

REIVINDICACIONES

1. Un casete de expresión, que comprende una secuencia que codifica para un factor de transcripción que no se presenta de manera natural que comprende un dominio de unión a ADN de dedo de zinc que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 135, 371, 372 y 376, y un dominio de activación de transcripción que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 95, 96, 97, 98, 100, y 114.

2. El casete de expresión de la reivindicación 1, en donde el dominio de unión a ADN de dedo de zinc que comprende SEQ ID NO: 135 comprende SEQ ID NO: 131.

3. El casete de expresión de la reivindicación 1, en donde el dominio de activación de transcripción comprende SEQ ID NO: 95.

4. El casete de expresión de la reivindicación 1, en donde el casete de expresión comprende además un elemento regulador que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 183, 184, 185, o 417.

5. El casete de expresión de la reivindicación 4, en donde el elemento regulador comprende una secuencia que tiene SEQ ID NO: 183 o 185.

6. El casete de expresión de la reivindicación 1, en donde el casete de expresión es una parte de un vector viral.

7. El casete de expresión de la reivindicación 6, en donde el vector viral es un virus AAV.

8. El casete de expresión de la reivindicación 7, en donde el virus AAV es un virus AAV9 o un virus scAAV9.

9. Un método para incrementar la expresión de SCN1A en una célula que comprende poner en contacto la célula con un casete de expresión de la reivindicación 1.

10. El método de la reivindicación 9, en donde la célula es una neurona PV.

11. Un casete de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína de unión a ADN que no se presenta de manera natural que comprende un dominio de unión a ADN, en donde el dominio

de unión a ADN comprende seis dominios de dedos de zinc que comprenden las siguientes hélices de reconocimiento en orden de N a C: SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:117, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:119, y SEQ ID NO:120.

12. El casete de expresión de la reivindicación 11, en donde el dominio de unión a ADN se une a un sitio diana que comprende SEQ ID NO: 35.

13. El casete de expresión de la reivindicación 11, en donde:

(i) el dominio de unión a ADN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:131;

(ii) el dominio de unión a ADN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:131;

(iii) el dominio de unión a ADN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:131; o

(iv) el dominio de unión a ADN comprende SEQ ID NO:131.

14. El casete de expresión de la reivindicación 11, en donde la proteína de unión a ADN que no se presenta de manera natural comprende además un dominio de activación de transcripción.

15. El casete de expresión de la reivindicación 14, en donde el dominio de activación de transcripción comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:95; el dominio de activación de transcripción comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:95; o el dominio de activación de transcripción comprende SEQ ID NO:95.

16. El casete de expresión de la reivindicación 11, en donde el casete de expresión comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica para una primera secuencia de localización nuclear (NLS), en donde la primera NLS se fusiona al extremo N del dominio de unión a ADN que no se presenta de manera natural.

17. El casete de expresión de la reivindicación 16, en donde el casete de

expresión comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica para una segunda NLS, en donde la segunda NLS se ubica entre el dominio de unión a ADN y el dominio de activación de transcripción.

18. El casete de expresión de la reivindicación 17, en donde la primera NLS es la NLS de antígeno T grande de SV40 y la segunda NLS es la NLS de nucleoplasmina.

19. El casete de expresión de la reivindicación 18, en donde:

(i) el dominio de unión a ADN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:131 y el dominio de activación de transcripción comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:95;

(ii) el dominio de unión a ADN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:131 y el dominio de activación de transcripción comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:95;

o

(iii) el dominio de unión a ADN comprende SEQ ID NO:131 y el dominio de activación de transcripción comprende SEQ ID NO:95.

20. El casete de expresión de la reivindicación 19, en donde:

(i) la proteína de unión a ADN que no se presenta de manera natural comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:306;

(ii) la proteína de unión a ADN que no se presenta de manera natural comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:306;

(iii) la proteína de unión a ADN que no se presenta de manera natural comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:306; o

(iv) la proteína de unión a ADN que no se presenta de manera natural comprende SEQ ID NO: 306.

21. El casete de expresión de la reivindicación 19, en donde:

(i) el casete de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:443;

(ii) el casete de expresión comprende una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:443;

(iii) el casete de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 95% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:443; o

(iv) el casete de expresión comprende SEQ ID NO: 443.

22. El casete de expresión de la reivindicación 11, en donde el casete de expresión comprende además un elemento regulador selectivo de parvalbúmina (PV) colocado encima de la secuencia que codifica para la proteína de unión a ADN que no se presenta de manera natural.

23. El casete de expresión de la reivindicación 22, en donde:

(i) el elemento regulador selectivo de PV comprende SEQ ID NO: 183;

(ii) el elemento regulador selectivo de PV comprende una secuencia que tiene 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 183; o

(iii) el elemento regulador selectivo de PV comprende una secuencia que tiene 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 183.

24. El casete de expresión de la reivindicación 11, en donde el casete de expresión comprende además una secuencia de poliA colocada cadena abajo del polinucleótido que codifica para la proteína de unión a ADN que no se presenta de manera natural.

25. El casete de expresión de la reivindicación 24, en donde la secuencia de poliA comprende SEQ ID NO: 327.

26. El casete de expresión de la reivindicación 25, en donde el casete de expresión comprende, además:

una primera secuencia de ácido nucleico que codifica para una primera secuencia de localización nuclear (NLS), en donde la primera NLS se fusiona al extremo N de la proteína de unión a ADN que no se presenta de manera natural; y

una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica para una segunda NLS, en donde la segunda NLS se ubica entre el dominio de unión a ADN y el dominio de activación de transcripción;

en donde el dominio de unión a ADN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:131 y el dominio de activación de transcripción comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO:95.

27. El casete de expresión de la reivindicación 26, en donde:

5 (i) el casete de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 354;

(ii) el casete de expresión comprende una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 354;

(iii) el casete de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 98% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 354; o

10 (iv) el casete de expresión comprende SEQ ID NO: 354.

28. Un vector de expresión que comprende el casete de expresión de la reivindicación 11, opcionalmente en donde el vector de expresión es un vector viral.

29. El vector de expresión de la reivindicación 28, en donde el vector de expresión es un vector viral, y en donde el vector viral es un vector de virus adeno-asociado (AAV).

15 30. El vector de expresión de la reivindicación 29, en donde el vector de AAV es AAV1, AAV2, AAVS, AAV8, AAV9, scAAV1, scAAV2, scAAV5, scAAV8, o scAAV9.

31. El vector de expresión de la reivindicación 30, en donde el casete de expresión comprende además una secuencia de repetición terminal invertida (ITR) de AAV de 5' y una secuencia de ITR de AAV de 3'.

20 32. El vector de expresión de la reivindicación 31, en donde la secuencia de ITR de AAV de 5' y la secuencia de ITR de AAV de 3' son secuencias de ITR de AAV1, AAV2, AAV, AAV8, AAV9, scAAV1, scAAV2, scAAV5, scAAV8, o scAAV9.

33. Una partícula viral que comprende el casete de expresión de la reivindicación 11 o el vector de expresión de la reivindicación 28.

25 34. La partícula viral de la reivindicación 33, en donde la partícula viral

comprende proteínas de cápside de un AAV, opcionalmente en donde el AAV es un AA1, AAV2, AAV, AAV8 o AAV9.

35. Una célula hospedadora que comprende el casete de expresión de la reivindicación 11 o el vector de expresión de la reivindicación 28.

36. Una composición farmacéutica que comprende (a) el casete de expresión de la reivindicación 11, el vector de expresión de la reivindicación 28, o la partícula viral de la reivindicación 33, y (b) uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

37. Un método para incrementar la expresión de SCN1A en una célula, el método que comprende poner en contacto la célula con el casete de expresión de cualquiera de la reivindicación 11, el vector de expresión de la reivindicación 28, la partícula viral de la reivindicación 33, o la composición farmacéutica de la reivindicación 36.

38. Una composición que comprende un polinucleótido, en donde el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína de unión a ADN que no se presenta de manera natural que comprende un dominio de unión a ADN, en donde el dominio de unión a ADN es un dominio de unión a ADN de dedo de zinc que comprende SEQ ID NO: 414.

39. Un casete de expresión, que comprende una secuencia que codifica para un factor de transcripción que no se presenta de manera natural que incrementa la expresión del gen SCN1A en una célula, en donde el factor de transcripción se une a un sitio diana que es capaz de incrementar la expresión de SCN1A por al menos 20% en un ensayo de activación transcripcional, y en donde el factor de transcripción es capaz de reducir la frecuencia de convulsiones en un modelo de ratón del síndrome de Dravet por al menos 20% en un ensayo de convulsiones hipertérmicas.

40. El casete de expresión de la reivindicación 39, en donde el factor de transcripción se une a una región genómica que tiene 18-27 nucleótidos.

41. El casete de expresión de la reivindicación 39 o 40, en donde el factor de transcripción comprende un dominio de unión a ADN.

42. El casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 39-41,

en donde el factor de transcripción comprende un dominio de unión a ADN y un dominio de activación de transcripción.

43. El casete de expresión de la reivindicación 41 o 42, en donde el dominio de unión a ADN comprende al menos 80% de identidad de secuencia a su contraparte humana más cercana.

5 44. El casete de expresión de la reivindicación 43, en donde el dominio de unión a ADN comprende al menos 90% de identidad de secuencia a su contraparte humana más cercana.

45. El casete de expresión de la reivindicación 42 o 43, en donde tanto el dominio de unión a ADN como el dominio de activación de transcripción comprenden al menos 80% de identidad de secuencia a sus contrapartes humanas más cercanas.

10 46. El casete de expresión de la reivindicación 45, en donde tanto el dominio de unión a ADN como el dominio de activación de transcripción comprenden al menos 90% de identidad de secuencia a sus contrapartes humanas más cercanas.

15 47. El casete de expresión de la reivindicación 41 o 42, en donde el dominio de unión a ADN comprende un ARN guía y una proteína Cas inactivada por nucleasa.

48. El casete de expresión de la reivindicación 47, en donde la proteína Cas inactivada con nucleasa es una Cas9 inactivada con nucleasa.

49. El casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 41-46, en donde el dominio de unión a ADN comprende un dominio de dedo de zinc.

20 50. El casete de expresión de la reivindicación 49, en donde el dominio de unión a ADN comprende de seis a nueve dominios de dedos de zinc.

51. El casete de expresión de la reivindicación 50, en donde el dominio de unión a ADN comprende seis dedos de zinc.

52. El casete de expresión de la reivindicación 51, en donde el dominio de unión a ADN se une a una región genómica que tiene 18 nucleótidos.

25 53. El casete de expresión de la reivindicación 50, en donde el dominio de unión a ADN comprende nueve dedos de zinc.

54. El casete de expresión de la reivindicación 53, en donde el dominio de unión a ADN se une a una región genómica que tiene 27 nucleótidos.

55. El casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 41-46, 49 o 50, en donde el dominio de unión a ADN comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad de secuencia a cualquiera de SEQ ID NO: 135, 371, 372, o 376.

56. El casete de expresión de la reivindicación 55, en donde el dominio de unión a ADN comprende una secuencia de cualquiera de SEQ ID NOS: 135, 371, 372, o 376.

57. El casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 41-46 o 49-56, en donde el dominio de unión a ADN se deriva de EGR1 humana o EGR3 humana.

58. El casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 41-46 o 49-56, en donde el dominio de activación de transcripción comprende una secuencia de VPR, VP64, CITED2, o CITED4, o un fragmento funcional de esta.

59. El casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 41-46 o 49-58, en donde el dominio de activación de transcripción comprende una secuencia de CITED2 o CITED4 humana, o un fragmento funcional de esta.

60. El casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 39-59, en donde 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.

61. El casete de expresión de la reivindicación 60, en donde el elemento regulador comprende una secuencia que tiene cualquiera de SEQ ID NO: 183, 184, 185, o 417.

62. El casete de expresión de la reivindicación 61, en donde el elemento regulador comprende una secuencia de SEQ ID NO: 183 o 185.

63. El casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 39-62, en donde el casete de expresión es una parte de un plásmido o un vector viral.

64. El casete de expresión de la reivindicación 63, en donde el vector viral es un virus AAV.

65. El casete de expresión de la reivindicación 64, en donde el virus AAV es un virus AAV9 o un virus scAAV9.

66. Un método para incrementar la expresión de SCN1A en una célula poniendo en contacto la célula con un casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 39-65.

5 67. El método de la reivindicación 66, en donde la célula es una neurona de PV.

68. Un casete de expresión, que comprende una secuencia que codifica para un factor de transcripción que no se presenta de manera natural que incrementa la expresión del gen de progranulina (GRN) en una célula.

69. El casete de expresión de la reivindicación 68, en donde el factor de transcripción se une a una región genómica que tiene 18-27 nucleótidos.

10 70. El casete de expresión de la reivindicación 68 o 69, en donde el factor de transcripción comprende un dominio de unión a ADN.

71. El casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 68-70, en donde el factor de transcripción comprende un dominio de unión a ADN y un dominio de activación de transcripción.

15 72. El casete de expresión de la reivindicación 70 o 71, en donde el dominio de unión a ADN comprende un ARN guía y una proteína Cas inactivada por nucleasa.

73. El casete de expresión de la reivindicación 72, en donde la proteína Cas inactivada con nucleasa es una Cas9 inactivada con nucleasa.

74. El casete de expresión de la reivindicación 70 o 71, en donde el dominio de unión a ADN comprende un dominio de dedo de zinc.

20 75. El casete de expresión de la reivindicación 74, en donde el dominio de unión a ADN comprende de seis a nueve dominios de dedos de zinc.

76. El casete de expresión de la reivindicación 75, en donde el dominio de unión a ADN comprende seis dedos de zinc.

77. El casete de expresión de la reivindicación 76, en donde el dominio de unión a ADN se une a una región genómica que tiene 18 nucleótidos.

25 78. El casete de expresión de la reivindicación 75, en donde el dominio

de unión a ADN comprende nueve dedos de zinc.

79. El casete de expresión de la reivindicación 78, en donde el dominio de unión a ADN se une a una región genómica que tiene 27 nucleótidos.

80. El casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 70, 71, 74 o 75, en donde el dominio de unión a ADN comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad de secuencia a cualquiera de SEQ ID NOS: 171 o 412-416.

81. El casete de expresión de la reivindicación 80, en donde el dominio de unión a ADN comprende una secuencia que tiene cualquiera de SEQ ID NO: 171 o 412-416.

82. El casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 70, 71 o 74-81, en donde el dominio de unión a ADN se deriva de EGR1 humana o EGR3 humana.

83. El casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 71 o 74-82, en donde el dominio de activación de transcripción comprende una secuencia de VPR, VP64, CITED2 o CITED4, o un fragmento funcional de esta.

84. El casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 68-83, en donde el casete de expresión comprende además un elemento regulador que impulsa la expresión del factor de transcripción.

85. El casete de expresión de la reivindicación 84, en donde el elemento regulador es un elemento regulador selectivo de tipo de célula.

86. El casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 68-85, en donde el casete de expresión es una parte de un plásmido o un vector viral.

87. El casete de expresión de la reivindicación 86, en donde el vector viral es un virus AAV.

88. El casete de expresión de la reivindicación 87, en donde el virus AAV es un virus AAV9 o un virus scAAV9.

89. Un método para incrementar la expresión de GRN en una célula por la administración de un casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 68-88.

90. Un casete de expresión que codifica para una proteína de unión a

ADN que no se presenta de manera natural, en donde la proteína de unión a ADN comprende un dominio de unión a ADN que comprende tres o más dominios de dedos de zinc, en donde la proteína de unión a ADN incrementa o reprime la expresión de un gen endógeno que no es SCN1A por un factor de al menos 5 veces, y en donde la proteína de unión a ADN tiene 90% o más de identidad de secuencia a su contraparte humana más cercana.

91. El casete de expresión de la reivindicación 90, en donde la proteína de unión a ADN se une a un sitio diana en el genoma humano que la proteína de contraparte humana no se une de manera natural.

92. El casete de expresión de la reivindicación 90 o 91, en donde la contraparte humana es EGR1.

93. El casete de expresión de la reivindicación 90 o 91, en donde la contraparte humana es EGR3.

94. El casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 90-93, en donde la proteína de unión a ADN comprende al menos 6 dominios de dedos de zinc.

95. El casete de expresión de la reivindicación 94, en donde la proteína de unión a ADN comprende 9 dominios de dedos de zinc.

96. El casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 90-95, en donde el dominio de unión a ADN comprende al menos una sustitución de aminoácidos en la posición -1, 2, 3 o 6 de hélices de reconocimiento de uno o más dominios de dedos de zinc.

97. El casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 90-96, en donde la proteína de unión a ADN comprende uno o más dominios de dedos de zinc derivados de EGR1 o EGR3.

98. El casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 90-97, en donde la proteína de unión a ADN comprende además un dominio de efector de transcripción.

99. El casete de expresión de la reivindicación 98, en donde el dominio de efector de transcripción se deriva de CITED2 o CITED4.

100. El casete de expresión de la reivindicación 98 o 99, en donde el

dominio de efector de transcripción se coloca en el extremo C del dominio de unión a ADN en la proteína de unión a ADN.

101. El casete de expresión de la reivindicación 98 o 99, en donde el dominio de efector se coloca en el extremo N del dominio de unión a ADN en la proteína de unión a ADN.

5 102. El casete de expresión de la reivindicación 98 o 99, en donde la proteína de unión a ADN comprende un dominio de efector colocado en el extremo N del dominio de unión a ADN en la proteína de unión a ADN y un dominio de efector colocado en el extremo C del dominio de unión a ADN en la proteína de unión a ADN.

10 103. El casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 90-102, en donde la proteína de unión a ADN reconoce un sitio de unión a diana de 18 pb o más.

104. El casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 103, en donde la proteína de unión a ADN reconoce un sitio de unión diana de 27 pb.

105. El casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 90-104, en donde el casete de expresión comprende además un elemento regulador selectivo de tipo de célula.

15 106. El casete de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 90-105, en donde el casete de expresión está en un vector viral.

107. El casete de expresión de la reivindicación 106, en donde el vector viral es AAV.

108. El casete de expresión de la reivindicación 107, en donde el AAV es AAV9 o scAAV9.

20

25