHQRTHTGKKTS	82
eZF/z7	LEPGEKPYKCPECGKSFSSKKALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRS DELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGNLTEHQRTHTGEKPY KCPECGKSFSTSGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQNSTLT EHQRTHTGKKTS	83
eZF/z8	LEPGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSRSDELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQS GNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGHLVRHQRTHTGKKTS	84
eZF/z9	LEPGEKPYKCPECGKSFSSKKALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRS DELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGNLTEHQRTHTGKKTS	85
eZF/z10	LEPGEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSRNDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHTG	86

DBD/Sitio diana	SECUENCIA	SEQ ID NO
	EKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDP GNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPY KCPECGKSFSQSSSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHRTTLT NHQRTHTGKKTS	
eZF/z11	LEPGEKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGNLVRHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQS SSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHRTTLTNHQRTHTGKKTS	87
eZF/z12	LEPGEKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGELVRHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSTHLDLIRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSK KALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPY KCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGKKTS	88
eZF/z13	LEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSHRTTLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQS SSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGKKTS	89
eZF/z14	LEPGEKPYKCPECGKSFSDPGALVRHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSTHLDLIRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTS GNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGKKTS	90
eZF/z15	LEPGEKPYKCPECGKSFSRRDELNVHQRTHTGEKPYKCPECGKS	91

DBD/Sitio diana	SECUENCIA	SEQ ID NO
	FSRSDHLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDDLVRHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHR TTLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPY KCPECGKSFSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSSLV RHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGKKTS	
EGR1 / z1	RPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSR EDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDELVRHTKIHLRQKD RPYACPVESCDRRFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFST SGHLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHLRQKD K	92
EGR1 / z13	RPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSH RTTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIHLRQKD RPYACPVESCDRRFSTSHSLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSQ SSSLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIHLRQKD K	93
EGR1 / z15	RPYACPVESCDRRFSRRDELNVHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSR SDHLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDDLVRHTKIHLRQKD RPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSH RTTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIHLRQKD RPYACPVESCDRRFSTSHSLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSQ SSSLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIHLRQKD	94
EGr1 /	RPYACPVESCDRRFSDPGALVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSR	95

DBD/Sitio diana	SECUENCIA	SEQ ID NO
z17	SDNLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQSGDLRRHTKIHLRQKD RPYACPVESCDRRFSTHLDLIRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFST SGNLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDNLVRHTKIHLRQKD RPYACPVESCDRRFSQSGHLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSE RSHLREHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQAGHLASHTKIHLRQKD	
EGR3 / z1	RPHACPAEGCDRRFSRSDNLVRHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSR EDNLHTHIRTHTGEKPFACEFCGRKFARSDELVRHAKIHLKQKE HACPAEGCDRRFSQSGNLTEHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSTSG HLVRHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAQNSTLTEHAKIHLKQKEK	96
EGR3 / z13	RPHACPAEGCDRRFSRSDNLVRHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSH RTTLTNHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAREDNLHTHAKIHLKQKE HACPAEGCDRRFSTSHSLTEHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSQSS SLVRHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAREDNLHTHAKIHLKQKEK	97
EGR3 / z15	RPHACPAEGCDRRFSRRDELNVHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSR SDHLTNHIRTHTGEKPFACEFCGRKFARSDDLVRHAKIHLKQKE HACPAEGCDRRFSRSDNLVRHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSHRT TLTNHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAREDNLHTHAKIHLKQKEHA CPAEGCDRRFSTSHSLTEHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSQSSSL VRHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAREDNLHTHAKIHLKQKEK	98

TABLA 4. Secuencias de sitios diana y ubicación cromosómica para sitios diana de ejemplo unidos por dominios de unión a

ADN descritos en la presente.

Chr 2 Posición de inicio	**Secuencia del sitio diana**	**Sitio diana**	**SEQ ID NO para secuencia de sitio diana**
166149168	ctaggtcaagtgtaggag	z1	18
166149158	acttgacctagacagcct	z2	19
166073978	tgaataactcattagtga	z3	20
166073933	aaagtacattaggctaat	z4	21
166149199	CCAGCACTGGTGCTTCGT	z5	22
166149176	aaggctgtctaggtcaag	z6	23
166149168	CTAGGTCAAGTGTAGGAGACACAC	z7	24
166149165	GGTCAAGTGTAGGAGACA	z8	25
166149162	CAAGTGTAGGAGACACAC	z9	26
166149160	AGTGTAGGAGACACACTGCTGGCC	z10	27
166149160	AGTGTAGGAGACACACTG	z11	28
166149155	AGGAGACACACTGCTGGCCTG	z12	29
166128025	taggtaccatagagtgag	z13	30
166127991	gaggatactgcagaggtc	z14	31
166127999	taggtaccatagagtgaggcgaggatg	z15	32
166127991	atagagtgaggcgaggatgaagccgag	z16	33
166127974	tgaagccgagaggatactgcagaggtc	z17	34

TABLA 5. Secuencias de aminoácidos para dominios de activación transcripcional (TAD) de ejemplo descritos en la presente.

TAD	**SECUENCIA**	**SEQ ID NO**
VPR	DALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDL DMLINSRSSGSPKKKRKVGSQYLPDTDDRHRIEEKRKRTYETFKSIM KKSPFSGPTDPRPPPRRIAVPSRSSASVPKPAPQPYPFTSSLSTINY DEFPTMVFPSGQISQASALAPAPPQVLPQAPAPAPAPAMVSALAQAP APVPVLAPGPPQAVAPPAPKPTQAGEGTLSEALLQLQFDDEDLGALL GNSTDPAVFTDLASVDNSEFQQLLNQGIPVAPHTTEPMLMEYPEAIT RLVTGAQRPPDPAPAPLGAPGLPNGLLSGDEDFSSIADMDFSALLGS GSGSRDSREGMFLPKPEAGSAISDVFEGREVCQPKRIRPFHPPGSPW ANRPLPASLAPTPTGPVHEPVGSLTPAPVPQPLDPAPAVTPEASHLL EDPDEETSQAVKALREMADTVIPQKEEAAICGQMDLSHPPPRGHLDE LTTTLESMTEDLNLDSPLTPELNEILDTFLNDECLLHAMHISTGLSI FDTSLF	132
VP64	DALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDL DML	133
CITED2	MSGLEMADHMMAMNHGRFPDGTNGLHHHPAHRMGMGQFPSPHHHQQQ QPQHAFNALMGEHIHYGAGNMNATSGIRHAMGPGTVNGGHPPSALAP AARFNNSQFMGPPVASQGGSLPASMQLQKLNNQYFNHHPYPHNHYMP DLHPAAGHQMNGTNQHFRDCNPKHSGGSSTPGGSGGSSTPGGSGSSS	134

TAD	SECUENCIA	SEQ ID NO
	GGGAGSSNSGGGSGSGNMPASVAHVPAAMLPPNVIDTDFIDEEVLMSLVIEMGLDRIKELPELWLGQNEFDFMTDFVCKQQPSRVSC	
CITED4	ADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSC	135
CREB3	MELELDAGDQDLLAFLLEESGDLGTAPDEAVRAPLDWALPLSEVPSDWEVDDLLCSLLSPPASLNILSSSNPCLVHHDHTYSLPRETVSMDLESESCRKEGTQMTPQHMEELAEQEIARLVLTDEEKSLLEKEGLILPETLPLTKTEEQILKRVR	224

TABLA 6. Secuencias de aminoácidos para factores de transcripción modificados (DBD + TAD) de ejemplo descritos en la presente.

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
1	MAPKKKRKVGIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHRTTLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGKKTSKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYALEEASGSGRADALDDFDLDMLGSDAL	99

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	DDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLINSRSSG SPKKKRKVGSQYLPDTDDRHRIEEKRKRTYETFKSIMKKSP FSGPTDPRPPPRRIAVPSRSSASVPKPAPQPYPFTSSLSTI NYDEFPTMVFPSGQISQASALAPAPPQVLPQAPAPAPAPAM VSALAQAPAPVPVLAPGPPQAVAPPAPKPTQAGEGTLSEAL LQLQFDDEDLGALLGNSTDPAVFTDLASVDNSEFQQLLNQG IPVAPHTTEPMLMEYPEAITRLVTGAQRPPDPAPAPLGAPG LPNGLLSGDEDFSSIADMDFSALLGSGSGSRDSREGMFLPK PEAGSAISDVFEGREVCQPKRIRPFHPPGSPWANRPLPASL APTPTGPVHEPVGSLTPAPVPQPLDPAPAVTPEASHLLEDP DEETSQAVKALREMADTVIPQKEEAAICGQMDLSHPPPRGH LDELTTTLESMTEDLNLDSPLTPELNEILDTFLNDECLLHA MHISTGLSIFDTSLF	
2	MAPKKKRKVGIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLV RHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSRSDELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGN LTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGHLVRHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSQNSTLTEHQRTHTGKKTSKRPAATKKAGQA KKKKGSYPYDVPDYALEEASGSGRADALDDFDLDMLGSDAL DDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLINSRSSG SPKKKRKVGSQYLPDTDDRHRIEEKRKRTYETFKSIMKKSP FSGPTDPRPPPRRIAVPSRSSASVPKPAPQPYPFTSSLSTI	100

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	NYDEFPTMVFPSGQISQASALAPAPPQVLPQAPAPAPAPAM VSALAQAPAPVPVLAPGPPQAVAPPAPKPTQAGEGTLSEAL LQLQFDDEDLGALLGNSTDPAVFTDLASVDNSEFQQLLNQG IPVAPHTTEPMLMEYPEAITRLVTGAQRPPDPAPAPLGAPG LPNGLLSGDEDFSSIADMDFSALLGSGSGSRDSREGMFLPK PEAGSAISDVFEGREVCQPKRIRPFHPPGSPWANRPLPASL APTPTGPVHEPVGSLTPAPVPQPLDPAPAVTPEASHLLEDP DEETSQAVKALREMADTVIPQKEEAAICGQMDLSHPPPRGH LDELTTTLESMTEDLNLDSPLTPELNEILDTFLNDECLLHA MHISTGLSIFDTSLF	
3	MAPKKKRKVGIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLV RHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHRTTLTNHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSHS LTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSSLVRHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGKKTSKRPAATKKAGQA KKKKGSYPYDVPDYALEDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDML GSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDML	101
4	MAPKKKRKVGIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLV RHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSRSDELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGN LTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGHLVRHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSQNSTLTEHQRTHTGKKTSKRPAATKKAGQA	102

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	KKKKGSYPYDVPDYALEDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDML GSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDML	
5	MAADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGPGL DSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPP PAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAP PPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLG QSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCGGSGGGSGQSQLIKPSRMRK YPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTG QKPFQCRICMRNFSHRTTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKF AREDNLHTHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSTSHSLTEH IRIHTGQKPFQCRICMRNFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACD ICGRKFAREDNLHTHTKIHLRQKDKLEMADHLMLAEGYRLV QRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRGAPLGPPP PRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPY PGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELI DEEALTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPP AGSVSC	103
6	MAADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGPGL DSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPP PAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAP PPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLG QSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCGGSGGGSGQSQLIKPSRMRK	104

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	YPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTG QKPFQCRICMRNFSHRTTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKF AREDNLHTHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSTSHSLTEH IRIHTGQKPFQCRICMRNFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACD ICGRKFAREDNLHTHTKIHLRQKDK	
7	MAADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGPGL DSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPP PAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAP PPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLG QSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCGGSGGGSGQSQLIKPSRMRK YPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTG QKPFQCRICMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKF ARSDELVRHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEH IRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACD ICGRKFAQNSTLTEHTKIHLRQKDKLEMADHLMLAEGYRLV QRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRGAPLGPPP PRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPY PGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELI DEEALTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPP AGSVSC	105
8	MAADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGPGL DSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPP	106

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	PAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAP PPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLG QSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCGGSGGGSGQSQLIKPSRMRK YPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTG QKPFQCRICMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKF ARSDELVRHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEH IRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACD ICGRKFAQNSTLTEHTKIHLRQKDK	
9	MQSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSR SDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSREDNLHTHIRTHTG EKPFACDICGRKFARSDELVRHTKIHLRQKDRPYACPVESC DRRFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRH IRTHTGEKPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHLRQKDKLEM ADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGPGLDS GLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPA AGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAPPP PAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLGQS EFDCFSDLGSAPPAGSVSC	107
10	MQSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSR SDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSREDNLHTHIRTHTG EKPFACDICGRKFARSDELVRHTKIHLRQKDRPYACPVESC DRRFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRH	108

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	IRTHTGEKPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHLRQKDKLEM SGLEMADHMMAMNHGRFPDGTNGLHHHPAHRMGMGQFPSPH HHQQQQPQHAFNALMGEHIHYGAGNMNATSGIRHAMGPGTV NGGHPPSALAPAARFNNSQFMGPPVASQGGSLPASMQLQKL NNQYFNHHPYPHNHYMPDLHPAAGHQMNGTNQHFRDCNPKH SGGSSTPGGSGGSSTPGGSGSSSGGGAGSSNSGGGSGSGNM PASVAHVPAAMLPPNVIDTDFIDEEVLMSLVIEMGLDRIKE LPELWLGQNEFDFMTDFVCKQQPSRVSC	
11	MSGLEMADHMMAMNHGRFPDGTNGLHHHPAHRMGMGQFPSP HHHQQQQPQHAFNALMGEHIHYGAGNMNATSGVRHAMGPGT VNGGHPPSALAPAARFNNSQFMGPPVASQGGSLPASMQLQK LNNQYFNHHPYPHNHYMPDLHPAAGHQMNGTNQHFRDCNPK HSGGSSTPGGSGGSSTPGGSGSSSGGGAGSSNSGGGSGSGN MPASVAHVPAAMLPPNVIDTDFIDEEVLMSLVIEMGLDRIK ELPELWLGQNEFDFMTDFVCKQQPSRVSCQSQLIKPSRMRK YPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTG QKPFQCRICMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKF ARSDELVRHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEH IRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACD ICGRKFAQNSTLTEHTKIHLRQKDK	109
12	MAADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGPGL DSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPP	110

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	PAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAP PPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLG QSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCGGSGGGSGRPHACPAEGCDR RFSRSDNLVRHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSREDNLHTHIR THTGEKPFACEFCGRKFARSDELVRHAKIHLKQKEHACPAE GCDRRFSQSGNLTEHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSTSGHLV RHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAQNSTLTEHAKIHLKQKEKL EMADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGPGL DSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPP PAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAP PPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLG QSEFDCFSDLGSAPPAGSVSC	
13	MRPHACPAEGCDRRFSRSDNLVRHLRIHTGHKPFQCRICMR SFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACEFCGRKFARSDELVRHAK IHLKQKEHACPAEGCDRRFSQSGNLTEHLRIHTGHKPFQCR ICMRSFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAQNSTLT EHAKIHLKQKEKLEMADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPH ALRTLPPYAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFG PPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGG PPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELG LHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSC	111
14	MRPHACPAEGCDRRFSRSDNLVRHLRIHTGHKPFQCRICMR	112

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	SFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACEFCGRKFARSDELVRHAK IHLKQKEHACPAEGCDRRFSQSGNLTEHLRIHTGHKPFQCR ICMRSFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAQNSTLT EHAKIHLKQKEKKAEKGGAPSASSAPPVSLAPVVTTCALEM SGLEMADHMMAMNHGRFPDGTNGLHHHPAHRMGMGQFPSPH HHQQQQPQHAFNALMGEHIHYGAGNMNATSGIRHAMGPGTV NGGHPPSALAPAARFNNSQFMGPPVASQGGSLPASMQLQKL NNQYFNHHPYPHNHYMPDLHPAAGHQMNGTNQHFRDCNPKH SGGSSTPGGSGGSSTPGGSGSSSGGGAGSSNSGGGSGSGNM PASVAHVPAAMLPPNVIDTDFIDEEVLMSLVIEMGLDRIKE LPELWLGQNEFDFMTDFVCKQQPSRVSC	
15	MSGLEMADHMMAMNHGRFPDGTNGLHHHPAHRMGMGQFPSP HHHQQQQPQHAFNALMGEHIHYGAGNMNATSGVRHAMGPGT VNGGHPPSALAPAARFNNSQFMGPPVASQGGSLPASMQLQK LNNQYFNHHPYPHNHYMPDLHPAAGHQMNGTNQHFRDCNPK HSGGSSTPGGSGGSSTPGGSGSSSGGGAGSSNSGGGSGSGN MPASVAHVPAAMLPPNVIDTDFIDEEVLMSLVIEMGLDRIK ELPELWLGQNEFDFMTDFVCKQQPSRVSCRPHACPAEGCDR RFSRSDNLVRHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSREDNLHTHIR THTGEKPFACEFCGRKFARSDELVRHAKIHLKQKEHACPAE GCDRRFSQSGNLTEHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSTSGHLV RHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAQNSTLTEHAKIHLKQKEKK	113

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	AEKGGAPSASSAPPVSLAPVVTTCA	
16	MTGKLAEKLPVTMSSLLNQLPDNLYPEEIPSALNLFSGSSD SVVHYNQMATENVMDIGLTNEKPNPELSYSGSFQPAPGNKT VTYLGKFAFDSPSNWCQDNIISLMSAGILGVPPASGALSTQ TSTASMVQPPQGDVEAMYPALPPYSNCGDLYSEPVSFHDPQ GNPGLAYSPQDYQSAKPALDSNLFPMIPDYNLYHHPNDMGS IPEHKPFQGMDPIRVNPPPITPLETIKAFKDKQIHPGFGSL PQPPLTLKPIRPRKYPNRPSKTPLHERPHACPAEGCDRRFS RRDELNVHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSRSDHLTNHIRTHT GEKPFACEFCGRKFARSDDLVRHAKIHLKQKEHACPAEGCD RRFSRSDNLVRHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSHRTTLTNHI RTHTGEKPFACEFCGRKFAREDNLHTHAKIHLKQKEHACPA EGCDRRFSTSHSLTEHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSQSSSL VRHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAREDNLHTHAKIHLKQKEK KAEKGGAPSASSAPPVSLAPVVTTCA	114
17	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLL SNGAPQFLGAAGAPEGSGSNSSSSSSGGGGGGGGGSNSSSS SSTFNPQADTGEQPYEHLTAESFPDISLNNEKVLVETSYPS QTTRLPPITYTGRFSLEPAPNSGNTLWPEPLFSLVSGLVSM TNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSA APTFPTPNTDIFPEPQSQAFPGSAGTALQYPPPAYPAAKGG FQVPMIPDYLFPQQQGDLGLGTPDQKPFQGLESRTQQPSLT	115

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	PLSTIKAFATQSGSQDLKALNTSYQSQLIKPSRMRKYPNRP SKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQ CRICMRNFSHRTTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDN LHTHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSTSHSLTEHIRIHT GQKPFQCRICMRNFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACDICGRK FAREDNLHTHTKIHLRQKDKKADKSVVASSATSSLSSYPSP VATSYPSPVTTSYPSPATTSYPSPVPTSFSSPGSSTYPSPV HSGFPSPSVATTYSSVPPAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTG LSDMTATFSPRTIEIC	
18	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLL SNGAPQFLGAAGAPEGSGSNSSSSSSGGGGGGGGSNSSSS SSTFNPQADTGEQPYEHLTAESFPDISLNNEKVLVETSYPS QTTRLPPITYTGRFSLEPAPNSGNTLWPEPLFSLVSGLVSM TNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSA APTFPTPNTDIFPEPQSQAFPGSAGTALQYPPPAYPAAKGG FQVPMIPDYLFPQQQGDLGLGTPDQKPFQGLESRTQQPSLT PLSTIKAFATQSGSQDLKALNTSYQSQLIKPSRMRKYPNRP SKTPPHERPYACPVESCDRRFSRRDELNVHIRIHTGQKPFQ CRICMRNFSRSDHLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDD LVRHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHT GQKPFQCRICMRNFSHRTTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRK FAREDNLHTHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSTSHSLTE	116

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	HIRIHTGQKPFQCRICMRNFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFAC DICGRKFAREDNLHTHTKIHLRQKDKKADKSVVASSATSSL SSYPSPVATSYPSPVTTSYPSPATTSYPSPVPTSFSSPGSS TYPSPVHSGFPSPSVATTYSSVPPAFPAQVSSFPSSAVTNS FSASTGLSDMTATFSPRTIEIC	
19	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLL SNGAPQFLGAAGAPEGSGSNSSSSSSGGGGGGGGGSNSSSS SSTFNPQADTGEQPYEHLTAESFPDISLNNEKVLVETSYPS QTTRLPPITYTGRFSLEPAPNSGNTLWPEPLFSLVSGLVSM TNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSA APTFPTPNTDIFPEPQSQAFPGSAGTALQYPPPAYPAAKGG FQVPMIPDYLFPQQQGDLGLGTPDQKPFQGLESRTQQPSLT PLSTIKAFATQSGSQDLKALNTSYQSQLIKPSRMRKYPNRP SKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQ CRICMRNFSHRTTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDN LHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFSTSHSLTEHIRIHTGQKP FQCRICMRNFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFARE DNLHTHTKIHLRQKDKKADKSVVASSATSSLSSYPSPVATS YPSPVTTSYPSPATTSYPSPVPTSFSSPGSSTYPSPVHSGF PSPSVATTYSSVPPAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDM TATFSPRTIEIC	117
20	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLL	115

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	SNGAPQFLGAAGAPEGSGSNSSSSSGGGGGGGGGSNSSSS SSTFNPQADTGEQPYEHLTAESFPDISLNNEKVLVETSYPS QTTRLPPITYTGRFSLEPAPNSGNTLWPEPLFSLVSGLVSM TNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSA APTFPTPNTDIFPEPQSQAFPGSAGTALQYPPPAYPAAKGG FQVPMIPDYLFPQQQGDLGLGTPDQKPFQGLESRTQQPSLT PLSTIKAFATQSGSQDLKALNTSYQSQLIKPSRMRKYPNRP SKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQ CRICMRNFSHRTTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDN LHTHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSTSHSLTEHIRIHT GQKPFQCRICMRNFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACDICGRK FAREDNLHTHTKIHLRQKDKKADKSVVASSATSSLSSYPSP VATSYPSPVTTSYPSPATTSYPSPVPTSFSSPGSSTYPSPV HSGFPSPSVATTYSSVPPAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTG LSDMTATFSPRTIEIC	
21	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLL SNGAPQFLGAAGAPEGSGSNSSSSSGGGGGGGGGSNSSSS SSTFNPQADTGEQPYEHLTAESFPDISLNNEKVLVETSYPS QTTRLPPITYTGRFSLEPAPNSGNTLWPEPLFSLVSGLVSM TNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSA APTFPTPNTDIFPEPQSQAFPGSAGTALQYPPPAYPAAKGG	118

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	FQVPMIPDYLFPQQQGDLGLGTPDQKPFQGLESRTQQPSLT PLSTIKAFATQSGSQDLKALNTSYQSQLIKPSRMRKYPNRP SKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQ CRICMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDE LVRHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEHIRIHT GQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACDICGRK FAQNSTLTEHTKIHLRQKDKKADKSVVASSATSSLSSYPSP VATSYPSPVTTSYPSPATTSYPSPVPTSFSSPGSSTYPSPV HSGFPSPSVATTYSSVPPAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTG LSDMTATFSPRTIEIC	
22	MTGKLAEKLPVTMSSLLNQLPDNLYPEEIPSALNLFSGSSD SVVHYNQMATENVMDIGLTNEKPNPELSYSGSFQPAPGNKT VTYLGKFAFDSPSNWCQDNIISLMSAGILGVPPASGALSTQ TSTASMVQPPQGDVEAMYPALPPYSNCGDLYSEPVSFHDPQ GNPGLAYSPQDYQSAKPALDSNLFPMIPDYNLYHHPNDMGS IPEHKPFQGMDPIRVNPPPITPLETIKAFKDKQIHPGFGSL PQPPLTLKPIRPRKYPNRPSKTPLHERPHACPAEGCDRRFS RSDNLVRHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSHRTTLTNHIRTHT GEKPFACEFCGRKFAREDNLHTHAKIHLKQKEHACPAEGCD RRFSTSHSLTEHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSQSSSLVRHI RTHTGEKPFACEFCGRKFAREDNLHTHAKIHLKQKEKKAEK GGAPSASSAPPVSLAPVVTTCA	119

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
23	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLL SNGAPQFLGAAGAPEGSGSNSSSSSGGGGGGGGGSNSSSS SSTFNPQADTGEQPYEHLTAESFPDISLNNEKVLVETSYPS QTTRLPPITYTGRFSLEPAPNSGNTLWPEPLFSLVSGLVSM TNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSA APTFPTPNTDIFPEPQSQAFPGSAGTALQYPPPAYPAAKGG FQVPMIPDYLFPQQQGDLGLGTPDQKPFQGLESRTQQPSLT PLSTIKAFATQSGSQDLKALNTSYQSQLIKPSRMRKYPNRP SKTPPHERPYACPVESCDRRFSDPGALVRHIRIHTGQKPFQ CRICMRNFSRSDNLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQSGD LRRHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSTHLDLIRHIRIHT GQKPFQCRICMRNFSTSGNLVRHIRTHTGEKPFACDICGRK FARSDNLVRHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGHLTE HIRIHTGQKPFQCRICMRNFSERSHLREHIRTHTGEKPFAC DICGRKFAQAGHLASHTKIHLRQKDKKADKSVVASSATSSL SSYPSPVATSYPSPVTTSYPSPATTSYPSPVPTSFSSPGSS TYPSPVHSGFPSPSVATTYSSVPPAFPAQVSSFPSSAVTNS FSASTGLSDMTATFSPRTIEIC	120
24	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLL SNGAPQFLGAAGAPEGSGSNSSSSSGGGGGGGGGSNSSSS SSTFNPQADTGEQPYEHLTAESFPDISLNNEKVLVETSYPS QTTRLPPITYTGRFSLEPAPNSGNTLWPEPLFSLVSGLVSM	121

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	TNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSA APTFPTPNTDIFPEPQSQAFPGSAGTALQYPPPAYPAAKGG FQVPMIPDYLFPQQQGDLGLGTPDQKPFQGLESRTQQPSLT PLSTIKAFATQSGSQDLKALNTSYQSQLIKPSRMRKYPNRP SKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLTRHIRIHTGQKPFQ CRICMRNFSHSTTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDN RKTHIRTHTGEKPFACDICGRKFSTSHSLTEHIRIHTGQKP FQCRICMRNFSQSSSLTRHIRTHTGEKPFACDICGRKFARS DNRKTHTKIHLRQKDKKADKSVVASSATSSLSSYPSPVATS YPSPVTTSYPSPATTSYPSPVPTSFSSPGSSTYPSPVHSGF PSPSVATTYSSVPPAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDM TATFSPRTIEIC	
25	MTGKLAEKLPVTMSSLLNQLPDNLYPEEIPSALNLFSGSSD SVVHYNQMATENVMDIGLTNEKPNPELSYSGSFQPAPGNKT VTYLGKFAFDSPSNWCQDNIISLMSAGILGVPPASGALSTQ TSTASMVQPPQGDVEAMYPALPPYSNCGDLYSEPVSFHDPQ GNPGLAYSPQDYQSAKPALDSNLFPMIPDYNLYHHPNDMGS IPEHKPFQGMDPIRVNPPPITPLETIKAFKDKQIHPGFGSL PQPPLTLKPIRPRKYPNRPSKTPLHERPHACPAEGCDRRFS RSDNLVRHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSREDNLHTHIRTHT GEKPFACEFCGRKFARSDELVRHAKIHLKQKEHACPAEGCD RRFSQSGNLTEHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSTSGHLVRHI	122

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	RTHTGEKPFACEFCGRKFAQNSTLTEHAKIHLKQKEKKAEK GGAPSASSAPPVSLAPVVTTCA	
26	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLL SNGAPQFLGAAGAPEGSGSNSSSSSGGGGGGGGSNSSSS SSTFNPQADTGEQPYEHLTAESFPDISLNNEKVLVETSYPS QTTRLPPITYTGRFSLEPAPNSGNTLWPEPLFSLVSGLVSM TNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSA APTFPTPNTDIFPEPQSQAFPGSAGTALQYPPPAYPAAKGG FQVPMIPDYLFPQQQGDLGLGTPDQKPFQGLESRTQQPSLT PLSTIKAFATQSGSQDLKALNTSYQSQLIKPSRMRKYPNRP SKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLTRHIRIHTGQKPFQ CRICMRNFSRSDNLTTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDE RKRHIRTHTGEKPFACDICGRKFSQSGNLTEHIRIHTGQKP FQCRICMRNFSTSGHLTRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQS STRKEHTKIHLRQKDKKADKSVVASSATSSLSSYPSPVATS YPSPVTTSYPSPATTSYPSPVPTSFSSPGSSTYPSPVHSGF PSPSVATTYSSVPPAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDM TATFSPRTIEIC	123
27	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLL SNGAPQFLGAAGAPEGSGSNSSSSSGGGGGGGGSNSSSS SSTFNPQADTGEQPYEHLTAESFPDISLNNEKVLVETSYPS QTTRLPPITYTGRFSLEPAPNSGNTLWPEPLFSLVSGLVSM	124

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	TNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSA APTFPTPNTDIFPEPQSQAFPGSAGTALQYPPPAYPAAKGG FQVPMIPDYLFPQQQGDLGLGTPDQKPFQGLESRTQQPSLT PLSTIKAFATQSGSQDLKALNTSYQSQLIKPSRMRKYPNRP SKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQ CRICMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDE LVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFSQSGNLTEHIRIHTGQKP FQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQN STLTEHTKIHLRQKDKKADKSVVASSATSSLSSYPSPVATS YPSPVTTSYPSPATTSYPSPVPTSFSSPGSSTYPSPVHSGF PSPSVATTYSSVPPAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDM TATFSPRTIEIC	
28	MAPKKKRKVGIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSSPADLT RHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDE LVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGNLTEHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSTSGHLVRHQRTHTGKKTSKRPAATKKAGQA KKKKGSYPYDVPDYALEDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDML GSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDML	125
29	MAPKKKRKVGIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSDPGALV RHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTHLD	126

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	LIRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGNLVRHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGKKTSKRPAATKKAGQA KKKKGSYPYDVPDYALEDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDML GSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDML	
30	MAPKKKRKVGIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLV RHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHRTTLTNHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSHS LTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSSLVRHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGKKTSKRPAATKKAGQA KKKKGSYPYDVPDYALEEASGSGRADALDDFDLDMLGSDAL DDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLINSRSSG SPKKKRKVGSQYLPDTDDRHRIEEKRKRTYETFKSIMKKSP FSGPTDPRPPPRRIAVPSRSSASVPKPAPQPYPFTSSLSTI NYDEFPTMVFPSGQISQASALAPAPPQVLPQAPAPAPAPAM VSALAQAPAPVPVLAPGPPQAVAPPAPKPTQAGEGTLSEAL LQLQFDDEDLGALLGNSTDPAVFTDLASVDNSEFQQLLNQG IPVAPHTTEPMLMEYPEAITRLVTGAQRPPDPAPAPLGAPG LPNGLLSGDEDFSSIADMDFSALLGSGSGSRDSREGMFLPK PEAGSAISDVFEGREVCQPKRIRPFHPPGSPWANRPLPASL APTPTGPVHEPVGSLTPAPVPQPLDPAPAVTPEASHLLEDP DEETSQAVKALREMADTVIPQKEEAAICGQMDLSHPPPRGH LDELTTTLESMTEDLNLDSPLTPELNEILDTFLNDECLLHA	99

25

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	MHISTGLSIFDTSLF	
31	MAPKKKRKVGIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLV RHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSRSDELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGN LTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGHLVRHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSQNSTLTEHQRTHTGKKTSKRPAATKKAGQA KKKKGSYPYDVPDYALEDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDML GSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDML	102
32	MAPKKKRKVGIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLV RHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSRSDELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGN LTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGHLVRHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSQNSTLTEHQRTHTGKKTSKRPAATKKAGQA KKKKGSYPYDVPDYALEDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDML GSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDML	102
33	MAPKKKRKVGIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLV RHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSRSDELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGN LTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGHLVRHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSQNSTLTEHQRTHTGKKTSKRPAATKKAGQA KKKKGSYPYDVPDYALEEASGSGRADALDDFDLDMLGSDAL DDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLINSRSSG	100

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	SPKKKRKVGSQYLPDTDDRHRIEEKRKRTYETFKSIMKKSP FSGPTDPRPPPRRIAVPSRSSASVPKPAPQPYPFTSSLSTI NYDEFPTMVFPSGQISQASALAPAPPQVLPQAPAPAPAPAM VSALAQAPAPVPVLAPGPPQAVAPPAPKPTQAGEGTLSEAL LQLQFDDEDLGALLGNSTDPAVFTDLASVDNSEFQQLLNQG IPVAPHTTEPMLMEYPEAITRLVTGAQRPPDPAPAPLGAPG LPNGLLSGDEDFSSIADMDFSALLGSGSGSRDSREGMFLPK PEAGSAISDVFEGREVCQPKRIRPFHPPGSPWANRPLPASL APTPTGPVHEPVGSLTPAPVPQPLDPAPAVTPEASHLLEDP DEETSQAVKALREMADTVIPQKEEAAICGQMDLSHPPPRGH LDELTTTLESMTEDLNLDSPLTPELNEILDTFLNDECLLHA MHISTGLSIFDTSLF	
34	MAPKKKRKVGIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLV RHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSRSDELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGN LTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGHLVRHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSQNSTLTEHQRTHTGKKTSKRPAATKKAGQA KKKKGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLD MLGSDALDDFDLDML	127
35	MAPKKKRKVGIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLV RHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSRSDELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGN	127

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	LTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGHLVRHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSQNSTLTEHQRTHTGKKTSKRPAATKKAGQA KKKKGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLD MLGSDALDDFDLDML	
36	MAADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGPGL DSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPP PAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAP PPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLG QSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCQSQLIKPSRMRKYPNRPSKT PPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRI CMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDELVR HTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEHIRIHTGQK PFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQ NSTLTEHTKIHLRQKDK	128
37	MAADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGPGL DSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPP PAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAP PPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLG QSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCGGSGGGSGQSQLIKPSRMRK YPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTG QKPFQCRICMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKF ARSDELVRHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEH	106

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	IRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACD ICGRKFAQNSTLTEHTKIHLRQKDK	
38	MAADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGPGL DSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPP PAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAP PPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLG QSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCGGSGGGSGGGSGGGSGQSQL IKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLV RHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPFA CDICGRKFARSDELVRHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFS QSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHT GEKPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHLRQKDK	129
39	MAADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGPGL DSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPP PAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAP PPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLG QSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCGGSGGGSGQSQLIKPSRMRK YPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTG QKPFQCRICMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKF ARSDELVRHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEH IRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACD ICGRKFAQNSTLTEHTKIHLRQKDKLEMADHLMLAEGYRLV	105

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	QRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRGAPLGPPP PRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPY PGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELI DEEALTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPP AGSVSC	
40	MAADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGPGL DSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPP PAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAP PPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLG QSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCADHLMLAEGYRLVQRPPSAA AAHGPHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGAL AYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAP PNAPGGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALTS LELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCQ SQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSD NLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSREDNLHTHIRTHTGEK PFACDICGRKFARSDELVRHTKIHLRQKDRPYACPVESCDR RFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIR THTGEKPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHLRQKDK	130
41	MAADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGPGL DSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPP PAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAP	131

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	PPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLG QSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCGGSGGGSGADHLMLAEGYRL VQRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRGAPLGPP PPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATP YPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAEL IDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAP PAGSVSCGGSGGGSGQSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERP YACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFS REDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDELVRHTKIHL RQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRI CMRNFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQNSTLTE HTKIHLRQKDK	
42	MAPKKKRKVGIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLV RHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSRSDELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGN LTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGHLVRHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSQNSTLTEHQRTHTGKKTSKRPAATKKAGQA KKKKGSYPYDVPDYALEDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDML GSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDML	102
43	MAPKKKRKVGIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLV RHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSRSDELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGN	102

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	LTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGHLVRHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSQNSTLTEHQRTHTGKKTSKRPAATKKAGQA KKKKGSYPYDVPDYALEDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDML GSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDML	
44	MAADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGPGL DSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPP PAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAP PPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLG QSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCGGSGGGSGQSQLIKPSRMRK YPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTG QKPFQCRICMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKF ARSDELVRHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEH IRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACD ICGRKFAQNSTLTEHTKIHLRQKDK	106
45	MAADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGPGL DSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPP PAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAP PPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLG QSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCGGSGGGSGQSQLIKPSRMRK YPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTG QKPFQCRICMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKF ARSDELVRHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEH	106

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	IRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACD ICGRKFAQNSTLTEHTKIHLRQKDK	
46	MAADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGPGL DSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPP PAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAP PPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLG QSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCGGSGGGSGGGSGGGSGQSQL IKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLV RHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPFA CDICGRKFARSDELVRHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFS QSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHT GEKPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHLRQKDK	205
47	MAADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGPGL DSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPP PAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAP PPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLG QSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCADHLMLAEGYRLVQRPPSAA AAHGPHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGAL AYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAP PNAPGGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALTS LELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCQ SQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSD	207

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	NLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSREDNLHTHIRTHTGEK PFACDICGRKFARSDELVRHTKIHLRQKDRPYACPVESCDR RFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIR THTGEKPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHLRQKDK	
48	MAADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGPGL DSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPP PAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAP PPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLG QSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCGGSGGGSGADHLMLAEGYRL VQRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRGAPLGPP PPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATP YPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAEL IDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAP PAGSVSCGGSGGGSGQSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERP YACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFS REDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDELVRHTKIHL RQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRI CMRNFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQNSTLTE HTKIHLRQKDK	209
49	MELELDAGDQDLLAFLLEESGDLGTAPDEAVRAPLDWALPL SEVPSDWEVDDLLCSLLSPPASLNILSSSNPCLVHHDHTYS LPRETVSMDLESESCRKEGTQMTPQHMEELAEQEIARLVLT	213

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	DEEKSLLEKEGLILPETLPLTKTEEQILKRVRLEPGEKPYK CPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDN LHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDELVRHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSQSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTS GHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQNSTLTEHQRTHTGK KTSVYVGGLESRVLKYTAQNMELQNKVQLLEEQNLSLLDQL RKLQAMVIEISNKTSSSSTCILVLLVSFCLLLVPAMYSSDT RGSLPAEHGVLSRQLRALPSEDPYQLELPALQSEVPKDSTH QWLDGSDCVLQAPGNTSCLLHYMPQAPSAEPPLEWPFPDLF SEPLCRGPILPLQANLTRKGGWLPTGSPSVILQDRYSG	
50	MELELDAGDQDLLAFLLEESGDLGTAPDEAVRAPLDWALPL SEVPSDWEVDDLLCSLLSPPASLNILSSSNPCLVHHDHTYS LPRETVSMDLESESCRKEGTQMTPQHMEELAEQEIARLVLT DEEKSLLEKEGLILPETLPLTKTEEQILKRVRRPYACPVES CDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSREDNLHT HIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDELVRHTKIHLRQKDRPY ACPVESCDRRFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFST SGHLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHLR QKDVYVGGLESRVLKYTAQNMELQNKVQLLEEQNLSLLDQL RKLQAMVIEISNKTSSSSTCILVLLVSFCLLLVPAMYSSDT RGSLPAEHGVLSRQLRALPSEDPYQLELPALQSEVPKDSTH QWLDGSDCVLQAPGNTSCLLHYMPQAPSAEPPLEWPFPDLF	217

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	SEPLCRGPILPLQANLTRKGGWLPTGSPSVILQDRYSG	
51	MELELDAGDQDLLAFLLEESGDLGTAPDEAVRAPLDWALPL SEVPSDWEVDDLLCSLLSPPASLNILSSSNPCLVHHDHTYS LPRETVSMDLESESCRKEGTQMTPQHMEELAEQEIARLVLT DEEKSLLEKEGLILPETLPLTKTEEQILKRVRRPYACPVES CDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSHRTTLTN HIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIHLRQKDRPY ACPVESCDRRFSTSHSLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSQ SSSLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIHLR QKDVYVGGLESRVLKYTAQNMELQNKVQLLEEQNLSLLDQL RKLQAMVIEISNKTSSSSTCILVLLVSFCLLLVPAMYSSDT RGSLPAEHGVLSRQLRALPSEDPYQLELPALQSEVPKDSTH QWLDGSDCVLQAPGNTSCLLHYMPQAPSAEPPLEWPFPDLF SEPLCRGPILPLQANLTRKGGWLPTGSPSVILQDRYSG	219
52	MELELDAGDQDLLAFLLEESGDLGTAPDEAVRAPLDWALPL SEVPSDWEVDDLLCSLLSPPASLNILSSSNPCLVHHDHTYS LPRETVSMDLESESCRKEGTQMTPQHMEELAEQEIARLVLT DEEKSLLEKEGLILPETLPLTKTEEQILKRVRLEPGEKPYK CPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDN LHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDELVRHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSQSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTS GHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQNSTLTEHQRTHTGK	221

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	KTSVYVGGLESRVLKYTAQNMELQNKVQLLEEQNLSLLDQLRKLQAMVIEIS	
53	MELELDAGDQDLLAFLLEESGDLGTAPDEAVRAPLDWALPLSEVPSDWEVDDLLCSLLSPPASLNILSSSNPCLVHHDHTYSLPRETVSMDLESESCRKEGTQMTPQHMEELAEQEIARLVLTDEEKSLLEKEGLILPETLPLTKTEEQILKRVRRPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDELVRHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHLRQKDVYVGGLESRVLKYTAQNMELQNKVQLLEEQNLSLLDQLRKLQAMVIEIS	223

TABLA 7. Secuencias de ácido nucleico que codifican factores de transcripción modificados de ejemplo descritos en la presente.

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
31 (RE + codificación)	ggaggaagccatcaactaaactacaatgactgtaagatacaaaattgggaatggtaacatattttgaagttctgttgacataaagaatcatgatattaatgcccatggaaatgaaagggcgatcaacactatggtttgaaaaggggga	67

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	aattgtagagcacagatgtgttcgtgtggcagtgtgc tgtctctagcaatactcagagaagagagagaacaatg aaattctgattggccccagtgtgagcccagatgaggt tcagctgccaactttctctttcacatcttatgaaagt catttaagcacaactaactttttttttttttttttt ttttgagacagagtcttgctctgttgcccaggacaga gtgcagtagtgactcaatctcggctcactgcagcctc cacctcctaggctcaaacggtcctcctgcatcagcct cccaagtagctggaattacaggagtggcccaccatgc ccagctaatttttgtatttttaatagatacgggggtt tcaccatatcacccaggctggtctcgaactcctggcc tcaagtgatccacctgcctcggcctcccaaagtgctg ggattataggcgtcagccactatgcccaacccgacca acctttttaaaataaatatttaaaaaattggtattt cacatatatactagtatttacatttatccacacaaaa cggacgggcctccgctgaaccagtgaggccccagacg tgcgcataaataacccctgcgtgctgcaccacctggg gagaggggaggaccacggtaaatggagcgagcgcat agcaaaagggacgcggggtccttttctctgccggtgg cactgggtagctgtggccaggtgtggtactttgatgg ggcccagggctggagctcaaggaagcgtcgcagggtc acagatctgggggaaccccggggaaaagcactgaggc	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	aaaaccgccgctcgtctcctacaatatatgggagggg gaggttgagtacgttctggattactcataagaccttt ttttttccttccgggcgcaaaaccgtgagctggatt tataatcgccctataaagctccagaggcggtcaggca cctgcagaggagccccgccgctccgccgactagctgc ccccgcgagcaacggcctcgtgatttccccgccgatc cggtccccgcctccccactctgcccccgcctaccccg gagccgtgcagccgcctctccgaatctctctcttctc ctggcgctcgcgtgcgagagggaactagcgagaacga ggaagcagctggaggtgacgccgggcagattacgcct gtcagggccgagccgagcggatcgctgggcgctgtgc agaggaaaggcgggagtgcccggctcgctgtcgcaga gccgaggtgggtaagctagcgaccacctggacttccc agcgcccaaccgtggcttttcagccaggtcctctcct cccgcggcttctcaaccaaccccatcccagcgccggc cacccaacctcccgaaatgagtgcttcctgccccagc agccgaaggcgctactaggaacggtaacctgttactt ttccaggggccgtagtcgacccgctgcccgagttgct gtgcgactgcgcgcgcggggctagagtgcaaggtgac tgtggttcttctctggccaagtccgagggagaacgta aagatatgggccttttttccccctctcaccttgtctca ccaaagtccctagtccccggagcagttagcctctttc	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	tttccagggaattagccagacacaacaacgggaacca gacaccgaaccagacatgcccgccccgtgcgccctcc ccgctcgctgcctttcctccctcttgtctctccagag ccggatcttcaaggggagcctccgtgcccccggctgc tcagtccctccggtgtgcaggaccccggaagtcctcc ccgcacagctctcgcttctctttgcagcctgtttctg cgccggaccagtcgaggactctggacagtagaggccc cgggacgaccgagctgGAATTCGCCACCATGGCCCCA AAGAAGAAGCGGAAGGTCGGTATCCACGGAGTCCCAG CAGCCCTCGAACCAGGTGAAAAACCTTACAAATGTCC TGAATGTGGGAAATCATTCAGTCGCAGCGACAACCTG GTGAGACATCAACGCACCCATACAGGAGAAAAACCTT ATAAATGTCCAGAATGTGGAAAGTCCTTCTCACGAGA GGATAACTTGCACACTCATCAACGAACACATACTGGT GAAAAACCATACAAGTGTCCCGAATGTGGTAAAAGTT TTAGCCGGAGCGATGAACTTGTCCGACACCAACGAAC CCATACAGGCGAGAAGCCTTACAAATGTCCCGAGTGT GGCAAGAGCTTCTCACAATCAGGGAATCTGACTGAGC ATCAACGAACTCATACCGGGGAAAAACCTTACAAGTG TCCAGAGTGTGGGAAGAGCTTTTCCACAAGTGGACAT CTGGTACGCCACCAGAGGACACATACAGGGGAGAAGC CCTACAAATGCCCCGAATGCGGTAAAAGTTTCTCTCA	

25

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	GAATAGTACCCTGACCGAACACCAGCGAACACACACT GGGAAAAAAACGAGTAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAA AGGCCGGCCAGGCAAAAAAGAAAAAGGGATCCTACCC ATACGACGTACCAGATTACGCTCTCGAGGACGCGCTG GACGATTTCGATCTCGACATGCTGGGTTCTGATGCCC TCGATGACTTTGACCTGGATATGTTGGGAAGCGACGC ATTGGATGACTTTGATCTGGACATGCTCGGCTCCGAT GCTCTGGACGATTTCGATCTCGATATGTTATAAACTA GTaaagagaccggttcactgtgacagtaaaagagacc ggttcactgtgagaatgaaagagaccggttcactgtg atcggaaaagagaccggttcactgtgagcggccttga aacccagcagacaatgtagctcagtagaaacccagca gacaatgtagctgaatggaaacccagcagacaatgta gcttcggagaaacccagcagacaatgtagctAAGCTT GGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCC TGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCT TGTCCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGAC TAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGG TGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTG TAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGT GCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCT CCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGA	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	GTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGC TAATTTTTGTTTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTCACCA TATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACTCCTAATCTCAGGT GATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTA CAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCCTGTCCTT	
32 (RE + codificación)	ggaggaagccatcaactaaactacaatgactgtaaga tacaaaattgggaatggtaacatattttgaagttctg ttgacataaagaatcatgatattaatgcccatggaaa tgaaagggcgatcaacactatggtttgaaaaggggga aattgtagagcacagatgtgttcgtgtggcagtgtgc tgtctctagcaatactcagagaagagagagaacaatg aaattctgattggccccagtgtgagcccagatgaggt tcagctgccaactttctctttcacatcttatgaaagt catttaagcacaactaacttttttttttttttttt ttttgagacagagtcttgctctgttgcccaggacaga gtgcagtagtgactcaatctcggctcactgcagcctc cacctcctaggctcaaacggtcctcctgcatcagcct cccaagtagctggaattacaggagtggcccaccatgc ccagctaatttttgtatttttaatagatacgggggtt tcaccatatcacccaggctggtctcgaactcctggcc tcaagtgatccacctgcctcggcctcccaaagtgctg ggattataggcgtcagccactatgcccaacccgacca	68

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	acctttttaaaataaatatttaaaaaattggtattt cacatatatactagtatttacatttatccacacaaaa cggacgggcctccgctgaaccagtgaggccccagacg tgcgcataaataacccctgcgtgctgcaccacctggg gagaggggaggaccacggtaaatggagcgagcgcat agcaaaagggacgcggggtccttttctctgccggtgg cactgggtagctgtggccaggtgtggtactttgatgg ggcccagggctggagctcaaggaagcgtcgcagggtc acagatctgggggaaccccggggaaaagcactgaggc aaaaccgccgctcgtctcctacaatatatgggagggg gaggttgagtacgttctggattactcataagaccttt ttttttccttccgggcgcaaaaccgtgagctggatt tataatcgccctataaagctccagaggcggtcaggca cctgcagaggagccccgccgctccgccgactagctgc ccccgcgagcaacggcctcgtgatttccccgccgatc cggtccccgcctccccactctgcccccgcctaccccg gagccgtgcagccgcctctccgaatctctctcttctc ctggcgctcgcgtgcgagagggaactagcgagaacga ggaagcagctggaggtgacgccgggcagattacgcct gtcagggccgagccgagcggatcgctgggcgctgtgc agaggaaaggcgggagtgcccggctcgctgtcgcaga gccgaggtgggtaagctagcgaccacctggacttccc	

25

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	agcgcccaaccgtggcttttcagccaggtcctctcct cccgcggcttctcaaccaaccccatcccagcgccggc cacccaacctcccgaaatgagtgcttcctgccccagc agccgaaggcgctactaggaacggtaacctgttactt ttccaggggccgtagtcgacccgctgcccgagttgct gtgcgactgcgcgcgcggggctagagtgcaaggtgac tgtggttcttctctggccaagtccgagggagaacgta aagatatgggccttttttccccctctcaccttgtctca ccaaagtccctagtccccggagcagttagcctctttc tttccagggaattagccagacacaacaacgggaacca gacaccgaaccagacatgcccgccccgtgcgccctcc ccgctcgctgcctttcctccctcttgtctctccagag ccggatcttcaaggggagcctccgtgcccccggctgc tcagtccctccggtgtgcaggaccccggaagtcctcc ccgcacagctctcgcttctctttgcagcctgtttctg cgccggaccagtcgaggactctggacagtagaggccc cgggacgaccgagctgGAATTCGCCACCATGGCCCCA AAGAAGAAGCGGAAGGTCGGTATCCACGGAGTCCCAG CAGCCCTCGAACCAGGTGAAAAACCTTACAAATGTCC TGAATGTGGGAAATCATTCAGTCGCAGCGACAACCTG GTGAGACATCAACGCACCCATACAGGAGAAAAACCTT ATAAATGTCCAGAATGTGGAAAGTCCTTCTCACGAGA	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	GGATAACTTGCACACTCATCAACGAACACATACTGGT GAAAAACCATACAAGTGTCCCGAATGTGGTAAAAGTT TTAGCCGGAGCGATGAACTTGTCCGACACCAACGAAC CCATACAGGCGAGAAGCCTTACAAATGTCCCGAGTGT GGCAAGAGCTTCTCACAATCAGGGAATCTGACTGAGC ATCAACGAACTCATACCGGGGAAAAACCTTACAAGTG TCCAGAGTGTGGGAAGAGCTTTTCCACAAGTGGACAT CTGGTACGCCACCAGAGGACACATACAGGGGAGAAGC CCTACAAATGCCCCGAATGCGGTAAAAGTTTCTCTCA GAATAGTACCCTGACCGAACACCAGCGAACACACACT GGGAAAAAAACGAGTAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAA AGGCCGGCCAGGCAAAAAAGAAAAAGGGATCCTACCC ATACGACGTACCAGATTACGCTCTCGAGGACGCGCTG GACGATTTCGATCTCGACATGCTGGGTTCTGATGCCC TCGATGACTTTGACCTGGATATGTTGGGAAGCGACGC ATTGGATGACTTTGATCTGGACATGCTCGGCTCCGAT GCTCTGGACGATTTCGATCTCGATATGTTATAAACTA GTAAGCTTGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGT GCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCC ACCAGCCTTGTCCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTT TGTCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTG GAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAG	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	ACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAA GCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAAT CTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAG CCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCA GGCTCAGCTAATTTTTGTTTTTTTGGTAGAGACGGGG TTTCACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACTCCTAA TCTCAGGTGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGC TGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCCTGT CCTT	
33 (RE + codificación)	ggaggaagccatcaactaaactacaatgactgtaaga tacaaaattgggaatggtaacatattttgaagttctg ttgacataaagaatcatgatattaatgcccatggaaa tgaaagggcgatcaacactatggtttgaaaaggggga aattgtagagcacagatgtgttcgtgtggcagtgtgc tgtctctagcaatactcagagaagagagagaacaatg aaattctgattggccccagtgtgagcccagatgaggt tcagctgccaactttctctttcacatcttatgaaagt catttaagcacaactaacttttttttttttttttt ttttgagacagagtcttgctctgttgcccaggacaga gtgcagtagtgactcaatctcggctcactgcagcctc cacctcctaggctcaaacggtcctcctgcatcagcct cccaagtagctggaattacaggagtggcccaccatgc	69

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	ccagctaatttttgtatttttaatagatacgggggtt tcaccatatcacccaggctggtctcgaactcctggcc tcaagtgatccacctgcctcggcctcccaaagtgctg ggattataggcgtcagccactatgcccaacccgacca acctttttttaaaataaatatttaaaaaattggtattt cacatatatactagtatttacatttatccacacaaaa cggacgggcctccgctgaaccagtgaggccccagacg tgcgcataaataacccctgcgtgctgcaccacctggg gagaggggaggaccacggtaaatggagcgagcgcat agcaaaagggacgcggggtccttttctctgccggtgg cactgggtagctgtggccaggtgtggtactttgatgg ggcccagggctggagctcaaggaagcgtcgcagggtc acagatctgggggaaccccggggaaaagcactgaggc aaaaccgccgctcgtctcctacaatatatgggagggg gaggttgagtacgttctggattactcataagacctttt ttttttttccttccgggcgcaaaaccgtgagctggatt tataatcgccctataaagctccagaggcggtcaggca cctgcagaggagccccgccgctccgccgactagctgc ccccgcgagcaacggcctcgtgatttccccgccgatc cggtccccgcctccccactctgcccccgcctaccccg gagccgtgcagccgcctctccgaatctctctcttctc ctggcgctcgcgtgcgagagggaactagcgagaacga	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	ggaagcagctggaggtgacgccgggcagattacgcct gtcagggccgagccgagcggatcgctgggcgctgtgc agaggaaaggcgggagtgcccggctcgctgtcgcaga gccgaggtgggtaagctagcgaccacctggacttccc agcgcccaaccgtggcttttcagccaggtcctctcct cccgcggcttctcaaccaaccccatcccagcgccggc cacccaacctcccgaaatgagtgcttcctgccccagc agccgaaggcgctactaggaacggtaacctgttactt ttccaggggccgtagtcgacccgctgcccgagttgct gtgcgactgcgcgcgcggggctagagtgcaaggtgac tgtggttcttctctggccaagtccgagggagaacgta aagatatgggccttttttccccctctcaccttgtctca ccaaagtccctagtccccggagcagttagcctctttc tttccagggaattagccagacacaacaacgggaacca gacaccgaaccagacatgcccgccccgtgcgccctcc ccgctcgctgcctttcctccctcttgtctctccagag ccggatcttcaaggggagcctccgtgccccccggctgc tcagtccctccggtgtgcaggaccccggaagtcctcc ccgcacagctctcgcttctctttgcagcctgtttctg cgccggaccagtcgaggactctggacagtagaggccc cgggacgaccgagctgGAATTCGCCACCATGGCCCCA AAGAAGAAGCGGAAGGTCGGTATCCACGGAGTCCCAG	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	CAGCCCTCGAACCAGGTGAAAAACCTTACAAATGTCC TGAATGTGGGAAATCATTCAGTCGCAGCGACAACCTG GTGAGACATCAACGCACCCATACAGGAGAAAAACCTT ATAAATGTCCAGAATGTGGAAAGTCCTTCTCACGAGA GGATAACTTGCACACTCATCAACGAACACATACTGGT GAAAAACCATACAAGTGTCCCGAATGTGGTAAAAGTT TTAGCCGGAGCGATGAACTTGTCCGACACCAACGAAC CCATACAGGCGAGAAGCCTTACAAATGTCCCGAGTGT GGCAAGAGCTTCTCACAATCAGGGAATCTGACTGAGC ATCAACGAACTCATACCGGGGAAAAACCTTACAAGTG TCCAGAGTGTGGGAAGAGCTTTTCCACAAGTGGACAT CTGGTACGCCACCAGAGGACACATACAGGGGAGAAGC CCTACAAATGCCCCGAATGCGGTAAAAGTTTCTCTCA GAATAGTACCCTGACCGAACACCAGCGAACACACACT GGGAAAAAAACGAGTAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAA AGGCCGGCCAGGCAAAAAAGAAAAAGGGATCCTACCC ATACGACGTACCAGATTACGCTCTCGAGGAGGCCAGC GGTTCCGGACGGGCTGACGCATTGGACGATTTTGATC TGGATATGCTGGGAAGTGACGCCCTCGATGATTTTGA CCTTGACATGCTTGGTTCGGATGCCCTTGATGACTTT GACCTCGACATGCTCGGCAGTGACGCCCTTGATGATT TCGACCTGGACATGCTGATTAACTCTAGAAGTTCCGG	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	ATCTCCGAAAAAGAAACGCAAAGTTGGTAGCCAGTAC CTGCCCGACACCGACGACCGGCACCGGATCGAGGAAA AGCGGAAGCGGACCTACGAGACATTCAAGAGCATCAT GAAGAAGTCCCCCTTCAGCGGCCCCACCGACCCTAGA CCTCCACCTAGAAGAATCGCCGTGCCCAGCAGATCCA GCGCCAGCGTGCCAAAACCTGCCCCCCAGCCTTACCC CTTCACCAGCAGCCTGAGCACCATCAACTACGACGAG TTCCCTACCATGGTGTTCCCCAGCGGCCAGATCTCTC AGGCCTCTGCTCTGGCTCCAGCCCCTCCTCAGGTGCT GCCTCAGGCTCCTGCTCCTGCACCAGCTCCAGCCATG GTGTCTGCACTGGCTCAGGCACCAGCACCCGTGCCTG TGCTGGCTCCTGGACCTCCACAGGCTGTGGCTCCACC AGCCCCTAAACCTACACAGGCCGGCGAGGGCACACTG TCTGAAGCTCTGCTGCAGCTGCAGTTCGACGACGAGG ATCTGGGAGCCCTGCTGGGAAACAGCACCGATCCTGC CGTGTTCACCGACCTGGCCAGCGTGGACAACAGCGAG TTCCAGCAGCTGCTGAACCAGGGCATCCCTGTGGCCC CTCACACCACCGAGCCCATGCTGATGGAATACCCCGA GGCCATCACCCGGCTCGTGACAGGCGCTCAGAGGCCT CCTGATCCAGCTCCTGCCCCTCTGGGAGCACCAGGCC TGCCTAATGGACTGCTGTCTGGCGACGAGGACTTCAG CTCTATCGCCGATATGGATTTCTCAGCCTTGCTGGGC	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	TCTGGCAGCGGCAGCCGGGATTCCAGGGAAGGGATGT TTTTGCCGAAGCCTGAGGCCGGCTCCGCTATTAGTGA CGTGTTTGAGGGCCGCGAGGTGTGCCAGCCAAAACGA ATCCGGCCATTTCATCCTCCAGGAAGTCCATGGGCCA ACCGCCCACTCCCCGCCAGCCTCGCACCAACACCAAC CGGTCCAGTACATGAGCCAGTCGGGTCACTGACCCCG GCACCAGTCCCTCAGCCACTGGATCCAGCGCCCGCAG TGACTCCCGAGGCCAGTCACCTGTTGGAGGATCCCGA TGAAGAGACGAGCCAGGCTGTCAAAGCCCTTCGGGAG ATGGCCGATACTGTGATTCCCCAGAAGGAAGAGGCTG CAATCTGTGGCCAAATGGACCTTTCCCATCCGCCCCC AAGGGGCCATCTGGATGAGCTGACAACCACACTTGAG TCCATGACCGAGGATCTGAACCTGGACTCACCCCTGA CCCCGGAATTGAACGAGATTCTGGATACCTTCCTGAA CGACGAGTGCCTCTTGCATGCCATGCATATCAGCACA GGACTGTCCATCTTCGACACATCTCTGTTTTAAACTA GTaataaaagatctttattttcattagatctgtgtgt tggtttttgtgtg	
34 (RE + codificación)	ggaggaagccatcaactaaactacaatgactgtaaga tacaaaattgggaatggtaacatattttgaagttctg ttgacataaagaatcatgatattaatgcccatggaaa tgaaagggcgatcaacactatggtttgaaaaggggga	70

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	aattgtagagcacagatgtgttcgtgtggcagtgtgc tgtctctagcaatactcagagaagagagagaacaatg aaattctgattggccccagtgtgagcccagatgaggt tcagctgccaactttctctttcacatcttatgaaagt catttaagcacaactaactttttttttttttttttt ttttgagacagagtcttgctctgttgcccaggacaga gtgcagtagtgactcaatctcggctcactgcagcctc cacctcctaggctcaaacggtcctcctgcatcagcct cccaagtagctggaattacaggagtggcccaccatgc ccagctaatttttgtatttttaatagatacgggggtt tcaccatatcacccaggctggtctcgaactcctggcc tcaagtgatccacctgcctcggcctcccaaagtgctg ggattataggcgtcagccactatgcccaacccgacca acctttttaaaataaatatttaaaaaattggtattt cacatatatactagtatttacatttatccacacaaaa cggacgggcctccgctgaaccagtgaggccccagacg tgcgcataaataacccctgcgtgctgcaccacctggg gagaggggaggaccacggtaaatggagcgagcgcat agcaaaagggacgcggggtccttttctctgccggtgg cactgggtagctgtggccaggtgtggtactttgatgg ggcccagggctggagctcaaggaagcgtcgcagggtc acagatctgggggaaccccggggaaaagcactgaggc	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	aaaaccgccgctcgtctcctacaatatatgggagggg gaggttgagtacgttctggattactcataagaccttt ttttttttccttccgggcgcaaaaccgtgagctggatt tataatcgccctataaagctccagaggcggtcaggca cctgcagaggagccccgccgctccgccgactagctgc ccccgcgagcaacggcctcgtgatttccccgccgatc cggtccccgcctccccactctgcccccgcctaccccg gagccgtgcagccgcctctccgaatctctctcttctc ctggcgctcgcgtgcgagagggaactagcgagaacga ggaagcagctggaggtgacgccgggcagattacgcct gtcagggccgagccgagcggatcgctgggcgctgtgc agaggaaaggcgggagtgcccggctcgctgtcgcaga gccgaggtgggtaagctagcgaccacctggacttccc agcgcccaaccgtggcttttcagccaggtcctctcct cccgcggcttctcaaccaaccccatcccagcgccggc cacccaacctcccgaaatgagtgcttcctgccccagc agccgaaggcgctactaggaacggtaacctgttactt ttccaggggccgtagtcgacccgctgcccgagttgct gtgcgactgcgcgcgcggggctagagtgcaaggtgac tgtggttcttctctggccaagtccgagggagaacgta aagatatgggccttttttccccctctcaccttgtctca ccaaagtccctagtccccggagcagttagcctctttc	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	tttccagggaattagccagacacaacaacgggaacca gacaccgaaccagacatgcccgccccgtgcgccctcc ccgctcgctgcctttcctccctcttgtctctccagag ccggatcttcaaggggagcctccgtgcccccggctgc tcagtccctccggtgtgcaggaccccggaagtcctcc ccgcacagctctcgcttctctttgcagcctgtttctg cgccggaccagtcgaggactctggacagtagaggccc cgggacgaccgagctgGAATTCGCCACCATGGCCCCA AAGAAGAAGCGGAAGGTCGGTATCCACGGAGTCCCAG CAGCCCTCGAACCAGGTGAAAAACCTTACAAATGTCC TGAATGTGGGAAATCATTCAGTCGCAGCGACAACCTG GTGAGACATCAACGCACCCATACAGGAGAAAAACCTT ATAAATGTCCAGAATGTGGAAAGTCCTTCTCACGAGA GGATAACTTGCACACTCATCAACGAACACATACTGGT GAAAAACCATACAAGTGTCCCGAATGTGGTAAAAGTT TTAGCCGGAGCGATGAACTTGTCCGACACCAACGAAC CCATACAGGCGAGAAGCCTTACAAATGTCCCGAGTGT GGCAAGAGCTTCTCACAATCAGGGAATCTGACTGAGC ATCAACGAACTCATACCGGGGAAAAACCTTACAAGTG TCCAGAGTGTGGGAAGAGCTTTTCCACAAGTGGACAT CTGGTACGCCACCAGAGGACACATACAGGGGAGAAGC CCTACAAATGCCCCGAATGCGGTAAAAGTTTCTCTCA	

25

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	GAATAGTACCCTGACCGAACACCAGCGAACACACACT GGGAAAAAAACGAGTAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAA AGGCCGGCCAGGCAAAAAAGAAAAAGGGATCCGACGC GCTGGACGATTTCGATCTCGACATGCTGGGTTCTGAT GCCCTCGATGACTTTGACCTGGATATGTTGGGAAGCG ACGCATTGGATGACTTTGATCTGGACATGCTCGGCTC CGATGCTCTGGACGATTTCGATCTCGATATGTTATAA AAGCTTGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGC CTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCAC CAGCCTTGTCCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTG TCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGA GGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGAC AACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGC TGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCT CCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCC TCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGG CTCAGCTAATTTTTGTTTTTTTGGTAGAGACGGGGTT TCACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACTCCTAATC TCAGGTGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTG GGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCCTGTCC TT	
26 (RE +	ggaggaagccatcaactaaactacaatgactgtaaga	71

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
codificación)	tacaaaattgggaatggtaacatattttgaagttctg ttgacataaagaatcatgatattaatgcccatggaaa tgaaagggcgatcaacactatggtttgaaaaggggga aattgtagagcacagatgtgttcgtgtggcagtgtgc tgtctctagcaatactcagagaagagagagaacaatg aaattctgattggccccagtgtgagcccagatgaggt tcagctgccaactttctctttcacatcttatgaaagt catttaagcacaactaacttttttttttttttttttt ttttgagacagagtcttgctctgttgcccaggacaga gtgcagtagtgactcaatctcggctcactgcagcctc cacctcctaggctcaaacggtcctcctgcatcagcct cccaagtagctggaattacaggagtggcccaccatgc ccagctaatttttgtatttttaatagatacgggggtt tcaccatatcacccaggctggtctcgaactcctggcc tcaagtgatccacctgcctcggcctcccaaagtgctg ggattataggcgtcagccactatgcccaacccgacca acctttttttaaaataaatatttaaaaaattggtattt cacatatatactagtatttacatttatccacacaaaa cggacgggcctccgctgaaccagtgaggccccagacg tgcgcataaataacccctgcgtgctgcaccacctggg gagaggggaggaccacggtaaatggagcgagcgcat agcaaaagggacgcggggtccttttctctgccggtgg	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	cactgggtagctgtggccaggtgtggtactttgatgg ggcccagggctggagctcaaggaagcgtcgcagggtc acagatctgggggaaccccggggaaaagcactgaggc aaaaccgccgctcgtctcctacaatatatgggagggg gaggttgagtacgttctggattactcataagacctttt ttttttccttccgggcgcaaaaccgtgagctggatt tataatcgccctataaagctccagaggcggtcaggca cctgcagaggagccccgccgctccgccgactagctgc ccccgcgagcaacggcctcgtgatttccccgccgatc cggtccccgcctccccactctgcccccgcctaccccg gagccgtgcagccgcctctccgaatctctctcttctc ctggcgctcgcgtgcgagagggaactagcgagaacga ggaagcagctggaggtgacgccgggcagattacgcct gtcagggccgagccgagcggatcgctgggcgctgtgc agaggaaaggcgggagtgcccggctcgctgtcgcaga gccgaggtgggtaagctagcgaccacctggacttccc agcgcccaaccgtggcttttcagccaggtcctctcct cccgcggcttctcaaccaaccccatcccagcgccggc cacccaacctcccgaaatgagtgcttcctgccccagc agccgaaggcgctactaggaacggtaacctgttactt ttccaggggccgtagtcgacccgctgcccgagttgct gtgcgactgcgcgcgcggggctagagtgcaaggtgac	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	tgtggttcttctctggccaagtccgagggagaacgta aagatatgggccttttttccccctctcaccttgtctca ccaaagtccctagtccccggagcagttagcctctttc tttccagggaattagccagacacaacaacgggaacca gacaccgaaccagacatgcccgccccgtgcgccctcc ccgctcgctgcctttcctccctcttgtctctccagag ccggatcttcaaggggagcctccgtgcccccggctgc tcagtccctccggtgtgcaggaccccggaagtcctcc ccgcacagctctcgcttctctttgcagcctgtttctg cgccggaccagtcgaggactctggacagtagaggccc cgggacgaccgagctgGAATTCGCCACCATGGCCCCA AAGAAGAAGCGGAAGGTCGGTATCCACGGAGTCCCAG CAGCCCTCGAACCAGGTGAAAAACCTTACAAATGTCC TGAATGTGGGAAATCATTCAGTCGCAGCGACAACCTG GTGAGACATCAACGCACCCATACAGGAGAAAAACCTT ATAAATGTCCAGAATGTGGAAAGTCCTTCTCACGAGA GGATAACTTGCACACTCATCAACGAACACATACTGGT GAAAAACCATACAAGTGTCCCGAATGTGGTAAAAGTT TTAGCCGGAGCGATGAACTTGTCCGACACCAACGAAC CCATACAGGCGAGAAGCCTTACAAATGTCCCGAGTGT GGCAAGAGCTTCTCACAATCAGGGAATCTGACTGAGC ATCAACGAACTCATACCGGGGAAAAACCTTACAAGTG	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	TCCAGAGTGTGGGAAGAGCTTTTCCACAAGTGGACAT CTGGTACGCCACCAGAGGACACATACAGGGGAGAAGC CCTACAAATGCCCCGAATGCGGTAAAAGTTTCTCTCA GAATAGTACCCTGACCGAACACCAGCGAACACACACT GGGAAAAAAACGAGTAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAA AGGCCGGCCAGGCAAAAAAGAAAAAGGGATCCGACGC GCTGGACGATTTCGATCTCGACATGCTGGGTTCTGAT GCCCTCGATGACTTTGACCTGGATATGTTGGGAAGCG ACGCATTGGATGACTTTGATCTGGACATGCTCGGCTC CGATGCTCTGGACGATTTCGATCTCGATATGTTATAA aaagagaccggttcactgtgacagtaaaagagaccgg ttcactgtgagaatgaaagagaccggttcactgtgat cggaaaagagaccggttcactgtgagcggccttgaaa cccagcagacaatgtagctcagtagaaacccagcaga caatgtagctgaatggaaacccagcagacaatgtagc ttcggagaaacccagcagacaatgtagctAAGCTTGG GTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTG GCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTG TCCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTA GGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTG GTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTA GGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGC	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	AGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCC TGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGT TGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTA ATTTTTGTTTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTCACCATA TTGGCCAGGCTGGTCTCCAACTCCTAATCTCAGGTGA TCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACA GGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCCTGTCCTT	
40 (codificación)	ATGGCCGCAGATCACCTGATGCTGGCTGAAGGCTACA GACTGGTGCAGCGGCCTCCATCTGCCGCTGCCGCCCA CGGCCCCCACGCCCTGAGAACACTGCCCCCCTACGCC GGCCCTGGTCTTGATAGCGGACTCAGACCTAGAGGCG CCCCTCTGGGCCCTCCACCTCCAAGACAGCCTGGAGC CCTGGCCTACGGCGCCTTCGGCCCTCCTTCTAGCTTC CAGCCCTTCCCCGCCGTGCCTCCTCCAGCcGCTGGCA TCGCCCACCTGCAGCCTGTGGCCACCCCTTACCCCGG AAGAGCCGCCGCCCCTCCAAACGCCCCTGGCGGACCT CCTGGCCCCCAGCCTGCTCCAAGCGCCGCTGCCCCTC CACCTCCTGCTCATGCCCTGGGCGGCATGGACGCCGA GCTGATCGACGAGGAAGCCCTGACCAGCCTGGAACTG GAACTGGGCCTGCACAGAGTGCGGGAACTGCCTGAGC TGTTCCTGGGACAGAGCGAGTTCGACTGCTTCAGCGA CCTGGGCAGCGCCCCTCCTGCCGGCTCTGTGTCCTGC	72

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	gccgaccacctgatgctcgccgagggctaccgcctgg tgcagaggccgccgtccgccgccgccgcccatggccc tcatgcgctccggactctgccgccgtacgcgggcccg ggcctggacagtgggctgaggccgcgggggctccgc tggggccgccgccgccccgccaacccggggccctggc gtacggggccttcgggccgccgtcctccttccagccc tttccggccgtgcctccgccggccgcgggcatcgcgc acctgcagcctgtggcgacgccgtaccccggccgcgc Cgccgcgcccccaacgctccgggaggcccccgggc ccgcagccggccccaagcgccgcagccccgccgccgc ccgcgcacgccctgggcggcatggacgccgaactcat cgacgaggaggcgctgacgtcgctggagctggagctg gggctgcaccgcgtgcgcgagctgcccgagctgttcc tgggccagagcgagttcgactgcttctcggacttggg gtccgcgccgcccgccggctccgtgagctgccagtcc cagctcatcaaacccagccgcatgcgcaagtacccca accggcccagcaagacgccccccacgaacgcccttа cgcttgcccagtggagtcctgtgatcgccgcttctcc CGCAGCGACAACCTGGTGAGAcacatccgcatccaca caggccagaagcccttccagtgccgcatctgcatgAG AaacttcagcCGAGAGGATAACTTGCACACTcacatc cgcacccacacaggcgaaaagcccttcgcctgcgaca	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	tctgtggaagaaagtttgccCGGAGCGATGAACTTGT CCGAcataccaagatccacttgcggcagaaggaccgc ccttacgcttgcccagtggagtcctgtgatcgccgct tctccCAATCAGGGAATCTGACTGAGcacatccgcat ccacacaggccagaagcccttccagtgccgcatctgc atgAGAaacttcagcACAAGTGGACATCTGGTACGCc acatccgcacccacacaggcgaaaagcccttcgcctg cgacatctgtggaagaaagtttgccCAGAATAGTACC CTGACCGAAcataccaagatccacttgcggcagaagg acaag	
41 (codificación)	ATGGCCGCAGATCACCTGATGCTGGCTGAAGGCTACA GACTGGTGCAGCGGCCTCCATCTGCCGCTGCCGCCCA CGGCCCCCACGCCCTGAGAACACTGCCCCCCTACGCC GGCCCTGGTCTTGATAGCGGACTCAGACCTAGAGGCG CCCCTCTGGGCCCTCCACCTCCAAGACAGCCTGGAGC CCTGGCCTACGGCGCCTTCGGCCCTCCTTCTAGCTTC CAGCCCTTCCCCGCCGTGCCTCCTCCAGCTGCTGGCA TCGCCCACCTGCAGCCTGTGGCCACCCCTTACCCCGG AAGAGCCGCCGCCCCTCCAAACGCCCCTGGCGGACCT CCTGGCCCCCAGCCTGCTCCAAGCGCCGCTGCCCCTC CACCTCCTGCTCATGCCCTGGGCGGCATGGACGCCGA GCTGATCGACGAGGAAGCCCTGACCAGCCTGGAACTG	73

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	GAACTGGGCCTGCACAGAGTGCGGGAACTGCCTGAGC TGTTCCTGGGACAGAGCGAGTTCGACTGCTTCAGCGA CCTGGGCAGCGCCCCTCCTGCCGGCTCTGTGTCCTGC GGCGGCAGCGGCGGCGGAAGCGGCgccgaccacctga tgctcgccgagggctaccgcctggtgcagaggccgcc gtccgccgccgccgcccatggccctcatgcgctccgg actctgccgccgtacgcgggcccgggcctggacagtg ggctgaggccgcgggggctccgctggggccgccgcc gccccgccaacccggggccctggcgtacggggccttc gggccgccgtcctccttccagccctttccggccgtgc ctccgccggccgcgggcatcgcgcacctgcagcctgt ggcgacgccgtaccccggccgcgcggccgcgccccc aacgctccgggaggccccccgggcccgcagccggccc caagcgccgcagccccgccgccgcccgcgcacgccct gggcggcatggacgccgaactcatcgacgaggaggcg ctgacgtcgctggagctggagctggggctgcaccgcg tgcgcgagctgcccgagctgttcctgggccagagcga gttcgactgcttctcggacttggggtccgcgccgccc gccggctccgtgagctgcggtggttctggtggtggtt ctggtcagtcccagctcatcaaacccagccgcatgcg caagtaccccaaccggcccagcaagacgcccccccac gaacgcccttacgcttgcccagtggagtcctgtgatc	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	gccgcttctccCGCAGCGACAACCTGGTGAGAcacat ccgcatccacacaggccagaagcccttccagtgccgc atctgcatgAGAaacttcagcCGAGAGGATAACTTGC ACACTcacatccgcacccacacaggcgaaaagccctt cgcctgcgacatctgtggaagaaagtttgccCGGAGC GATGAACTTGTCCGAcataccaagatccacttgcggc agaaggaccgcccttacgcttgcccagtggagtcctg tgatcgccgcttctccCAATCAGGGAATCTGACTGAG cacatccgcatccacacaggccagaagcccttccagt gccgcatctgcatgAGAaacttcagcACAAGTGGACA TCTGGTACGCcacatccgcacccacacaggcgaaaag cccttcgcctgcgacatctgtggaagaaagtttgccC AGAATAGTACCCTGACCGAAcataccaagatccactt gcggcagaaggacaag	
42 (RE + codificación)	ggaggaagccatcaactaaactacaatgactgtaaga tacaaaattgggaatggtaacatattttgaagttctg ttgacataaagaatcatgatattaatgcccatggaaa tgaaagggcgatcaacactatggtttgaaaaggggga aattgtagagcacagatgtgttcgtgtggcagtgtgc tgtctctagcaatactcagagaagagagagaacaatg aaattctgattggccccagtgtgagcccagatgaggt tcagctgccaactttctctttcacatcttatgaaagt	74

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	catttaagcacaactaacttttttttttttttttttt ttttgagacagagtcttgctctgttgcccaggacaga gtgcagtagtgactcaatctcggctcactgcagcctc cacctcctaggctcaaacggtcctcctgcatcagcct cccaagtagctggaattacaggagtggcccaccatgc ccagctaatttttgtatttttaatagatacgggggtt tcaccatatcacccaggctggtctcgaactcctggcc tcaagtgatccacctgcctcggcctcccaaagtgctg ggattataggcgtcagccactatgcccaacccgacca acctttttttaaaataaatatttaaaaaattggtattt cacatatatactagtatttacatttatccacacaaaa cggacgggcctccgctgaaccagtgaggccccagacg tgcgcataaataacccctgcgtgctgcaccacctggg gagaggggaggaccacggtaaatggagcgagcgcat agcaaaagggacgcggggtccttttctctgccggtgg cactgggtagctgtggccaggtgtggtactttgatgg ggcccagggctggagctcaaggaagcgtcgcagggtc acagatctgggggaaccccggggaaaagcactgaggc aaaaccgccgctcgtctcctacaatatatgggagggg gaggttgagtacgttctggattactcataagaccttt ttttttccttccgggcgcaaaaccgtgagctggatt tataatcgccctataaagctccagaggcggtcaggca	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	cctgcagaggagccccgccgctccgccgactagctgc ccccgcgagcaacggcctcgtgatttccccgccgatc cggtccccgcctccccactctgcccccgcctaccccg gagccgtgcagccgcctctccgaatctctctcttctc ctggcgctcgcgtgcgagagggaactagcgagaacga ggaagcagctggaggtgacgccgggcagattacgcct gtcagggccgagccgagcggatcgctgggcgctgtgc agaggaaaggcgggagtgcccggctcgctgtcgcaga gccgaggtgggtaagctagcgaccacctggacttccc agcgcccaaccgtggcttttcagccaggtcctctcct cccgcggcttctcaaccaaccccatcccagcgccggc cacccaacctcccgaaatgagtgcttcctgccccagc agccgaaggcgctactaggaacggtaacctgttactt ttccaggggccgtagtcgacccgctgcccgagttgct gtgcgactgcgcgcgcggggctagagtgcaaggtgac tgtggttcttctctggccaagtccgagggagaacgta aagatatgggccttttttccccctctcaccttgtctca ccaaagtccctagtccccggagcagttagcctctttc tttccagggaattagccagacacaacaacgggaacca gacaccgaaccagacatgcccgccccgtgcgccctcc ccgctcgctgcctttcctccctcttgtctctccagag ccggatcttcaaggggagcctccgtgccccccggctgc	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	tcagtccctccggtgtgcaggaccccggaagtcctcc ccgcacagctctcgcttctctttgcagcctgtttctg cgccggaccagtcgaggactctggacagtagaggccc cgggacgaccgagctgGAATTCGCCACCATGGCCCCA AAGAAGAAGCGGAAGGTCGGTATCCACGGAGTCCCAG CAGCCCTCGAACCAGGTGAAAAACCTTACAAATGTCC TGAATGTGGGAAATCATTCAGTCGCAGCGACAACCTG GTGAGACATCAACGCACCCATACAGGAGAAAAACCTT ATAAATGTCCAGAATGTGGAAAGTCCTTCTCACGAGA GGATAACTTGCACACTCATCAACGAACACATACTGGT GAAAAACCATACAAGTGTCCCGAATGTGGTAAAAGTT TTAGCCGGAGCGATGAACTTGTCCGACACCAACGAAC CCATACAGGCGAGAAGCCTTACAAATGTCCCGAGTGT GGCAAGAGCTTCTCACAATCAGGGAATCTGACTGAGC ATCAACGAACTCATACCGGGGAAAAACCTTACAAGTG TCCAGAGTGTGGGAAGAGCTTTTCCACAAGTGGACAT CTGGTACGCCACCAGAGGACACATACAGGGGAGAAGC CCTACAAATGCCCCGAATGCGGTAAAAGTTTCTCTCA GAATAGTACCCTGACCGAACACCAGCGAACACACACT GGGAAAAAAACGAGTAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAA AGGCCGGCCAGGCAAAAAAGAAAAAGGGATCCTACCC ATACGACGTACCAGATTACGCTCTCGAGGACGCGCTG	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	GACGATTTCGATCTCGACATGCTGGGTTCTGATGCCC TCGATGACTTTGACCTGGATATGTTGGGAAGCGACGC ATTGGATGACTTTGATCTGGACATGCTCGGCTCCGAT GCTCTGGACGATTTCGATCTCGATATGTTATAAACTA GTGAAACCCAGCAGACAATGTAGCTAGACCCAGTAGC CAGATGTAGCTAAAGAGACCGGTTCACTGTGAAAGCT TGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTC CTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCC TTGTCCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGA CTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGG GTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCT GTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAG TGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCC TCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCG AGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAG CTAATTTTTGTTTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTCACC ATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACTCCTAATCTCAGG TGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATT ACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCCTGTCCTT	
43 (RE + codificación)	ggaggaagccatcaactaaactacaatgactgtaaga tacaaaattgggaatggtaacatattttgaagttctg ttgacataaagaatcatgatattaatgcccatggaaa	75

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	tgaaagggcgatcaacactatggtttgaaaaggggga aattgtagagcacagatgtgttcgtgtggcagtgtgc tgtctctagcaatactcagagaagagagagaacaatg aaattctgattggccccagtgtgagcccagatgaggt tcagctgccaactttctctttcacatcttatgaaagt catttaagcacaactaacttttttttttttttttt ttttgagacagagtcttgctctgttgcccaggacaga gtgcagtagtgactcaatctcggctcactgcagcctc cacctcctaggctcaaacggtcctcctgcatcagcct cccaagtagctggaattacaggagtggcccaccatgc ccagctaatttttgtatttttaatagatacgggggtt tcaccatatcacccaggctggtctcgaactcctggcc tcaagtgatccacctgcctcggcctcccaaagtgctg ggattataggcgtcagccactatgcccaacccgacca acctttttttaaaataaatatttaaaaaattggtattt cacatatatactagtatttacatttatccacacaaaa cggacgggcctccgctgaaccagtgaggccccagacg tgcgcataaataacccctgcgtgctgcaccacctggg gagaggggaggaccacggtaaatggagcgagcgcat agcaaaagggacgcggggtccttttctctgccggtgg cactgggtagctgtggccaggtgtggtactttgatgg ggcccagggctggagctcaaggaagcgtcgcagggtc	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	acagatctgggggaaccccggggaaaagcactgaggc aaaaccgccgctcgtctcctacaatatatgggagggg gaggttgagtacgttctggattactcataagacctttt ttttttccttccgggcgcaaaaccgtgagctggatt tataatcgccctataaagctccagaggcggtcaggca cctgcagaggagccccgccgctccgccgactagctgc ccccgcgagcaacggcctcgtgatttccccgccgatc cggtccccgcctccccactctgcccccgcctaccccg gagccgtgcagccgcctctccgaatctctctcttctc ctggcgctcgcgtgcgagagggaactagcgagaacga ggaagcagctggaggtgacgccgggcagattacgcct gtcagggccgagccgagcggatcgctgggcgctgtgc agaggaaaggcgggagtgcccggctcgctgtcgcaga gccgaggtgggtaagctagcgaccacctggacttccc agcgcccaaccgtggcttttcagccaggtcctctcct cccgcggcttctcaaccaaccccatcccagcgccggc cacccaacctcccgaaatgagtgcttcctgccccagc agccgaaggcgctactaggaacggtaacctgttactt ttccaggggccgtagtcgacccgctgcccgagttgct gtgcgactgcgcgcgcggggctagagtgcaaggtgac tgtggttcttctctggccaagtccgagggagaacgta aagatatgggccttttttccccctctcaccttgtctca	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	ccaaagtccctagtccccggagcagttagcctctttc tttccagggaattagccagacacaacaacgggaacca gacaccgaaccagacatgcccgccccgtgcgccctcc ccgctcgctgcctttcctccctcttgtctctccagag ccggatcttcaaggggagcctccgtgcccccggctgc tcagtccctccggtgtgcaggaccccggaagtcctcc ccgcacagctctcgcttctctttgcagcctgtttctg cgccggaccagtcgaggactctggacagtagaggccc cgggacgaccgagctgGAATTCGCCACCATGGCCCCA AAGAAGAAGCGGAAGGTCGGTATCCACGGAGTCCCAG CAGCCCTCGAACCAGGTGAAAAACCTTACAAATGTCC TGAATGTGGGAAATCATTCAGTCGCAGCGACAACCTG GTGAGACATCAACGCACCCATACAGGAGAAAAACCTT ATAAATGTCCAGAATGTGGAAAGTCCTTCTCACGAGA GGATAACTTGCACACTCATCAACGAACACATACTGGT GAAAAACCATACAAGTGTCCCGAATGTGGTAAAAGTT TTAGCCGGAGCGATGAACTTGTCCGACACCAACGAAC CCATACAGGCGAGAAGCCTTACAAATGTCCCGAGTGT GGCAAGAGCTTCTCACAATCAGGGAATCTGACTGAGC ATCAACGAACTCATACCGGGGAAAAACCTTACAAGTG TCCAGAGTGTGGGAAGAGCTTTTCCACAAGTGGACAT CTGGTACGCCACCAGAGGACACATACAGGGGAGAAGC	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	CCTACAAATGCCCCGAATGCGGTAAAAGTTTCTCTCA GAATAGTACCCTGACCGAACACCAGCGAACACACACT GGGAAAAAAACGAGTAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAA AGGCCGGCCAGGCAAAAAAGAAAAAGGGATCCTACCC ATACGACGTACCAGATTACGCTCTCGAGGACGCGCTG GACGATTTCGATCTCGACATGCTGGGTTCTGATGCCC TCGATGACTTTGACCTGGATATGTTGGGAAGCGACGC ATTGGATGACTTTGATCTGGACATGCTCGGCTCCGAT GCTCTGGACGATTTCGATCTCGATATGTTATAAACTA GTGAAACCCAGCAGACAATGTAGCTAGACCCAGTAGC CAGATGTAGCTAAAGAGACCGGTTCACTGTGAGAAAC CCAGCAGACAATGTAGCTAGACCCAGTAGCCAGATGT AGCTAAAGAGACCGGTTCACTGTGAAAGCTTGGGTGG CATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCC TGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTGTCCT AATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTG TCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGTAT GGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGC CTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTG GCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCTGGG TTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTTGTT GGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTT	

25

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	TTGTTTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTCACCATATTGG CCAGGCTGGTCTCCAACTCCTAATCTCAGGTGATCTA CCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCG TGAACCACTGCTCCCTTCCCTGTCCTT	
44 (RE + codificación)	ggaggaagccatcaactaaactacaatgactgtaaga tacaaaattgggaatggtaacatattttgaagttctg ttgacataaagaatcatgatattaatgcccatggaaa tgaaagggcgatcaacactatggtttgaaaaggggga aattgtagagcacagatgtgttcgtgtggcagtgtgc tgtctctagcaatactcagagaagagagagaacaatg aaattctgattggccccagtgtgagcccagatgaggt tcagctgccaactttctctttcacatcttatgaaagt catttaagcacaactaacttttttttttttttttt ttttgagacagagtcttgctctgttgcccaggacaga gtgcagtagtgactcaatctcggctcactgcagcctc cacctcctaggctcaaacggtcctcctgcatcagcct cccaagtagctggaattacaggagtggcccaccatgc ccagctaatttttgtatttttaatagatacgggggtt tcaccatatcacccaggctggtctcgaactcctggcc tcaagtgatccacctgcctcggcctcccaaagtgctg ggattataggcgtcagccactatgcccaacccgacca acctttttttaaaataaatatttaaaaaattggtattt	76

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	cacatatatactagtatttacatttatccacacaaaa cggacgggcctccgctgaaccagtgaggccccagacg tgcgcataaataacccctgcgtgctgcaccacctggg gagaggggaggaccacggtaaatggagcgagcgcat agcaaaagggacgcggggtccttttctctgccggtgg cactgggtagctgtggccaggtgtggtactttgatgg ggcccagggctggagctcaaggaagcgtcgcagggtc acagatctgggggaaccccggggaaaagcactgaggc aaaaccgccgctcgtctcctacaatatatgggagggg gaggttgagtacgttctggattactcataagacctttt ttttttccttccgggcgcaaaaccgtgagctggatt tataatcgccctataaagctccagaggcggtcaggca cctgcagaggagccccgccgctccgccgactagctgc ccccgcgagcaacggcctcgtgatttccccgccgatc cggtccccgcctccccactctgcccccgcctaccccg gagccgtgcagccgcctctccgaatctctctcttctc ctggcgctcgcgtgcgagagggaactagcgagaacga ggaagcagctggaggtgacgccgggcagattacgcct gtcagggccgagccgagcggatcgctgggcgctgtgc agaggaaaggcgggagtgcccggctcgctgtcgcaga gccgaggtgggtaagctagcgaccacctggacttccc agcgcccaaccgtggcttttcagccaggtcctctcct	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	cccgcggcttctcaaccaaccccatcccagcgccggc cacccaacctcccgaaatgagtgcttcctgccccagc agccgaaggcgctactaggaacggtaacctgttactt ttccaggggccgtagtcgacccgctgcccgagttgct gtgcgactgcgcgcgcggggctagagtgcaaggtgac tgtggttcttctctggccaagtccgagggagaacgta aagatatgggccttttttccccctctcaccttgtctca ccaaagtccctagtccccggagcagttagcctctttc tttccagggaattagccagacacaacaacgggaacca gacaccgaaccagacatgcccgccccgtgcgccctcc ccgctcgctgcctttcctccctcttgtctctccagag ccggatcttcaaggggagcctccgtgccccccggctgc tcagtccctccggtgtgcaggaccccggaagtcctcc ccgcacagctctcgcttctctttgcagcctgtttctg cgccggaccagtcgaggactctggacagtagaggccc cgggacgaccgagctgGAATTCGCCACCATGGCCgcc gaccacctgatgctcgccgagggctaccgcctggtgc agaggccgccgtccgccgccgccgcccatggccctca tgcgctccggactctgccgccgtacgcgggcccgggc ctggacagtgggctgaggccgcgggggctccgctgg ggccgccgccgccccgccaacccggggccctggcgta cggggccttcgggccgccgtcctccttccagcccttt	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	ccggccgtgcctccgccggccgcgggcatcgcgcacc tgcagcctgtggcgacgccgtaccccggccgcgcggc cgcgcccccaacgctccgggaggcccccgggcccg cagccggccccaagcgccgcagccccgccgccgcccg cgcacgccctgggcggcatggacgccgaactcatcga cgaggaggcgctgacgtcgctggagctggagctgggg ctgcaccgcgtgcgcgagctgcccgagctgttcctgg gccagagcgagttcgactgcttctcggacttggggtc cgcgccgcccgccggctccgtgagctgcggtggttct ggtggtggttctggtcagtcccagctcatcaaaccca gccgcatgcgcaagtaccccaaccggcccagcaagac gccccccacgaacgcccttacgcttgcccagtggag tcctgtgatcgccgcttctccCGCAGCGACAACCTGG TGAGAcacatccgcatccacacaggccagaagcccctt ccagtgccgcatctgcatgAGAaacttcagcCGAGAG GATAACTTGCACACTcacatccgcacccacacaggcg aaaagcccttcgcctgcgacatctgtggaagaaagtt tgccCGGAGCGATGAACTTGTCCGAcataccaagatc cacttgcggcagaaggaccgcccttacgcttgcccag tggagtcctgtgatcgccgcttctccCAATCAGGGAA TCTGACTGAGcacatccgcatccacacaggccagaag cccttccagtgccgcatctgcatgAGAaacttcagcA	

25

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	CAAGTGGACATCTGGTACGCcacatccgcacccacac aggcgaaaagcccttcgcctgcgacatctgtggaaga aagtttgccCAGAATAGTACCCTGACCGAAcatacca agatccacttgcggcagaaggacaagtaaCTCGAGGA AACCCAGCAGACAATGTAGCTAGACCCAGTAGCCAGA TGTAGCTAAAGAGACCGGTTCACTGTGAAAGCTTGGG TGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGG CCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTGT CCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAG GTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGG TATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAG GGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCA GTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCT GGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTT GTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAA TTTTTGTTTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTCACCATAT TGGCCAGGCTGGTCTCCAACTCCTAATCTCAGGTGAT CTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAG GCGTGAACCACTGCTCCCTTCCCTGTCCTT	
45 (RE + codificación)	ggaggaagccatcaactaaactacaatgactgtaaga tacaaaattgggaatggtaacatattttgaagttctg ttgacataaagaatcatgatattaatgcccatggaaa	184

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	tgaaagggcgatcaacactatggtttgaaaaggggga aattgtagagcacagatgtgttcgtgtggcagtgtgc tgtctctagcaatactcagagaagagagagaacaatg aaattctgattggccccagtgtgagcccagatgaggt tcagctgccaactttctctttcacatcttatgaaagt catttaagcacaactaacttttttttttttttttt ttttgagacagagtcttgctctgttgcccaggacaga gtgcagtagtgactcaatctcggctcactgcagcctc cacctcctaggctcaaacggtcctcctgcatcagcct cccaagtagctggaattacaggagtggcccaccatgc ccagctaatttttgtatttttaatagatacgggggtt tcaccatatcacccaggctggtctcgaactcctggcc tcaagtgatccacctgcctcggcctcccaaagtgctg ggattataggcgtcagccactatgcccaacccgacca acctttttttaaaataaatatttaaaaaattggtattt cacatatatactagtatttacatttatccacacaaaa cggacgggcctccgctgaaccagtgaggccccagacg tgcgcataaataacccctgcgtgctgcaccacctggg gagaggggaggaccacggtaaatggagcgagcgcat agcaaaagggacgcggggtccttttctctgccggtgg cactgggtagctgtggccaggtgtggtactttgatgg ggcccagggctggagctcaaggaagcgtcgcagggtc	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	acagatctgggggaaccccggggaaaagcactgaggc aaaaccgccgctcgtctcctacaatatatgggagggg gaggttgagtacgttctggattactcataagacctttt ttttttccttccgggcgcaaaaccgtgagctggatt tataatcgccctataaagctccagaggcggtcaggca cctgcagaggagccccgccgctccgccgactagctgc ccccgcgagcaacggcctcgtgatttccccgccgatc cggtccccgcctccccactctgcccccgcctaccccg gagccgtgcagccgcctctccgaatctctctcttctc ctggcgctcgcgtgcgagagggaactagcgagaacga ggaagcagctggaggtgacgccgggcagattacgcct gtcagggccgagccgagcggatcgctgggcgctgtgc agaggaaaggcgggagtgcccggctcgctgtcgcaga gccgaggtgggtaagctagcgaccacctggacttccc agcgcccaaccgtggcttttcagccaggtcctctcct cccgcggcttctcaaccaaccccatcccagcgccggc cacccaacctcccgaaatgagtgcttcctgccccagc agccgaaggcgctactaggaacggtaacctgttactt ttccaggggccgtagtcgacccgctgcccgagttgct gtgcgactgcgcgcgcggggctagagtgcaaggtgac tgtggttcttctctggccaagtccgagggagaacgta aagatatgggccttttttccccctctcaccttgtctca	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	ccaaagtccctagtccccggagcagttagcctctttc tttccagggaattagccagacacaacaacgggaacca gacaccgaaccagacatgcccgccccgtgcgccctcc ccgctcgctgcctttcctccctcttgtctctccagag ccggatcttcaaggggagcctccgtgccccc ggctgc tcagtccctccggtgtgcaggaccccggaagtcctcc ccgcacagctctcgcttctctttgcagcctgtttctg cgccggaccagtcgaggactctggacagtagaggccc cgggacgaccgagctgGAATTCGCCACCATGGCCgcc gaccacctgatgctcgccgagggctaccgcctggtgc agaggccgccgtccgccgccgcccatggccctca tgcgctccggactctgccgccgtacgcgggcccgggc ctggacagtgggctgaggccgcgggggctccgctgg ggccgccgccgccccgccaacccggggccctggcgta cggggccttcgggccgccgtcctccttccagcccttt ccggccgtgcctccgccggccgcgggcatcgcgcacc tgcagcctgtggcgacgccgtaccccggccgcgcggc cgcgcccccc aacgctccgggaggcccccc gggcccg cagccggccccaagcgccgcagccccgccgccgcccg cgcacgccctgggcggcatggacgccgaactcatcga cgaggaggcgctgacgtcgctggagctggagctgggg ctgcaccgcgtgcgcgagctgcccgagctgttcctgg	

25

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	gccagagcgagttcgactgcttctcggacttggggtc cgcgccgcccgccggctccgtgagctgcggtggttct ggtggtggttctggtcagtcccagctcatcaaaccca gccgcatgcgcaagtaccccaaccggcccagcaagac gccccccacgaacgcccttacgcttgcccagtggag tcctgtgatcgccgcttctccCGCAGCGACAACCTGG TGAGAcacatccgcatccacacaggccagaagccctt ccagtgccgcatctgcatgAGAaacttcagcCGAGAG GATAACTTGCACACTcacatccgcacccacacaggcg aaaagcccttcgcctgcgacatctgtggaagaaagtt tgccCGGAGCGATGAACTTGTCCGAcataccaagatc cacttgcggcagaaggaccgcccttacgcttgcccag tggagtcctgtgatcgccgcttctccCAATCAGGGAA TCTGACTGAGcacatccgcatccacacaggccagaag cccttccagtgccgcatctgcatgAGAaacttcagcA CAAGTGGACATCTGGTACGCcacatccgcacccacac aggcgaaaagcccttcgcctgcgacatctgtggaaga aagtttgccCAGAATAGTACCCTGACCGAAcatacca agatccacttgcggcagaaggacaagtaaCTCGAGGA AACCCAGCAGACAATGTAGCTAGACCCAGTAGCCAGA TGTAGCTAAAGAGACCGGTTCACTGTGAGAAACCCAG CAGACAATGTAGCTAGACCCAGTAGCCAGATGTAGCT	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	AAAGAGACCGGTTCACTGTGAAAGCTTGGGTGGCATC CCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGA AGTTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTGTCCTAATA AAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTGTCCT TCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAG CAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGC GGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCAC AATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCTGGGTTCA AGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGGA TTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTTGT TTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTCACCATATTGGCCAG GCTGGTCTCCAACTCCTAATCTCAGGTGATCTACCCA CCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAA CCACTGCTCCCTTCCCTGTCCTT	
8 (codificación)	ATGGCCgccgaccacctgatgctcgccgagggctacc gcctggtgcagaggccgccgtccgccgccgccgccca tggccctcatgcgctccggactctgccgccgtacgcg ggcccgggcctggacagtgggctgaggccgcgggggg ctccgctggggccgccgccgccccgccaacccggggc cctggcgtacggggccttcgggccgccgtcctccttc cagccctttccggccgtgcctccgccggccgcgggca tcgcgcacctgcagcctgtggcgacgccgtaccccgg	203

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	ccgcgcggccgcgccccccaacgctccgggaggcccc ccgggcccgcagccggccccaagcgccgcagccccgc cgccgcccgcgcacgccctgggcggcatggacgccga actcatcgacgaggaggcgctgacgtcgctggagctg gagctggggctgcaccgcgtgcgcgagctgcccgagc tgttcctgggccagagcgagttcgactgcttctcgga cttggggtccgcgccgcccgccggctccgtgagctgc ggtggttctggtggtggttctggtcagtcccagctca tcaaacccagccgcatgcgcaagtaccccaaccggcc cagcaagacgcccccccacgaacgcccttacgcttgc ccagtggagtcctgtgatcgccgcttctccCGCAGCG ACAACCTGGTGAGAcacatccgcatccacacaggcca gaagcccttccagtgccgcatctgcatgAGAaacttc agcCGAGAGGATAACTTGCACACTcacatccgcaccc acacaggcgaaaagcccttcgcctgcgacatctgtgg aagaaagtttgccCGGAGCGATGAACTTGTCCGAcat accaagatccacttgcggcagaaggaccgcccttacg cttgcccagtggagtcctgtgatcgccgcttctccCA ATCAGGGAATCTGACTGAGcacatccgcatccacaca ggccagaagcccttccagtgccgcatctgcatgAGAa acttcagcACAAGTGGACATCTGGTACGCcacatccg cacccacacaggcgaaaagcccttcgcctgcgacatc	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	tgtggaagaaagtttgccCAGAATAGTACCCTGACCG AAcataccaagatccacttgcggcagaaggacaag	
46 (codificación)	ATGGCCgccgaccacctgatgctcgccgagggctacc gcctggtgcagaggccgccgtccgccgccgccgccca tggccctcatgcgctccggactctgccgccgtacgcg ggcccgggcctggacagtgggctgaggccgcgggggg ctccgctggggccgccgccgccccgccaacccggggc cctggcgtacggggccttcgggccgccgtcctccttc cagccctttccggccgtgcctccgccggccgcgggca tcgcgcacctgcagcctgtggcgacgccgtaccccgg ccgcgcggccgcgccccccaacgctccgggaggcccc ccgggcccgcagccggccccaagcgccgcagccccgc cgccgcccgcgcacgccctgggcggcatggacgccga actcatcgacgaggaggcgctgacgtcgctggagctg gagctggggctgcaccgcgtgcgcgagctgcccgagc tgttcctgggccagagcgagttcgactgcttctcgga cttggggtccgcgccgcccgccggctccgtgagctgc ggtggttctggtggtggttctggtGGTGGCAGCGGGG GAGGTTCTGGTcagtcccagctcatcaaacccagccg catgcgcaagtaccccaaccggcccagcaagacgccc ccccacgaacgcccttacgcttgcccagtggagtcct gtgatcgccgcttctccCGCAGCGACAACCTGGTGAG	204

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	Acacatccgcatccacacaggccagaagcccttccag tgccgcatctgcatgAGAaacttcagcCGAGAGGATA ACTTGCACACTcacatccgcacccacacaggcgaaaa gcccttcgcctgcgacatctgtggaagaaagtttgcc CGGAGCGATGAACTTGTCCGAcataccaagatccact tgcggcagaaggaccgcccttacgcttgcccagtgga gtcctgtgatcgccgcttctccCAATCAGGGAATCTG ACTGAGcacatccgcatccacacaggccagaagccct tccagtgccgcatctgcatgAGAaacttcagcACAAG TGGACATCTGGTACGCcacatccgcacccacacaggc gaaaagcccttcgcctgcgacatctgtggaagaaagt ttgccCAGAATAGTACCCTGACCGAAcataccaagat ccacttgcggcagaaggacaag	
47 (codificación)	ATGGCCGCAGATCACCTGATGCTGGCTGAAGGCTACA GACTGGTGCAGCGGCCTCCATCTGCCGCTGCCGCCCA CGGCCCCCACGCCCTGAGAACACTGCCCCCCTACGCC GGCCCTGGTCTTGATAGCGGACTCAGACCTAGAGGCG CCCCTCTGGGCCCTCCACCTCCAAGACAGCCTGGAGC CCTGGCCTACGGCGCCTTCGGCCCTCCTTCTAGCTTC CAGCCCTTCCCCGCCGTGCCTCCTCCAGCcGCTGGCA TCGCCCACCTGCAGCCTGTGGCCACCCCTTACCCCGG AAGAGCCGCCGCCCCTCCAAACGCCCCTGGCGGACCT	206

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	CCTGGCCCCCAGCCTGCTCCAAGCGCCGCTGCCCCTC CACCTCCTGCTCATGCCCTGGGCGGCATGGACGCCGA GCTGATCGACGAGGAAGCCCTGACCAGCCTGGAACTG GAACTGGGCCTGCACAGAGTGCGGGAACTGCCTGAGC TGTTCCTGGGACAGAGCGAGTTCGACTGCTTCAGCGA CCTGGGCAGCGCCCCTCCTGCCGGCTCTGTGTCCTGC gccgaccacctgatgctcgccgagggctaccgcctgg tgcagaggccgccgtccgccgccgccgcccatggccc tcatgcgctccggactctgccgccgtacgcgggcccg ggcctggacagtgggctgaggccgcgggggctccgc tggggccgccgccgccccgccaacccggggccctggc gtacggggccttcgggccgccgtcctccttccagccc tttccggccgtgcctccgccggccgcgggcatcgcgc acctgcagcctgtggcgacgccgtaccccggccgcgc Cgccgcgccccccaacgctccgggaggcccccgggc ccgcagccggccccaagcgccgcagccccgccgccgc ccgcgcacgccctgggcggcatggacgccgaactcat cgacgaggaggcgctgacgtcgctggagctggagctg gggctgcaccgcgtgcgcgagctgcccgagctgttcc tgggccagagcgagttcgactgcttctcggacttggg gtccgcgccgcccgccggctccgtgagctgccagtcc cagctcatcaaacccagccgcatgcgcaagtacccca	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	accggcccagcaagacgccccccacgaacgccctta cgcttgcccagtggagtcctgtgatcgccgcttctcc CGCAGCGACAACCTGGTGAGAcacatccgcatccaca caggccagaagcccttccagtgccgcatctgcatgAG AaacttcagcCGAGAGGATAACTTGCACACTcacatc cgcacccacacaggcgaaaagcccttcgcctgcgaca tctgtggaagaaagtttgccCGGAGCGATGAACTTGT CCGAcataccaagatccacttgcggcagaaggaccgc ccttacgcttgcccagtggagtcctgtgatcgccgct tctccCAATCAGGGAATCTGACTGAGcacatccgcat ccacacaggccagaagcccttccagtgccgcatctgc atgAGAaacttcagcACAAGTGGACATCTGGTACGCc acatccgcacccacacaggcgaaaagcccttcgcctg cgacatctgtggaagaaagtttgccCAGAATAGTACC CTGACCGAAcataccaagatccacttgcggcagaagg acaag	
48 (codificación)	ATGGCCGCAGATCACCTGATGCTGGCTGAAGGCTACA GACTGGTGCAGCGGCCTCCATCTGCCGCTGCCGCCCA CGGCCCCCACGCCCTGAGAACACTGCCCCCCTACGCC GGCCCTGGTCTTGATAGCGGACTCAGACCTAGAGGCG CCCCTCTGGGCCCTCCACCTCCAAGACAGCCTGGAGC CCTGGCCTACGGCGCCTTCGGCCCTCCTTCTAGCTTC	208

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	CAGCCCTTCCCCGCCGTGCCTCCTCCAGCTGCTGGCA TCGCCCACCTGCAGCCTGTGGCCACCCCTTACCCCGG AAGAGCCGCCGCCCCTCCAAACGCCCCTGGCGGACCT CCTGGCCCCCAGCCTGCTCCAAGCGCCGCTGCCCCTC CACCTCCTGCTCATGCCCTGGGCGGCATGGACGCCGA GCTGATCGACGAGGAAGCCCTGACCAGCCTGGAACTG GAACTGGGCCTGCACAGAGTGCGGGAACTGCCTGAGC TGTTCCTGGGACAGAGCGAGTTCGACTGCTTCAGCGA CCTGGGCAGCGCCCCTCCTGCCGGCTCTGTGTCCTGC GGCGGCAGCGGCGGCGGAAGCGGCgccgaccacctga tgctcgccgagggctaccgcctggtgcagaggccgcc gtccgccgccgccgcccatggccctcatgcgctccgg actctgccgccgtacgcgggcccgggcctggacagtg ggctgaggccgcgggggggctccgctggggccgccgcc gccccgccaacccggggccctggcgtacggggccttc gggccgccgtcctccttccagccctttccggccgtgc ctccgccggccgcgggcatcgcgcacctgcagcctgt ggcgacgccgtaccccggccgcgcggccgcgccccc aacgctccgggaggccccccgggcccgcagccggccc caagcgccgcagccccgccgccgcccgcgcacgccct gggcggcatggacgccgaactcatcgacgaggaggcg ctgacgtcgctggagctggagctggggctgcaccgcg	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	tgcgcgagctgcccgagctgttcctgggccagagcga gttcgactgcttctcggacttggggtccgcgccgccc gccggctccgtgagctgcggtggttctggtggtggtt ctggtcagtcccagctcatcaaacccagccgcatgcg caagtaccccaaccggcccagcaagacgcccccccac gaacgcccttacgcttgcccagtggagtcctgtgatc gccgcttctccCGCAGCGACAACCTGGTGAGAcacat ccgcatccacacaggccagaagcccttccagtgccgc atctgcatgAGAaacttcagcCGAGAGGATAACTTGC ACACTcacatccgcacccacacaggcgaaaagccctt cgcctgcgacatctgtggaagaaagtttgccCGGAGC GATGAACTTGTCCGAcataccaagatccacttgcggc agaaggaccgcccttacgcttgcccagtggagtcctg tgatcgccgcttctccCAATCAGGGAATCTGACTGAG cacatccgcatccacacaggccagaagcccttccagt gccgcatctgcatgAGAaacttcagcACAAGTGGACA TCTGGTACGCcacatccgcacccacacaggcgaaaag cccttcgcctgcgacatctgtggaagaaagtttgccC AGAATAGTACCCTGACCGAAcataccaagatccactt gcggcagaaggacaag	
49 (codificació	atggagctggaattggatgctggtgaccaagacctgc tggccttcctgctagaggaaagtggagatttggggac	212

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
n)	ggcacccgatgaggccgtgagggccccactggactgg gcgctgccgctttctgaggtGccgagcgactgggaag tagatgatttgctgtgctccctgctgagtcccccagc gtcgttgaacattctcagctcctccaacccctgcctt gtccaccatgaccacacctactccctcccacgggaaa ctgtctctatggatctagagagtgagagctgtagaaa agaggggacccagatgactccacagcatatggaggag ctggcagagcaggagattgctaggctagtactgacag atgaggagaagagtctattggagaaggaggggcttat tctgcctgagacacttcctctcactaagacagaggaa caaattctgaaacgtgtgcggCTCGAACCAGGTGAAA AACCTTACAAATGTCCTGAATGTGGGAAATCATTCAG TCGCAGCGACAACCTGGTGAGACATCAACGCACCCAT ACAGGAGAAAAACCTTATAAATGTCCAGAATGTGGAA AGTCCTTCTCACGAGAGGATAACTTGCACACTCATCA ACGAACACATACTGGTGAAAAACCATACAAGTGTCCC GAATGTGGTAAAAGTTTTAGCCGGAGCGATGAACTTG TCCGACACCAACGAACCCATACAGGCGAGAAGCCTTA CAAATGTCCCGAGTGTGGCAAGAGCTTCTCACAATCA GGGAATCTGACTGAGCATCAACGAACTCATACCGGGG AAAAACCTTACAAGTGTCCAGAGTGTGGGAAGAGCTT TTCCACAAGTGGACATCTGGTACGCCACCAGAGGACA	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	CATACAGGGGAGAAGCCCTACAAATGCCCCGAATGCG GTAAAAGTTTCTCTCAGAATAGTACCCTGACCGAACA CCAGCGAACACACACTGGGAAAAAAACGAGTgtgtaC gttgggggtttagagagcCgggtcttgaaatacacag cccagaatatggagcttcagaacaaagtacagcttct ggaggaacagaatttgtcccttctagatcaactgagg aaactccaggccatggtgattgagatCtcaaacaaaa ccagcagcagcagcacctgcatcttggtcctGctagt ctccttctgcctcctccttgtacctgctatgtactcc tctgacacaaggggagcctgccagctgagcatggag tgttgtcccgccagcttcgtgccctccccagtgagga cccttaccagctggagctgcctgccctgcagtcagaa gtgccgaaagacagcacacaccagtggttggacggct cagactgtgtactccaggcccctggcaacacttcctg cctgctgcattacatgcctcaggctcccagtgcagag cctcccctggagtggccCttccctgacctcttctcag agcctctctgccgaggtcccatcctccccctgcaggc aaatctcacaaggaagggaggatggcttcctactggt agcccctctgtcattttgcaggacagatactcaggc	
50 (codificación)	atggagctggaattggatgctggtgaccaagacctgc tggccttcctgctagaggaaagtggagatttggggac ggcacccgatgaggccgtgagggccccactggactgg	216

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	gcgctgccgctttctgaggtGccgagcgactgggaag tagatgatttgctgtgctccctgctgagtcccccagc gtcgttgaacattctcagctcctccaacccctgcctt gtccaccatgaccacacctactccctcccacgggaaa ctgtctctatggatctagagagtgagagctgtagaaa agaggggacccagatgactccacagcatatggaggag ctggcagagcaggagattgctaggctagtactgacag atgaggagaagagtctattggagaaggaggggcttat tctgcctgagacacttcctctcactaagacagaggaa caaattctgaaacgtgtgcggcgcccttacgcttgcc cagtggagtcctgtgatcgccgcttctccCGCAGCGA CAACCTGGTGAGAcacatccgcatccacacaggccag aagcccttccagtgccgcatctgcatgAGAaacttca gcCGAGAGGATAACTTGCACACTcacatccgcaccca cacaggcgaaaagcccttcgcctgcgacatctgtgga agaaagtttgccCGGAGCGATGAACTTGTCCGAcata ccaagatccacttgcggcagaaggaccgcccttacgc ttgcccagtggagtcctgtgatcgccgcttctccCAA TCAGGGAATCTGACTGAGcacatccgcatccacacag gccagaagcccttccagtgccgcatctgcatgAGAaa cttcagcACAAGTGGACATCTGGTACGCcacatccgc acccacacaggcgaaaagcccttcgcctgcgacatct	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	gtggaagaaagtttgccCAGAATAGTACCCTGACCGA AcataccaagatccacttgcggcagaaggacgtgtaC gttgggggtttagagagcCgggtcttgaaatacacag cccagaatatggagcttcagaacaaagtacagcttct ggaggaacagaatttgtcccttctagatcaactgagg aaactccaggccatggtgattgagatCtcaaacaaaa ccagcagcagcagcacctgcatcttggtcctGctagt ctccttctgcctcctccttgtacctgctatgtactcc tctgacacaaggggagcctgccagctgagcatggag tgttgtcccgccagcttcgtgccctccccagtgagga cccttaccagctggagctgcctgccctgcagtcagaa gtgccgaaagacagcacacaccagtggttggacggct cagactgtgtactccaggcccctggcaacacttcctg cctgctgcattacatgcctcaggctcccagtgcagag cctcccctggagtggccCttccctgacctcttctcag agcctctctgccgaggtcccatcctccccctgcaggc aaatctcacaaggaagggaggatggcttcctactggt agcccctctgtcattttgcaggacagatactcaggc	
51 (codificación)	atggagctggaattggatgctggtgaccaagacctgc tggccttcctgctagaggaaagtggagatttggggac ggcacccgatgaggccgtgagggccccactggactgg gcgctgccgctttctgaggtGccgagcgactgggaag	218

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	tagatgatttgctgtgctccctgctgagtcccccagc gtcgttgaacattctcagctcctccaacccctgcctt gtccaccatgaccacacctactccctcccacgggaaa ctgtctctatggatctagagagtgagagctgtagaaa agaggggacccagatgactccacagcatatggaggag ctggcagagcaggagattgctaggctagtactgacag atgaggagaagagtctattggagaaggaggggcttat tctgcctgagacacttcctctcactaagacagaggaa caaattctgaaacgtgtgcggcgcccttacgcttgcc cagtggagtcctgtgatcgccgcttctccCGCTCAGA CAACCTCGTTCGAcacatccgcatccacacaggccag aagcccttccagtgccgcatctgcatgAGAaacttca gcCACCGGACTACACTCACGAACcacatccgcaccca cacaggcgaaaagcccttcgcctgcgacatctgtgga agaaagtttgccAGAGAAGACAATCTCCATACTcata ccaagatccacttgcggcagaaggaccgcccttacgc ttgcccagtggagtcctgtgatcgccgcttctccACC AGCCATTCTCTCACTGAAcacatccgcatccacacag gccagaagcccttccagtgccgcatctgcatgAGAaa cttcagcCAGTCTAGCTCACTGGTGAGGcacatccgc acccacacaggcgaaaagcccttcgcctgcgacatct gtggaagaaagtttgccAGGGAGGATAACCTGCATAC	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	GcataccaagatccacttgcggcagaaggacgtgtaC gttgggggtttagagagcCgggtcttgaaatacacag cccagaatatggagcttcagaacaaagtacagcttct ggaggaacagaatttgtcccttctagatcaactgagg aaactccaggccatggtgattgagatCtcaaacaaaa ccagcagcagcagcacctgcatcttggtcctGctagt ctccttctgcctcctccttgtacctgctatgtactcc tctgacacaaggggagcctgccagctgagcatggag tgttgtcccgccagcttcgtgccctccccagtgagga cccttaccagctggagctgcctgccctgcagtcagaa gtgccgaaagacagcacacaccagtggttggacggct cagactgtgtactccaggcccctggcaacacttcctg cctgctgcattacatgcctcaggctcccagtgcagag cctcccctggagtggccCttccctgacctcttctcag agcctctctgccgaggtcccatcctcccccctgcaggc aaatctcacaaggaagggaggatggcttcctactggt agcccctctgtcattttgcaggacagatactcaggc	
52 (codificación)	atggagctggaattggatgctggtgaccaagacctgc tggccttcctgctagaggaaagtggagatttggggac ggcacccgatgaggccgtgagggccccactggactgg gcgctgccgctttctgaggtGccgagcgactgggaag tagatgatttgctgtgctccctgctgagtcccccagc	220

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	gtcgttgaacattctcagctcctccaacccctgcctt gtccaccatgaccacacctactccctcccacgggaaa ctgtctctatggatctagagagtgagagctgtagaaa agaggggacccagatgactccacagcatatggaggag ctggcagagcaggagattgctaggctagtactgacag atgaggagaagagtctattggagaaggaggggcttat tctgcctgagacacttcctctcactaagacagaggaa caaattctgaaacgtgtgcggCTCGAACCAGGTGAAA AACCTTACAAATGTCCTGAATGTGGGAAATCATTCAG TCGCAGCGACAACCTGGTGAGACATCAACGCACCCAT ACAGGAGAAAAACCTTATAAATGTCCAGAATGTGGAA AGTCCTTCTCACGAGAGGATAACTTGCACACTCATCA ACGAACACATACTGGTGAAAAACCATACAAGTGTCCC GAATGTGGTAAAAGTTTTAGCCGGAGCGATGAACTTG TCCGACACCAACGAACCCATACAGGCGAGAAGCCTTA CAAATGTCCCGAGTGTGGCAAGAGCTTCTCACAATCA GGGAATCTGACTGAGCATCAACGAACTCATACCGGGG AAAAACCTTACAAGTGTCCAGAGTGTGGGAAGAGCTT TTCCACAAGTGGACATCTGGTACGCCACCAGAGGACA CATACAGGGGAGAAGCCCTACAAATGCCCCGAATGCG GTAAAAGTTTCTCTCAGAATAGTACCCTGACCGAACA CCAGCGAACACACACTGGGAAAAAAACGAGTgtgtaC	

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	gttgggggtttagagagcCgggtcttgaaatacacag cccagaatatggagcttcagaacaaagtacagcttct ggaggaacagaatttgtcccttctagatcaactgagg aaactccaggccatggtgattgagatatca	
53 (codificación)	atggagctggaattggatgctggtgaccaagacctgc tggccttcctgctagaggaaagtggagatttggggac ggcacccgatgaggccgtgagggccccactggactgg gcgctgccgctttctgaggtGccgagcgactgggaag tagatgatttgctgtgctccctgctgagtcccccagc gtcgttgaacattctcagctcctccaacccctgcctt gtccaccatgaccacacctactccctcccacgggaaa ctgtctctatggatctagagagtgagagctgtagaaa agaggggacccagatgactccacagcatatggaggag ctggcagagcaggagattgctaggctagtactgacag atgaggagaagagtctattggagaaggaggggcttat tctgcctgagacacttcctctcactaagacagaggaa caaattctgaaacgtgtgcggcgcccttacgcttgcc cagtggagtcctgtgatcgccgcttctccCGCAGCGA CAACCTGGTGAGAcacatccgcatccacacaggccag aagcccttccagtgccgcatctgcatgAGAaacttca gcCGAGAGGATAACTTGCACACTcacatccgcaccca cacaggcgaaaagcccttcgcctgcgacatctgtgga	222

Construcción	Secuencia	SEQ ID NO
	agaaagtttgccCGGAGCGATGAACTTGTCCGAcata ccaagatccacttgcggcagaaggaccgcccttacgc ttgcccagtggagtcctgtgatcgccgcttctccCAA TCAGGGAATCTGACTGAGcacatccgcatccacacag gccagaagcccttccagtgccgcatctgcatgAGAaa cttcagcACAAGTGGACATCTGGTACGCcacatccgc acccacacaggcgaaaagcccttcgcctgcgacatct gtggaagaaagtttgccCAGAATAGTACCCTGACCGA AcataccaagatccacttgcggcagaaggacgtgtaC gttgggggtttagagagcCgggtcttgaaatacacag cccagaatatggagcttcagaacaaagtacagcttct ggaggaacagaatttgtcccttctagatcaactgagg aaactccaggccatggtgattgagatCtca	

TABLA 8. Secuencias de ácido nucleico para sitios de unión de microARN y microARN de ejemplo.

Descrip-ción	SECUENCIA	SEQ ID NO
Sitio de unión M1	aaagagaccggttcactgtgacagtaaaagagaccggttca ctgtgagaatgaaagagaccggttcactgtgatcggaaaag agaccggttcactgtgagcggccttgaaacccagcagacaa tgtagctcagtagaaacccagcagacaatgtagctgaatgg	7

Descrip-ción	**SECUENCIA**	**SEQ ID NO**
	aaacccagcagacaatgtagcttcggagaaacccagcagacaatgtagct	
secuencia miR128	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	8
sitio de unión de miR128	AAAGAGACCGGTTCACTGTGA	9
secuencia miR221	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC	10
sitio de unión de miR221	GAAACCCAGCAGACAATGTAGCT	11
secuencia miR222	AGCUACAUCUGGCUACUGGGUCU	12
sitio de unión de miR222	AGACCCAGTAGCCAGATGTAGCT	13
Sitio de unión M2	GAAACCCAGCAGACAATGTAGCTAGACCCAGTAGCCAGATGTAGCTAAAGAGACCGGTTCACTGTGA	14
Sitio de unión M3	GAAACCCAGCAGACAATGTAGCTAGACCCAGTAGCCAGATGTAGCTAAAGAGACCGGTTCACTGTGAGAAACCCAGCAGACAATGTAGCTAGACCCAGTAGCCAGATGTAGCTAAAGAGACCG	15

Descrip-ción	**SECUENCIA**	**SEQ ID NO**
	GTTCACTGTGA	

TABLA 9. Diferentes tipos de estructuras de dedos de zinc y ejemplos de proteínas de dedos de zinc para generar eTF.

Nombre de tipo ZF	**SEQ ID NO**	**Estructura ZF (en donde cada x puede ser independientemente cualquier residuo)**	**Proteínas de ejemplo que pueden servir como la plataforma de proteínas para un eTF o un dominio de unión a ADN de un eTF descrito en la presente**
Dedos de zinc tipo C2H2 (ZNF)	136	C-x-C-x-H-x-H	KLF4, KLF5, EGR3, ZFP637, SLUG, ZNF750, ZNF281, ZBP89, GLIS1, GLIS3
Proteínas de dedo de anillo (RNF)	137	C-x-C-x-C-x-H-xxx-C-x-C-x-C-x-C	MDM2, BRCA1, ZNF179
Proteínas de dedo PHD (PHF)	138	C-x-C-x-C-x-C-xxx-H-x-C-x-C-x-C	KDM2A, PHF1, ING1
LIM que contiene el	139	C-x-C-x-H-x-C-x-C-x-C-x-C-x-C-x-(C,H,D)	ZNF185, LIMK1, PXN

Nombre de tipo ZF	SEQ ID NO	Estructura ZF (en donde cada x puede ser independientemente cualquier residuo)	Proteínas de ejemplo que pueden servir como la plataforma de proteínas para un eTF o un dominio de unión a ADN de un eTF descrito en la presente
dominio			
Receptores de hormonas nucleares (NR)	140	C-x-C-x-C-x-C-xxx-C-x-C-x-C-x-C	VDR, ESR1, NR4A1
Dedos de zinc tipo CCCH (ZC3H)	141	C-x-C-x-C-x-H	RC3H1, HELZ, MBNL1, ZFP36, ZFP36L1
Dedos de zinc tipo FYVE (ZFYVE)	140	C-x-C-x-C-x-C-xxx-C-x-C-x-C-x-C	EEA1, HGS, PIKFYVE
Dedos de zinc tipo CCHC (ZCCHC)	142	C-x-C-x-H-x-C	CN BP, SF1, LIN28A
Dedos de zinc tipo DHHC	143	C-x-C-x-H-x-C-xxx-C-x-C-x-H-x-C	ZDHHC2, ZDHHC8, ZDHHC9

Nombre de tipo ZF	SEQ ID NO	Estructura ZF (en donde cada x puede ser independientemente cualquier residuo)	Proteínas de ejemplo que pueden servir como la plataforma de proteínas para un eTF o un dominio de unión a ADN de un eTF descrito en la presente
(ZDHHC)			
Dedos de zinc tipo MYND (ZMYND)	144	C-x-C-x-C-x-C-xxx-C-x-C-x-H-x-C	PDCD2, RUNX1T1, SMYD2, SMYD1
Dedos de zinc tipo CCCH (ZCCHC)	145	C-x-C-x-C-x-C	YAF2, SHARPIN, EWSR1
Dedos de zinc tipo ZZ (ZZZ)	145	C-x-C-x-C-x-C	HERC2, NBR1, CREBBP
Dedos de zinc tipo C2HC (ZC2HC)	142	C-x-C-x-H-x-C	IKBKG, L3MBTL1, ZNF746
Dominio de dedos de zinc GATA	145	C-x-C-x-C-x-C	GATA4, GATA6, MTA1

Nombre de tipo ZF	SEQ ID NO	Estructura ZF (en donde cada x puede ser independientemente cualquier residuo)	Proteínas de ejemplo que pueden servir como la plataforma de proteínas para un eTF o un dominio de unión a ADN de un eTF descrito en la presente
que contiene (GATAD)			
Pseudogenes y homeoboxes clase ZF	136	C-x-C-x-H-x-H	ADNP, ZEB1, ZHX1
Dominio THAP que contiene (THAP)	141	C-x-C-x-C-x-H	THAP1, THAP4, THAP11
Dedos de zinc tipo CXXC (CXXC)	140	C-x-C-x-C-x-C-xxx-C-x-C-x-C-x-C	CXXC1, CXXC5, MBD1, DNMT1
Dedos de zinc tipo SWIM (ZSWIM)	141	C-x-C-x-C-x-H	MAP3K1, ZSWIM5, ZSWIM6
Dedos de	146	C-x-C-x-C-x-C-xxx-	ZFAND3, ZFAND6,

Nombre de tipo ZF	SEQ ID NO	Estructura ZF (en donde cada x puede ser independientemente cualquier residuo)	Proteínas de ejemplo que pueden servir como la plataforma de proteínas para un eTF o un dominio de unión a ADN de un eTF descrito en la presente
zinc tipo AN1 (ZFAND)		C-x-H-x-H-x-C	IGHMBP2
Dedos de zinc tipo 3CxxC (Z3CXXC)	142	C-x-C-x-H-x-C	ZAR1, RTP1, RTP4
Dedos de zinc tipo CW (ZCW)	145	C-x-C-x-C-x-C	MORC1, ZCWPW1, KDM1B
Dedos de zinc tipo GRF (ZGRF)	145	C-x-C-x-C-x-C	TTF2, NEIL3, TOP3A
Dedos de zinc tipo MIZ (ZMIZ)	142	C-x-C-x-H-x-C	PIAS1, PIAS3, PIAS4
Dedos de zinc tipo BED (ZBED)	136	C-x-C-x-H-x-H	ZBED1, ZBED4, ZBED6
Dedos de	144	C-x-C-x-C-x-C-xxx-	ZNHIT3, DDX59,

Nombre de tipo ZF	SEQ ID NO	Estructura ZF (en donde cada x puede ser independientemente cualquier residuo)	Proteínas de ejemplo que pueden servir como la plataforma de proteínas para un eTF o un dominio de unión a ADN de un eTF descrito en la presente
zinc tipo HIT (ZNHIT)		C-x-C-x-H-x-C	INO80B
Dedos de zinc tipo MYM (ZMYM)	145	C-x-C-x-C-x-C	ZMYM2, ZMYM3, ZMYM4
Dedos de zinc tipo matrin (ZMAT)	136	C-x-C-x-H-x-H	ZNF638, ZMAT1, ZMAT3, ZMAT5
Dedos de zinc tipo C2H2C	136	C-x-C-x-H-x-H	MYT1, MYT1L, ST18
Dedos de zinc tipo DBF (ZDBF)	136	C-x-C-x-H-x-H	DBF4, DBF4B, ZDBF2
Dedos de zinc tipo PARP	142	C-x-C-x-H-x-C	LIG3, PARP1

TABLA 10. Secuencias de aminoácidos para dominios de unión de

ADN de dedo de zinc de ejemplo.

DBD/Sitio diana	**SECUENCIA**	**SEQ ID NO**
eZF	LEPGEKP – [YKCPECGKSFS X HQRTH TGEKP]n – YKCPECGKSFS X HQRTH - TGKKTS, en donde n es un número entero de 1-15, y cada X es una secuencia de reconocimiento capaz de unirse a 3 pb de la secuencia diana	147
Z1 Sitio diana	RSDNLVR x REDNLHT x RSDELVR x QSGNLTE x TSGHLVR x QNSTLTE, en donde cada x es un ligador que comprende 1-50 residuos de aminoácido	148
Z13 Sitio diana	RSDNLVR x HRTTLTN x REDNLHT x TSHSLTE x QSSSLVR x REDNLHT, en donde cada x es un ligador que comprende 1-50 residuos de aminoácido	149
Z14 Sitio diana	DPGALVR x RSDNLVR x QSGDLRR x THLDLIR x TSGNLVR x RSDNLVR, en donde cada x es un ligador que comprende 1-50 residuos de aminoácido	150
Z15 Sitio diana	RRDELNV x RSDHLTN x RSDDLVR x RSDNLVR x HRTTLTN x REDNLHT x TSHSLTE x QSSSLVR x REDNLHT, en donde cada x es un ligador que comprende 1-50 residuos de aminoácido	151

TABLA 11. Secuencias de aminoácidos para secuencias de reconocimiento de dedo de zinc de ejemplo descritas en la presente.

SECUENCIA	**SEQ ID NO**
RSDNLVR	152
REDNLHT	153
RSDELVR	154
QSGNLTE	155
TSGHLVR	156
QNSTLTE	157
DPGALVR	158
HRTTLTN	159
QSGDLRR	160
TSHSLTE	161
THLDLIR	162
QSSSLVR	163
TSGNLVR	164
RRDELNV	165
RSDDLVR	166
RSDHLTN	167

TABLA 12. Otra secuencia de nucleótidos y aminoácidos

descrita en la presente.

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO
Dominio NLS EGR1	LIKPSRMRKYPNRPSK	168
SV40 NLS	PKKKRKV	169
Nucleoplasmina NLS	KRPAATKKAGQAKKKK	170
Tag HA	YPYDVPDYA	171
spA (poliA sintética)	AATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCGGACCGCACGTG	16
hGH (hormona de crecimiento humana poliA)	GGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTGTCCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTCACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACTCCTAATCTCAGGTGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCCTGTCCTT	17
Proteína	MEQTVLVPPGPDSFNFFTRESLAAIERRIAEEKAKNPKPDKKD	172

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO
SCN1A	DDENGPKPNSDLEAGKNLPFIYGDIPPEMVSEPLEDLDPYYIN KKTFIVLNKGKAIFRFSATSALYILTPFNPLRKIAIKILVHSL FSMLIMCTILTNCVFMTMSNPPDWTKNVEYTFTGIYTFESLIK IIARGFCLEDFTFLRDPWNWLDFTVITFAYVTEFVDLGNVSAL RTFRVLRALKTISVIPGLKTIVGALIQSVKKLSDVMILTVFCL SVFALIGLQLFMGNLRNKCIQWPPTNASLEEHSIEKNITVNYN GTLINETVFEFDWKSYIQDSRYHYFLEGFLDALLCGNSSDAGQ CPEGYMCVKAGRNPNYGYTSFDTFSWAFLSLFRLMTQDFWENL YQLTLRAAGKTYMIFFVLVIFLGSFYLINLILAVVAMAYEEQN QATLEEAEQKEAEFQQMIEQLKKQQEAAQQAATATASEHSREP SAAGRLSDSSSEASKLSSKSAKERRNRRKKRKQKEQSGGEEKD EDEFQKSESEDSIRRKGFRFSIEGNRLTYEKRYSSPHQSLLSI RGSLFSPRRNSRTSLFSFRGRAKDVGSENDFADDEHSTFEDNE SRRDSLFVPRRHGERRNSNLSQTSRSSRMLAVFPANGKMHSTV DCNGVVSLVGGPSVPTSPVGQLLPEVIIDKPATDDNGTTTETE MRKRRSSSFHVSMDFLEDPSQRQRAMSIASILTNTVEELEESR QKCPPCWYKFSNIFLIWDCSPYWLKVKHVVNLVVMDPFVDLAI TICIVLNTLFMAMEHYPMTDHFNNVLTVGNLVFTGIFTAEMFL KIIAMDPYYYFQEGWNIFDGFIVTLSLVELGLANVEGLSVLRS FRLLRVFKLAKSWPTLNMLIKIIGNSVGALGNLTLVLAIIVFI FAVVGMQLFGKSYKDCVCKIASDCQLPRWHMNDFFHSFLIVFR VLCGEWIETMWDCMEVAGQAMCLTVFMMVMVIGNLVVLNLFLA LLLSSFSADNLAATDDDNEMNNLQIAVDRMHKGVAYVKRKIYE	

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO
	FIQQSFIRKQKILDEIKPLDDLNNKKDSCMSNHTAEIGKDLDY LKDVNGTTSGIGTGSSVEKYIIDESDYMSFINNPSLTVTVPIA VGESDFENLNTEDFSSESDLEESKEKLNESSSSSEGSTVDIGA PVEEQPVVEPEETLEPEACFTEGCVQRFKCCQINVEEGRGKQW WNLRRTCFRIVEHNWFETFIVFMILLSSGALAFEDIYIDQRKT IKTMLEYADKVFTYIFILEMLLKWVAYGYQTYFTNAWCWLDFL IVDVSLVSLTANALGYSELGAIKSLRTLRALRPLRALSRFEGM RVVVNALLGAIPSIMNVLLVCLIFWLIFSIMGVNLFAGKFYHC INTTTGDRFDIEDVNNHTDCLKLIERNETARWKNVKVNFDNVG FGYLSLLQVATFKGWMDIMYAAVDSRNVELQPKYEESLYMYLY FVIFIIFGSFFTLNLFIGVIIDNFNQQKKKFGGQDIFMTEEQK KYYNAMKKLGSKKPQKPIPRPGNKFQGMVFDFVTRQVFDISIM ILICLNMVTMMVETDDQSEYVTTILSRINLVFIVLFTGECVLK LISLRHYYFTIGWNIFDFVVVILSIVGMFLAELIEKYFVSPTL FRVIRLARIGRILRLIKGAKGIRTLLFALMMSLPALFNIGLLL FLVMFIYAIFGMSNFAYVKREVGIDDMFNFETFGNSMICLFQI TTSAGWDGLLAPILNSKPPDCDPNKVNPGSSVKGDCGNPSVGI FFFVSYIIISFLVVVNMYIAVILENFSVATEESAEPLSEDDFE MFYEVWEKFDPDATQFMEFEKLSQFAAALEPPLNLPQPNKLQL IAMDLPMVSGDRIHCLDILFAFTKRVLGESGEMDALRIQMEER FMASNPSKVSYQPITTTLKRKQEEVSAVIIQRAYRRHLLKRTV KQASFTYNKNKIKGGANLLIKEDMIIDRINENSITEKTDLTMS TAACPPSYDRVTKPIVEKHEQEGKDEKAKGK	

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO
proteína dCAS	KRNYILGLAIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENN EGRRSKRGARRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGIN PYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGN ELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKT SDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPG EGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNAL NDLNNLVITRDENEKLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKE ILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIENA ELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISNLKG YTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLS QQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDI IIELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENA KYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIP RSVSFDNSFNNKVLVKQEEASKKGNRTPFQYLSSSDSKISYET FKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNL VDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWK FKKERNKGYKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQM FEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRV DKKPNRELINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLKK LINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYYEET GNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKV VKLSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCY EEAKKLKKISNQAEFIASFYNNDLIKINGELYRVIGVNNDLLN	173

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO
	RIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPRIIKTIASKTQSIKKYSTD ILGNLYEVKSKKHPQIIKKG	
construcción dCAS9-VP64	MAPKKKRKVGIHGVPAAKRNYILGLAIGITSVGYGIIDYETRD VIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRRRRHRIQRVKKL LFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLA KRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLE RLKKDGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFID TYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPE ELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYYEKFQIIE NVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKV YHDIKDITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNL NSELTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQ IAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQS IKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQ TNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPL EDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEEASKKGNR TPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEE RDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVK VKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAEDALIIANADFIF KEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPH QIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRELINDTLYSTRKDDKGNTLI VNNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIM EQYGDEKNPLYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKL	174

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO
	NAHLDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKN LDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQAEFIASFYNNDLIK INGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPRI IKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKGKRPAAT KKAGQAKKKKGSYPYDVPDYALEDALDDFDLDMLGSDALDDFD LDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDML	
Proteína WT EGR3 (humana)	MTGKLAEKLPVTMSSLLNQLPDNLYPEEIPSALNLFSGSSDSV VHYNQMATENVMDIGLTNEKPNPELSYSGSFQPAPGNKTVTYL GKFAFDSPSNWCQDNIISLMSAGILGVPPASGALSTQTSTASM VQPPQGDVEAMYPALPPYSNCGDLYSEPVSFHDPQGNPGLAYS PQDYQSAKPALDSNLFPMIPDYNLYHHPNDMGSIPEHKPFQGM DPIRVNPPPITPLETIKAFKDKQIHPGFGSLPQPPLTLKPIRP RKYPNRPSKTPLHERPHACPAEGCDRRFSRSDELTRHLRIHTG HKPFQCRICMRSFSRSDHLTTHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAR SDERKRHAKIHLKQKEKKAEKGGAPSASSAPPVSLAPVVTTCA	175
Proteína WT EGR1 (humana)	maaakaemqlmsplqisdpfgsfphsptmdnypkleemmllsn gapqflgaagapegsgsnsssssgggggggsnsssssstf npqadtgeqpyehltaesfpdislnnekvlvetsypsqttrlp pitytgrfslepapnsgntlwpeplfslvsglvsmtnppasss sapspaassasasqspplscavpsndsspiysaaptfptpntd ifpepqsqafpgsagtalqypppaypaakggfqvpmipdylfp qqqgdlglgtpdqkpfqglesrtqqpsltplstikafatqsgs	176

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO
	qdlkalntsyqsqlikpsrmrkypnrpsktppherpyacpves cdrrfsrsdeltrhirihtgqkpfqcricmrnfsrsdhltthi rthtgekpfacdicgrkfarsderkrhtkihlrqkdkkadksv vassatsslssypspvatsypspvttsypspattsypspvpts fsspgsstypspvhsgfpspsvattyssvppafpaqvssfpss avtnsfsastglsdmtatfsprtieic	
Ligador	GGSGGGSG	177
Ligador	GGSGGGSGGGSGGGSG	178
Ligador	[GGGS]n	179
Ligador	[GGGGS]n	180
Ligador	[GGSG]n	181
Sitio de reconocimiento para WT EGR1 o EGR3	GCG(T/G)GGGCG	182
andamiaje de ARNsg	GTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAA TGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGA	183
Secuencia de codificación CREB3 humana	atggagctggaattggatgctggtgaccaagacctgctggcct tcctgctagaggaaagtggagatttggggacggcacccgatga ggccgtgagggccccactggactgggcgctgccgctttctgag gtGccgagcgactgggaagtagatgatttgctgtgctccctgc tgagtcccccagcgtcgttgaacattctcagctcctccaaccc	210

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO
	ctgccttgtccaccatgaccacacctactccctcccacgggaa actgtctctatggatctagagagtgagagctgtagaaaagagg ggacccagatgactccacagcatatggaggagctggcagagca ggagattgctaggctagtactgacagatgaggagaagagtcta ttggagaaggaggggcttattctgcctgagacacttcctctca ctaagacagaggaacaaattctgaaacgtgtgcggaggaagat tcgaaataaaagatctgctcaagagagccgcaggaaaaagaag gtgtaCgttgggggtttagagagcCgggtcttgaaatacacag cccagaatatggagcttcagaacaaagtacagcttctggagga acagaatttgtcccttctagatcaactgaggaaactccaggcc atggtgattgagatCtcaaacaaaaccagcagcagcagcacct gcatcttggtcctGctagtctccttctgcctcctccttgtacc tgctatgtactcctctgacacaaggggagcctgccagctgag catggagtgttgtcccgccagcttcgtgccctccccagtgagg acccttaccagctggagctgcctgccctgcagtcagaagtgcc gaaagacagcacacaccagtggttggacggctcagactgtgta ctccaggcccctggcaacacttcctgcctgctgcattacatgc ctcaggctcccagtgcagagcctcccctggagtggccCttccc tgacctcttctcagagcctctctgccgaggtcccatcctcccc ctgcaggcaaatctcacaaggaagggaggatggcttcctactg gtagcccctctgtcattttgcaggacagatactcaggc	
Secuencia AA CREB3 humana	MELELDAGDQDLLAFLLEESGDLGTAPDEAVRAPLDWALPLSE VPSDWEVDDLLCSLLSPPASLNILSSSNPCLVHHDHTYSLPRE	211

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO
	TVSMDLESESCRKEGTQMTPQHMEELAEQEIARLVLTDEEKSL LEKEGLILPETLPLTKTEEQILKRVRRKIRNKRSAQESRRKKK VYVGGLESRVLKYTAQNMELQNKVQLLEEQNLSLLDQLRKLQA MVIEISNKTSSSSTCILVLLVSFCLLLVPAMYSSDTRGSLPAE HGVLSRQLRALPSEDPYQLELPALQSEVPKDSTHQWLDGSDCV LQAPGNTSCLLHYMPQAPSAEPPLEWPFPDLFSEPLCRGPILP LQANLTRKGGWLPTGSPSVILQDRYSG	
Dominio C-terminal CREB3 humano con región transmembrana	VYVGGLESRVLKYTAQNMELQNKVQLLEEQNLSLLDQLRKLQA MVIEISNKTSSSSTCILVLLVSFCLLLVPAMYSSDTRGSLPAE HGVLSRQLRALPSEDPYQLELPALQSEVPKDSTHQWLDGSDCV LQAPGNTSCLLHYMPQAPSAEPPLEWPFPDLFSEPLCRGPILP LQANLTRKGGWLPTGSPSVILQDRYSG	225
Dominio C-terminal CREB3 humano sin región transmembrana	VYVGGLESRVLKYTAQNMELQNKVQLLEEQNLSLLDQLRKLQA MVIEIS	226
Secuencia de codificación CREB3-TRE	atggagctggaattggatgctggtgaccaagacctgctggcct tcctgctagaggaaagtggagatttggggacggcacccgatga ggccgtgagggccccactggactgggcgctgccgctttctgag	214

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO
	gtGccgagcgactgggaagtagatgatttgctgtgctccctgc tgagtcccccagcgtcgttgaacattctcagctcctccaaccc ctgccttgtccaccatgaccacacctactccctcccacgggaa actgtctctatggatctagagagtgagagctgtagaaaagagg ggacccagatgactccacagcatatggaggagctggcagagca ggagattgctaggctagtactgacagatgaggagaagagtcta ttggagaaggaggggcttattctgcctgagacacttcctctca ctaagacagaggaacaaattctgaaacgtgtgcggCTTGAGCC CGGAGAGAAGCCGTACAAGTGCCCTGAGTGCGGCAAGTCTTTT AGCAGAAGAGACGAACTTAATGTCCACCAGCGAACGCATACTG GTGAAAAGCCCTATAAATGTCCTGAATGTGGGAAATCATTCTC CAGCCGCAGAACCTGTAGGGCTCACCAGCGAACACACACCGGC GAAAAACCATACAAATGTCCAGAATGCGGGAAATCCTTTTCTC AGTCATCCAACTTGGTGAGACATCAACGCACGCACACTGGAGA AAAGCCTTACAAATGCCCGGAATGTGGAAAGTCTTTTTCCCAA TTGGCCCATTTGCGAGCCCATCAGAGGACTCACACGGGCGAGA AACCTTACAAATGCCCGGAATGCGGGAAATCTTTTTCAACGAG TGGCAACCTCGTAAGACACCAAAGAACGCATACAGGCGAAAAG CCATATAAGTGTCCTGAGTGTGGTAAATCATTCTCACACAGGA CCACCCTGACAAATCACCAGCGCACGCACACCGGCAAGAAGAC AAGCgtgtaCgttgggggtttagagagcCgggtcttgaaatac acagcccagaatatggagcttcagaacaaagtacagcttctgg aggaacagaatttgtcccttctagatcaactgaggaaactcca	

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO
	ggccatggtgattgagatCtcaaacaaaaccagcagcagcagc acctgcatcttggtcctGctagtctccttctgcctcctccttg tacctgctatgtactcctctgacacaaggggagcctgccagc tgagcatggagtgttgtcccgccagcttcgtgccctccccagt gaggacccttaccagctggagctgcctgccctgcagtcagaag tgccgaaagacagcacacaccagtggttggacggctcagactg tgtactccaggcccctggcaacacttcctgcctgctgcattac atgcctcaggctcccagtgcagagcctcccctggagtggccCt tccctgacctcttctcagagcctctctgccgaggtcccatcct ccccctgcaggcaaatctcacaaggaagggaggatggcttcct actggtagcccctctgtcattttgcaggacagatactcaggc	
CREB3-TRE	MELELDAGDQDLLAFLLEESGDLGTAPDEAVRAPLDWALPLSE VPSDWEVDDLLCSLLSPPASLNILSSSNPCLVHHDHTYSLPRE TVSMDLESESCRKEGTQMTPQHMEELAEQEIARLVLTDEEKSL LEKEGLILPETLPLTKTEEQILKRVRLEPGEKPYKCPECGKSF SRRDELNVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSRRTCRAHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQ LAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGNLVRHQRTHTGEK PYKCPECGKSFSHRTTLTNHQRTHTGKKTSVYVGGLESRVLKY TAQNMELQNKVQLLEEQNLSLLDQLRKLQAMVIEISNKTSSSS TCILVLLVSFCLLLVPAMYSSDTRGSLPAEHGVLSRQLRALPS EDPYQLELPALQSEVPKDSTHQWLDGSDCVLQAPGNTSCLLHY MPQAPSAEPPLEWPFPDLFSEPLCRGPILPLQANLTRKGGWLP	215

Descripción	SECUENCIA	SEQ ID NO
	TGSPSVILQDRYSG	

EJEMPLOS

[00317] Los siguientes ejemplos se incluyen para describir adicionalmente algunos aspectos de la presente descripción y no se deben usar para limitar el alcance de la invención.

EJEMPLO 1

Identificación de regiones diana capaces de regular por aumento SCN1A usando activadores transcripcionales específicos de SCN1A

[00318] A fin de identificar regiones del genoma capaces de favorecer la expresión de SCN1A endógeno, se diseñaron diferentes factores de transcripción modificados (ya sea nucleasas de dedos de zinc o construcciones de ARNg/daCas9) de modo que tomaran como diana diferentes regiones del genoma como se expone en las Tablas 4 y 13 anteriores. Para construcciones de ARNg/daCas9, el ARNg tuvo la misma secuencia que la región diana debido a que el ARNg se diseñó para tomar como diana la hebra genómica complementaria. La proteína dCas9 fue una construcción dCAS9-VP64 (SEQ ID NO: 174).

[00319] Se cultivaron células HEK293 por métodos estándar y se transfectaron (FugeneHD, Promega) con plásmido de 3 ug que

porta un factor de transcripción modificado o construcción de control por pocillo de una placa de 6 pocillos. Las células se transfectaron con plásmidos que expresan las construcciones indicadas en la TABLA 13 a continuación. 48 horas después de la transfección, se recolectaron células y se aisló el ARN (Qiagen RNeasy Mini kit) y se trató con DNasa. El ARN (3ug) se transcribió de manera inversa usando cebadores OligoDT (Superscript IV, Invitrogen). Las muestras de ADNc se analizaron por qPCR usando Phusion Polymerase (New England Biolabs) y SYBR Green I: (30s a 98°C, 40x[10 seg a 98°C, 15 seg a 66 °C, 15 seg a 72°C]). Se usaron cebadores contra SCN1A (5'-TGTCTCGGCATTGAGAACATTC-3' (SEQ ID NO: 185); 5'-ATTGGTGGAGGCCATTGTAT-3' (SEQ ID NO: 186)) para cuantificar los niveles de transcripto SCN1A endógeno, y niveles relativos de expresión de SCN1A se determinaron por el método delta-delta Ct con GAPDH como un gen de referencia (5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC'-3' (SEQ ID NO: 187); 5'-TCCACCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (SEQ ID NO: 188)). Los datos se presentan como veces de cambio con respecto a la condición de control.

[00320] Los resultados se muestran en Figura 1 y en la TABLA 13 a continuación como veces de cambio de transcripción de SCN1A con respecto a condiciones de control (por ejemplo, construcción indicadora de EGFP-KASH). La TABLA 13 informa valores para construcciones que condujeron a un aumento de al

menos 1,5 veces en la transcripción con respecto a las condiciones de control.

TABLA 13. Efecto que los diferentes sitios diana genómicos y los correspondientes eTF tienen en la transcripción. CON indica la construcción del dedo de zinc que se utilizó en el experimento (ver TABLA 1). Para las construcciones de ARNg, el sitio diana y la secuencia de ARNg son iguales ya que los ARNg se diseñaron para tomar como diana la hebra de ADN complementaria.

CON	Chr 2 Posición de inicio	Secuencia diana	Sitio diana de la figura 1	SEQ ID NO para sitio diana	Media	Prueba T
4	166149168	ctaggtcaagtgtaggag	z1	18	5.12090848	0.0096628
28	166149165	GGTCAAGTGTAGGAGACA	z8	25	1.52068773	0.62403349
3	166128025	taggtaccatagagtgag	z13	30	25.4730028	0.14942042
29	166127991	gaggatactgcagaggtc	z14	31	8.6766618	0.16432794
	166149176	aaggctgtctaggtcaagtgt	g9	35	1.36378425	0.18753821
	166149118	tgttcctccagattaacactt	g10	36	1.63040825	0.46710683
	166128002	gatgaagccgagaggatactg	g11	37	18.7579211	0.13148732
	166128037	gctgatttgtattaggtacca	g12	38	22.4892633	0.09291316
	166177299	AGAAAGCTGATACAGATACAA	g15	39	1.7542842	0.34519408
	166178880	ggtacgggcaaagatttcttg	g17	40	1.36801947	0.48762102
	166177299	AGAAAGCTGATACAGATACAA	g19	41	1.45636874	0.44464045
	166177369	ACACAATGAGCCACCTACAAG	g20	42	1.31187425	0.42605224
	166177362	GTGGCTCATTGTGTGTGTGCC	g22	43	1.25217773	0.26572657

CON	Chr 2 Posición de inicio	Secuencia diana	Sitio diana de la figura 1	SEQ ID NO para sitio diana	Media	Prueba T
	166155264	CATATCCCTGCAGGTTCAGAA	g24	44	1.75688991	0.28984533
	166155099	agagagagagagagagagaga	g25	45	2.05701745	0.42409102
	166155393	TTCTCAGTTTTGAAATTAAAA	g26	46	1.64498972	0.21705582
	166155255	TGGATTCTCTTCTGAACCTGC	g27	47	2.27026665	0.43195546
	166148361	TGCTGAGGCAGGACACAGTGT	g29	48	2.4290169	0.30364553
	166148843	ATCATCTGTAACCATCAAGGA	g30	49	2.58328006	0.0748197
	166148565	TCCTGCCTACTTAGTTTCAAG	g31	50	1.97097781	0.25980859
	166148953	ATTACAGTTCTGTCAGCATGC	g32	51	1.34500323	0.32186367
	166149373	TGGTCTCATTCTTTTTGTGGG	g33	52	1.71471378	0.32104302
	166142239	CGATATTTTCATGGATTCCTT	g34	53	1.7735976	0.21954265
	166142391	CTGACACTTACTTTGTCTAAA	g35	54	1.95513108	0.02069095
	166142219	AAAACTGGAACCGCATTCCCA	g36	55	2.08698135	0.0454403
	166142396	ACAAAGTAAGTGTCAGTGTGG	g37	56	1.30739959	0.72725347
	166142344	ATAATAGTTGTGTCTTTATAA	g38	57	1.55783618	0.29846459
	166141162	TGTACAAGCAGGGCTGCAAAG	g39	58	1.4663605	0.02946062
	166140590	GTTAACAAATACACTAAACAC	g40	59	1.37399196	0.33638238
	166140928	ttcaacaagctcccaagaagt	g42	60	1.46929899	0.24465271
	166141090	ATGTTCAAGGTGCAGAAGGAA	g43	61	2.04547409	0.09880194
	165990246	TGTTTGCTCAAACGTGCACCA	g44	62	2.13402102	0.25583999
	165989684	AAATAAGACATGAAAACAAGA	g45	63	1.27016182	0.32368695
	165990193	AAATATGTACCACAAGAAATG	g46	64	2.29522738	0.41829497
	165990076	TATCTGGTTTCTCTCACTGCT	g47	65	1.44542116	0.0947106
	165989571	ATTGCAAAGCATAATTTGGAT	g48	66	1.42246971	0.18117243

EJEMPLO 2

Regulación por aumento de SCN1A endógeno en células HEK293 usando factores de transcripción específicos de SCN1A

[00321] Las células HEK293 se cultivaron por métodos estándar y se colocaron en placas de 6 pocillos. Las células en cada pocillo se transfectaron (FugeneHD, Promega) con 3 ug de un plásmido que portaba una sola construcción de factor de transcripción modificada, un CREB3 humano WT (SEQ ID NO: 211) o una construcción de control de EGFP. Las construcciones de factor de transcripción modificadas probadas incluyeron: Construcciones 1-27 y 46-53 (**TABLA 1)** y un plásmido que expresa CREB3-TRE (SEQ ID NO: 215; CREB3 con el dominio de unión a ADN bZIP reemplazado con el dominio ZF sintético dirigido a promotor TET) (cada uno probado por separado). 48 horas después de la transfección, se recolectaron células y se aisló el ARN (Qiagen RNeasy Mini kit) y se trató con DNasa. El ARN (3ug) se transcribió de manera inversa usando cebadores OligoDT (Superscript IV, Invitrogen). Las muestras de ADNc se analizaron por qPCR usando Phusion Polymerase (New England Biolabs) y SYBR Green I: (30s a 98°C, 40x[10 seg a 98°C, 15 seg a 66 °C, 15 seg a 72°C]). Se usaron cebadores contra SCN1A (5’-TGTCTCGGCATTGAGAACATTC-3’ (SEQ ID NO: 185); 5’-ATTGGTGGAGGCCATTGTAT-3’ (SEQ ID NO: 186)) para cuantificar los niveles de transcripto SCN1A endógeno, y niveles relativos de expresión de SCN1A se determinaron por el método

delta-delta Ct con GAPDH como un gen de referencia (5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC'3' (SEQ ID NO: 187); 5'-TCCACCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (SEQ ID NO: 188)). Los datos se presentan como veces de cambio con respecto a la condición de control (ver Figura 2A, la figura 2B y Figura 2C). La construcción de control consistió en EGFP expresado bajo el control de RE 1 (SEQ ID NO: 1). El suministro de factores de transcripción modificados indujo grados variables de regulación por aumento de transcripto SCN1A endógeno con respecto a la condición de EGFP.

EJEMPLO 3

Regulación por aumento de SCN1A endógeno en neuronas GABA usando factores de transcripción específicos de SCN1A

[00322] Las neuronas GABA iCell (Cellular Dynamics) se colocaron en placa en una placa de 6 pocillos (~1E6 células/pocillo) y se mantuvieron por protocolo recomendado por el fabricante. 72 h después de la colocación en placa, se adicionó AAV recombinante (serotipo AAV-DJ) que expresa EGFP o una construcción activadora 30 en la Figura 3A o Construcción 25 o Construcción 16 en la Figura 3B) bajo el control de un promotor ubicuo (promotor CBA) al medio de cultivo en aproximadamente copias de genoma 2E11 por pocillo. Una semana (Figura 3A) o dos semanas (Figura 3B) después de la infección, se aisló ARN de células cultivadas (Qiagen RNeasy Mini kit) y se trató con DNasa. El ARN recuperado se

transcribió de manera inversa usando cebadores OligoDT (Superscript IV, Invitrogen). Las muestras de ADNc se analizaron por qPCR usando Phusion Polymerase (New England Biolabs) y SYBR Green I: (30s a 98°C, 40x[10 seg a 98°C, 15 seg a 66 °C, 15 seg a 72°C]). Se usaron cebadores contra SCN1A (5'-TGTCTCGGCATTGAGAACATTC-3' (SEQ ID NO: 185); 5'-ATTGGTGGAGGCCATTGTAT-3' (SEQ ID NO: 186)) para cuantificar los niveles de transcripto SCN1A endógeno, y niveles relativos de expresión de SCN1A se determinaron por el método delta-delta Ct con GAPDH como un gen de referencia (5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC'3' (SEQ ID NO: 187); 5'-TCCACCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (SEQ ID NO: 188)). Los datos se presentan como veces de cambio con respecto a la condición de control (ver Figura 3A y Figura 3B). La expresión impulsada por AAV de factores de transcripción modificados produjo regulación por aumento significativa de transcripto SCN1A endógeno en neuronas GABA derivadas de iPS cultivadas.

EJEMPLO 4

Regulación por aumento específica de SCN1A endógeno en neuronas GABA usando un factor de transcripción específico de SCN1A

[00323] Las neuronas GABA iCell (Cellular Dynamics) se colocaron en placa en una placa de 6 pocillos (~1E6 células/pocillo) y se mantuvieron por protocolo recomendado por el fabricante. 72 h después de la colocación en placas,

se adicionó AAV recombinante (serotipo AAV-DJ) que expresa EGFP o activador (construcción 30), que comprende un DBD de dedo de zinc fusionado a un TAD de VPR impulsado por un promotor CBA) bajo el control de un promotor CBA al medio de cultivo a aproximadamente copias de genoma 2E11 por pocillo.

[00324] Una semana después de la infección, se aisló el ARN de células cultivadas (Qiagen RNeasy Mini kit) y se trató con DNasa. Las bibliotecas de ARNseq se prepararon del ARN recuperado, usando el kit de biblioteca de ARNm TruSeq Stranded (Illumina) y se secuenciaron en una Illumina NextSeq (secuenciación de extremo apareado de 2 x 75 ciclos). Las lecturas de secuenciación se alinearon con el genoma humano (RNASTAR) y se realizó análisis de expresión diferencial con DESeq2. Los datos se presentan como veces de cambio con respecto a muestras de control (AAVDJ-CBA-EGFP) (ver Figura 4). Los resultados se muestran en la TABLA 14 y la Figura 4 ilustra la expresión relativa de SCN1A endógeno y los 40 transcriptos génicos vecinos más cercanos presentados como veces de cambio con respecto a la condición de control. La construcción 30, como se describe en la TABLA 1, fue capaz de incrementar específicamente la expresión del gen SCN1A, o la proteína Nav1.1, en comparación con los otros genes examinados. Esto indicó que el sitio diana reconocido por el activador transcripcional de la construcción 30 fue específico para el gen SCN1A, dando por resultado de este

modo un incremento en la expresión génica de SCN1A en neuronas GABA.

TABLA 14. Efectos en la transcripción de SCN1A endógeno y los 40 genes vecinos más cercanos en neuronas GABA tratadas con un factor de transcripción específico de SCN1A (Construcción 30).

Nombre génico	**Inicio Chr 2**	**Final Chr 2**	**Hebra Chr**	**Veces de cambio vs. Control**
PLA2R1	160788518	160919121	-	0.16367458
ITGB6	160956176	161128399	-	0.20679884
RBMS1	161128661	161350305	-	1.63514667
TANK	161993418	162092732	+	0.90946407
PSMD14	162164548	162268228	+	0.92699237
TBR1	162272604	162282381	+	0.53199642
SLC4A10	162280842	162841792	+	1.89407328
DPP4	162848750	162931052	-	2.82345284
FAP	163027193	163101661	-	2.26977379
IFIH1	163123588	163175213	-	1.46146481
GCA	163175349	163228105	+	2.58702426
FIGN	164449905	164592522	-	0.46785861
GRB14	165349321	165478358	-	0.5631965
COBLL1	165510133	165700189	-	0.43199257
SLC38A11	165752695	165812035	-	4.06730119

Nombre génico	Inicio Chr 2	Final Chr 2	Hebra Chr	Veces de cambio vs. Control
SCN3A	165944031	166060577	-	1.0807866
SCN2A	166095911	166248818	+	1.24475196
CSRNP3	166326156	166545917	+	0.82971233
GALNT3	166604100	166651192	-	0.33804418
TTC21B	166713984	166810353	-	1.58661143
SCN1A	166845669	166984523	-	62.9552975
SCN9A	167051694	167232503	-	1.71659087
SCN7A	167260082	167350757	-	0.29331967
B3GALT1	168675181	168730551	+	0.64436013
STK39	168810529	169104651	-	1.19821739
CERS6	169312371	169631644	+	0.86828378
NOSTRIN	169643048	169722024	+	1.82142718
SPC25	169690641	169769881	-	0.86880697
ABCB11	169779447	169887832	-	3.1441368
DHRS9	169921298	169952677	+	1.10381777
BBS5	170335687	170382432	+	0.65476347
KLHL41	170366211	170382772	+	0.87373377
FASTKD1	170386258	170430385	-	1.02786927
PPIG	170440849	170497916	+	1.09866236
CCDC173	170501934	170550943	-	0.67290779
PHOSPHO2	170550974	170558218	+	0.91339152

Nombre génico	Inicio Chr 2	Final Chr 2	Hebra Chr	Veces de cambio vs. Control
KLHL23	170550997	170633499	+	0.73926347
SSB	170648442	170668574	+	1.00631994
METTL5	170666590	170681441	-	1.21271497
UBR3	170683967	170940641	+	1.21350908
MYO3B	171034654	171511681	+	0.52839217

EJEMPLO 5

Expresión de SCN1A a partir de un casete de expresión *in vivo*

[00325] Para probar la expresión de activadores transcripcionales de SCN1A *in vivo*, se generaron vectores AAV9 recombinantes por Vector Biolabs (Malvern, PA). Se les puso una infusión a ratones C57Bl/6 machos (N=5 por grupo, 7-8 semanas de edad) de manera bilateral con 1.5ul de vector de AAV purificado en el hipocampo dorsal (AP -2.0 mm, lateral ±1.5, DV -1.4 mm de dura) e hipocampo ventral (AP -3.1 mm, lateral ±2.8, DV -3.8 mm de dura), para un total de 4 sitios de inyección. Se administró AAV a una velocidad de 0.3 ul/minuto con un período de descanso de 4 m después de cada inyección. Cuatro semanas después del tratamiento, se aplicó eutanasia a los ratones y se diseccionó el tejido de hipocampo. Para cada grupo, se recolectó tejido de tanto

tejido de hipocampo izquierdo como derecho, se mezclaron para homogeneización en la mayoría de los animales (N=4), excepto para un animal, donde solo se recolectó y homogeneizó el hipocampo izquierdo. Se aisló ARN del homogenado (Qiagen RNeasy Mini kit) y se trató con DNasa. El ARN (3 µg) se transcribió de manera inversa usando cebadores OligoDT (Superscript IV, Invitrogen). Las muestras de ADNc se analizaron por qPCR para la expresión de SCN1A de ratón usando Phusion Polymerase (New England Biolabs) y SYBR Green I: 30s a 98°C, 40x[10 seg a 98°C, 15 seg a 64 °C, 15 seg a 72°C]. Se usaron cebadores contra SCN1A de ratón (5'-CAAAAAAGCCACAAAAGCCT-3' (SEQ ID NO: 189); 5'-TTAGCTCCGCAAGAAACATC-3' (SEQ ID NO: 190)) para cuantificar los niveles de transcripto SCN1A endógeno, y niveles relativos de expresión de SCN1A *in vivo* se determinaron por el método delta-delta Ct con GAPDH como un gen de referencia (5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC'3' (SEQ ID NO: 187); 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (SEQ ID NO: 188))

[00326] La Figura 5A y Figura 5B ilustran los resultados medios de cinco animales, cada uno inyectado con una construcción de AAV9. La construcción de control de eGFP comprendió un transgén indicador de eGFP. La construcción 4 (ver **TABLA 1**) comprendió un activador transcripcional que reconoció una secuencia diana que comprende SEQ ID NO: 18, como se describe en la **TABLA 1** anterior. **La Figura 5A** ilustra

la expresión relativa de SCN1A *in vivo*. **La Figura 5B** ilustra el cambio en la expresión de SCN1A *in vivo* como un porcentaje de expresión media de eGFP. Estos resultados indicaron que el activador transcripcional de SCN1A del casete de expresión A dio por resultado aproximadamente 20%-30% de regulación por aumento de la expresión de SCN1A *in vivo*.

[00327] Estos casetes de expresión se pueden adaptar para su uso en humanos para tratar síndrome de Dravet, epilepsia, convulsiones, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y/o cualquier otra enfermedad o condición asociada con una deficiencia y/o actividad deteriorada de SCN1A.

EJEMPLO 6

Ensayo de convulsiones hipertérmicas (HTS) en modelos en ratón de síndrome de Dravet

[00328] A. Modelo de ratón de inactivación Scn1a heterocigoto

[00329] El tratamiento de síndrome de Dravet y/o síntomas del mismo usando los casetes de expresión se probó en la línea de ratones Scn1a^{tm1Kea}. Esta línea de ratones es un modelo de ratón establecido para el síndrome de Dravet. Las líneas de ratones Scn1a^{tm1Kea} no requieren recombinasa CRE. El ratón Scn1a^{tm1Kea} (disponible en el Laboratorio Jackson; descrito en Hawkins et al., Scientific Reports, vol. 7: 15327 (2017)) comprende una deleción del primer exón codificador de SCN1A. Los ratones homocigotos para el alelo inactivado SCN1A se caracterizan por temblores, ataxia, convulsiones y mueren en

el día 16 postnatal. Los ratones heterocigotos en el antecedente C57BL/6 desarrollan convulsiones espontáneas y un gran porcentaje muere en cuestión de semanas. Esta variedad de ratón se puede usar para estudiar la seguridad y eficacia del tratamiento de epilepsia y síndrome de Dravet. Ver Miller et al., Genes Brain Behav. 2014 Feb;13(2):163-72 para información adicional.

[00330] Para evaluar la eficacia de los activadores transcripcionales en la línea de ratones Scn1a^{tm1Kea}, se dosificaron camadas de crías producidas a partir de machos Scn1a +/- cruzados con hembras C57Bl/6J reproductoras con vector AAV a través de ICV bilateral a P1. Los ratones se dosificaron con las construcciones 31-34 (**TABLA 1**). Los ratones se dejaron inalterados con su madre hasta el destete a P18 y luego nuevamente se dejaron inalterados hasta P26-P28 cuando se inició el ensayo de convulsiones hipertérmicas (HTS). Se destetaron camadas separadas de ratones P1 dosificados a P18 y se observó mortalidad diaria. La inducción de convulsiones por hipertermia se realizó en ratones heterocigotos P26-P28 (HET) y WT Scn1a en un antecedente 129Stac X C57BL/6 mezclado. Antes del ensayo, los ratones tenían una sonda de temperatura rectal lubricada (Ret-4) insertada y conectada a un módulo de control de temperatura (TCAT 2DF, Physitemp) que se conectó en serie con una lámpara de calentamiento (HL-1). Luego, los ratones se

colocaron en un vaso de precipitados de vidrio grande y se dejaron equilibrar brevemente con el entorno. Después de esto, la temperatura corporal se incrementó por ~ 0.5° C cada 2 minutos hasta el inicio de la primera convulsión tónico-clónica acompañada de pérdida de postura o hasta que se alcanzó 43°C. Si un ratón experimentó una convulsión con pérdida de postura, el experimento terminó y se registró la temperatura corporal interna del ratón. Si no se detectó ninguna convulsión con pérdida de postura durante todo el transcurso del experimento, ese ratón se consideró libre de convulsiones y el ensayo concluyó. Las muestras de tejido se obtuvieron de los ratones a P1 y se realizó genotipificación de los ratones durante el transcurso del experimento usando PCR en tiempo real. La genotipificación se desenmascaró después de completar el ensayo y el estado de los ratones como HET o WT se correlacionó con los datos obtenidos. Los datos se graficaron en una curva de supervivencia Kaplan-Meier y la significación se determinó mediante la prueba de Mantel-Cox. Los resultados se muestran en la TABLA 15 y TABLA 16 y Figuras 6A-E.

TABLA 15. Resumen de condiciones usadas en Ejemplo 6.

Construcción	**Dosificación (gc/ratón)**
Construcción 31	6.0E+10

Construcción	**Dosificación (gc/ratón)**
(Figura 6A & 6E))	
Construcción 32 (Figuras 6B, 6D, 6E)	3.1E+11
Construcción 33 (Figura 6C)	5.8E+10
Construcción 34 (Figura 6D)	4.9E+13

TABLA 16. Resumen de resultados del ensayo de convulsiones hipertérmicas.

Construcción de eTF (Figura)	**# de Animales de control (tratados con PBS)**	**# de Animales tratados**	**% libre de convulsiones a 42.6 °C**	**Valor P**
Indicador de EGFP	16	N/A	44%	
Construcción 31 (Figura 6A & 6E))	16	18	95	P<0.0001
Construcción 32 (Figuras 6B, 6D, 6E)	16	21	76	P<0.05
Construcción	16	14	93	P<0.001

Construcción de eTF (Figura)	**# de Animales de control (tratados con PBS)**	**# de Animales tratados**	**% libre de convulsiones a 42.6 °C**	**Valor P**
33 (Figura 6C)				
Construcción 34 (Figura 6D)	16	12	83	P<0.05

[00331] Se llevaron a cabo experimentos adicionales en ratones Scn1a^{tm1Kea} como se describió anteriormente para evaluar las construcciones 42 y 43 para determinar su efecto en las convulsiones en el ensayo HTS. En estos experimentos, la construcción 42 se dosificó a 9x10^{10} gc/ratón a través de ICV bilateral a P1 y la construcción 43 se dosificó a 6x10^{10} gc/ratón a través de ICV bilateral a P1 o P5. Los resultados se muestran en **la Figura 6F** (Construcción 42) y **Figura 6G** (Construcción 43). Ambas construcciones mostraron una reducción significativa en las convulsiones en comparación con los controles de EGFP (P < 0.0001 para ambas Construcciones 42 y 43).

[00332] B. Modelo de ratón mutante Scn1a^{RX} heterocigoto

[00333] El tratamiento de síndrome de Dravet y/o síntomas del mismo usando un casete de expresión de la presente

descripción se probó en la línea de ratones Scn1a^{RX}. Esta línea de ratones es un modelo de ratón establecido para el síndrome de Dravet. Las líneas de ratones Scn1a^{RX} no requieren recombinasa CRE. El ratón Scn1a^{RX} (disponible en el Laboratorio Jackson; descrito en Ogiwara et al., J. Neuroscience, vol. 27: 5903-5914 (2007)) comprende una pérdida de función mutación finalizadora de base única del exón 21 del gen SCN1A (CgG a TgA; R1407X). Los ratones heterocigotos en el antecedente C57BL/6 desarrollan convulsiones espontáneas y un gran porcentaje muere en cuestión de semanas.

[00334] Para evaluar la eficacia de los activadores transcripcionales en la línea de ratones Scn1a^{RX}, se dosificaron camadas de crías producidas a partir del cruce de machos y FIV de espermatozoides Scn1a$^{RX/+}$ con óvulos C57Bl/6J hembra con embriones implantados en hembras madre CD-1 con vector AAV (Construcción 31) a 5.1 x ^{10} copias genómicas (gc)/ratón o control PBS mediante ICV bilateral a P1. Los ratones se dejaron inalterados con su madre hasta el destete a P18 y luego nuevamente se dejaron inalterados hasta P26-P28 cuando se inició el ensayo HTS. Se destetaron camadas separadas de ratones P1 dosificados a P18 y se observó mortalidad diaria. La inducción de convulsiones por hipertermia se realizó en ratones heterocigotos P26-P28 (HET) y WT Scn1a en un antecedente C57BL/6. Antes del ensayo, los

ratones tenían una sonda de temperatura rectal lubricada (Ret-4) insertada y conectada a un módulo de control de temperatura (TCAT 2DF, Physitemp) que se conectó en serie con una lámpara de calentamiento (HL-1). Luego, los ratones se colocaron en un vaso de precipitados de vidrio grande y se dejaron equilibrar brevemente con el entorno. Después de esto, la temperatura corporal se incrementó por ~ 0.5° C cada 2 minutos hasta el inicio de la primera convulsión tónico-clónica acompañada de pérdida de postura o hasta que se alcanzó 43°C. Si un ratón experimentó una convulsión con pérdida de postura, el experimento terminó y se registró la temperatura corporal interna del ratón. Si no se detectó ninguna convulsión con pérdida de postura durante todo el transcurso del experimento, ese ratón se consideró libre de convulsiones y el ensayo concluyó. Las muestras de tejido se obtuvieron de los ratones a P1 y se realizó genotipificación de los ratones durante el transcurso del experimento usando PCR en tiempo real. La genotipificación se desenmascaró después de completar el ensayo y el estado de los ratones como HET o WT se correlacionó con los datos obtenidos. Ninguno de los ratones WT Scna1 probados experimentó una convulsión. Los datos para los ratones HET tratados con Construcción 31 (n=13) y control con PBS (n=14) se graficaron en una curva de supervivencia Kaplan-Meier y la significación se determinó mediante la prueba de Mantel-Cox. Como se

muestra en la Figura **6H,** los ratones HET tratados con Construcción 31 muestran una reducción significativa en la inducción de convulsiones de hipertermia sobre los ratones HET tratados con control de PBS ($P < 0.01$).

EJEMPLO 7

Ensayo de supervivencia en modelo en ratón de síndrome de Dravet

[00335] A. Modelo de ratón de inactivación Scn1a heterocigoto

[00336] Para evaluar la eficacia de los activadores transcripcionales en la línea de ratones Scn1a^{tm1Kea}, se dosificaron camadas de crías producidas a partir de machos Scn1a +/- cruzados con hembras C57Bl/6J reproductoras con vector AAV a través de ICV bilateral a P1. Los ratones se dejaron inalterados con su madre hasta el destete. La observación del estado de salud de ratones Scn1a +/- se realizó diariamente después del destete a P18. Se registró la fecha de los ratones que se encontraron muertos en su jaula hogar de cualquier causa. Los datos se graficaron en una curva de supervivencia Kaplan-Meier y la significación se determinó mediante la prueba de Mantel-Cox.

[00337] Los resultados se muestran en la TABLA 17 y Figuras 7A-D.

TABLA 17. Resumen de condiciones y resultados para ensayo de supervivencia.

SEQ ID	Dosificación (gc/ratón)	# de Animales de control (tratados con PBS)	# de Animales tratados	% de supervivencia a P100 (*a P83)	Valor P
PBS	N/A	53	N/A	49%	
Construcción 33 (Figura 7C y 7D)	5.8E+10	53	29	76%	P<0.05
Construcción 31 (Figura 7B y 7D)	6.0E+10	53	34	97%	P<0.0001

[00338] B. Modelo de ratón mutante Scn1a^{RX} heterocigoto

[00339] Para evaluar la eficacia de los activadores transcripcionales en la línea de ratones Scn1a^{RX}, se dosificaron camadas de crías producidas a partir del cruce de machos y FIV de espermatozoides Scn1a$^{RX/+}$ con óvulos C57Bl/6J hembra con embriones implantados en hembras madre CD-1 con vector AAV (Construcción 31) a 5.1 x ^{10} copias genómicas (gc)/ratón o control PBS mediante ICV bilateral a P1. Los ratones se dejaron inalterados con su madre hasta el destete. La observación del estado de salud de ratones Scn1a $^{RX/+}$ se realizó diariamente después del destete a P18. Se registró la fecha de los ratones que se encontraron muertos en su jaula hogar de cualquier causa. Los datos para la Construcción 31 tratada (n=27) y el control tratado (n=18) se graficaron en una curva de supervivencia Kaplan-Meier y la significación se

determinó mediante la prueba de Mantel-Cox.

[00340] Como se muestra en la Figura **7E,** los ratones Scn1a $^{RX/+}$ tratados con Construcción 31 tuvieron una mayor supervivencia sobre los ratones Scn1a $^{RX/+}$ tratados con control de PBS ($P < 0.0001$).

EJEMPLO 8

Niveles de transcripción de SCN1A en primates no humanos después de tratamiento con factor de transcripción específico de SCN1A codificación AAV

[00341] El estudio usó macacos cynomolgus machos (macaca fascicularis) entre 2 y 3 años de edad. Los animales se preseleccionaron para detectar anticuerpo reactivo cruzado contra AAV9 antes de su inclusión en el estudio mediante un ensayo de anticuerpo neutralizante basado en células. AAV9 que expresa un factor de transcripción específico de SCN1A (construcción 33) o un control se diluyó en PBS y se inyectó de manera intraparenquimatosa a 1.2E12 gc/animal. Se identificaron tres coordenadas estereotóxicas diferentes en cada hemisferio, seis sitios de inyección por animal, para las inyecciones. Se inyectó un volumen de 10 ul por sitio. Las inyecciones en el hemisferio derecho fueron simétricas a aquellas en el izquierdo. Se usaron dos animales no tratados como un control.

[00342] Para valorar la expresión de ARNm de Scn1A, se llevó a cabo transcripción inversa seguida por el método qPCR. En

la necropsia, 28 días después de la dosificación, se recolectaron secciones de tejido de diferentes regiones del cerebro (corteza frontal, corteza parietal, corteza temporal, corteza occipital, hipocampo, médula, cerebelo; 200 mg cada una) de animales de control y tratados en RNAlater y luego se congelaron. En resumen, se disecaron 30 mg de tejido, se extrajo ARN (con minikit de tejido lípido Qiagen Rneasy, catálogo # 1023539), se convirtió en ADNc mediante transcripción inversa (usando kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad Applied Biosystems, catálogo # 4368814) y se realizó qPCR usando un conjunto de cebador/sonda para Scn1A y gen de mantenimiento GAPDH (Applied Biosystems, catálogo # Rh02621745-gI FAM).

[00343] Los conjuntos de cebador/sonda para SCN1A se proporcionan a continuación.

TABLA 18. Secuencias de cebador usadas en Ejemplo 8.

Gen	**SEQ ID NO**	**Secuencia (5′-3′)**	**Nota**
Scn1A	191	CCATGGAACTGGCTCGATTTCAC	F-cebador
	192	ATTGGTGGGAGGCCACTGTAT	R-cebador
	193	AGGCCTGAAAACCATTGTGGGAGCCCT	Sonda (FAM)

[00344] La expresión génica de Scn1A en cada muestra de

prueba se determinó por cuantificación relativa (RQ) usando el método comparativo Ct (ΔCt). Este método mide la diferencia de Ct (ΔCt) entre el gen diana y el gen de limpieza, luego compara los valores ΔCt de las muestras de tratamiento con las muestras de control.

[00345] ΔCt =Ct promedio del gen diana – Ct promedio del gen de limpieza

[00346] ΔΔCt = ΔCt de muestra de tratamiento – ΔCt de muestra de control

[00347] Expresión relativa (muestra de tratamiento) = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

[00348] Los datos se reportan como expresión normalizada de ARNm diana en diferentes secciones de tejido del cerebro (ver Figura 8). Como se muestra en la Figura 8, los sitios en el cerebro proximales a los sitios de inyección intraparenquimatosa mostraron los niveles más altos de expresión de transcripto SCN1A.

EJEMPLO 9

Expresión transgénica selectiva en neuronas PV en primates no humanos después de tratamiento con AAV con promotor selectivo de PV y sitio de unión de microARN

[00349] El estudio utilizó seis tití (Callithrix jacchus) que se preseleccionaron para detectar anticuerpo reactivo cruzado contra AAV9 antes de su inclusión en el estudio. Se trataron dos monos con AAV9 que contenía un transgén EGFP bajo el control del promotor EF1alpha, se trataron dos monos con AAV9

que contenía un transgén EGFP bajo el control de RE 2 (SEQ ID NO: 2), y dos monos se trataron con AAV9 que contenía un transgén EGFP bajo el control de RE 2 (SEQ ID NO: 2) y que también contiene un sitio de unión de microARN (SEQ ID NO: 7) ubicado entre la región codificadora de EGFP y la extremidad de poliA. Los vectores de AAV9 se diluyeron en PBS y los animales se trataron con tres inyecciones intracerebrales (2 uL cada una) en el hipocampo/corteza refinal de cada hemisferio para un total de 6 sitios de inyección por animal. Los dos animales tratados con el vector de AAV9 que contiene EF1alpha-EGFP recibieron cada uno una dosis total de 5.8E+11 gc/animal, los dos animales tratados con el vector de AAV9 que contiene RE 2-EGFP recibieron cada uno una dosis total de 3.0E+11 gc/animal, y los dos animales tratados con el vector de AAV9 que contiene RE 2 + m1-EGFP recibieron cada uno una dosis total de 2.3E+11 gc/animal.

[00350] Se utilizó inmunohistoquímica para evaluar la expresión selectiva de paravalbúmina (PV). En la necropsia, 28 días después de la dosificación, se recolectaron secciones de tejido de diferentes regiones del cerebro. Las secciones de cerebro de titi flotante (35um) se fijaron en paraformaldehído al 4%, se bloquearon con amortiguador (PBS, 3% de BSA, 3% de suero de burro, 0.3% de Triton-X 100, 0.2% de Tween-20) y luego se tiñeron con anti-GFP (Abcam ab290) seguido de un anticuerpo secundario conjugado con Alexa-488

(Thermo A21206). Esto fue seguido por anticuerpo anti-PV (Swant) y anticuerpo secundario conjugado con Alexa-647 (Thermo A31571) y 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Las secciones se montaron y formaron imágenes usando un PerkinElmer Vectra3.

[00351] Los resultados se muestran en **las Figuras** 9A-F y 10A-L.

EJEMPLO 10

Biodistribución de eTF^{SCN1A}

[00352] El objetivo de este estudio fue comparar la biodistribución de eTF^{SCN1A} en el sistema nervioso central (CNS) de monos macacos cynomolgus juveniles cuando se administró a una dosis de 4.8E+13 mediante inyección intracerebroventricular (ICV) unilateral. A cada animal se le inyectó AAV9 que contenía un casete de expresión que codifica para eTF^{SCN1A} bajo el control de un elemento regulador selectivo de GABA (RE^{GABA}-eTF^{SCN1A}). Las partículas de AAV9 se formularon en PBS + 0.001% de ácido plurónico y se administraron a una dosis de 4.8E+13 u 8E+13 vg/animal. Se administró un volumen de 2 ml de partículas virales formuladas a cada animal. El diseño del estudio se expone en la TABLA 19.

[00353] Los monos macacos cynomolgus de veinticuatro meses de edad se agruparon como se indica en la TABLA 19. Antes del inicio del estudio, se analizaron muestras de sangre de los

animales para determinar los niveles de título de anticuerpo neutralizante para AAV9 usando el ensayo de título de NAb descrito anteriormente. Los animales con resultados bajos o negativos para los anticuerpos se seleccionaron para el estudio. Las muestras se administraron mediante inyección de ICV utilizando procedimientos quirúrgicos estándar. El material de dosificación descongelado se almacenó brevemente en hielo húmedo y se calentó a temperatura ambiente justo antes de la dosificación. Los animales se anestesiaron, se prepararon para la cirugía y se montaron en un marco estereotóxico compatible con IRM (Kopf). Se realizó una resonancia magnética de referencia para establecer las coordenadas diana. Se realizó una incisión y se perforó un solo agujero a través del cráneo sobre la ubicación diana. Se preparó una jeringa BD de 3 mL unida a un conjunto de extensión de 36” con muestra y se colocó en una bomba de infusión. La línea de extensión se cebó. Se abrió la dura y se avanzó la aguja de dosificación a una profundidad de 13.0 a 18.1 mm desde el pia. Se utilizó inyección de medios de contraste y fluoroscopia para confirmar la colocación de la aguja espinal en el ventrículo lateral derecho. La aguja de punta central espinal Quinke BD de 3.0 ”22g se llenó con contraste para determinar la ubicación antes de conectar la línea de extensión cebada y la jeringa. La configuración de la bomba fue de 0.1 mL/minuto durante 19 a 20 minutos. El

amortiguador se empujó con la mano después de la dosis para limpiar la línea de extensión. La aguja permaneció en su lugar durante 1 a 2 minutos después de la finalización de la infusión y luego se retiró la aguja. El vehículo y el artículo de prueba se administraron una vez el día 1 y los sujetos se mantuvieron durante un período de recuperación de 27 o 29 días.

TABLA 19. Diseño del Estudio de Biodistribución

Grupo	**Género**	**ID**	**Dosis (VG/animal)**
Grupo 1 (Control de amortiguador)	M	21001	
	F	11501	
Grupo 2 (RE^{GABA}-eTF^{SCN1A})	M	2001	4.8E+13
	F	2501	4.8E+13
	M	3001	4.8E+13
	M	3002	8E+13

[00354] Después de la dosificación, los animales se monitorearon rutinariamente durante toda la duración del estudio y las muestras de sangre se retiraron periódicamente. La administración de eTF^{SCN1A} no se asoció con ninguna mortalidad inesperada, hallazgos clínicos u observaciones macroscópicas. Los animales tratados con AAV9-RE^{GABA}-eTF^{SCN1A} sobrevivieron hasta la necropsia programada el día 28 ± 2 días. No se observaron signos clínicos o de comportamiento,

aumentos en la temperatura corporal o reducción del peso corporal durante los exámenes físicos diarios o semanales. Se observó una elevación transitoria en las transaminasas hepáticas (ALT y AST) en animales tratados con AAV9-RE ^{GABA} -eTF ^{SCN1A}, pero se resolvieron por completo al final del estudio sin inmunomodulación, y no se observó un aumento concomitante en la bilirrubina sérica o las fosfatasas alcalinas. No fue notable ningún otro criterio de valoración de química clínica medido. No se informaron observaciones microscópicas en los estudios de histopatología hepática. Los leucocitos del LCR se elevaron en la recolección terminal con respecto a los valores previos al tratamiento, pero fueron comparables entre el control y los animales tratados con AAV9-RE ^{GABA} -eTF ^{SCN1A}. No se observó pleocitosis asociada a AAV9-RE ^{GABA} -eTF ^{SCN1A}. Las macro-observaciones y el examen micro-histopatológico detallado de los tejidos no neuronales en todos los animales no fueron notables. Los tejidos incluyeron órganos periféricos principales (es decir, corazón, pulmones, bazo, hígado y gónadas). Las macro-observaciones y la micro-histopatología detallada de los tejidos neuronales no mostraron ningún hallazgo notable. Los tejidos incluyeron el cerebro, la médula espinal y los ganglios de la raíz dorsal asociados (de la región cervical, torácica y lumbar). Los estudios fueron realizados por tres patólogos independientes, incluido uno en un sitio de

neuropatología especializado.

[00355] La administración de VCI de AAV9 no previno la respuesta inmunitaria posdosis en el suero, ya que se observaron anticuerpos neutralizantes de la cápside anti-AAV9 cuatro semanas después de la dosis. Sin embargo, los niveles de anticuerpos anti-AAV9 neutralizantes en el LCR permanecieron sin cambios y comparables a los niveles previos a la dosis (TABLA 20).

TABLA 20. Título sérico de NAb de AAV9

Número de sujeto	**Título de NAb en suero de AAV9**			**Título de NAb de LCR de AAV9**	
	Pre-selección	**En inyección**	**4 semanas después de la inyección**	**En inyección**	**4 semanas después de la inyección**
21001	1:5	<1:5	<1:5	<1:5	<1:5
11501	<1:5	<1:5	<1:5	<1:5	<1:5
2001	<1:5	<1:5	1:405	<1:5	1:5
2501	<1:5	<1:5	1:135	<1:5	1:5
3001	<1:5	<1:5	1:1215	<1:5	<1:5
3002	<1:5	<1:5	1:135	<1:5	<1:5

[00356] Las muestras se recolectaron 27-29 días después de la

dosis de los órganos principales (ventrículos cardíacos, lóbulos hepáticos, lóbulos cardíacos pulmonares, riñones, bazo, páncreas y ganglios linfáticos cervicales) durante la necroscopia programada. Los punzones se recolectaron mediante punzón de ocho milímetros y se procesaron adicionalmente como se analiza más adelante.

EJEMPLO 11

Biodistribución de eTF^{SCN1A} en el cerebro

[00357] Se utilizó ddPCR para medir la biodistribución de eTF^{SCN1A} en el cerebro. Muestras de diferentes regiones de tejido cerebral de macaco cynomolgus (FC: Corteza frontal; PC: corteza parietal; TC: corteza temporal; Cadera: hipocampo; Med: médula; OC: corteza occipital) se midieron para determinar el número de copias vectoriales para evaluar la biodistribución de eTF^{SCN1A} bajo el control de un elemento regulador selectivo de GABA (RE^{GABA}-eTF^{SCN1A}) cuando se administró en AAV9 por ICV unilateral. Se aisló ADN tisular con kits de sangre y tejidos DNeasy (Qiagen). La cantidad de ADN se determinó y normalizó usando espectrofotómetro UV. Se adicionaron 20 nanogramos de ADN tisular a una reacción de 20 microlitros junto con ddPCR Super Mix for Probes (sin dUTP) (Bio-Rad) y cebadores y sondas TaqMan dirigidos contra regiones de la secuencia de eTF^{SCN1A} . Se generaron gotas y se amplificaron las plantillas usando generador de gotas automatizado y termociclador (Bio-Rad). Después del paso de

PCR, la placa se cargó y se leyó mediante el lector de gotas QX2000 para determinar el número de copias del vector en los tejidos. El gen de *albúmina* de mono (Mf*Alb*) sirvió como un control interno para normalizar el contenido de ADN genómico y se amplificó en la misma reacción. Los cebadores y las sondas para eTF^{SCN1A} y MfAlb se exponen en la TABLA 21.

TABLA 21. Cebadores y sondas para eTF^{SCN1A} y MfAlb

Nombre de los cebadores / sonda		**Secuencia (5'-3')**
eTF^{SCN1A}	Cebador directo eTF^{SCN1A}	GAATGTGGGAAATCATTCAGTCGC (SEQ ID NO: 194)
	Cebador inverso eTF^{SCN1A}	GCAAGTTATCCTCTCGTGAGAAGG (SEQ ID NO: 195)
	Sonda eTF^{SCN1A}	GCGACAACCTGGTGAGACATCAACGCACC (SEQ ID NO: 196)
MfAlbúmina	Cebador directo MfAlb	GCTGTTATCTCTTGTGGGCTGT (SEQ ID NO: 197)
	Cebador inverso MfAlb	AAACTCATGGGAGCTGCCGGTT (SEQ ID NO: 198)
	Sonda MfAlb	CCACACAAATCTCTCCCTGGCATTG (SEQ ID NO: 199)

[00358] eTF^{SCN1A} se distribuyó ampliamente en todo el cerebro cuando se dosificó a 4.8E + 13 genomas virales por animal con

un promedio de 1.3-3.5 VG/genoma diploide (**Figura 11**). Además, al comparar la transferencia de genes a través del cerebro de RE^{GABA}-eTF^{SCN1A} dosificado a 4.8E +13 genomas virales por animal a la transferencia de genes a través del cerebro de eGFP dosificado a través de ICV en varias dosis, se observó un aumento en el genoma VG/diploide con dosis crecientes. Esto indicó que la transferencia de genes en el cerebro se produjo de manera dependiente de la dosis cuando se administró en AAV9 a través de ICV.

EJEMPLO 12

Transcripción de eTF^{SCN1A} en el cerebro

[00359] La transcripción de eTF^{SCN1A} bajo el control de un elemento regulador selectivo de GABA, RE^{GABA} (RE^{GABA}-eTF^{SCN1A}), se evaluó midiendo el ARNm de eTF^{SCN1A} usando un ensayo de expresión génica basado en ddPCR. ARN tisular se aisló con RNeasy Plus Mini kits (Qiagen) o RNeasy Lipid Tissue Mini kits (Qiagen) para tejidos cerebrales. La cantidad de ARN se determinó y normalizó usando espectrofotómetro UV y la calidad de ARN (RIN) se verificó usando chip de ARN Bioanalizador. Se utilizó un microgramo de ARN de tejido para el tratamiento con DNasa y la síntesis de ADNc con el kit de síntesis de ADNc SuperScript VILO con los kits de enzimas ezDNase™ (Thermo Fisher). 50 microgramos de ARN se convirtieron en ADNc. Se adicionó ADNc a una reacción de 20 microlitros junto con ddPCR Super Mix para sondas (sin dUTP)

(Bio-Rad) y cebadores y sondas TaqMan dirigidos contra regiones de la secuencia de eTF^{SCN1A} (TABLA 22). Se generaron gotas y se amplificaron las plantillas usando generador de gotas automatizado y termociclador (Bio-Rad). Después de la amplificación de PCR, la placa se cargó y se leyó mediante el lector de gotas QX2000 para proporcionar niveles de expresión génica en los tejidos. El gen de *mono* ARFGAP2 (Mf*ARFGAP2*) (Thermo Fisher Scientific) sirvió como un control endógeno para normalizar los niveles de expresión génica y se amplificó en la misma reacción. Los transcritos promedio *para* ARFGAP2 fueron 1.85E+6/ug de ARN (**Figura 12**, límite superior). Límite de detección indicado por el límite inferior.

[00360] Se observó ARNm de eTF ^{SCN1A} en todo el cerebro en todos los animales, lo que indica que el promotor selectivo de GABA RE^{GABA}, fue transcripcionalmente activo en el tejido cerebral para todos los macacos tratados con AAV9-RE ^{GABA} -eTF ^{SCN1A} (Figura 12) FC: Corteza frontal; PC: corteza parietal; TC: corteza temporal; Cadera: hipocampo; Med: médula; OC: corteza occipital.

TABLA 22. Cebadores y sondas TaqMan dirigidos contra regiones de la secuencia de eTF^{SCN1A}

Nombre de los cebadores / sonda	**Descripción**	**Secuencia (5'-3')**
eTF^{SCN1A}	Cebador directo eTF ^{SCN1A}	GAATGTGGGAAATCATTCAGTCGC (SEQ ID NO: 200)
	Cebador inverso eTF ^{SCN1A}	GCAAGTTATCCTCTCGTGAGAAGG (SEQ ID NO: 201)
	Sonda eTF^{SCN1A}	GCGACAACCTGGTGAGACATCAACGCACC (SEQ ID NO: 202)
Mf*ARFGAP2*	Cebadores directos e inversos, sonda	Thermo Fisher (Cat#: 4448491)

EJEMPLO 13

Biodistribución y transcripción de eTF ^{SCN1A} en tejidos periféricos

[00361] El número de copias vectoriales se midió adicionalmente en varios órganos para evaluar la transducción de RE^{GABA}-eTF^{SCN1A} en tejidos en todo el cuerpo cuando se administró en AAV9 por ICV unilateral. Los niveles de transcripción de eTF^{SCN1A} también se midieron por ddPCR para evaluar la actividad transcripcional de eTF^{SCN1A} bajo el control del elemento regulador selectivo de GABA RE^{GABA} en tejidos en todo el cuerpo cuando se administró en AAV9 por ICV unilateral. Ambos métodos se realizaron como se describe

generalmente anteriormente. La transducción y la transcripción de eTF ^{SCN1A} de RE$^{GABA\text{-}eTF}$ en la médula espinal (SC) y el ganglio de la raíz dorsal (DRG) fueron comparables a los niveles observados en el cerebro. Con la excepción del hígado, la transducción de RE^{GABA} -eTF ^{SCN1A} fue menor en tejidos periféricos fuera del cerebro (**Figura 13**) La transducción de RE^{GABA}-eTF^{SCN1A} en el hígado fue mayor que en el cerebro. La transcripción de eTF^{SCN1A} no se detectó en tejidos periféricos, incluidos el corazón, los pulmones y las gónadas. Sin embargo, los niveles de transcripción de eTF ^{SCN1A} en el hígado fueron comparables a los niveles de$^{eTF\ SCN1A}$ medidos en el cerebro. Además, la transcripción de eTF ^{SCN1A} en el hígado es extremadamente baja cuando se normaliza al número de copias de vector presentes (aproximadamente 1000 veces menor en comparación con la transcripción de eTF^{SCN1A} en el cerebro). En general, esto demostró que la transcripción de eTF^{SCN1A} bajo el control del elemento regulador selectivo de GABA RE^{GABA} está restringida al CNS.