

CONSTRUCTOS DE ÁCIDO NUCLEICO, VECTORES VÍRICOS Y PARTÍCULAS VÍRICAS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a constructos de ácido nucleico, vectores víricos y partículas víricas para uso en el tratamiento y/o prevención de la enfermedad asociada con una pérdida de actividad funcional de la proteína de unión a la syntaxina 1 (STXBP1), identificada, por ejemplo, en trastornos del desarrollo neurológico asociados con epilepsia, tal como el síndrome de Ohtahara, el síndrome de West y el síndrome de Dravet.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Muchos trastornos del desarrollo neurológico se han asociado con alteraciones genéticas que causan la manifestación de síntomas clínicos graves de manera temprana en la vida. La alteración genética de STXBP1 está asociada con graves encefalopatías epilépticas de inicio temprano (EOEE, *Early Onset Epileptic Encephalopathies*), tales como el síndrome de Ohtahara, el síndrome de West y el síndrome de Dravet (Saito et al. 2008, Stamberger et al. 2016). Las encefalopatías STXBP1 (STXBP1-E) se caracterizan por un amplio espectro de síntomas, aunque ahora se ha establecido que todos los pacientes tienen discapacidad intelectual profunda y hasta un 85 % de los pacientes padece de crisis (*seizures*) (Abramov et al. 2020). La STXBP1-E puede estar causada por mutaciones dominantes, heterocigóticas, *de novo*, en el gen STXBP1 (Munc-18). Se han informado múltiples variantes genéticas con inclusión de variantes de sitio de sentido alterado (*missense*), finalizador (*nonsense*), de desplazamiento (*frameshift*), de deleciones, de duplicación y de corte y empalme (*splice*). La mayoría de los casos están causados por mutaciones de pérdida de función (LoF, *Loss de Function*) heterocigóticas, normalmente *de novo*, aunque en raros casos se hereda de precursores heterocigóticos o mosaicos. Se ha descrito una variante reciente que conlleva a la mutación homocigótica de STXBP1. Los estudios de la correlación entre genotipo-fenotipo han fracasado en la identificación de una clara asociación entre el tipo de mutación y las diferentes expresiones de STXBP1-E hasta la fecha.

La STXBP1 (Munc-18; proteína de unión a la syntaxina 1) es un componente esencial de la maquinaria molecular que controla la fusión de membranas mediada por SNARE (N-*ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*, receptor de proteína de inserción del factor sensible a N-etilmaleimida) en neuronas y células neuroendócrinas. La STXBP1 regula la formación del complejo SNARE mediante la unión a la conformación

cerrada de sintaxina-1, un proceso que acciona la fusión de vesículas sinápticas y la liberación de neurotransmisores en la sinapsis¹ (*synapse*).

La Figura 1 muestra un dibujo esquemático del impacto de STXBP1 sobre la transmisión sináptica en condiciones normales (A) y patológicas (B). La STXBP1 (Munc18) es un componente principal de la maquinaria sináptica y su interacción con Sintaxina-1 en la membrana presináptica consiste en un paso crucial para activar la liberación de neurotransmisores. En condiciones normales (A), la STXBP1 se expresa abundantemente en la membrana presináptica y la formación del complejo con Sintaxina-1 asegura una fusión de vesículas sinápticas eficaz, la que trae como resultado una liberación de neurotransmisores y la generación de corrientes postsinápticas. En condiciones patológicas (B), la STXBP1 mutante no expresa o no puede unirse directamente a Sintaxina-1 y los niveles restantes de STXBP1 normal no son suficientes para mantener una liberación de neurotransmisores eficaz, lo que trae como resultado corrientes postsinápticas reducidas [Patzke et al. 2015].

Los estudios de desactivación (KO, *Knock-Out*) de STXBP1 han demostrado que la ausencia de la proteína en las neuronas conlleva a una pérdida completa de secreción de neurotransmisores desde las vesículas sinápticas a lo largo del desarrollo (Verhage et al. 2000). La caracterización de modelos KO heterocigóticos para STXBP1 (HET) indicó que una reducción de alrededor del 50 % de los niveles de proteína STXBP1 trae como resultado un fenotipo de crisis fuerte caracterizado por espasmos mioclónicos y descargas de punta-onda (Kovacevic et al. 2018, Orock et al. 2018, Chen et al. 2020). La fenotipificación extendida de dichos ratones HET también mostró rendimiento cognitivo deteriorado, hiperactividad y conducta similar a la ansiedad. La generación de ratones con una expresión heterocigótica solamente en neuronas gabérgicas brindó mayores conocimientos del mecanismo de las mutaciones de STXBP1 al resaltar las diferencias en la transmisión sináptica desde interneuronas gabérgicas hacia las neuronas piramidales glutamatérgicas (Chen et al. 2020).

Las neuronas de ratón HET de STXBP1 muestran transmisión sináptica normal aunque un análisis más detallado indicó que niveles reducidos de STXBP1 crean depresión sináptica con aumento durante la estimulación intensa en las sinapsis glutamatérgicas, gabérgicas y

¹ N. del T.: La traducción del término "*synapse*" se refiere a la sinapsis nerviosa (punto de unión funcional entre dos neuronas), que difiere del término "*synapsis*" que hace referencia a la unión de cromosomas homólogos de ambos pronúcleos al comienzo de la profase, aunque la traducción al español sea "sinapsis" en ambos casos.

neuromusculares (Toonen et al. 2006). Los experimentos con neuronas humanas derivadas de citoblastos (*stem cell*) indicaron que una reducción comprendida entre el 20 y el 30 % en los niveles de STXBP1 trae como resultado una drástica disminución de la función sináptica normal (Patzke et al. 2015), lo que, además, resalta que los efectos de las mutaciones de STXBP1 pueden variar entre los subtipos neuronales y los antecedentes de la especie. Por el contrario, la sobreexpresión de STXBP1 en neuronas normales de ratón da por resultado una función sináptica aumentada (Toonen et al. 2006) y el análisis fenotípico de una cepa de ratón transgénico que sobreexpresa la isoforma de la proteína munc18-1a en el cerebro mostró diversas conductas relacionadas con la esquizofrenia (Urighen et al. 2013). Se han descrito roles no sinápticos adicionales para STXBP1 y se sugirió regular el mecanismo de la migración radial de neuronas corticales. Así pues, la STXBP1 también puede modular la fusión de vesículas en la membrana plasmática para distribuir varias proteínas sobre la superficie celular y el transporte de vesículas desde (el aparato de) Golgi hasta la membrana plasmática (Hamada et al. 2016).

Las mutaciones en STXBP1 que traen como resultado una pérdida de actividad funcional se han caracterizado en sistemas en *vitro* y en modelos para establecer el impacto sobre la función neuronal. Las mutaciones que conllevan al truncamiento de la proteína STXBP1, vinculada en general a un finalizador, un desplazamiento o deleciones, no se detectan en los sistemas neuronales y se formula la hipótesis de que dichas proteínas mutantes son rápidamente reguladas con descenso mediante un mecanismo de deterioro mediado por finalizador (*nonsense*) de sus mensajeros de ARN. Alrededor de entre el 40 y el 50 % de las mutaciones en STXBP1 son mutaciones de sentido alterado (Abramov et al. 2020) y los experimentos en *vitro* han demostrado que dichas mutaciones puntuales traen como resultado una estabilidad disminuida de la proteína STXBP1 y conllevan a niveles de expresión reducidos en los sistemas neuronales (Kovacevik et al. 2018, Zhu et al. 2020). El estudio de neuronas derivadas de citoblastos de pacientes con Othahara portadores de mutaciones de sentido alterado de STXBP1 también indicó una reducción de niveles de proteína STXBP1 (Yamashita et al. 2016). Más recientemente, se identificó una mutación de STXBP1 homocigótica y estudios en *vitro* indicaron que la mutación de L446F homocigótica causa un fenotipo de ganancia funcional (*gain-of-function*) mientras que ejerce menos impacto sobre los niveles de proteína que los informados previamente para las mutaciones heterocigóticas (Lammertse et al. 2020).

En general, el trastorno genético de STXBP1 se vincula con una pérdida de la función de la proteína STXBP1 y se han propuesto múltiples abordajes terapéuticos que incluyen chaperonas moleculares pequeñas para evitar la agregación de formas mutantes y

oligonucleótidos antisentido para regular con descenso los ARNm específicos, que regulan negativamente la expresión de la STXBP1 (Abramov et al. 2020). La complejidad para el desarrollo de una terapia modificadora de la enfermedad para STXBP1 se encuentra en el desarrollo de nuevas herramientas específicas capaces de restaurar la actividad funcional de STXBP1 normal y que pueda traducirse a nivel clínico. En este punto, no se encuentra disponible una terapia farmacológica aprobada que aborde el mecanismo de la enfermedad subyacente.

Existe una obvia necesidad médica insatisfecha para el tratamiento eficaz de trastornos genético de la STXBP1. La presente descripción proporciona una terapia génica modificadora de la enfermedad que sobreexpresa la STXBP1 para restaurar la actividad funcional normal de la STXBP1 con potencial curativo.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona, por medio de terapia génica, una copia sana del gen STXBP1, que tiene la capacidad de compensar los efectos de la mutación de la STXBP1 y restaurar la actividad funcional de la STXBP1 normal.

La presente invención proporciona:

Un constructo de ácido nucleico que comprende un transgén que codifica lo siguiente:

- i. una proteína de unión a la syntaxina 1 (STXBP1) que comprende las isoformas a, b, c, d, e, f, g o h, que tiene la secuencia dada en las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 respectivamente; o
- ii. una secuencia que tiene al menos una identidad de secuencia de 95 % o 96 % o 97 % o 98 % o 99 % o 99,5 % con respecto a las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 y que retiene la funcionalidad como STXBP1; o
- iii. una variante de origen natural que comprende, con referencia a la SEQ ID NO:9, una o más mutaciones, como se observa en la Tabla 7.

La invención proporciona, además, lo siguiente:

- ❖ Un vector vírico que comprende el constructo de ácido nucleico.
- ❖ Una partícula vírica que comprende el vector vírico.
- ❖ El uso médico de la partícula vírica el tratamiento y/o prevención de un trastorno genético de STXBP1.

- ❖ Un método para tratar y/o prevenir una enfermedad caracterizada por una o más mutaciones de la STXBP1, que comprende administrar la partícula vírica a un sujeto que la necesita.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ILUSTRACIONES

Figura 1: Dibujo esquemático del impacto de la STXBP1 sobre la transmisión sináptica en condiciones normales (A) y patológicas (B). STXBP1 (Munc18) es un componente principal de la maquinaria sináptica y su interacción con Sintaxina-1 en la membrana presináptica es un paso crucial para activar la liberación de neurotransmisores. En condiciones normales (A), la STXBP1 se expresa en forma abundante en la membrana presináptica y la formación de complejo con Sintaxina-1 asegura una fusión de vesículas sinápticas eficaz, lo que da como resultado la liberación de neurotransmisores y la generación de corrientes postsinápticas. En condiciones patológicas (B), la STXBP1 mutante no expresa o no puede unirse directamente a Sintaxina-1 y los niveles de la STXBP1 normal restantes no resultan suficientes para mantener una liberación de neurotransmisores eficaz, lo cual da como resultado corrientes postsinápticas reducidas [Patzke et al. 2015].

Figura 2: Alineamiento de secuencias de proteínas de las secuencias de STXBP1 de humanos, monos y ratones (isoforma a de humano de acuerdo con la SEQ ID NO: 9). El alineamiento muestra la alta homología de secuencias a través de las especies. Las secuencias de aminoácidos de mono y ratón son idénticas a la secuencia de aminoácido humana.

Figura 3: Dibujo esquemático de los constructos designados. En la Figura, el término “prom” se refiere al activador (*promoter*); “INT” se refiere al intrón, “h” significa de humano, SV40 hace referencia a la secuencia de poliadenilación SV40; “tag” se refiere a un identificador de HA o Myc, ubicado ya sea en el extremo (*terminus*) N o el C de un constructo.

Figura 4: (A) Imágenes por inmunofluorescencia de células AD-HEK293 transfectadas con plásmidos hSTXBP1 activadas por varios activadores (CAG, MECP2 y MECP2-intrón) detectadas con anticuerpo anti-STXBP1. (B) La sección de magnificación muestra que STXBP1 se localiza hacia la membrana celular. AD = adherente, NC (*Negative Control*) = control negativo.

Figura 5: (A) Imágenes por inmunofluorescencia de células Neuro-2A transfectadas con plásmidos hSTXBP1 activadas por varios activadores (CAG, MECP2 y MECP2-intrón) detectadas con anticuerpo anti-STXBP1. (B) La magnificación muestra que la STXBP1 está localizada hacia la membrana celular. NC = control negativo.

Figura 6: Análisis *Western blot* de células Neuro-2A transfectadas con hSTXBP1 activadas por varios activadores (CAG, MECP2 y MECP2-intrón). Se muestran dos replicas técnicas de cada condición. NC = control negativo, 1 = MECP2-intrón-hSTXBP1, 2 = CAG-hSTXBP1, 3 = MECP2-hSTXBP1.

Figura 7: Análisis *Western blot* de (A) hSTXBP1 identificadas por Myc, activadas por activador CAG, en células AD-HEK293 detectadas con anticuerpo anti-Myc y (B) hSTXBP1 identificadas por HA, activadas por activador hSYN, en células AD-HEK293, células SH-SY5Y y células Neuro-2a detectadas con anticuerpo anti-HA. Se muestran dos réplicas técnicas de cada condición. (C) También se detectaron proteínas identificadas por epítipo en células AD-HEK293 usando anticuerpos anti-STXBP1. NC = control negativo, 1 = CAG-hSTXBP1-Myc, 2 = CAG-Myc-hSTXBP1, 3 = hSYN-HA-hSTXBP1. La banda de proteína de fondo en el carril NC en (A) se debe a la detección de Myc endógeno por medio del anticuerpo anti-Myc.

Figura 8: Transducción de vector lentivírico de casetes de STXBP1 en neuronas glutamatérgicas derivadas de iPSC (*induced Pluripotent Stem Cell*, citoblastos pluripotentes inducidos). Las imágenes muestran ilustraciones representativas de la expresión de STXBP1 en condiciones con control (sin transducción) y siguientes a la transducción de casetes bajo el control de los activadores hSyn o MECP2.

Figura 9: Transducción de AAV9 de STXBP1 en neuronas primarias de ratón. (A) Imágenes representativas de tinción de STXBP1 en neuronas corticales primarias de ratón transducidas con el vector vírico AAV9 a MOI 5.0E+5 GC/célula. Las ilustraciones muestran condiciones con control (sin transducir) y la expresión de STXBP1 bajo el control de activadores hSyn, MECP2 o MECP2-intrón. (B) Comparación de la tinción de HA (derecha) con la tinción de STXBP1 (izquierda) en las mismas neuronas corticales primarias de ratón.

Figura 10: Colocalización de sobreexpresión de STXBP1 en neuronas positivas MAP2. Las imágenes son ilustraciones representativas de tinción de identificador anti-HA (paneles izquierdos) y tinción anti-MAP2 (paneles derechos) en neuronas primarias de ratón después

de la transducción de los vectores víricos AAV9. Las flechas indican ejemplos de células que expresan STXBP1 (HA) y el marcador neuronal (MAP2).

Figura 11: Análisis de las copias de ADN de vector vírico. Los datos de qPCR de SV40pA (señal poliA de virus símico 40) normalizado mediante el número de genomas diploide de ratón del hipocampo izquierdo y de la corteza frontal izquierda de ratones de 5 semanas de edad después del tratamiento con AAV. Se muestran los datos para el vehículo y para los cuatro grupos transducidos con AAV9 (virus de control, hSyn, MECP2, MECP2-intrón). Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD (*Standard Deviation*, desviación estándar).

Figura 12: Análisis de expresión de ARNm de STXBP1. Los datos se expresan como la expresión relativa normalizada con respecto a dos genes de referencia y graduados con respecto al promedio de la expresión de todos los grupos (media $\pm$ SD). El análisis se realizó a partir de tejidos del hipocampo izquierdo y corteza frontal izquierda de ratones de 5 semanas de edad después del tratamiento con AAV. Se muestran los datos para el vehículo y los cuatro grupos transducidos con AAV9 (virus de control, hSyn, MECP2, MECP2-intrón).

Figura 13: Análisis de proteínas mediante *Western blot*. (A) Un *Western blot* que muestra la expresión de identificador de HA para los diferentes casetes en la corteza (n = 5 a 7 por grupo). Se utilizó GAPDH (*GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase*, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) como un control de carga. (B) Cuantificación de las intensidades de banda de identificador de HA, cada muestra está normalizada con respecto al control de carga de GAPDH. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD.

Figura 14: Distribución de células infectadas en el cerebro de ratón usando indicador (*reporter*) GFP (*Green Fluorescent Protein*, proteína verde fluorescente) del virus AAV9-hSyn-NLS-eGFP-NLS. (A) Sección sagital de un cerebro de ratón que recibió AAV9-hSyn1-NLS-GFP-NLS icv, sacrificado 1 mes después, y con inmunotinción para marcaje de GFP. La distribución de células que expresan la GFP se observó desde la parte delantera hacia la parte posterior del cerebro completo. Algunas de las regiones cerebrales principales que muestran células GFP+ están resaltadas con rectángulos. (B-G): alta magnificación de las regiones cerebrales que muestran células GFP+ de A (las flechas apuntan hacia las células GFP+).

Figura 15: Caracterización de células que expresan indicador de GFP del virus AAV9-hSyn-NLS-eGFP-NLS. Se llevó a cabo un marcaje inmunofluorescente doble para detectar (A-F) GFP y el marcador neuronal NeuN, (G-L) GFP y el marcador astrocítico GFAP (*Glial*

Fibrillary Acidic Protein, proteína ácida fibrilar glial). Las células positivas tanto para (A-C) GFP como (D-F) NeuN se observaron en todas las regiones cerebrales (las flechas apuntan hacia las células con doble marcaje) lo que indica que las neuronas fueron transducidas y expresaron el gen indicador. Por el contrario, no se detectó señal de GFP (G-I) en las células GFAP positivas (J-L), lo que sugiere que los astrocitos no estaban expresando el gen indicador.

Figura 16: Distribución de la proteína de fusión HA-STXBP1 de diferentes activadores en el cerebro de ratón después de la administración de AAV9. Se estudió la distribución de STXBP1 identificado por HA sobreexpresada de diferentes activadores en el cerebro de ratones por medio de inmunohistoquímica contra HA. Como condiciones de control negativas, no se observó señal de HA en animales que recibieron (A) PBS solamente o (B) virus AAV9-hSyn-GFP icv. (C) Como un control negativo (NC) de la selectividad de anticuerpos, no se observó señal de HA en animales que recibieron virus AAV9-MECP2-intrón-HA-STXBP1, pero para los cuales el anticuerpo de HA primario fue omitido durante el procedimiento de inmunohistoquímica. (D-F) La señal de HA se observó en el cerebro de todos los animales inyectados con los diferentes virus que expresan HA-STXBP1 a partir de los diferentes activadores. Los 3 activadores conllevaron a un patrón común de distribución de HA a través del cerebro completo, con una expresión principal observada en la corteza cerebral, el hipocampo, el cuerpo estriado, los bulbos olfativos, la sustancia negra y los fascículos en el prosencéfalo. Las diferencias destacables en la distribución de HA entre activadores se informan en la Tabla 16.

Figura 17: Distribución de la proteína de fusión HA-STXBP1 de diferentes activadores en el hipocampo después de la administración de AAV9. Se llevó a cabo el marcaje inmunofluorescente doble para detectar (A-C) HA y (D-F) el marcador neuronal NeuN, que se utilizó para identificar las diferentes partes del hipocampo. Los 3 activadores conllevaron a la expresión de HA en todo el hipocampo, principalmente en las proyecciones neuronales (Mol, LMol, Or, MF) y, ocasionalmente, en pericariones (*cell bodies*). (F) El activador MECP2-intrón conllevó a una mejor cobertura y mayor intensidad de la señal de HA en comparación con los otros 2 activadores (D, E). LMol: (*Lacunosum Molecular layer*) capa molecular lacunar en el hipocampo; MF: (*Mossy Fibers*) fibras musgosas; Mol: (*Molecular layer*) capa molecular del giro dentado; Or: (*stratum Oriens*) la capa de oriens.

Figura 18: Caracterización de células que expresan HA-STXBP1 de diferentes activadores. Se llevó a cabo el marcaje inmunofluorescente doble para detectar (A-C) HA y (D-F) el marcador neuronal NeuN. Los pericariones que fueron positivos para HA y que se

observaron ocasionalmente en diferentes regiones del cerebro también fueron positivos para NeuN, lo que respalda que los 3 activadores activan la expresión del transgén en las neuronas. Las flechas apuntan hacia las células con doble marcaje.

Figura 19: Análisis de los niveles de ARNm de la variante STXBP1 en cerebro de ratón por medio de qPCR. El análisis de ARNm de las muestras de tejido cerebral de la corteza caudal (hemisferio derecho) de compañeros de camada WT (salvajes) y los ratones HET (heterocigóticos) (n = 11 a 13 por grupo). (A): El análisis de la expresión de ARNm de STXBP1 endógeno total (sonda común que reconoce todos los transcritos de STXBP1). (B) y (C): El análisis de la expresión de ARNm de las variantes de STXBP1, que usan dos sondas distintas que reconocen específicamente la isoforma larga (B) o la isoforma corta de la proteína (C). Los datos se muestran como nivel de expresión de ARNm, al calcular el valor de $2^{-\Delta Ct}$, donde la expresión se normalizó con respecto al promedio de los dos genes de referencia. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD.

Figura 20: El análisis de los niveles de proteína STXBP1 en cerebro de ratón por *Western blot*. Se han analizado las muestras de tejido de la corteza frontal derecha (medial o interna) de compañeros de camada WT (salvaje) y los ratones HET (heterocigóticos) (n = 11 a 13 por grupo). (A): Los análisis de *Western blot* que representan la expresión de proteína STXBP1 total. (B): Los datos de cuantificación de los resultados de *Western blot* respectivos en (A). Se utilizó B-actina como un control de carga, para la normalización. El grupo "WT" se utilizó como el grupo de gradación. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD.

Figura 21: El análisis de los niveles de proteína de la variante de STXBP1 en cerebro de ratón mediante LC-MS. Se han analizado las muestras de tejido de la mitad lateral de la corteza frontal de compañeros de camada WT (salvajes) y ratones HET (heterocigóticos) (n = 11 a 13 por grupo). (A): La cuantificación de péptido de STXBP1 total frente a isoforma larga de STXBP1 frente a isoforma corta de STXBP1. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD. (B): Los valores de *Western blot* que representan las isoformas cortas y largas de STXBP1. (C): Datos combinados de cuantificación de los resultados de *Western blot* respectivos en (B). Se utilizó B-actina como un control de carga. Los datos se muestran como la relación entre la intensidad de banda de cada isoforma de STXBP1 y la respectiva banda de B-actina. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD.

Figure 22: El análisis de los niveles de proteína syntaxina-1A (STX1A) en cerebro de ratón mediante *Western blot*. Cuantificación de expresión de proteína STX1A en las muestras de tejido de cerebro de ratón (n = 11 a 13 por grupo). Se utilizó B-actina como un control de

carga, para la normalización. Se utilizó el grupo "WT" como el grupo de gradación. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD.

Figura 23: El análisis de la eficiencia de la transducción de los AAV en cerebro de ratón por medio de qPCR (7 semanas después de la inyección) (A) Cuantificación absoluta por medio de qPCR de copias genómicas víricas en ratones WT inyectados con vehículo-PBS (WT), ratones HET inyectados con vehículo-PBS (HET), ratones HET inyectados con variante larga de STXBP1 (HET-AAV9(L)) y ratones HET inyectados con variante corta de STXBP1 (HET-AAV9(S)). Las muestras se recolectaron de la corteza caudal (hemisferio derecho) y se cuantificaron usando SV40pA normalizada con respecto al número absoluto de genoma de ratón diploide. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD. Por grupo, se analizaron n=14 a 15 animales, y se aplicó un ANOVA no paramétrico de una vía (prueba de Kruskal-Wallis) seguido por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* de Dunn. No se observó diferencia significativa entre los grupos transducidos. (B) El análisis de la expresión de ARNm de los SV40 PolIA y (C) STXBP1 específica de humanos. Los datos se muestran como nivel de expresión de ARNm, al calcular el valor de $2^{-\Delta Ct}$, donde la expresión se normalizó con respecto al promedio de los dos genes de referencia. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD. Por grupo, se analizaron n=14 a 15 animales, y se aplicó un ANOVA no paramétrico de una vía (prueba de Kruskal-Wallis) seguido por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* de Dunn. No se observó diferencia significativa entre los grupos transducidos.

Figura 24: El análisis de la expresión de la variante de STXBP1 después del tratamiento con AAV en cerebro de ratón por medio de qPCR (7 semanas después de la inyección). El análisis de la expresión del ARNm de la variante de STXBP1 se llevó a cabo usando sondas que miden específicamente los niveles totales (de ratón y de humanos) de la variante corta (A) o la variante larga (B). Los datos se muestran como nivel de expresión de ARNm, al calcular el valor de $2^{-\Delta Ct}$, donde la expresión se normalizó con respecto al promedio de los dos genes de referencia. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD. Por grupo, se analizaron n=14 a 16 animales.

Figura 25: El análisis de la expresión de la variante de STXBP1 después del tratamiento con AAV en cerebro de ratón por medio de *Western blot* (7 semanas después de la inyección). El análisis de proteína por *Western blot* de muestras de la corteza frontal derecha (medial), en ratones WT inyectados con vehículo-PBS (WT), ratones HET inyectados con vehículo-PBS (HET), ratones HET inyectados con variante larga de STXBP1 (HET-AAV9(L)) y ratones HET inyectados con variante corta de STXBP1 (HET-AAV9(S))

- (A) Cuantificación de los datos obtenidos por *Western blot* para la expresión total de proteína STXBP1 (variantes larga y corta).
- (B) Cuantificación de los datos obtenidos por *Western blot* para la expresión de proteína la variante larga de STXBP1.
- (C) Cuantificación de los datos obtenidos por *Western blot* para la expresión de proteína la variante corta de STXBP1.
- (D) Cuantificación de los datos obtenidos por *Western blot* para la expresión de la proteína syntaxina-1A

Se utilizó B-actina como un control de carga, para la normalización de cada intensidad de banda de STXBP1 y STX1A. Se utilizó el grupo WT (WT) de vehículo como el grupo de gradación. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD. Los datos se analizaron usando ANOVA no paramétrico de una vía (prueba de Kruskal-Wallis) seguido por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* de Dunn (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Figura 26: Distribución cerebral de la expresión de STXBP1 con identificación de HA después del tratamiento con AAV en cerebro de ratón mediante inmunohistoquímica (7 semanas después de la inyección). La tinción con identificador HA se realizó en secciones sagitales de ratones HET inyectados con la variante larga con identificación de HA de STXBP1 y se comparó con los ratones tratados con vehículo (PBS). Se muestra un ejemplo de la sección cerebral representativa para el grupo tratado con AAV (animal 6023) y el grupo tratado con vehículo (animal 6009). Se observa una fuerte tinción de HA en las principales regiones del cerebro en el animal 6023 (tratado con AAV) mientras que no se observa tinción de HA en los grupos tratados con PBS (animal 6009).

Figura 27: El análisis de las descargas de punta-onda (SWD, *spike wave discharges*) después del tratamiento con AAV en STXBP1 de cerebros de ratón HET mouse por EEG (6 a 7 semanas) (A,B) y 24 semanas (C,D) después de la inyección. (A) Promedio del número de SWDs en ratones WT inyectados con vehículo-PBS (WT, $n=10$), ratones HET inyectados con vehículo-PBS (HET, $n=19$), ratones HET inyectados con variante larga de STXBP1 (HET-AAV9(L), $n=15$) y ratones HET inyectados con variante corta de STXBP1 (HET-AAV9(S), $n=16$). Las SWD se analizaron 6 a 7 semanas después de la inyección durante un período de 24 h por 7 días consecutivos. (B) El análisis del número de animales “sin crisis” (sin ninguna SWD detectada durante los registros) y animales “con crisis” (SWD detectada durante los registros). (C) Promedio del número de SWD en ratones WT inyectados con vehículo-PBS (WT, $n=5$), ratones HET inyectados con vehículo-PBS (HET, $n=12$), ratones HET inyectados con variante larga de STXBP1 (HET-AAV9(L), $n=9$) y ratones HET

inyectados con variante corta de STXBP1 (HET-AAV9(S), n=11). Las SWD se analizaron 24 semanas después de la inyección durante un período de 24 h por 7 días consecutivos. (D) El análisis del número de animales que están “libres de crisis” (sin ninguna SWD detectada durante los registros) y animales “con crisis” (SWD detectada durante los registros) 24 semanas después de la inyección. Se analizó la diferencia entre grupos mediante ANOVA no paramétrico de una vía (prueba de Kruskal-Wallis) seguido por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* de Dunn (**** $p < 0,0001$), (** $p < 0,001$) y para el análisis de la ausencia de crisis se utilizó una prueba de contingencia de chi cuadrado.

Figure 28: El análisis del peso corporal después del tratamiento con AAV en STXBP1 de ratones HET (1 a 22 semanas después de la inyección) (A) Promedio de pesos corporales como una función de la edad en ratones WT (n=17) y HET (n=16) inyectados con vehículo-PBS. Se analizó la diferencia entre grupos mediante ANOVA de mediciones repetidas de dos vías seguido por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* LSC de Fisher sin corrección (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). (B) Promedio del peso corporal medido a las 22 semanas de edad en ratones WT inyectados con vehículo-PBS (WT, n=17) y ratones HET inyectados con vehículo-PBS (HET, n=16), ratones HET inyectados con variante larga de STXBP1 (HET-AAV9(L), n=10) y ratones HET inyectados con variante corta de STXBP1 (HET-AAV9(S), n=13). La diferencia entre grupos se analizó mediante ANOVA paramétrico de una vía seguido por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* LSC de Fisher sin corrección ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; ns, no significativo). Los gráficos de barra son la media $\pm$ SEM.

Figura 29: El análisis de la fijación de miembros posteriores después del tratamiento con AAV en STXBP1 de ratones HET (4 a 22 semanas después de la inyección) (A) Promedio del puntaje de la fijación de miembros posteriores como una función de la edad en ratones WT inyectados con vehículo-PBS (WT, n=17) y ratones HET inyectados con vehículo-PBS (HET, n=16), ratones HET inyectados con variante larga de STXBP1 (HET-AAV9(L), n=10) y ratones HET inyectados con variante corta de STXBP1 (HET-AAV9(S), n=13). (B) Promedio del puntaje de la fijación de miembros posteriores registrado a las 22 semanas de edad en ratones WT inyectados con vehículo-PBS (n=17) y ratones HET inyectados con vehículo-PBS (n=16), AAV9/MECP2-int-STXBP1-L (n=10) y AAV9/MECP2-int-STXBP1-S (n=13). La diferencia entre grupos se analizó por ANOVA no paramétrico de una vía (prueba de Kruskal-Wallis) seguido por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* de Dunn sin corrección (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; ns, no significativo). Los gráficos de barra son la media $\pm$ SEM.

Figure 30: El análisis de los STXBP1 ratones HET en la prueba de colgado de alambre (*wire hanging test*) después del tratamiento con AAV (8 semanas después de la inyección). Latencia hasta la caída medida en la prueba de colgado de alambre de las cuatro extremidades a las 8 semanas de edad en ratones WT inyectados con vehículo-PBS (WT, n=17) y ratones HET inyectados con vehículo-PBS (HET, n=16), ratones HET inyectados con variante larga de STXBP1 (HET-AAV9(L), n=10) y ratones HET inyectados con variante corta de STXBP1 (HET-AAV9(S), n=13). La diferencia entre grupos se analizó mediante ANOVA paramétrico de una vía seguido por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* LSC de Fisher sin corrección (****p<0,0001; ns, no significativo). Los gráficos de barra son la media ± SEM.

Figura 31: El análisis de STXBP1 de ratones HET en la prueba de miedo condicionado después del tratamiento con AAV (10 semanas después de la inyección) (A) Promedio de conducta congelada durante la prueba de memoria de miedo contextual realizada a las 10 semanas de edad 24 h después de la fase de entrenamiento de miedo condicionado en ratones WT inyectados con vehículo-PBS (WT, n=17) y ratones HET inyectados con vehículo-PBS (HET, n=16), ratones HET inyectados con variante larga de STXBP1 (HET-AAV9(L), n=10) y ratones HET inyectados con variante corta de STXBP1 (HET-AAV9(S), n=13). La diferencia entre grupos se analizó mediante ANOVA paramétrico de una vía seguido por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* LSC de Fisher sin corrección (*p<0,05; ****p<0,0001). (B) Promedio de conducta de congelamiento durante la prueba de memoria del miedo con señal realizada en los mismos animales que en (A) 1 h después de la prueba de memoria de miedo contextual. La diferencia entre los grupos se analizó por ANOVA paramétrico de una vía seguido por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* LSC de Fisher sin corrección (*p<0,05; ***p<0,001; ****p<0,0001). Los gráficos de barra son la media ± SEM.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

Tabla 1: Resumen de las secuencias

Identificador de la secuencia	Nombre de la secuencia
SEQ ID NO: 1	Activador CAG 1.6kb
SEQ ID NO: 2	Activador hSYN
SEQ ID NO: 3	Activador MECP2
SEQ ID NO: 4	activador hNSE
SEQ ID NO: 5	Activador CamKII

SEQ ID NO: 6	Activador hSTXBP1 endógeno
SEQ ID NO: 7	Isoforma a que codifica la secuencia de ADNc (ADN complementario) de STXBP1 de humano
SEQ ID NO: 8	SV40 poli A
SEQ ID NO: 9	Isoforma a de STXBP1 de humano (603 aminoácidos)
SEQ ID NO: 10	Isoforma b de STXBP1 de humano (594 aminoácidos)
SEQ ID NO: 11	Isoforma c de STXBP1 de humano
SEQ ID NO: 12	Isoforma d de STXBP1 de humano
SEQ ID NO: 13	Isoforma e de STXBP1 de humano
SEQ ID NO: 14	Isoforma f de STXBP1 de humano
SEQ ID NO: 15	Isoforma g de STXBP1 de humano
SEQ ID NO: 16	Isoforma h de STXBP1 de humano
SEQ ID NO: 17	Secuencia de ADN de AAV9.hu14
SEQ ID NO: 18	3' ITR
SEQ ID NO: 19	5' ITR
SEQ ID NO: 20	AAVtt (secuencia de aminoácidos)
SEQ ID NO: 21	AAV9 (secuencia de aminoácidos)
SEQ ID NO: 22	Isoforma a que codifica STXBP1 (variante de transcrito 1) de humano
SEQ ID NO: 23	Isoforma b que codifica STXBP1 (variante de transcrito 2) de humano
SEQ ID NO: 24	Isoforma c que codifica STXBP1 (variante de transcrito 3) de humano
SEQ ID NO: 25	Isoforma d que codifica STXBP1 (variante de transcrito 4) de humano
SEQ ID NO: 26	Isoforma d que codifica STXBP1 (variante de transcrito 5) de humano
SEQ ID NO: 27	Isoforma e que codifica STXBP1 (variante de transcrito 6) de humano
SEQ ID NO: 28	Isoforma e que codifica STXBP1 (variante de transcrito 7) de humano
SEQ ID NO: 29	Isoforma e que codifica STXBP1 (variante de transcrito 8) de humano
SEQ ID NO: 30	Isoforma e que codifica STXBP1 (variante de transcrito 9) de humano
SEQ ID NO: 31	Isoforma f que codifica STXBP1 (variante de transcrito 10) de humano
SEQ ID NO: 32	Isoforma g que codifica STXBP1 (variante de transcrito 11) de humano
SEQ ID NO: 33	Isoforma h que codifica STXBP1 (variante de transcrito 12) de humano

SEQ ID NO: 34	Secuencia de ADN de AAVtt
SEQ ID NO: 35	MYC TAG
SEQ ID NO: 36	HA TAG
SEQ ID NO: 37	MECP2 intrón
SEQ ID NO: 38	Munc18-1a (aa 568-603)
SEQ ID NO: 39	Munc18-1b (aa 568-594)
SEQ ID NO: 40	Cebador directo utilizado en el ejemplo 4.
SEQ ID NO: 41	Cebador inverso utilizado en el ejemplo 4.
SEQ ID NO: 42	Sonda 6-Fam/Zen/3'IB FQ utilizada en el ejemplo 4.
SEQ ID NO: 43	Péptido de STXBP1 (Ejemplo 9).
SEQ ID NO: 44	Péptido de STXBP1 (Ejemplo 9).
SEQ ID NO: 45	Péptido de STXBP1 (Ejemplo 9).
SEQ ID NO: 46	Específica de la isoforma larga del péptido de STXBP1 (Ejemplo 9).
SEQ ID NO: 47	Específica de la isoforma corta del péptido de STXBP1 (Ejemplo 9)..

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se describirá a continuación con respecto a los aspectos particulares no limitantes y sus formas de realización, y con referencia a ciertas figuras y ejemplos.

Los términos técnicos se emplean según su sentido común, a menos que se indique de otra forma. Si un significado específico se transmite a ciertos términos, las definiciones de los términos se darán en el contexto en el cual se utilizan dichos términos.

Donde se utiliza un artículo definido o indefinido cuando se hace referencia a un sustantivo singular, por ejemplo, “una”, “uno” o “el/la”, este incluye un plural de dicho sustantivo, a menos que se especifique de alguna otra forma.

Como se utiliza en este documento, el término “comprende/n, que comprende/n” no excluye otros elementos. Para los propósitos de la presente descripción, se considera que el término “consiste/n en, que consiste/n en” es una forma de realización preferida del término “comprende/n, que comprende/n”.

Como se utiliza en el presente documento, los términos “tratamiento”, “tratar, que trata/n” y similares, hacen referencia a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede resultar profiláctico en términos de prevenir en forma completa o parcial una

enfermedad o su síntoma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad y/o síntomas adversos atribuibles a la enfermedad. Así pues, el tratamiento abarca todo tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente, en un ser humano, e incluye: (a) prevenir la manifestación de síntomas de una enfermedad en un sujeto, es decir, un ser humano, que puede tener predisposición a padecer la enfermedad, aunque no haya sido diagnosticado con ella todavía; (b) inhibir la enfermedad, es decir, interrumpir su desarrollo; y (c) aliviar la enfermedad, es decir, causar regresión de la enfermedad.

Proteína de unión a la syntaxina 1

Se han identificado 12 variantes de transcritos de STXBP1 de humano, que codifican 8 isoformas de proteínas. Las secuencias de aminoácidos están altamente conservadas entre roedores y humanos. En el sistema nervioso central, STXBP1 se expresa específicamente en las neuronas y se distribuye ampliamente a través de las áreas cerebrales principales, con inclusión de corteza, cerebelo, hipocampo y núcleos basales (*basal ganglia*) (Kalidas et al. 2000). Se han descrito dos variantes de empalme principales, con inclusión de una versión corta y una larga:

Munc18-1a (aa 568-603): GSTHILTPTKFLMDLRHPDFRESSRVSFEDQAPTME (SEQ ID NO:38).

Munc18-1b (aa 568-594): GSTHILTPQKLLDTLKKLNKTDEEISS (SEQ ID NO:39).

La versión de empalme más larga (M18L, Munc18-1a, 603 aminoácidos) muestra una diferencia en los últimos 25 aminoácidos del extremo C y se informa que está expresada hacia una parte principal al nivel sináptico y en las neuronas gabérgicas en el cerebro de rata (Ramos et al. 2015). La versión de empalme más pequeña (M18S, Munc18-1b, 594 aminoácidos) se ha localizado en diferentes compartimientos celulares y está más omnipresentemente expresada en neuronas gabérgicas y glutamatérgicas. Los estudios funcionales indicaron que las variantes de empalme de STXBP1 podrían cumplir distintas funciones en la plasticidad sináptica (Meijer et al. 2015).

El gen de STXBP1 está ubicado en el cromosoma 9q34.11 (coordinados genómicos de GRCh38: chr9:127,579,370-127,696,029) y la proteína codificada humana tiene un alto nivel de identidad, tanto con STXBP1 de rata como de ratón (Swanson et al. 1998). El gen de STXBP1 contiene 25 exones. El empalme alternativo del exón final en el transcripto primario

de STXBP1 puede incluir o saltar una secuencia de 110 bp con contenido de un codón finalizador, lo que trae como resultado dos secuencias de aminoácidos del extremo C diferentes para STXBP1. El transcrito STXBP1-202 (ENST00000373302.8) (SEQ ID NO: 22) es el más largo, codifica una proteína de 603 aminoácidos (SEQ ID NO: 9). STXBP1-201 (ENST00000373299.5) (SEQ ID NO: 23) codifica una proteína de 594 aminoácidos (SEQ ID NO: 10). Ambas dichas variantes son detectadas en el sistema nervioso central a pesar de que su patrón de expresión puede variar entre los tejidos cerebrales y los tipos de células (Ramos-Miguel et al. 2015).

Las 12 variantes de transcritos y las 8 isoformas de la proteína de STXBP1 de humano se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2: variantes de transcritos de STXBP1 e isoformas de la proteína

Isoforma de STXBP1 de humano	Identificador de la secuencia de la proteína	Variante de transcrito	Identificador de la secuencia de ADN
isoforma a	SEQ ID NO:9	variante de transcrito 1 que codifica la isoforma a	SEQ ID NO:22
isoforma b	SEQ ID NO:10	variante de transcrito 2 que codifica la isoforma b	SEQ ID NO:23
isoforma c	SEQ ID NO:11	variante de transcrito 3 que codifica la isoforma c	SEQ ID NO:24
isoforma d	SEQ ID NO:12	variante de transcrito 4 que codifica la isoforma d	SEQ ID NO:25
		variante de transcrito 5 que codifica la isoforma d	SEQ ID NO:26
isoforma e	SEQ ID NO:13	variante de transcrito 6 que codifica la isoforma e	SEQ ID NO:27

		variante de transcrito 7 que codifica la isoforma e	SEQ ID NO:28
		variante de transcrito 8 que codifica la isoforma e	SEQ ID NO:29
		variante de transcrito 9 que codifica la isoforma e	SEQ ID NO:30
isoforma f	SEQ ID NO:14	variante de transcrito 10 que codifica la isoforma f	SEQ ID NO:31
isoforma g	SEQ ID NO:15	variante de transcrito 11 que codifica la isoforma g	SEQ ID NO:32
isoforma h	SEQ ID NO:16	variante de transcrito 12 que codifica la isoforma h	SEQ ID NO:33

En ocasiones, la proteína de unión a la sintaxina 1 o STXBP1 es denominada en la técnica con nombres alternativos, que se enlistan en la Tabla 3. Los nombres más comunes son “Munc18-1” y, con menor asiduidad, “Sec1”. El nombre aceptado del gen es STXBP1.

Tabla 3: Nombres alternativos de proteína de unión a la sintaxina 1

Proteína de unión a la sintaxina 1
Proteína de unión por sintaxina 1
MUNC18-1
Homólogo 1 de la proteína Unc-18
Homólogo A de la proteína Unc-18
Unc-18A
Unc18-1
N-Sec1
UNC18
P67
SEC1 neuronal
RBSEC1
STXBP1

HUNC18
RbSec1
UNC18A
NSEC1
M18

El alineamiento de las secuencias de proteínas de las secuencias de STXBP1 de humanos, monos y ratones (isoforma a de humano de acuerdo con la SEQ ID NO: 9) se muestra en la Figura 2. El alineamiento muestra la alta homología de secuencias a través de las especies. Las secuencias de aminoácidos de mono y ratón son idénticas a la secuencia de aminoácidos de humano.

Transgén

La presente invención proporciona un constructo de ácido nucleico que comprende un transgén que codifica lo siguiente:

- i. una proteína de unión a la syntaxina 1 (STXBP1) que comprende las isoformas a, b, c, d, e, f, g o h, que tiene la secuencia dada en las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 respectivamente; o
- ii. una secuencia que tiene al menos 95 % o 96 % o 97 % o 98 % o 99 % o 99,5 % de identidad de secuencia con respecto a las SEQ ID NO:9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 y que mantiene la funcionalidad como STXBP1; o
- iii. una variante de origen natural que comprende, con referencia a la SEQ ID NO:9, una o más mutaciones, como se observa en la Tabla 7.

El término “transgén” se refiere a una molécula de ácido nucleico (“molécula de ácido nucleico” y “ácido nucleico” se utilizan en forma indistinta), ADN o ADNc (ADN complementario) que codifican un producto génico para utilizar como el principio activo en terapia génica. El producto génico puede ser uno o más péptidos o proteínas.

En una forma de realización, el transgén codifica la isoforma a de STXBP1 que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 9; o una secuencia que tiene al menos 95 % o 96 % o 97 % o 98 % o 99 % o 99,5 % de identidad de secuencia con respecto a las SEQ ID NO: 9.

En una forma de realización, el transgén codifica la isoforma b de STXBP1 que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 10; o una secuencia que tiene al menos 95 % o 96 % o 97 % o 98 % o 99 % o 99,5 % de identidad de secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 10.

En una forma de realización, el transgén codifica la isoforma c de STXBP1 que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 11; o una secuencia que tiene al menos 95 % o 96 % o 97 % o 98 % o 99 % o 99,5 % de identidad de secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 11.

En una forma de realización, el transgén codifica la isoforma d de STXBP1 que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 12; o una secuencia que tiene al menos 95 % o 96 % o 97 % o 98 % o 99 % o 99,5 % de identidad de secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 12.

En una forma de realización, el transgén codifica la isoforma e de STXBP1 que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 13; o una secuencia que tiene al menos 95 % o 96 % o 97 % o 98 % o 99 % o 99,5 % de identidad de secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 13.

En una forma de realización, el transgén codifica la isoforma f de STXBP1 que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 14; o una secuencia que tiene al menos 95 % o 96 % o 97 % o 98 % o 99 % o 99,5 % de identidad de secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 14.

En una forma de realización, el transgén codifica la isoforma g de STXBP1 que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 15; o una secuencia que tiene al menos 95 % o 96 % o 97 % o 98 % o 99 % o 99,5 % de identidad de secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 15.

En una forma de realización, el transgén codifica la isoforma h de STXBP1 que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 16; o una secuencia que tiene al menos 95 % o 96 % o 97 % o 98 % o 99 % o 99,5 % de identidad de secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 16.

En una forma de realización, el transgén codifica:

- i. La variante de transcrito 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 de STXBP1 que tiene la secuencia dada en las SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 o 33 respectivamente; o
- ii. una secuencia que tiene al menos 95 % o 96 % o 97 % o 98 % o 99 % o 99,5 % de identidad de secuencia con respecto a las SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 o 33.

Tal como es en la práctica convencional en la técnica, las secuencias de ARNm de las variantes de transcritos 1 a 12 de STXBP1 se informan como secuencias de ADN a fines de consistencia con la secuencia genómica de referencia. (*National Center for Biotechnology Information*, www.ncbi.nlm.nih.gov). El objetivo de lo anterior consiste en llevar a cabo, en forma más directa, un alineamiento genómico con menos faltas de coincidencias informadas. A fin de expresar la isoforma a, b, o c de STXBP1, por ejemplo, un experto en la técnica expresaría un ADNc a partir de la variante de transcrito 1, 2, o 3.

En una forma de realización, el transgén codifica la isoforma a de STXBP1 y comprende una secuencia de ADNc de la SEQ ID NO: 7; o una secuencia que tiene al menos 95 % o 96 % o 97 % o 98 % o 99 % o 99,5 % de identidad de secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 7.

Los términos “ácido nucleico” y “polinucleótido” o “secuencia de nucleótido” se pueden emplear en forma indistinta para hacer referencia a cualquier molécula compuesta por nucleótidos monoméricos, o que los comprende. Un ácido nucleico puede ser un oligonucleótido o un polinucleótido. Una secuencia de nucleótido puede ser un ADN o ARN. Una secuencia de nucleótido puede ser modificada en forma química o artificial. Las secuencias de nucleótidos incluyen ácidos nucleicos peptídicos (PNA, *Peptide Nucleic Acid*), morfolinos y ácidos nucleicos bloqueados (LNA, *Locked Nucleic Acid*), así como también ácidos nucleicos glicólicos (GNA, *Glycol Nucleic Acid*) y ácido nucleico treósico (TNA, *Threose Nucleic Acid*). Cada una de estas secuencias se distingue de ARN o ADN de origen natural por los cambios en la cadena principal de la molécula. Se pueden utilizar los nucleótidos fosforotioato. Otros análogos de desoxinucleótido incluyen metilfosfonatos, fosforamidatos, fosforoditioatos, N3'P5'-fosforamidatos y oligoribonucleótido fosforotioatos y sus análogos de 2'-O-alilo y 2'-O-metilribonucleótido metilfosfonatos.

El término “constructo de ácido nucleico” se refiere a un ácido nucleico que no es de origen natural y es el resultado del uso de la tecnología de ADN recombinante. Especialmente, un constructo de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico que ha sido modificada para contener segmentos de secuencias de ácido nucleico, que se combinan o yuxtaponen de una manera que no existe en la naturaleza.

En formas de realización específicas, dicho constructo de ácido nucleico comprende todos o un fragmento de una secuencia de ácido nucleico codificante que tiene al menos 70 %, 80 %, 90 %; 95 %, 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia codificante de una variante funcional de origen natural o recombinante de STXBP1.

El término “fragmento”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a una porción contigua de una secuencia de referencia. Por ejemplo, un fragmento de una secuencia que tiene 1000 nucleótidos de longitud puede hacer referencia a 5, 50, 500 nucleótidos contiguos de dicha secuencia.

El término “variante patológica”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a un ácido nucleico o secuencia de aminoácidos que está modificada en relación con una secuencia de referencia y que tiene una función disminuida en comparación con dicha secuencia de referencia. Las variantes patológicas y las variantes presumiblemente patológicas de STXBP1 se muestran en las Tablas 5 y 6 respectivamente.

El término “variante funcional”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a un ácido nucleico o secuencia de aminoácidos que está modificada en relación con una secuencia de referencia, pero que retiene la función de dicha secuencia de referencia. Las variantes funcionales de STXBP1 se muestran en la Tabla 7.

El término “identidad de secuencia” o “identidad” se refiere al número de coincidencias (ácido nucleico o residuos de aminoácido idénticos) en posiciones de un alineamiento de dos polinucleótidos o secuencias de polipéptidos. La identidad de secuencia se determina mediante la comparación de las secuencias cuando se alinean, de manera de maximizar la superposición y la identidad, a la vez que se minimizan los espacios (*gaps*, deleciones o inserciones) de las secuencias. En particular, se puede determinar la identidad de secuencia usando cualquiera entre un número de algoritmos matemáticos globales o de alineamiento local, según sea la longitud de las dos secuencias. Las secuencias de similares longitudes se alinean, preferentemente, utilizando algoritmos de alineamiento globales (por ejemplo, el algoritmo de Needleman y Wunsch; Needleman y Wunsch, 1970, J Mol Biol.;48(3):443-53) que alinea las secuencias óptimamente a lo largo de toda la longitud, mientras que las secuencias de longitudes sustancialmente diferentes, con preferencia, se alinean utilizando un algoritmo de alineamiento local (por ejemplo, el algoritmo de Smith y Aguaman (Smith y Aguaman, 1981, J Theor Biol. ;91(2):379-80) o el algoritmo de Altschul (Altschul SF et al., 1997, Nucleic Acids Res.;25(17):3389-402.; Altschul SF et al., 2005, Bioinformatics.;21(8):1451-6). El alineamiento para los fines de determinar el porcentaje de identidad del ácido nucleico o secuencia de aminoácidos se puede lograr en formas diversas, que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando *software* de computación disponible en forma pública en sitios web de internet, tal como <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> o <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/>. Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para el alineamiento con medición, con inclusión de cualquier algoritmo necesario para lograr un alineamiento máximo a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se están comparando. Para los fines del presente documento, los valores del porcentaje de identidad de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos se refieren a los valores generados utilizando el

programa de alineamiento de secuencias por pares EMBOSS Needle, el que crea un alineamiento global óptimo de dos secuencias empleando el algoritmo de Needleman-Wunsch, en donde todos los parámetros de búsqueda se establecen en valores predeterminados, es decir, Matriz de puntos = BLOSUM62, *Gap open* = 10, *Gap extend* = 0,5, *End gap penalty* = falso, *End gap open* = 10 y *End gap extend* = 0,5.

El constructo de ácido nucleico de acuerdo con la presente descripción comprende un transgén y al menos un elemento de ácido nucleico adecuado para su expresión en un hospedador, tal como en una célula hospedadora (*host cell*).

Por ejemplo, dicho constructo de ácido nucleico comprende un transgén que codifica la STXBP1 y una o más secuencias de control requeridas para la expresión de STXBP1 en el hospedador relevante. Por lo general, el constructo de ácido nucleico comprende un transgén y secuencias regulatorias precedentes (secuencias no codificantes 5') y posteriormente (secuencias no codificantes 3') el transgén que se requiere para la expresión de STXBP1.

Activador

En una forma de realización, el constructo de ácido nucleico comprende un transgén que codifica la STXBP1 y un activador ligado operativamente con dicho transgén. Preferentemente, el transgén se encuentra bajo el control del activador.

El término “activador” se refiere a un elemento regulatorio que dirige la transcripción de un ácido nucleico al que está operativamente ligado. Un activador puede regular tanto la velocidad como la eficacia de la transcripción de un ácido nucleico operativamente ligado. Un activador también puede estar ligado operativamente con otros elementos regulatorios que mejoran (“mejoradores”) o reprimen (“represores”) la transcripción dependiente del activador de un ácido nucleico. Dichos elementos regulatorios incluyen, sin limitación, sitios de unión de factores de transcripción, sitios de unión de represores y activadores de proteínas, y cualquier otra de las secuencias de nucleótidos conocidas por un experto en la técnica para que actúen, en forma directa o indirecta, a fin de regular la cantidad de transcripción a partir del activador, por ejemplo, atenuadores, mejoradores y silenciadores. El activador está ubicado próximo al sitio de inicio de la transcripción del gen o secuencia codificante a la cual está operativamente ligado, en la misma hebra y en dirección 5' (*upstream*, aguas arriba) de la secuencia de ADN (hacia la región 5' de la hebra de sentido). Un activador puede tener una longitud de entre aproximadamente 100 y 1000 pares de

base. Las posiciones en un activador se designan en relación con el sitio de inicio transcripcional para un gen en particular (es decir, las posiciones en dirección 5' son números negativos que se cuentan hacia atrás desde el -1, por ejemplo -100 es una posición de 100 pares de bases en dirección 5').

El término “operativamente ligado en una orientación 5' a 3'” o simplemente “operativamente ligado” se refiere a un ligamiento de dos o más secuencias de nucleótidos en una relación funcional que permite que cada una de dichas dos o más secuencias realicen su función normal. Típicamente, la frase “operativamente ligado” se emplea para hacer referencia a la yuxtaposición de un elemento regulatorio, tal como un activador y un transgén que codifica una proteína de interés. Por ejemplo, un ligamiento operable entre un activador y un transgén permite que el activador funcione para activar la expresión 5' del transgén en un sistema de expresión adecuado, tal como en una célula.

El activador puede ser un activador específico de tipo celular o tisular, o un activador específico por órgano, o un activador específico para múltiples órganos, o un activador sistémico o ubicuo.

El término “activador ubicuo” se refiere, más específicamente, a un activador que está activo en una variedad de tejidos o células distintas, por ejemplo, tanto en las neuronas como en los astrocitos.

Los ejemplos de activador adecuado para la expresión del transgén a través del sistema nervioso central incluyen el activador de beta-actina de pollo (CBA, *Chicken Beta Actin*) (Miyazaki 1989, Gene 79:269-277), el activador CAG (Niwa 1991, Gene 108:193-199), el activador del factor de elongación 1 alfa (EF1 α) (Nakai 1998, Blood 91:4600-4607), el activador del gen de sinapsina 1 de humano (hSyn) (Kugler S. et al. Gene Ther. 2003. 10(4):337-47) o el activador de fosfoglicerato-cinasa 1 (PGK1, *PhosphoGlycerate Kinase 1*) (Hannan 1993, Gene 130:233-239), el activador de proteína 2 de unión a metil-CPG (MECP2) (Adachi et al., Hum. Mol. Genetics. 2005; 14(23): 3709-3722), el activador de enolasa específica para neurona humana (NSE, *Neuron-Specific Enolase*) (Twyman, R. M. y E. A. Jones (1997). J Mol Neurosci 8(1): 63-73)), el activador de proteína-cinasa II dependiente de calcio/calmodulina (CAMKII) (Nathanson, J. L., et al. (2009). Neuroscience 161(2): 441-450) y el activador de ubiquitina C humana (UBC, *UBiquitin C*) (Schorpp, M., et al. (1996). Nucleic Acids Res 24(9): 1787-1788).

En una forma de realización, el activador es un activador CAG 1,6 kb de SEQ ID NO: 1.

En una forma de realización, el activador es un activador hSYN de SEQ ID NO: 2.
En una forma de realización, el activador es un activador MECP2 de SEQ ID NO: 3.
En una forma de realización, el activador es un activador hNSE de SEQ ID NO: 4.
En una forma de realización, el activador es un activador CamKII de SEQ ID NO: 5.
En una forma de realización, el activador es un activador hSTXBP1 endógeno de SEQ ID NO: 6.

En una forma de realización, el activador es un activador MECP2 de SEQ ID NO: 3, operativamente ligado en una orientación 5' hacia 3' con respecto a un intrón de MECP2 de SEQ ID NO: 37.

En formas de realización alternativas, el constructo de ácido nucleico comprende un transgén que codifica la STXBP1 y un activador ligado operativamente con dicho transgén, en donde el activador es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico al:

- (a) Activador CAG 1,6 kb (SEQ ID NO: 1).
- (b) activador hSYN (SEQ ID NO: 2).
- (c) Activador MECP2 (SEQ ID NO: 3).
- (d) activador hNSE (SEQ ID NO: 4).
- (e) Activador CamKII (SEQ ID NO: 5).
- (f) activador hSTXBP1 endógeno (SEQ ID NO: 6).
- (g) Activador MECP2 (SEQ ID NO: 3) operativamente ligado en una orientación 5' hacia 3' con respecto a un intrón de MECP2 (SEQ ID NO: 37).

El activador puede ser una variante funcional o fragmento de los activadores descritos en el presente documento. Una variante funcional o fragmento de un activador puede ser funcional en el sentido de que retiene las características del activador no variante o de longitud total correspondiente. Así pues, una variante funcional o fragmento de un activador retiene la capacidad para accionar la transcripción de un transgén al que está operativamente ligado, por medio de lo cual se acciona la expresión de STXBP1 codificada por dicho transgén. Una variante funcional o fragmento de un activador puede retener la especificidad por un tipo de tejido particular. Por ejemplo, una variante funcional o fragmento de un activador puede ser específico para las células del SNC. Una variante funcional o fragmento de un activador puede accionar específicamente la expresión de STXBP1 en las neuronas.

El activador puede comprender una “secuencia mínima”, que se refiera a una secuencia de nucleótido del activador que tiene suficiente longitud y que contiene los elementos

requeridos para funcionar como un activador, es decir, capaz de accionar la transcripción del transgén al cual dicho activador está ligado operativamente, por lo cual acciona la expresión de STXBP1.

El activador mínimo utilizado en los constructos de ácido nucleico de la presente invención puede ser, por ejemplo, el activador CAG que comprende la SEQ ID NO: 1, o el activador hSYN que comprende la SEQ ID NO: 2, o el activador MECP2 que comprende la SEQ ID NO: 3.

El activador puede comprender uno o más intrones. El término “intrón” se refiere a una secuencia de nucleótido no codificante intragénica. Típicamente, los intrones se transcriben de ADN a ARN mensajero (ARNm) durante la transcripción de un gen, pero se dividen del transcripto de ARNm mediante corte y empalme (*splicing*) previo a su traducción.

El activador puede comprender una variante funcional o fragmento de un intrón descrito en el presente documento. Una variante funcional o fragmento de un intrón puede ser funcional en el sentido de que retiene las características del intrón de longitud completa o no variante correspondiente. Por lo tanto, las variantes funcionales o fragmentos de un intrón descritos en el presente documento son no codificantes. Las variantes funcionales o fragmentos de un intrón descritos en el presente documento pueden también retener la capacidad de ser transcriptas de ADN a ARNm y/o la capacidad de ser separadas del ARNm mediante corte y empalme.

Los intrones que se pueden incorporar en los activadores utilizados en la presente invención pueden ser de regiones naturalmente no codificantes o pueden ser genomanipulados.

En una forma de realización, el intrón es un intrón MECP2 que comprende o que consiste en la SEQ ID NO: 37; o una variante funcional o fragmento suyo, que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, o 99,9 % de identidad con respecto a la SEQ ID NO: 37.

Un activador y/o intrón se puede combinar con una o más secuencias exónicas no expresantes. Las secuencias exónicas no expresantes no son capaces de producir un transcripto, en vez, pueden flanquear una secuencia intrónica para brindar sitios de corte y empalme.

Alternativamente, un activador puede ser un activador químicamente inducible. Un activador químicamente inducible es un activador que está regulado por la administración en vivo de un inductor químico a un sujeto que lo necesita. Los ejemplos de activadores químicamente inducibles adecuados incluyen, entre otros, activadores inducibles de tetraciclina/minociclina (Chtarto 2003, Neurosci Lett. 352:155–158) o activadores inducibles de rapamicina (Sanftner 2006, Mol Ther. 13:167–174).

Secuencia señal de poliadenilación

El constructo de ácido nucleico puede comprender una región 3' no traducida que comprende una secuencia señal de poliadenilación y/o un finalizador de transcripción.

El término “secuencia señal de poliadenilación”, (o “sitio de poliadenilación” “señal de poli(A)” pueden utilizarse en forma indistinta) se refiere a una secuencia de reconocimiento específica dentro de la región 3' no traducida (3' UTR) de un gen, que se transcribe en ARNm precursor y guía la terminación de una transcripción génica. La secuencia señal de poliadenilación actúa como una señal para la escisión endonucleolítica del ARNm precursor recientemente formado en su extremo 3', y para el agregado a este extremo 3' de un trecho de ARN que consiste solamente en bases de adenina (proceso de poliadenilación; cola de poli(A)). La secuencia señal de poliadenilación es importante para la traducción, exportación nuclear y estabilidad del ARNm. En el contexto de la invención, la secuencia señal de poliadenilación es una secuencia de reconocimiento que puede dirigir la poliadenilación de genes de mamíferos y/o genes virales, en células de mamíferos.

La secuencia señal de poliadenilación típicamente consiste en (a) una secuencia de consenso AAUAAA, la cual ha demostrado ser necesaria tanto para escisión del extremo 3' y la poliadenilación de ARN pre-mensajero (ARNpre-m) así como también para promover la finalización de la transcripción en dirección 3' (*downstream*, aguas abajo) ; y (b) elementos adicionales en dirección 5' y en dirección 3' de AAUAAA que controlan la eficacia de la utilización de AAUAAA como una señal de poli(A). Existe considerable variabilidad en dichos motivos en los genes de mamíferos.

En una forma de realización, opcionalmente, en combinación con una o más características de las diversas formas de realización descritas en el presente documento, la secuencia señal de poliadenilación del constructo de ácido nucleico de la invención es una secuencia señal de poliadenilación de un gen de mamífero o un gen vírico. Las señales de poliadenilación adecuadas incluyen, entre otras, una señal de poliadenilación SV40

temprana, una señal de poliadenilación SV40 tardía, una señal de poliadenilación de timidina cinasa HSV (*Herpes Simple Virus*, virus del herpes simple), una señal de poliadenilación de gen protamina, una señal de poliadenilación de adenovirus 5 Elb, una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento, una señal de poliadenilación de PBGD (*PorphobilinoGen Deaminase*, porfobilinógeno desaminasa) o una señal de poliadenilación sintética diseñada en *silico* (virtualmente).

En una forma de realización, la secuencia señal de poliadenilación es una secuencia señal de poliadenilación de SV40 que comprende la SEQ ID NO: 8.

Otros elementos regulatorios

El constructo de ácido nucleico puede comprender elementos regulatorios adicionales, por ejemplo, una secuencia mejoradora, un intrón, una secuencia de ARNmicro dianizada, una secuencia poliligante que facilita la inserción de un fragmento de ADN dentro de un vector y/o una secuencia de señal de corte y empalme.

Vector vírico

La presente invención proporciona, además, un vector vírico que comprende el constructo de ácido nucleico tal como se describe en el presente documento.

El término “vector vírico” se refiere a la parte del ácido nucleico de la partícula vírica como se detalla en este documento, que puede estar encerrada en una cápside.

Los vectores víricos, típicamente, comprenden al menos (i) un constructo de ácido nucleico con inclusión de un transgén y elementos del ácido nucleico adecuado para su expresión en un hospedador, y (ii) la totalidad o una porción de un genoma vírico, por ejemplo, repeticiones terminales invertidas de un genoma vírico.

El término “repetición terminal invertida” (ITR, *Inverted Terminal Repeat*) se refiere a una secuencia de nucleótido ubicada en el extremo 5' (5'ITR) y una secuencia de nucleótido ubicada en el extremo 3' (3'ITR) de un virus, que contiene secuencias palindrómicas y que pueden plegarse para formar estructuras de horquilla con forma de T que funcionan como cebadores durante el inicio de la replicación de ADN. También son necesarios para la integración del genoma vírico dentro del genoma hospedador, para el rescate desde el genoma hospedador y para la encapsidación del ácido nucleico vírico en viriones maduros.

Las ITR son necesarias en cis para la replicación del genoma del vector y su encapsidado en las partículas víricas.

En una forma de realización, el vector vírico comprende una 5'ITR, y una 3'ITR de un virus.

En una forma de realización, el vector vírico comprende una 5'ITR y una 3'ITR de un virus independientemente seleccionado entre el grupo que consiste en parvovirus (en particular, virus adenoasociados), adenovirus, alfavirus, retrovirus (en particular, retrovirus gama y lentivirus), herpesvirus y SV40.

En una forma de realización, el virus es un virus adenoasociado (AAV, *Adeno-Associated Virus*), un adenovirus (Ad), o un lentivirus.

En una forma de realización, el virus es un AAV.

En una forma de realización, el vector vírico comprende una 5'ITR y una 3'ITR de un AAV.

El AAV ha generado considerable interés como un vector potencial para la terapia génica humana. Entre las propiedades favorables del virus están su falta de asociación con cualquier enfermedad humana, su capacidad para infectar tanto las células divisoras como las no divisoras, y el amplio rango de líneas celulares derivadas desde diferentes tejidos que se pueden infectar. El genoma del AAV está compuesto por una molécula de ADN lineal monocatenario que contiene 4681 bases (Berns y Bohenzky, 1987, *Advances in Virus Research* (Academic Press, Inc.) 32:243-307). El genoma incluye repeticiones terminales invertidas (las ITR) en cada extremo, que funcionan en cis como orígenes de replicación de ADN y como señales de encapsidado para el virus. Comúnmente, las ITR tienen una longitud comprendida entre alrededor de 100 y 150 bp.

Las ITR de AAV pueden tener una secuencia de nucleótido natural o pueden estar alteradas por la inserción, deleción o sustitución de uno o más nucleótidos, típicamente, una inserción, deleción o sustitución de no más de 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótido, en comparación con las ITR de AAV conocidas. El serotipo de las repeticiones terminales invertidas (las ITR) del vector AAV se puede seleccionar entre cualquier serotipo de AAV humano o no humano.

En formas de realización específicas, el vector vírico puede comprender las ITR de cualquier serotipo de AAV. Las ITR de AAV conocidas incluyen, sin limitación, AAV1, AAV2, AAV3 (los tipos 3A y 3B inclusive), AAV-LK03, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 (AAVrh10), AAV11, AAV12, AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV equino, AAV

ovino. También se incluyen los serotipos recombinantes tales como Rec2 y Rec3 identificados del cerebro de primates.

Alternativamente, el vector vírico puede comprender una 5'ITR y/o 3'ITR sintéticas.

En una forma de realización, el constructo de ácido nucleico de la presente invención está comprendido en un vector vírico que comprende, además, una 5'ITR y/o una 3'ITR de un AAV de un serotipo AAV2.

En una forma de realización, el vector vírico comprende una 3'ITR y/o 5'ITR de un AAV de un serotipo AAV2, que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 18 y/o 19 respectivamente; o una secuencia que tiene al menos 80 % o al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 18 y/o la 19 respectivamente.

Partícula vírica

La presente invención proporciona, además, una partícula vírica que comprende el constructo de ácido nucleico o el vector vírico tal como se describe en el presente documento.

El término “partícula vírica” se refiere a una partícula de virus infeccioso y, típicamente, incapaz de replicarse, que comprende (i) un vector vírico encapsidado en su interior (que comprende, opcionalmente, un constructo de ácido nucleico) y (ii) una cápside.

En una forma de realización, la cápside está formada por proteínas de cápside de un virus adenoasociado.

Las proteínas de la cápside vírica de un virus adenoasociado incluyen las proteínas de cápside VP1, VP2 y VP3. Las diferencias entre las secuencias de las proteínas de la cápside de los diversos serotipos de AAV traen como resultado el uso de diferentes receptores de la superficie celular para el ingreso celular. En combinación con vías de procesamiento intracelular alternativas, esto origina distintos tropismos celulares para cada serotipo de AAV.

La terapia génica basada en AAV que tiene por diana el SNC se detalla en Pignataro D, Sucunza D, Rico AJ et al., J Neural Transm 2018;125:575-589. Las partículas víricas se pueden seleccionar y/o genomanipular para tener por diana, al menos, células neuronales en diversas áreas del cerebro y del SNC.

Comúnmente se hace referencia a los virus AAV en términos de su serotipo. Un serotipo corresponde a una subespecie de variante de AAV que, debido a su perfil de expresión de antígenos de superficie de la cápside, tiene una reactividad distintiva que puede ser utilizada para distinguirla de otras subespecies de variantes. Los serotipos de AAV incluyen AAV1, AAV2, AAV3 (A y B inclusive) AAV-LK03, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 (AAVrh10) o AAV11, o sus combinaciones. El AAV puede ser un serotipo recombinante, tal como Rec2 o Rec3 identificados del cerebro de primates; y AAV2-tipo real (AAVtt). El AAVtt se describe en detalle en Tordo et al., Brain. 2018; 141(7): 2014–2031 y en el documento de patente con el número WO 2015/121501. Las revisiones de los serotipos de AAV se pueden encontrar en Choi et al (Curr Gene Ther. 2005; 5(3); 299-310) y Wu et al (Molecular Therapy. 2006; 14(3), 316-327).

En la partícula vírica de la invención, la cápside puede derivarse a partir de cualquier serotipo de AAV o de una combinación de serotipos (tal como VP1 de un serotipo de AAV y VP2 y/o VP3 de un serotipo diferente).

En formas de realización específicas, las proteínas de la cápside pueden derivarse a partir de AAV2, AAV5, AAV8, AAV9, AAV2-retro o AAVtt.

En una forma de realización, la partícula vírica comprende al menos una proteína de la cápside de VP1 de un AAV, en donde dicha proteína de la cápside se deriva de AAV2, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9 (por ejemplo, AAV9.hu14 como se muestra en la SEQ ID NO: 21), AAV10, AAV-tipo real (AAVtt como se muestra en la SEQ ID NO: 20) o sus combinaciones.

En una forma de realización, la partícula vírica comprende la proteína de la cápside proveniente de AAVtt, como se muestra en la SEQ ID NO: 20. En una forma de realización la proteína de la cápside es al menos 98,5 %, 99 % o 99,5 % idéntica a la SEQ ID NO: 20.

En una forma de realización, la partícula vírica comprende la proteína de la cápside proveniente de AAV9, como se muestra en la SEQ ID NO: 21. En una forma de realización, la proteína de la cápside es al menos 98,5 %, 99 % o 99,5 % idéntica a la SEQ ID NO: 21.

Los genomas de AAV o elementos de los genomas de AAV, con inclusión de las secuencias de ITR, genes de replicación o cápside para el uso en la invención se pueden derivar de los siguientes números de acceso para las secuencias de genoma completas de AAV: virus

adenoasociado 1 NC_002077, AF063497; virus adenoasociado 2 NC_001401; virus adenoasociado 3 NC_001729; virus adenoasociado 3B NC_001863; virus adenoasociado 4 NC_001829; virus adenoasociado 5 Y18065,5AF085716; virus adenoasociado 6 NC_001862; AAV aviar ATCC VR-865 AY186198, AY629583, NC_004828; cepa de AAV aviar DA-1 NC_006263, AY629583; AAV bovino NC_005889, AY388617.

También se puede hacer referencia a los virus AAV en términos de subtipos (*clades*) o clones. Esto se refiere a la relación filogenética de los virus AAV naturalmente derivados, y típicamente, a un grupo filogenético de virus AAV cuyo origen se puede rastrear hasta un ancestro común, e incluye a todos sus descendientes. En forma adicional, se puede hacer referencia a los virus AAV en términos de un aislado específico, es decir, un aislado genético de un virus AAV específico encontrado en la naturaleza.

El término “aislado genético” describe una población de los virus AAV que se sometió a mezcla genética limitada con otros virus AAV de origen natural, por lo cual se define una población reconociblemente distinta a un nivel genético. Los ejemplos de los subtipos y aislados de AAV que se pueden emplear en la invención incluyen los siguientes:

- Subtipo A: AAV1 NC_002077, AF063497, AAV6 NC_001862, Hu. 48 AY530611, Hu 43 AY530606, Hu 44 AY530607, Hu 46 AY530609;
- Subtipo B: Hu. 19 AY530584, Hu. 20 AY530586, Hu 23 AY530589, Hu22 AY530588, Hu24 AY530590, Hu21 AY530587, Hu27 AY530592, Hu28 AY530593, Hu 29 AY530594, Hu63 AY530624, Hu64 AY530625, Hu13 AY530578, Hu56 AY530618, Hu57 AY530619, Hu49 AY530612, Hu58 25 AY530620, Hu34 AY530598, Hu35 AY530599, AAV2 NC_001401, Hu45 AY530608, Hu47 AY530610, Hu51 AY530613, Hu52 AY530614, Hu T41 AY695378, Hu S17 AY695376, Hu T88 AY695375, Hu T71 AY695374, HuT70 AY695373, Hu T40 AY695372, Hu T32 AY695371, Hu T17 AY695370, Hu LG15 AY695377;
- Subtipo C: Hu9 AY530629, Hu10 AY530576, Hu11 AY530577, Hu53 AY530615, Hu55 AY530617, Hu54 AY530616, Hu7 AY530628, Hu18 AY530583, Hu15 AY530580, Hu16 AY530581, Hu25 AY530591, Hu60 AY530622, Ch5 AY243021, Hu3 AY530595, Hu1 AY530575, Hu4 AY530602 Hu2, AY530585, Hu61 AY530623;
- Subtipo D: Rh62 AY530573, Rh48 AY530561, Rh54 AY530567, Rh55 AY530568, C5 y2 AY243020, AAV7 AF513851, Rh35 AY243000, Rh37 AY242998, Rh36 AY242999, Cy6 AY243016, Cy4 AY243018, Cy3 AY243019, Cy5 AY243017, Rh13 AY243013;

- Subtipo E: Rh38 AY530558, Hu66 AY530626, Hu42 AY530605, Hu67 AY530627, Hu40 AY530603, Hu41 AY530604, Hu37 AY530600, Rh40 10 AY530559, Rh2 AY243007, Bbl AY243023, Bb2 AY243022, RhIO AY243015, Hul7 AY530582, Hub AY530621, Rh25 AY530557, Pi2 AY530554, Pil AY530553, Pi3 AY530555, Rh57 AY530569, Rh50 AY530563, Rh49 AY530562, Hu39 AY530601, Rh58 AY530570, Rhbl AY530572, Rh52AY530565, Rh53 AY530566, Rh51 AY530564, Rh64 AY530574, Rh43 15 AY530560, AAV8 AF513852, Rh8 AY242997, RhI AY530556; and
- Subtipo F: Hu 14 (AAV9) AY530579, Hu31 AY530596, Hu32 AY530597; Clonal Aislado AAV5 Y18065, AF085716, AAV 3 NC_001729, AAV 3B NC_001863, AAV4 15 NC_001829, Rh34 AY243001, Rh33 AY243002, Rh32 AY243003.

La invención abarca el uso de secuencias de proteína de la cápside de diferentes serotipos, subtipos, clones, o aislados de AAV dentro del mismo vector. La invención también abarca la encapsidación del genoma de un serotipo en la cápside de otro serotipo, es decir, pseudotipado. Los derivados quiméricos, barajados (*shuffled*) o modificados por cápside, se pueden seleccionar para proporcionar una o más funcionalidades deseadas. Así pues, dichos derivados pueden mostrar eficacia aumentada de la inserción de genes foráneos (*gene delivery*), disminuida inmunogenicidad (humoral o celular), un rango de tropismo alterado y/o dianización mejorada de un tipo de célula en particular en comparación con un vector vírico de AAV que comprende una cápside de AAV de origen natural. La eficacia aumentada de la inserción de genes foráneos puede lograrse mediante un correceptor o receptor mejorado que se une en la superficie celular, internalización mejorada, tráfico mejorado dentro de la célula y dentro del núcleo, desvoltura mejorada de la partícula vírica o conversión mejorada de un genoma monocatenario a la forma bicatenaria. También puede relacionarse la eficacia aumentada con una dianización o rango de tropismo alterado de una población celular específica, tal que la dosis de vector no se diluya por distribución a tejidos en donde no se lo necesita.

Las proteínas de la cápside quiméricas incluyen las generadas por recombinación entre dos o más secuencias que codifican cápsides de serotipos de AAV naturales. Esto puede realizarse, por ejemplo, mediante un abordaje de rescate de marcador en el que las secuencias de cápside no infecciosas de un serotipo son cotransfectadas con secuencias de cápside de un serotipo diferente, y se utiliza selección dirigida para seleccionar las secuencias de cápside que tienen las propiedades deseadas. Las secuencias de cápside de los diferentes serotipos se pueden alterar mediante recombinación homóloga dentro de la célula para producir proteínas de la cápside quiméricas novedosas.

Las proteínas de cápside quiméricas incluyen las generadas por genomanipulación de secuencias de proteína de cápside para transferir dominios de proteína de cápside específicos, bucles de superficie o residuos de aminoácidos específicos entre dos o más proteínas de cápside, por ejemplo, entre dos o más proteínas de la cápside de diferentes serotipos. Las proteínas de cápside barajadas o quiméricas se pueden generar mediante el barajado de ADN o por PCR propensa a error (*error-prone PCR*). Los genes de cápside de AAV híbridos se pueden crear mediante fragmentación aleatoria de las secuencias de genes de AAV relacionados, por ejemplo, los que codifican proteínas de cápside de múltiples serotipos diferentes y luego, posteriormente, se redisponen los fragmentos en una reacción de polimerasa de cebado autónomo (*self-priming*), lo que también puede causar entrecruzamientos en regiones de homología de secuencias. Se puede seleccionar una genoteca de genes de AAV híbridos creada en esta forma al barajar los genes de cápside de diversos serotipos, a fin de identificar clones víricos que tienen una funcionalidad deseada. Similarmente, la PCR “propensa a error” se puede utilizar para mutar aleatoriamente genes de cápside de AAV para crear una genoteca diversa de variantes que, luego, pueden seleccionarse para una propiedad deseada.

Las secuencias de genes de la cápside pueden modificarse genéticamente para introducir deleciones, sustituciones o inserciones específicas con respecto a la secuencia natural nativa. Por ejemplo, los genes de la cápside se pueden modificar mediante la inserción de una secuencia de un péptido o proteína sin relación dentro de un marco de lectura abierto de una secuencia codificante de cápside, o en el extremo N y/o C de una secuencia codificante de cápside. El péptido o proteína sin relación puede ser, ventajosamente, el que actúa como un ligando para un tipo de célula particular, por lo cual confiere una unión mejorada a una célula diana, o mejora la especificidad de dianización de la partícula vírica con respecto a una población celular en particular. La proteína sin relación puede ser una que asiste en la purificación de la partícula vírica como parte del proceso de producción, es decir, un identificador de afinidad o epítipo. El sitio de inserción se seleccionará, típicamente, de manera de no interferir con otras funciones de la partícula vírica, tales como la internalización o trans migración (*trafficking*) de la partícula vírica. Los sitios de inserción adecuados se detallan en Choi et al (Curr Gene Ther. 2005; 5(3); 299-310).

En una forma de realización, una partícula vírica se puede preparar encapsulando un vector vírico de AAV, derivado de un serotipo de AAV particular, en una partícula vírica formada por proteínas Cap naturales que corresponden a un AAV del mismo serotipo.

No obstante, se han desarrollado diversas técnicas para modificar y mejorar las propiedades funcionales y estructurales de las partículas víricas de origen natural (Bünning H et al. J Gene Med 2008; 10: 717–733).

Por lo tanto, en otra forma de realización, una partícula vírica puede incluir un constructo de ácido nucleico que comprende un transgén que codifica STXBP1, flanqueado por las ITR de un determinado serotipo de AAV, encapsidado en:

- (a) una partícula vírica que comprende proteínas de la cápside derivadas de un serotipo de AAV diferente, por ejemplo, proteínas de la cápside de ITR de AAV2 y AAV9; o proteínas de la cápside de ITR de AAV2 y AAVtt; o
- (b) una partícula vírica mosaico que comprende una mezcla de proteínas de cápside de diferentes serotipos de AAV o mutantes, por ejemplo, las ITR de AAV2 con una cápside formada por proteínas de dos o más serotipos de AAV; o
- (c) una partícula vírica quimérica que comprende proteínas de cápside que han sido truncadas por intercambio de dominios (*domain swapping*) entre diferentes serotipos de AAV o variantes, por ejemplo, las ITR de AAV2 con proteínas de cápside de AAV5 que comprende dominios de AAV3; o
- (d) una partícula vírica genomanipulada para mostrar dominios de unión selectivos, lo que permite una interacción estricta con receptores específicos de células diana.

La cápside de AAVtt, también denominada cápside de tipo real de AAV2, se describe en el documento de patente con el número WO2015/121501. En una forma de realización, la proteína de cápside VP1 de AAVtt comprende al menos una sustitución de aminoácido con respecto a la proteína de cápside de VP1 natural en una posición correspondiente a una o más de las siguientes posiciones en una secuencia de proteína de AAV2 (secuencia de referencia del NCBI: YP_680426.1): 125, 151, 162, 205, 312, 457, 492, 499, 533, 546, 548, 585, 588 y/o 593.

En una forma de realización, AAVtt comprende una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos con respecto a la proteína de cápside de VP1 de AAV2 natural (secuencia de referencia del NCBI: YP_680426.1): V125I, V151A, A162S, T205S, N312S, Q457M, S492A, E499D, F533Y, G546D, E548G, R585S, R588T y/o A593S.

En una forma de realización, AAVtt comprende cuatro o más mutaciones con respecto a la proteína de cápside de VP1 de AAV2 natural en las posiciones 457, 492, 499 y 533.

La construcción de partículas víricas recombinantes de AAV es generalmente conocida en la técnica y se ha descrito, por ejemplo, en los documentos de patente con los números

US 5.173.414; US 5.139.941; WO 92/01070; WO 93/03769; Lebkowski et al. (1988) Molec. Célula. Biol. 8:3988-3996; Vincent et al. (1990) Vaccines 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B. J. (1992) Current Opinion en Biotechnology 3:533-539; Muzyczka, N. (1992) Current Topics en Microbiol. y Immunol. 158:97-129; y Kotin, R. M. (1994) Human Gene Therapy 5:793-801.

Producción de partículas víricas

La producción de partículas víricas que portan el vector vírico y el constructo de ácido nucleico, tal como se describe en el presente documento, se puede llevar a cabo por medio de protocolos y métodos convencionales, que se seleccionan tomando en cuenta las características estructurales de las partículas víricas que se van a producir.

Brevemente, las partículas víricas se pueden producir en una célula hospedadora, más particularmente, en una célula productora de virus específico (célula de encapsidado), que es transfectada con el constructo de ácido nucleico o vector vírico en presencia de un virus o vector auxiliar u otro/s constructos de ADN.

El término “célula de encapsidado” se refiere a una célula o línea celular que puede ser transfectada con un constructo de ácido nucleico o vector vírico y proporciona, en trans, todas las funciones faltantes que se requieren para la completa replicación y encapsidado de un vector vírico. Las células de encapsidado pueden expresar dichas funciones víricas faltantes en una manera constitutiva o inducible. Las células de encapsidado pueden ser células adherentes o de suspensión.

Típicamente, un proceso de producción de partículas víricas comprende los pasos siguientes:

- (a) cultivar una célula de encapsidado que comprende un constructo de ácido nucleico o vector vírico en un medio de cultivo; y
- (b) recolectar las partículas víricas del sobrenadante de cultivo celular y/o dentro de las células.

Se pueden emplear los métodos convencionales para producir partículas víricas, que abarcan cotransfección celular transitoria con un constructo de ácido nucleico o vector de expresión (por ejemplo, un plásmido) que porta el transgén que codifica STXBP1; un segundo constructo de ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido auxiliar de AAV) que codifica genes rep y cap, pero que no porta las secuencias de ITR; y un tercer constructo de

ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido) que proporciona las funciones adenovíricas necesarias para la replicación de AAV.

Se hace referencia a los genes víricos necesarios para la replicación de AAV como a genes víricos auxiliares. Típicamente, dichos genes necesarios para la replicación de AAV son genes auxiliares adenovíricos, tal como ARN de E1A, E1B, E2a, E4, o VA. En una forma de realización, los genes auxiliares adenovíricos son del serotipo Ad5 o Ad2.

La producción de partículas de AAV se puede llevar a cabo alternativamente por infección de células de insectos con una combinación de baculovirus recombinantes (Urabe et al. Hum. Gene Ther. 2002; 13: 1935-1943). Se coinfectan las células SF9 con dos o tres vectores de baculovirus que expresan, respectivamente, AAV rep, AAV cap y el vector AAV a ser encapsidado. Los vectores de baculovirus recombinante proporcionan las funciones del gen auxiliar vírico requeridas para la replicación y/o encapsidado del virus. Smith et al 2009 (Molecular Therapy, vol.17, no.11, pp 1888-1896) describe un sistema de expresión doble de baculovirus para una producción a gran escala de partículas de AAV en células de insectos.

Los medios de cultivo adecuados son conocidos por el experto en la técnica. Los ingredientes que constituyen un medio de cultivo pueden variar según sea el tipo de célula a cultivar. Además de la composición del nutriente, la osmolaridad y el pH se consideran parámetros importantes del medio de cultivo. El medio de crecimiento celular comprende un número de ingredientes ampliamente conocidos por el experto en la técnica, con inclusión de aminoácidos, vitaminas, sales orgánicas e inorgánicas, fuentes de carbohidratos, lípidos, oligoelementos (*trace elements*) (por nombrar algunos, CuSO₄, FeSO₄, Fe(NO₃)₃, ZnSO₄), donde cada ingrediente está presente en una cantidad que brinda soporte al cultivo de una célula *in vitro* (es decir, supervivencia y crecimiento de células). Los ingredientes también pueden incluir sustancias auxiliares, tales como sustancias de tamponamiento (por ejemplo, bicarbonato de sodio, Hepes, Tris o tampones que funcionan en forma similar), estabilizadores de oxidación, estabilizadores para contrarrestar el estrés mecánico, inhibidores de proteasa, factores de crecimiento animal, hidrolizados vegetales, agentes antiaglutinantes, agentes antiespuma. Las características y composiciones de los medios de crecimiento celular varían según sean los requerimientos celulares particulares. Los ejemplos de medios de crecimiento celular comercialmente disponibles incluyen: MEM (*Minimum Essential Medium*, medio esencial mínimo), BME (*Basal Medium Eagle*, medio basal Eagle), DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's Medium*, medio de Eagle modificado por Dulbecco), Iscoves DMEM (*Iscove's modification de Dulbecco's Medium*, medio de

Dulbecco modificado de Iscove), GMEM (*Glasgow MEM*, medio esencial mínimo de Glasgow), RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640, Leibovitz L-15, de McCoy, Medio 199, Ham (*Ham's Media*, medios de Ham) F10 y derivados, Ham F12, DMEM/F12.

Se puede encontrar una guía adicional para la construcción y producción de vectores víricos para el uso de acuerdo con la descripción en Los vectores víricos for Gene Therapy, Methods y Protocols. Serie: Methods en 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. Los vectores víricos for Gene Transfer: Current Status de Gene Therapeutics. In: Drug Delivery, Handbook de Experimental Pharmacology 197; M. Schäfer-Korting (Ed.). 2010 Springer-Verlag; pp. 143-170; Adeno-Associated Virus: Methods y Protocols. R.O. Snyder y P. Moullier (Eds). 2011 Humana Press (Springer); Bünning H. et al. Recent developments en Adeno-Associated Virus technology. J. Gene Med. 2008; 10:717-733; Adenovirus: Methods y Protocols. M. Chillón y A. Bosch (Eds.); Tercera edición. 2014 Humana Press (Springer).

Célula hospedadora

La descripción proporciona, además, una célula hospedadora que comprende un constructo de ácido nucleico o un vector vírico que codifica la STXBP1, tal como se describe en el presente documento. La célula hospedadora de acuerdo con la descripción es una célula productora de virus, también denominada célula de encapsidado, que es transfectada con el constructo de ácido nucleico o vector vírico en presencia de un virus o vector auxiliar u otros constructos de ADN; y proporciona en trans todas las funciones faltantes que son necesarias para la completa replicación y encapsidado de una partícula vírica. Dichas células de encapsidado pueden ser células adherentes o de suspensión.

La célula de encapsidado puede ser una célula eucariota, tal como una célula de mamífero, con inclusión de células de simio, de humano, de perro o de roedor. Los ejemplos de células de humano son las células PER.C6 (documento de patente con el número 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 macaco *rhesus* (ATCC CL-160). Los ejemplos de células de primates no humanos son las células Vero (ATCC CCL81), las células COS-1 (ATCC CRL-1650) o las células COS-7 (ATCC CRL-1651). Los ejemplos de células de perro son células MDCK (ATCC CCL-34). Los ejemplos de células de roedores son las células de hámster, tal como BHK21-F, las células HKCC o las células CHO.

Como una alternativa a las fuentes de mamíferos, la célula de encapsidado para producir las partículas víricas pueden derivarse de una fuente tal como pollo, pato, ganso, codorniz o faisán. Los ejemplos de líneas celulares de aves incluyen los citoblastos embrionarios de aves (documentos de patente con los números WO01/85938; WO03/076601), las células de retina de pato inmortalizadas (documento de patente con el número WO2005/042728), y las células derivadas de citoblastos embrionarios de aves, con inclusión de células de pollo (documento de patente con el número WO2006/108846) o células de pato, tal como la línea celular EB66 (documentos de patente con los números WO2008/129058; WO2008/142124).

En otra forma de realización, la célula hospedadora puede ser cualquier célula de encapsidado permisiva para la infección y replicación de baculovirus. En un ejemplo, dichas células son células de insectos, tal como células SF9 (ATCC CRL-1711), células Sf21 (IPLB-Sf21), células MG1 (BTI-TN-MG1) o células High Five™ (BTI-TN-5B1-4).

En una forma de realización, la célula hospedadora comprende:

- (a) un primer constructo de ácido nucleico o vector vírico que comprende un transgén que codifica STXBP1 de humano;
- (b) un segundo constructo de ácido nucleico, por ejemplo, un plásmido, que codifica genes rep y/o cap de AAV, en donde dicho segundo constructo de ácido nucleico no porta las secuencias de ITR; y, opcionalmente,
- (c) un tercer constructo de ácido nucleico, por ejemplo, un plásmido o virus, que comprende genes auxiliares víricos.

La descripción proporciona, además, una célula hospedadora transducida con una partícula vírica de la descripción, y el término “célula hospedadora”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier línea celular que es susceptible a infección por un virus de interés, y factible de cultivar *in vitro*.

Composición farmacéutica

La presente descripción proporciona, además, una composición farmacéutica que comprende un constructo de ácido nucleico, un vector vírico, una partícula vírica de la descripción, en combinación con un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

El término “farmacéuticamente aceptable” se refiere a que está aprobado por una agencia regulatoria o reconocido por la farmacopea, tal como la *European Pharmacopeia*, para

utilizar en animales y/o humanos. El término “excipiente” se refiere a un diluyente, adyuvante, portador o el vehículo con el cual se administra el agente terapéutico.

Se puede utilizar cualquier portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado en la preparación de una composición farmacéutica (Véase, por ejemplo, Remington: The Science y Practice de Pharmacy, Alfonso R. Gennaro (Editor) Mack Publishing Company, abril de 1997). Las composiciones farmacéuticas son, típicamente, estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular como soluciones (por ejemplo, solución salina, solución de dextrosa o solución tamponada, u otros fluidos estériles farmacéuticamente aceptables), microemulsiones, liposomas, u otra estructura ordenada adecuada para albergar una alta concentración de producto (por ejemplo, micropartículas o nanopartículas). El portador puede ser un solvente o medio de dispersión con contenido, por ejemplo, de agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido y similares), y sus mezclas adecuadas. Se puede mantener la fluidez correcta, por ejemplo, con el uso de una cubierta tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de edadntes tensoactivos. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tal como manitol o sorbitol, o sales, tal como cloruro de sodio.

En una forma de realización, la composición farmacéutica se formula como una solución, por ejemplo, una solución salina tamponada.

Los compuestos activos suplementarios pueden incorporarse en las composiciones farmacéuticas de la descripción. La guía sobre la coadministración de sustancias terapéuticas adicionales se puede encontrar en el *Compendium de Pharmaceutical y Specialties* (CPS) de la *Canadian Pharmacists Association*.

En una forma de realización, la composición farmacéutica es una composición adecuada para la administración por vía intraparenquimal, intracerebral, intravenosa, o intratecal. Dichas composiciones farmacéuticas son solamente ejemplares y no limitan las composiciones farmacéuticas adecuadas para otras vías de administración parenteral y no parenteral. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden envasar en dosis unitarias simples o en formas de dosificación múltiple.

Uso médico

Las composiciones farmacéuticas, constructos de ácido nucleico, vectores víricos y partículas víricas de la presente descripción se pueden utilizar en el tratamiento o la prevención de cualquier afección que está asociada con una pérdida de la actividad funcional de STXBP1; por ejemplo, toda afección asociada con la mutación de STXBP1.

Dichas afecciones incluyen el síndrome de Dravet, el síndrome de Lennox-Gastaut, espasmos infantiles, epilepsia mioclónica, encefalopatía epiléptica, encefalopatía mioclónica temprana, epilepsia no sindrómica, síndrome de Ohtahara, encefalopatía epiléptica de inicio temprano, síndrome de West, demora en el desarrollo, trastornos del espectro autista, síndrome de ataxia-temblor-enlentecimiento, síndrome de Rett y discapacidad intelectual sin epilepsia.

Las composiciones farmacéuticas, constructos de ácido nucleico, vectores víricos y partículas víricas de la presente descripción pueden resultar especialmente útiles para tratar o prevenir trastornos de neurodesarrollo y/o epilépticos asociados con mutaciones genéticas en el gen STXBP1, por ejemplo, mutaciones que contribuyen al desarrollo de síndromes tales como el síndrome de Ohtahara, de Dravet y de West.

Por ende, en una forma de realización, la composición farmacéutica, el constructo de ácido nucleico, el vector vírico o la partícula vírica se proporcionan para el uso en terapias.

En una forma de realización, la composición farmacéutica, el constructo de ácido nucleico, el vector vírico o la partícula vírica se proporcionan para utilizar en el tratamiento de un trastorno genético de STXBP1.

En una forma de realización, el trastorno genético de STXBP1 es el síndrome de Dravet, el síndrome de Lennox-Gastaut, espasmos infantiles, epilepsia mioclónica, encefalopatía epiléptica, encefalopatía mioclónica temprana, epilepsia no sindrómica, síndrome de Ohtahara, encefalopatía epiléptica de inicio temprano, síndrome de West, demora en el desarrollo, trastornos del espectro autista, síndrome de ataxia-temblor-enlentecimiento, síndrome de Rett o discapacidad intelectual sin epilepsia.

En una forma de realización, el trastorno genético de STXBP1 es el síndrome de Dravet, el síndrome de Ohtahara o el síndrome de West.

En una forma de realización, la presente descripción proporciona un método para tratar un trastorno genético de STXBP1, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica o partícula vírica a un paciente que lo necesita.

La frase “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a un número de partículas víricas, o una cantidad de una formulación farmacéutica que comprende dichas partículas víricas, que, cuando se administran a un paciente o sujeto, logra un resultado terapéutico deseado. Los resultados terapéuticos deseados incluyen:

- una reducción significativa en la frecuencia o duración de diferentes tipos de crisis, por ejemplo, crisis atónicas (*drop attacks*), crisis mioclónicas, crisis generalizadas, crisis parciales, convulsiones febriles, espasmos infantiles;
- un significativo logro con ausencia sostenida de las crisis;
- un significativo impacto sobre la progresión de síntomas de neurodesarrollo, tal como demora del desarrollo, discapacidad intelectual, deterioro del lenguaje, deficiencia cognitiva, movimientos involuntarios, alteración de la marcha, características autistas.

El término “paciente” o “sujeto”, cuando se utilizan en forma indistinta, se refieren a mamíferos. Cualquier especie de mamífero puede beneficiarse con los métodos del tratamiento. Típicamente, el paciente es un ser humano. El paciente puede ser un neonato, un bebé (*infant*, menos de 2 años de edad), un niño (*child*, hasta 6 años de edad) o un adolescente (más de 12 años de edad).

El trastorno genético de STXBP1 se puede identificar mediante mutaciones genéticas conocidas.

En una forma de realización, el trastorno genético de STXBP1 está asociado con una variante patológica de STXBP1 que comprende una mutación o combinación de mutaciones.

La frase “variante patológica de STXBP1” se refiere a una variante de STXBP1 observada en muestras de pacientes e identificada a través de investigación o pruebas clínicas, la que se informa como asociada con un fenotipo patológico. Las variantes patológicas y probablemente patológicas de STXBP1 se describen en el Ejemplo 3 y se ilustran en las Tablas 5 y 6 respectivamente.

En una forma de realización, la variante patológica de STXBP1 comprende una o más mutaciones seleccionadas entre el grupo detallado en la Tabla 5.

En una forma de realización, la variante patológica de STXBP1 comprende una o más mutaciones seleccionadas entre el grupo detallado en la Tabla 6.

La terapia génica de STXBP1 descrita en el presente documento se puede administrar en combinación con fármacos antiepilépticos u otros tratamientos neuromoduladores.

Las composiciones farmacéuticas, constructos de ácido nucleico, vectores víricos o partículas víricas se pueden administrar al cerebro y/o al líquido cefalorraquídeo (CSF, *CerebroSpinal Fluid*) del paciente. Por ejemplo, pueden administrarse mediante inyección o mediante el uso de un dispositivo para administración específica por propósito. La administración al cerebro se puede seleccionar entre administración intracerebral, administración intraparenquimal, administración intracortical, administración intrahipocampal, administración intraputamina, administración intracerebelar y sus combinaciones. Se puede seleccionar la administración al CSF entre la administración intracisterna magna, administración intratecal, administración intracerebroventricular (ICV) y sus combinaciones.

El tratamiento puede estar provisto como una dosis única, aunque se pueden considerar dosis repetidas, por ejemplo, en casos en los que el tratamiento puede no haber estado dirigido a la región correcta, o en años futuros y/o con diferentes serotipos de AAV.

SECUENCIAS

Las secuencias incluidas en la presente invención se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Secuencias

Identificador de la secuencia y nombre	Secuencia
SEQ ID NO: 1	CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGC CCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCC ATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCA AGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC

Activador CAG 1,6 kb	GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTTCTACTTGGCAGTACA TCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGCGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCT TCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTT TTAATTATTTTATGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCAGGCGG GGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCC AATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGGC GGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGG
SEQ ID NO: 2 Activador hSYN	AGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCGGGGTGGGGGTGCCTACCTGACG ACCGACCCCGACCCACTGGACAAGCACCCAACCCCATTTCCCAAATTGCGCATC CCCTATCAGAGAGGGGGAGGGGAAACAGGATGCGGCGAGGCGCGTGCGCACTGCC AGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCCTGGCGGCGCGCGCCACCGC CGCCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCGCAAACCTCCCC TTCCCGGCCACCTTGGTGCGCTCCGCGCCGCCGCCGGCCAGCCGGACCGCACCA CGCGAGGCGCGAGATAGGGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGCGCCGGC GACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGTCGTGTCTGCTGCTGA GAGCGCAG
SEQ ID NO: 3 Activador MECP2	AGCTGAATGGGGTCCGCCTCTTTTCCCTGCCTAAACAGACAGGAACCTCTGCCAA TTGAGGGCGTCACCGCTAAGGCTCCGCCCCAGCCTGGGCTCCACAACCAATGAAG GGTAATCTCGACAAAAGAGCAAGGGGTGGGGCGCGGGCGCGCAGGTGCAGCAGCAC ACAGGCTGGTCGGGAGGGCGGGGCGCGACGTCTGCCGTGCGGGGTCCCGGCATCG GTTGCGCGC
SEQ ID NO: 4 Activador hNSE	ATGCAGCTGGACCTAGGAGAGAAGCAGGAGAGGAAGATCCAGCACAAAAATCCG AAGCTAAAAACAGGACACAGAGATGGGGGAAGAAAAGAGGGCAGAGTGAGGCAAA AAGAGACTGAAGAGATGAGGGTGGCCGCCAGGCACCTTTAGATAGGGGAGAGGCTT TATTTACCTCTGTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGCGAGTA GTCTTGCTTAGTCTCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTCAGCTCACTGCAAC TTCCACCTCCTGGGTTCAGCAATTTCTCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGA CTACAGGCGCATGCAACCGCGCCTGGCTAATTTTTTGTATTTTTTAGTAGAAACGGG GTTTCACCACGTTAGCCAGGATGGTCTGGATCTCCTGACCTCGTGATCTGCCCCG CTCCGCCTTCCAAAGTGCTGGGATTACAGGGGTGAGCCACAGCGCCTGGTCCCTA TTTACTTCTGTCTTCTACCTCCAGGAGATCAAAGACGCTGGCCTTCAGACCTGAT CAGACTCCCAGGGGCAGCCACCACATGTATGACAGAGAACAGAGGATGCCTGTTT TTGCCCCAAAGCTGGAAATTCATCACAACCTGAGGCCAGGATCTGCTCTGTGCC GGTCCTCTGGGCAGTGTGGGGTGCAGAATGGGGTGCCTAGGCCTGAGCGTTGCC GGAGCCTAGGCCGGGGGCCGCCCTCGGGCAGGCGTGGGTGAGAGCCAAGACCGCG TGGGCCGCGGGGTGCTGGTAGGAGTGGTTGGAGAGACTTGCGAAGGCGGCTGGGG TGTTTCGGATTTCCAATAAAGAAACAGAGTGATGCTCCTGTGTCTGACCGGGTTG TGAGACATTGAGGCTGTCTTGGGCTTCACTGGCAGTGTGGGCCTTCGTACCCGGG CTACAGGGGTGCGGCTCTGCCTGTACTGTGAGTGGGTGCGGCCGTGGGTATGA GCGCTTGTGTGCGCTGGGGCCAGGTCGTGGGTGCCCCCACCCTTCCCCCATCCTC CTCCCTTCCCCACTCCACCCTCGTCGGTCCCCCACC CGCTCGTACGTGCGCCT CCGCCGCGAGCTCCTGACTCATCGGGGGCTCCGGGTCACATGCGCCCGCGCGGCC CTATAGGCGCCTCCTCCGCCCCGCCCGGGAGCCGCAGCCGCCGCCGCGCCACTGC CACTCCCGCTCTCTCAGCGCCGCGCTCGCCACCGCCACCGCCACCGCCACTACCA CCGAGATCTGCGATCTAAGTAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTGGTAAAGCC

SEQ ID NO: 5 Activador CamKII	CATTATGGCCTTAGGTCACCTTCATCTCCATGGGGTTCTTCTTCTGATTTTCTAGA AAATGAGATGGGGGTGCAGAGAGCTTCCTCAGTGACCTGCCCAGGGTCACATCAG AAATGTCAGAGCTAGAACTTGAACCTCAGATTACTAATCTTAAATTCCATGCCTTG GGGGCATGCAAGTACGATATACAGAAGGAGTGAATCATTAGGGCAGATGACCAA TGAGTTTAGGAAAGAAGAGTCCAGGGCAGGGTACATCTACACCACCCGCCCAGCC CTGGGTGAGTCCAGCCACGTTACCTCATTATAGTTGCCTCTCTCCAGTCTTACC TTGACGGGAAGCACAAAGCAGAACTGGGACAGGAGCCCCAGGAGACCAAATCTTC ATGGTCCCTCTGGGAGGATGGGTGGGGAGAGCTGTGGCAGAGGCCTCAGGAGGGG CCCTGCTGCTCAGTGGTGACAGATAGGGGTGAGAAAGCAGACAGAGTCATTCCGT CAGCATTCTGGGTCTGTTTGGTACTTCTTCTCACGCTAAGGTGGCGGTGTGATAT GCACAAATGGCTAAAAAGCAGGGAGAGCTGGAAAGAAACAAGGACAGAGACAGAGG CCAAGTCAACCAGACCAATTCCCAGAGGAAGCAAAGAAACCATTACAGAGACTAC AAGGGGGAAGGGAAGGAGAGATGAATTAGCTTCCCCTGTAAACCTTAGAACCAG CTGTTGCCAGGGCAACGGGGCAATACCTGTCTCTTCAGAGGAGATGAAGTTGCCA GGGTAACCTACATCCTGTCTTTCTCAAGGACCATCCCAGAATGTGGCACCCACTAG CCGTTACCATAGCAACTGCCTCTTTGCCCCACTTAATCCCATCCCGTCTGTAA AGGGCCCTATAGTTGGAGGTGGGGGAGGTAGGAAGAGCGATGATCACTTGTGGAC TAAGTTTGTTCGCATCCCCCTTCTCCAACCCCCCTCAGTACATCACCTGGGGGAAC AGGGTCCACTTGCTCCTGGGCCCACACAGTCCTGCAGTATTGTGTATATAAGGCC AGGGCAAAGAGGAGCAGGTTTTAAAGTGAAAGGCAGGCAGGTGTTGGGGAGGCAG TTACCGGGGCAACGGGAACAGGGCGTTTTCGGAGGTGGTTGCCATGGGGACCTGGA TGCTGACGAAGGCTCGCGAGGCTGTGAGCAGCCACAGTGCCCTGCTCAGAAGCCC CAAGCTCGTCAGTCAAGCCGGTTCTCCGTTTGCACCTCAGGAGCACGGGCAGGCGA GTGGCCCCTAGTTCTGGGGGCAGC
SEQ ID NO: 6 Activador hSTXBP1 endógeno	TAAAAAGCAATGCCAGTGATTGGAGGATTTGATGAGATGATGCCCGCGAGGTGC TTGGCACGGAGTTTGACACAAGAACTCAGTGTTGGTGAATGCACGAATGCAGGTA CCCAGCGACAGGGAGGTGCTGTGGGTGGATTACCCCTGGCTTCGCTGCGGCTGGG AGTGGGCGCTGCTAGTAAGAGATCTCGCCTCCAAGCTCCTTCCGTGGGCAGGAAA AAACGGAAGCTCCCAGAAAGAGGAAAGACAGGACCCGAGCGGGGTTTCAGGCAGA TGGAGCGCGTCGGTAGCCTGTGGCCAGGGATCCCAGCACCGACGGGAAAGAGGAG GCCTGGGTACCCTGCGCCCCGGGCGCGCGCGCGCGTGAAGGTGAGGGGGAGGGCG CGGCTCCGCACCAGCCAGCGGCCGCTGGCGCCCAGCCGCATCTCGGGGGGCGGG GTTGAGCCTCCGGGCCGAGTGCGATTGGCGGAGGCGAGTGGGTGACGCAACGG CCGGCGGAGGCCCCGCCCCGGCTTGCCCCGCCCCGCGCGCGCGCGGGCGGG GCAGCCTCGCTCTGGCTCGCGCCGCGCCCCCGCGCCAGTCCGCGCGTCAGTCGG TCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCCAGCGCGCCACCTGA GGAGGCGGCGGGGTCCGCAGGCGTCGCGGGACGAGGAGATCGGAGCCGGGAGACT CGCGCAGCGCC
SEQ ID NO: 7 STXBP1 de humano	ATGGCCCCCATTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGGAGAGAAGATTATGCATGATGTGA TAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGGATCAGTTAAG CATGAGGATGCTGTCCTCCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCATA ACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTG TGTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAA GGACCCGCCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTCACTGACTCTTGT CCAGATGCCCTGTTTAATGAACTGGTAAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAAA CTCTGACGGAAATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCCAGGTCTATTCTT GGACTCTGCTGACTCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCCACAAGGCTCAGATGAAG

	AATCCTATACTGGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCTTTGTGCCACCCTGA AGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGAATACAAGGACAATGCCCTGCTGGC TCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTGATGATCCAACAATGGGG GAGGGCCCAGACAAGGCACGCTCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGACC CCAGCTCCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGCT GCCTATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCGGCATCGGGGAGGCACGG GTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACTGCGCCACA AGCACATCGCAGAGGTGTCCCAGGAAGTCACCCGGTCTCTGAAAGATTTTTCTTC TAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTGTCCCAGATG CTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACCCACCTGC ACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAAACTCTGCCG AGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGATCAAGGAC CCTATGCGAGCCATCGTCCCCATTCTGCTGGATGCCAATGTCAGCACTTATGACA AAATCCGCATCATCCTTCTCTACATCTTTTTGAAGAATGGCATCACGGAGGAAAA CCTGAACAACTGATCCAGCACGCCCAGATACCCCCGGAGGATAGTGAGATCATC ACCAACATGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTCGCC GGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCACG GTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAAACTTGAC ACCAAACACTACCCTTATATCTCTACCCGTTCTCTGCCTCCTTCAGCACCCACCG CCGTCAGCGCCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACAAGGCCCCAGGCGAGTACCG CAGTGGCCCCCGCCTCATCATTTTCATCCTTGCGGGTGTGAGCCTGAATGAGATG CGCTGCGCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGAAAGTGGGAGGTGCTGATAGGTT CTACTCACATTCTTACTCCCACCAAATTTCTCATGGACCTGAGACACCCGACTT CAGGGAGTCCTCTAGGGTATCTTTTGAGGATCAGGCTCCAACAATGGAGTGA
SEQ ID NO: 8 poli A de SV40	GATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAAGTAGAATGC AGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAAC CATTATAAGCTGCAATAAACAAGTT
SEQ ID NO: 9 Isoforma a de STXBP1 de humano	MAPIGLKAVVGEKIMHDVIKKVKKKGEWKVLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGI TIVEDINKRREPLPSLEAVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSC PDALFNELVKSRAAKVIKLTLEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMK NPILERLAEQIATLCATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADDPTMG EGPDKARSQLLILDRGFDPSPLHELTFOAMSVDLLPIENDVYKYETSGIGEAR VKEVLLDEDDDLWIALRHKHIAEVSQEVTRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQM LKKMPQYQKELSKYSTHLHLAEDCMKHYQGTVDKLCRVEQDLAMGTDAEAGEKIKD PMRAIVPILLDANVSTYDKIRIILLYIFLKNNGITEENLNKLIQHAQIPPEDSEII TNMAHLGVPIVTDSTLRRRSKPERKERISEQTYQLSRWTPIIKDIMEDTIEDKLD TKHYPYISTRSSASFSTTAVSARYGHWKKNKAPGEYRSGPRLIIFILGGVSLNEM RCAYEVTQANGKWEVLIGSTHILTPKFLMDLRHPDFRESSRVSFEDQAPTME
SEQ ID NO: 10 Isoforma b de STXBP1 de humano	MAPIGLKAVVGEKIMHDVIKKVKKKGEWKVLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGI TIVEDINKRREPLPSLEAVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSC PDALFNELVKSRAAKVIKLTLEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMK NPILERLAEQIATLCATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADDPTMG EGPDKARSQLLILDRGFDPSPLHELTFOAMSVDLLPIENDVYKYETSGIGEAR VKEVLLDEDDDLWIALRHKHIAEVSQEVTRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQM LKKMPQYQKELSKYSTHLHLAEDCMKHYQGTVDKLCRVEQDLAMGTDAEAGEKIKD PMRAIVPILLDANVSTYDKIRIILLYIFLKNNGITEENLNKLIQHAQIPPEDSEII

	TNMAHLGVPIVTDSTLRRRSKPERKERISEQTYQLSRWTPPIIKDIMEDTIEDKLD TKHYPYISTRSSASFSTTAVSARYGHHKKNKAPGEYRSGPRLIIFILGGVSLNEM RCAYEVTQANGKWEVLIGSTHILTPQKLLDTLKKLNKTDEEISS
SEQ ID NO: 11 Isoforma c de STXBP1 de humano	MAPIGLKAVVGEKIMHDVIKKVKKKGWVKVLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGI TIVEDINKRREPLPSLEAVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDYA LFNELVKSRAAKVIKTLTEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMKNPI LERLAEQIATLCATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADDPTMGEGP DKARSQLLILDGRGFDPSPLHELTFQAMSYDLLPIENDVYKYETSGIGEARVKE VLLDEDDDLWIALRHKHIAEVSQEVTRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQMLKK MPQYQKELSKYSTHLHLAEDCMKHYQGTVDKLCRVEQDLAMGTDAEGEKIKDPMR AIVPILLDANVSTYDKIRIILLYIFLKNGITEENLNKLIQHAQIPPEDSEIITNM AHLGVPIVTDSTLRRRSKPERKERISEQTYQLSRWTPPIIKDIMEDTIEDKLDTKH YPYISTRSSASFSTTAVSARYGHHKKNKAPGEYRSGPRLIIFILGGVSLNEMRCA YEVTQANGKWEVLIGSTHILTPQKLLDTLKKLNKTDEEISS
SEQ ID NO: 12 Isoforma d de STXBP1 de humano	MHDVIKKVKKKGWVKVLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGITIVEDINKRREPLP SLEAVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSCPDALFNELVKSRAA KVIKTLTEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMKNPILERLAEQIATL CATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADDPTMGEGPDKARSQLLILD RGFDPSPLHELTFQAMSYDLLPIENDVYKYETSGIGEARVKEVLLDEDDDLWI ALRHKHIAEVSQEVTRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQMLKKMPQYQKELSKY STHLHLAEDCMKHYQGTVDKLCRVEQDLAMGTDAEGEKIKDPMRAIVPILLDANV STYDKIRIILLYIFLKNGITEENLNKLIQHAQIPPEDSEIITNMMAHLGVPIVTD STLRRRSKPERKERISEQTYQLSRWTPPIIKDIMEDTIEDKLDTKHYPYISTRSSA SFSTTAVSARYGHHKKNKAPGEYRSGPRLIIFILGGVSLNEMRCAYEVTQANGKE VLIGSTHILTPTKFLMDLRHPDFRESSRVSFEDQAPTME
SEQ ID NO: 13 Isoforma e de STXBP1 de humano	MHDVIKKVKKKGWVKVLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGITIVEDINKRREPLP SLEAVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSCPDALFNELVKSRAA KVIKTLTEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMKNPILERLAEQIATL CATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADDPTMGEGPDKARSQLLILD RGFDPSPLHELTFQAMSYDLLPIENDVYKYETSGIGEARVKEVLLDEDDDLWI ALRHKHIAEVSQEVTRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQMLKKMPQYQKELSKY STHLHLAEDCMKHYQGTVDKLCRVEQDLAMGTDAEGEKIKDPMRAIVPILLDANV STYDKIRIILLYIFLKNGITEENLNKLIQHAQIPPEDSEIITNMMAHLGVPIVTD STLRRRSKPERKERISEQTYQLSRWTPPIIKDIMEDTIEDKLDTKHYPYISTRSSA SFSTTAVSARYGHHKKNKAPGEYRSGPRLIIFILGGVSLNEMRCAYEVTQANGKE VLIGSTHILTPQKLLDTLKKLNKTDEEISS
SEQ ID NO: 14 Isoforma f de STXBP1 de humano	MAPIGLKAVVGEKIMHDVIKKVKKKGWVKVLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGI TIVEDINKRREPLPSLEAVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSC PDALFNELVKSRAAKVIKTLTEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMK NPILERLAEQIATLCATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADDPTMG EGPDKARSQLLILDGRGFDPSPLHELTFQAMSYDLLPIENDVYKYETSGIGEAR VKEVLLDEDDDLWIALRHKHIAEVSQEVTRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQM LKKMPQYQKELSKYSTHLHLAEDCMKHYQGTVDKLCRVEQDLAMGTDAEGEKIKD PMRAIVPILLDANVSTYDKIRIILLYIFLKNGITEENLNKLIQHAQIPPEDSEIIT NMMAHLGVPIVTDSTLRRRSKPERKERISEQTYQLSRWTPPIIKDIMEDTIEDKLD

	TKHYPYISTRSSASFSTTAVSARYGHWKHNKAPGEYRSGPRLIIFILGGVSLNEM RCAYEVTQANGKWEVLIGEPFRTLAR
SEQ ID NO: 15 Isoforma g de STXBP1 de humano	MAPIGLKAVVGEKIMHDVICKVKKKGGEWKVLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGI TIVEDINKRREPLPSLEAVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSC PDALFNELVKSRAAKVIKTLTEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMK NPILERLAEQIATLCATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADDPTMG EGPDKARSQLLILDRGFDPPSPVLHELTFQAMSVDLLPIENDVYKYETSGIGEAR VKEVLLDEDDDLWIALRHKHIAEVSQEVTRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQM LKKMPQYQKELSKYSTHLHLAEDCMKHYQGTVDKLCRVEQDLAMGTDAEGEKIKD PMRAIVPILLDANVSTYDKIRIILLYIFLKNGITEENLNKLIQHAQIPPEDSEII TNMAHLGVPIVTDSTLRRRSKPERKERISEQTYQLSRWTPIIKDIMEDTIEDKLD TKHYPYISTRSSASFSTTAVSARYGHWKHNKAPGEYRSGPRLIIFILGGVSLNEM RCAYEVTQANGKWEVLIVPEAGS
SEQ ID NO: 16 Isoforma h de STXBP1 de humano	MAPIGLKAVVGEKIMHDVICKVKKKGGEWKVLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGI TIVEDINKRREPLPSLEAVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSC PDALFNELVKSRAAKVIKTLTEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMK NPILERLAEQIATLCATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADDPTMG EGPDKARSQLLILDRGFDPPSPVLHELTFQAMSVDLLPIENDVYKEVTRSLKDFS SSKRMNTGEKTTMRDLSQMLKKMPQYQKELSKYSTHLHLAEDCMKHYQGTVDKLC RVEQDLAMGTDAEGEKIKDPMRAIVPILLDANVSTYDKIRIILLYIFLKNGITEE NLNLIQHAQIPPEDSEIITNMAHLGVPIVTDSTLRRRSKPERKERISEQTYQLS RWTPIIKDIMEDTIEDKLDTKHYPYISTRSSASFSTTAVSARYGHWKHNKAPGEY RSGPRLIIFILGGVSLNEMRCAYEVTQANGKWEVLIGSTHILTPTKFLMDLRHPD FRESSRVSFEDQAPTME
SEQ ID NO: 17 Secuencia de ADN de AAV9.hu14	AGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAATTGCAATTTATTCATATCAGGATTATC AATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGG CAGTTCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGCTGCGATTCCGACTCGTCCAA CATCAATACAACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAA ATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTTTATGCATTTCT TTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCAT CAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGGCGAAATACGCGATC GCTGTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAGTGCAACCGGCGCAGGAACACT GCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGA ACGCTGTTTTTCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACG GATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGTGGCATAAAATCCGTCAGCCAGTTTAGTCTG ACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACA ACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATAAAGCGATAGATTGTGCGACCTGATTGCCC GACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTT AATCGCGGCCTCGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATATTCTTCTTTTTTCAAT ATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATG TATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTCAGTGTTACAACCAATTAACCAATTCTG AACATTATCGCGAGCCCATTTATACCTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTTTG CCTGGCGGAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCCATGCCGAAGTGAAGTGA AACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGGACTCCCCATGCGAGAGTAGGGAACTG CCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGCCCGGG CTAATTAGGGGGTGTGCGCCCTTCGCTGAAGTCCTGTATTAGAGGTCACGTGAGTG

	TTTTGCGACATTTTGGCGACACCATGTGGTCACGCTGGGTATTTAAGCCCCGAGTGA GCACGCAGGGTCTCCATTTTGAAGCGGGAGGTTTGAACGCGCAGCCGCCATGCCG GGGTTTTACGAGATTGTGATTAAGGTCCCCAGCGACCTTGACGAGCATCTGCCCCG GCATTTCTGACAGCTTTGTGAACTGGGTGGCCGAGAAGGAATGGGAGTTGCCGCC AGATTCTGACATGGATCTGAATCTGATTGAGCAGGCACCCCTGACCGTGGCCGAG AAGCTGCAGCGCGACTTTCTGACGGAATGGCGCCGTGTGAGTAAGGCCCCGGAGG CCCTTTTCTTTGTGCAATTTGAGAAGGGAGAGAGCTACTTCCACATGCACGTGCT CGTGGAACACCGGGGTGAAATCCATGGTTTTTGGGACGTTTCCTGAGTCAGATT CGCGAAAACTGATTCAGAGAATTTACCGCGGGATCGAGCCGACTTTGCCAACT GGTTCGCGGTACAAAAGACCAGAAATGGCGCCGGAGGCGGGAACAAGGTGGTGGA TGAGTGCTACATCCCCAATTACTTGCTCCCCAAAACCCAGCCTGAGCTCCAGTGG GCGTGACTAATATGGAACAGTATTTAAGCGCCTGTTTGAATCTCACGGAGCGTA AACGGTTGGTGGCGCAGCATCTGACGCACGTGTCGCAGACGCAGGAGCAGAACAA AGAGAATCAGAATCCAATTCTGATGCGCCGGTGATCAGATCAAAAACCTCAGCC AGGTACATGGAGCTGGTCGGGTGGCTCGTGGACAAGGGGATTACCTCGGAGAAGC AGTGGATCCAGGAGGACCAGGCCTCATACATCTCCTTCAATGCGGCCTCCAACCTC GCGGTCCCAAATCAAGGCTGCCTTGGACAATGCGGGAAAGATTATGAGCCTGACT AAAACCGCCCCGACTACCTGGTGGGCCAGCAGCCCGTGGAGGACATTTCCAGCA ATCGGATTTATAAAATTTTGGAATAAACGGGTACGATCCCCAATATGCGGCTTC CGTCTTTCTGGGATGGGCCACGAAAAAGTTTCGGCAAGAGGAACACCATCTGGCTG TTTGGGCCTGCAACTACCGGGAAGACCAACATCGCGGAGGCCATAGCCCACACTG TGCCCTTCTACGGGTGCGTAACTGGACCAATGAGAACTTTCCCTTCAACGACTG TGTCGACAAGATGGTGATCTGGTGGGAGGAGGGGAAGATGACCGCCAAGGTCGTG GAGTCGGCCAAAGCCATTCTCGGAGGAAGCAAGGTGCGCGTGGACCAGAAATGCA AGTCCTCGGCCCAGATAGACCCGACTCCCGTGATCGTCACCTCCAACACCAACAT GTGCGCCGTGATTGACGGGAACCAACGACCTTCGAACACCAGCAGCCGTTGCAA GACCGGATGTTCAAATTTGAACTCACCCGCCGTCTGGATCATGACTTTGGGAAGG TCACCAAGCAGGAAGTCAAAGACTTTTTCCGGTGGGCAAAGGATCACGTGGTTGA GGTGGAGCATGAATTCTACGTCAAAAAGGGTGGAGCCAAGAAAAGACCCGCCCCC AGTGACGCAGATATAAGTGAGCCCCAACGGGTGCGCGAGTCAGTTGCGCAGCCAT CGACGTCAGACGCGGAAGCTTCGATCAACTACGCAGACAGGTACCAAAACAAATG TTCTCGTCACGTGGGCATGAATCTGATGCTGTTCCCTGCAGACAATGCGAGAGA CTGAATCAGAATTCAAATATCTGCTTCACTCACGGTGTCAAAGACTGTTTAGAGT GCTTTCCCGTGTGAGAATCTCAACCCGTTTCTGTGCTCAAAAAGGCGTATCAGAA ACTGTGCTACATTCATCACATCATGGGAAAGGTGCCAGACGCTTGCACTGCTTGC GACCTGGTCAATGTGGACTTGGATGACTGTGTTTCTGAACAATAAATGACTTAAA CCAGGTATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTTAGTG AAGGAATTCGCGAGTGGTGGGCTTTGAAACCTGGAGCCCCTCAACCCAAGGCAAA TCAACAACATCAAGACAACGCTCGAGGTCTTGTGCTTCCGGGTACAAATACCTT GGACCCGGCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCGGTCAACGCAGCAGACGCGGCGG CCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACCAGCAGCTCAAGGCCGGAGACAACCCGTA CCTCAAGTACAACCACGCCGACGCCGAGTTCCAGGAGCGGCTCAAAGAAGATACG TCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAAAAGAGGCTTCTTG AACCTCTTGGTCTGGTTGAGGAAGCGGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGGCC TGTAGAGCAGTCTCCTCAGGAACCGGACTCCTCCGCGGGTATTGGCAAATCGGGT GCACAGCCCGCTAAAAAGAGACTCAATTTCCGGTCAGACTGGCGACACAGAGTCAG TCCCAGACCCCTCAACCAATCGGAGAACCTCCCGCAGCCCCCTCAGGTGTGGGATC TCTTACAATGGCTTCAGGTGGTGGCGCACCAGTGGCAGACAATAACGAAGGTGCC
--	--

	GATGGAGTGGGTAGTTCCTCGGGAAATTGGCATTGCGATTCCCAATGGCTGGGGG ACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTGGGCCCTGCCACCTACAACAATCA CCTCTACAAGCAAATCTCCAACAGCACATCTGGAGGATCTTCAAATGACAACGCC TACTTCGGCTACAGCACCCCCTGGGGGTATTTTGACTTCAACAGATTCCACTGCC ACTTCTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAACCTGGGGATTCCGGCC TAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTCAAGTCAAAGAGGTTACGGACAAC AATGGAGTCAAGACCATCGCCAATAACCTTACCAGCACGGTCCAGGTCTTCACGG ACTCAGACTATCAGCTCCCGTACGTGCTCGGGTCGGCTCACGAGGGCTGCCTCCC GCCGTTCAGCGGACGTTTTTCATGATTCCCTCAGTACGGGTATCTGACGCTTAAT GATGGAAGCCAGGCCGTGGGTTCGTTCCTTTTACTGCCTGGAATATTTCCCGT CGCAAATGCTAAGAACGGGTAACAACCTCCAGTTCAGCTACGAGTTTGAGAAGCT ACCTTTCCATAGCAGCTACGCTCACAGCCAAAGCCTGGACCGACTAATGAATCCA CTCATCGACCAATACTTGTACTATCTCTCAAAGACTATTAACGGTTCTGGACAGA ATCAACAAACGCTAAAATTCAAGTGTGGCCGGACCCAGCAACATGGCTGTCCAGGG AAGAACTACATACCTGGACCCAGCTACCGACAACAACGTGTCTCAACCACTGTG ACTCAAAACAACAACAGCGAATTTGCTTGGCCTGGAGCTTCTTCTTGGGCTCTCA ATGGACGTAATAGCTTGATGAATCCTGGACCTGCTATGGCCAGCCACAAAGAAGG AGAGGACCGTTTTCTTTCCTTTGTCTGGATCTTTAATTTTTTGGCAAACAAGGAACT GGAAGAGACAACGTGGATGCGGACAAAGTCATGATAACCAACGAAGAAGAAATTA AACTACTAACCCGGTAGCAACGGAGTCCTATGGACAAGTGGCCACAAACCACCA GAGTGCCCAAGCACAGGCGCAGACCGGCTGGGTTCAAAACCAAGGAATACTTCCG GGTATGGTTTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTGCAAGGACCCATTTGGGCCAAAA TTCCTCACACGGACGGCAACTTTTACCCTTCTCCGCTGATGGGAGGGTTTGAAT GAAGCACCCGCCTCCTCAGATCCTCATCAAAAACACACCTGTACCTGCGGATCCT CCAACGGCCTTCAACAAGGACAAGCTGAACTCTTTCATCACCCAGTATTCTACTG GCCAAGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAGCGCTG GAACCCGGAGATCCAGTACACTTCCAATAATTACAAGTCTAATAATGTTGAATTT GCTGTTAATACTGAAGGTGTATATAGTGAACCCCGCCCCATTGGCACCAGATACC TGACTCGTAATCTGTAATTGCTTGTTAATCAATAAACCGTTTAATTCGTTTCAGT TGAACCTTGGTCTCTGCGCGTCAAAAGGGCGACACAAAATTTATTCTAAATGCAT AATAAATACTGATAACATCTTATAGTTTGTATTATATTTTGTATTATCGTTGACA TGTATAATTTTGATATCAAAAACCTGATTTTCCCTTTATTATTTTCGAGATTTATT TTCTTAATTCTCTTTAACAACTAGAAATATTGTATATACAAAAAATCATAAATA ATAGATGAATAGTTTAATTATAGGTGTTTCATCAATCGAAAAAGCAACGTATCTTA TTTAAAGTGCCTTGCCTTTTCTCATTTATAAGGTTAAATAATTCTCATATATCA AGCAAAGTGACAGGCGCCCTTAAATATTCTGACAAATGCTCTTTCCCTAAACTCC CCCCATAAAAAAACCCGCCGAAGCGGGTTTTTACGTTATTTGCGGATTAACGATT ACTCGTTATCAGAACCGCCCAGGGGGCCCGAGCTTAAGACTGGCCGTCGTTTTAC AACACAGAAAGAGTTTGTAGAAACGAAAAAGGCCATCCGTCAGGGGCCCTTCTGC TTAGTTTGATGCCTGGCAGTTCCCTACTCTCGCCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGA CTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCG GTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAA AAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCA TAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGG CGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCG TGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCTCCC TTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTTCGGTG TAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAGCCCGACC
--	---

	GCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTT ATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGC GGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAG TATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAG CTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAG CAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTA CGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGACGCGCGGTAACCTACGTAAAGGGATTTTG GTCATGAGCTTGCGCCGTCCCGTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCTT
SEQ ID NO: 18 3' ITR	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCAGCGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCA GTGAGCGAGCGAGCGCGC
SEQ ID NO: 19 5' ITR	GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACC TTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACT CCATCACTAGGGGTTCTT
SEQ ID NO: 20 AAVtt	MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGP FNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSF GGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPAEPDSSSGTGKSGQQ PARKRLNFGQTDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLTNTMASGSGAPMADNNEGADG VGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGY STPWGYFDFNRFHCHFSRPRDWQRLINNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNDGTT TIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQ AVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQ YLYYLSRTNTPSGTTTMSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTAADN NNSDYSWTGATKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHKDDEEKYFPQSGVLI FGKQDSGKT NVDIEKVMITDEEEIRTTPVATEQYGSVSTNLQSGNTQAATSDVNTQGVLPGMV WQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTT FSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYSVNVDFTVD TNGVYSEPRPIGTRYLTRNL
SEQ ID NO: 21 AAV9	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGP GNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSF GGNLGRAVFQAKKRILLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQ PAKKRLNFGQTDTESVPDQPIGEPPAAPSGVSLTMASGGGAPVADNNEGADG VGSSSGNWHCDSQWLGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYF GYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNG VKTIANNTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDG SQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLI DQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQ NNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGR DNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGM VWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPT AFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAV NTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL
SEQ ID NO: 22	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCCAGCGCGCCC ACCTGAGGAGGCGGCGGGGTCCGCAGGCGTTCGCGGGACGAGGAGATCGGAGCCGG

Isoforma a que codifica STXBP1 (variante de transcrito 1) de humano	GAGACTCGCGCAGCGCCATGGCCCCCATTTGGCCTCAAAGCTGTTGTCTGGAGAGAA GATTATGCATGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGGAATGGAAGGTGCTG GTGGTGGATCAGTTAAGCATGAGGATGCTGTCTCCTGCTGCAAGATGACAGACA TCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCT CCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCT CTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCT TCTTCACTGACTCTTGTCCAGATGCCCTGTTTAATGAACTGGTAAAATCCCGAGC AGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAAATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAA TCCCAGGTCTATTCCCTTGACTCTGCTGACTCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCC ACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGAC CCTTTGTGCCACCCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAG GACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTG ATGATCCAACAATGGGGGAGGGCCCAGACAAGGCACGCTCCCAGCTCCTGATCCT GGATCGAGGCTTTGACCCCAGCTCCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCT ATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCG GCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTG GATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCAGAGGTGTCCAGGAAGTCACCCGGTCT CTGAAAGATTTTTCTTCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGC GGGACCTGTCCCAGATGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAA GTACTCCACCCACCTGCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACC GTAGACAAACTCTGCCGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGG GAGAGAAGATCAAGGACCCTATGCGAGCCATCGTCCCCATTCTGCTGGATGCCAA TGTCAGCACTTATGACAAAATCCGCATCATCCTTCTCTACATCTTTTTTGAAGAAT GGCATCACGGAGGAAAACCTGAACAACTGATCCAGCACGCCAGATAACCCCGG AGGATAGTGAGATCATCACCAACATGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGA TTCCACGCTGCGTCGCCGGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAG ACCTACCAGCTCTCACGGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTA TTGAGGACAAACTTGACACCAAACACTACCCTTATATCTCTACCCGTTCCCTCTGC CTCCTTCAGCACACCACCGCCGTCAGCGCCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACAAG GCCCCAGGCGAGTACCGCAGTGGCCCCCGCCTCATCTTTTCATCCTTGGGGGTG TGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAAGTG GGAGGTGCTGATAGGTTCTACTCACATTCTTACTCCCACCAAATTTCTCATGGAC CTGAGACACCCCGACTTCAGGGAGTCCTCTAGGGTATCTTTTGAGGATCAGGCTC CAACAATGGAGTGAGAGCCAAAGAAACAAAGATCCACACACATCCTCACCCACA GAACTGCTGGACACACTGAAGAACTGAATAAAACAGATGAAGAAATAAGCAGT TAAAAAATAAGTCGCCCTCCAAAACACGCCCCCATCCCACAGCGCTCCGCAGC TTCCACACACCGCCCGCCTCAGTTCCTTTGCGTCTGTTGCCTCCCCAGCCCTGCA CGCCCTGGCTGGCACTGTTGCCGCTGCATTCTCGTGTTTCACTGATGCCCTCTTCT TGTTTGAAACAAAAGAAAATAATGCATTGTGTTTTTTAAAAAGAGTATCTTATAC ATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCATGTGCAATTGGTGCACAGCAGGAGAAATTC TGGACTGTTAGGATGAATGGACGCCTTCTCCCCGTTATTTAAGATTTGTGACCTT GTACATAACCCTGGGTGACGTGCACATTGCTTGGGTATGGAACGGTAGAAATTTG GGTGTTTTTTAAACCTTGTTTGGGGTGTGTTCCCTGTCCTTGTTGAGAATCATAGAG ATGTCTGTGTTCTTGGAGTATTTTACACTGAGGACTAATCTGCTATCTTCATTCC AGTCCCTACCCCTCAGTGCCTGCTCTCATCAAATAACCTGGGAGGTGACAATCA GGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGGAACAGACCTCTTTGCCTTTCCCAGCGTCTC ATACCCCGGTAGTGCAGCTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGG CCAGCGTCCTCCTCCACAGCCTGTCACTGCCCCCTCCCCAGCCTGTGTCCACAGT
--	---

	GCTGTGATCCCCGAGGGAAGTCCTCCAGTCTAAGTCACAGTGCCCTGACAGGTGAG AAGCAAACCTCCCGCTGGAAGCCTCCATCTCTTTGGAAAAACAGTTAGTCTGGAGC CTGTGGCCCAGGCCCTTCTGTCCCCAGGCATCATCCCAACAGCTCATTTCCTTA GTCCGCCTTCGTTCAAGGGTCAGGAATGGACCAGAACAGATGGGTTCTGGAGGCC CCTGAACAGAGGGCTATGGCTGTGGAGAAGGTTCTTGGCCCGTTGGACTCACACA GACCCTGTACCCTCTCGGCAAGCATCTTCAGTCAGATTATCCTCAGTTTCAGATA CTTCATAATACCTTGTGTTGTGTGGGGTCATACATCATCGTGTGTTGTAAGAGAAG ATGGTCATTTTATTCTCTGTATAAACTTAGCTCTAAAGCAGAACTAAAGCAGC AAATGCAGGAAGGCTGTCTCGCCATCCTCAAGACTCAGCAGCTCTCATTCTCCAG TGGTGAGCACACCATTTGTGCTGCTGCTGTTGTGCTGAAATATAATAACAGTGGA AGTCACAAAAATGTCCCCTGCCAGCCCCCTCGCCGCCCTTGACCTCCTGCAGGC CATGTGTGTATTACTTGTCTAGTGATGTCCTCTCAAAGTGCTGTACGCGAGCTCG GCGCCACCTCCGCCTCCCTTTTCAGAGCCTGCTCCCCGCCCTCTCTGCTCGCTGCA TTGTGGTGTCTCTTCTCAAGGCTTTGAAATCTCCCCTTGCACTGAGATTAGTCG TCAGATCTCTCCCCGTCTCCCTCCCAACTTATACGACCTGATTTCTTAGGACGG AACCGCAGGCACCTGCGCCGGGCGTCTTACTCCCGCTGCTTGTCTGTCCCCCTCC CTCGGACCAAACAGTGCTCATGCTTCAGGACCTTGTTTGTGCAAGATGTTGGTTT CCCTTTCTCTGTTATTTATATAAAAAATAATTTATCAAAGGATATTTTAAAAAAG CTAGTCTGTCTTGAACTTGTTTACCTTAAAATTATCAGAATCTCAGTGTTTGAA AGTACTGAAGCACAAACATATATCATCTCTGTACCATTCTGTACTAAAGCACTTG AGTCTAATAAATAAAGAAATCAGCACCCCT
SEQ ID NO: 23 Isoforma b que codifica STXBP1 (variante de transcrito 2) de humano	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCCAGCGCGCCC ACCTGAGGAGGCGGCGGGGTCCGCAGGCGTGC GGGACGAGGAGATCGGAGCCGG GAGACTCGCGCAGCGCCATGGCCCCCATTTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGAGAGAA GATTATGCATGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGGAATGGAAGGTGCTG GTGGTGGATCAGTTAAGCATGAGGATGCTGTCTCCTGCTGCAAGATGACAGACA TCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCT CCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCT CTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCCGACTGCTAAATACCGGGGCTGCACACGTCT TCTTCACTGACTCTTGTCCAGATGCCCTGTTTAATGAACTGGTAAAATCCCGAGC AGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAAATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAA TCCCAGGTCTATTCTTGGACTCTGCTGACTCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCC ACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGAC CCTTTGTGCCACCCTGAAGGAGTACCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAG GACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTG ATGATCCAACAATGGGGGAGGGCCAGACAAGGCACGCTCCCAGCTCCTGATCCT GGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCT ATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCG GCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTG GATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCAGAGGTGTCCCAGGAAGTCACCCGGTCT CTGAAAGATTTTTCTTCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGC GGGACCTGTCCAGATGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAA GTACTCCACCCACCTGCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACC GTAGACAACTCTGCCGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGG GAGAGAAGATCAAGGACCCTATGCGAGCCATCGTCCCCATTCTGCTGGATGCCAA TGTCAGCACTTATGACAAAATCCGCATCATCCTTCTCTACATCTTTTTGAAGAAT GGCATCACGGAGGAAAACCTGAACAACTGATCCAGCACGCCAGATACCCCCGG

	AGGATAGTGAGATCATCACCAACATGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGA TTCCACGCTGCGTCGCCGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAG ACCTACCAGCTCTCACGGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTA TTGAGGACAAACTTGACACCAAACTACCCTTATATCTCTACCCGTTCTCTGCTC CTCCTTCAGCACCCACCGCCGTCAGCGCCCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACAAG GCCCCAGGCGAGTACCGCAGTGGCCCCCGCCTCATCATTTTCATCCTTGGGGGTG TGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGAAAAGTG GGAGGTGCTGATAGGATCCACACACATCCTCACCCACAGAACTGCTGGACACA CTGAAGAACTGAATAAAACAGATGAAGAAATAAGCAGTTAAAAAATAAGTCGC CCCTCCAAAACACGCCCCCATCCCACAGCGCTCCGCAGCTTCCCACCACCGCCCCG CCTCAGTTTCCTTTGCGTCTGTTGCCTCCCCAGCCCTGCACGCCCTGGCTGGCACT GTTGCCGCTGCATTCTCGTGTTTCACTGATGCCCTCTTCTTGTGTTGAAACAAAAGA AAATAATGCATTGTGTTTTTTAAAAAGAGTATCTTATACATGTATCCTAAAAAGA GAAGCTCATGTGCAATTGGTGCACAGCAGGAGAAATTTCTGGACTGTTAGGATGA ATGGACGCCTTCTCCCCGTTATTTAAGATTTGTGACCTTGTACATAACCCTGGGT GACGTGCACATTGCTTGGGTATGGAACGGTAGAAATTTGGGTGTTTTTAAAACCT TGTTTGGGGTGTTCCTGTCCTTGTGAGAATCATAGAGATGTCTGTGTTCTTGG AGTATTTACACTGAGGACTAATCTGCTATCTTCATTCCAGTCCCTACCCCTCAG TGCTGCTCTCATCCAAATAACCTGGGAGGTGACAATCAGGATATCTCAGGAGGT CCAAGGTGGAACAGACCTCTTTGCCTTTCCCAGCGTCTCATACCCCGGTAGTGC AGCTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGGCCAGCGTCTCTCTCCA CAGCCTGTCACTGCCCCCTCCCCAGCCTGTGTCCACAGTGCTGTGATCCCGAGGG AAGTCCCTCCAGTCTAAGTCACAGTGCCCTGACAGGTGAGAAGCAAACCTCCCGCTG GAAGCCTCCATCTCTTTGGAAAAACAGTTAGTCTGGAGCCTGTGGCCCAGGCCCT TCTGTCCCCAGGCATCATCCCAACAGCTCATTTTCCCTAGTCCGCCTTCGTTCAA GGGTGAGGAATGGACCAGAACAGATGGGTTCTGGAGGCCCTGAACAGAGGGCTA TGGCTGTGGAGAAGGTTCTTGGCCCGTTGGACTCACACAGACCCTGTACCCTCTC GGCAAGCATCTTCAGTCAGATTATCCTCAGTTTCAGATACTTCATAATACCTTGT GTTGTGTGGGGTCATACATCATCGTGTTTGTAAGAGAAGATGGTCATTTTATTCT CTGTATAAACTTAGCTCTAAAGCAGAACTAAAGCAGCAATGCAGGAAGGCTG TCTCGCCATCCTCAAGACTCAGCAGCTCTCATTTCTCCAGTGGTGAGCACACCATT TGTGCTGCTGCTGTTGTGCTGAAATATAATAACAGTGGAAGTCACAAAAATGTCC CCTGCCAGCCCCCTCGCCGCCCTTGACCTCCTGCAGGCCATGTGTGATTACTT GTCTAGTGATGTCCTCTCAAAGTGCTGTACGCGAGCTCGGCGCCACCTCCGCCTC CCTTTCAGAGCCTGCTCCCCGCCCTCTCTGCTCGCTGCATTGTGGTGTCTCTTC TCAAGGCTTTGAAATCTCCCCTTGCACTGAGATTAGTCGTCAGATCTCTCCCCGT CTCCCTCCCAACTTATACGACCTGATTTCTTAGGACGGAACCGCAGGCACCTGC GCCGGGCGTCTTACTCCCGCTGCTTGTTCTGTCCCCTCCCTCGGACCAAACAGTG CTCATGCTTCAGGACCTTGTTTGTGCAAGATGTTGGTTTCCCTTTCTCTGTTATT TATATAAAAATAATTTATCAAAAGGATATTTTAAAAAAGCTAGTCTGTCTTGAAA CTTGTTTACCTTAAAATTATCAGAATCTCAGTGTTTGAAAGTACTGAAGCACAAA CATATATCATCTCTGTACCATTCTGTACTAAAGCACTTGAGTCTAATAAATAAAG AAATCAGCACCCCT
SEQ ID NO: 24 Isoforma c que codifica	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCCAGCGCGCCC ACCTGAGGAGGCGGCGGGGTCCGCAGGCGTGCAGGGACGAGGAGATCGGAGCCGG GAGACTCGCGCAGCGCCATGGCCCCCATTTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGGAGAGAA GATTATGCATGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGGAATGGAAGGTGCTG GTGGTGGATCAGTTAAGCATGAGGATGCTGTCTCCTGCTGCAAGATGACAGACA

STXBP1 (variante de transcrito 3) de humano	TCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCT CCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCT CTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCT TCTTCACTGACTATGCCCTGTTTAATGAACTGGTAAAATCCCGAGCAGCCAAAGT CATCAAAACTCTGACGGAAATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCCAGGTC TATTCCCTGGACTCTGCTGACTCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCCACAAGGCTC AGATGAAGAATCCTATACTGGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCTTTGTGC CACCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAGGACAATGCC CTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTGATGATCCAA CAATGGGGGAGGGCCCAGACAAGGCACGCTCCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAGG CTTTGACCCAGCTCCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCTATGAGTTAT GATCTGCTGCCTATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCGGCATCGGGG AGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACT GCGCCACAAGCACATCGCAGAGGTGTCCCAGGAAGTCACCCGGTCTCTGAAAGAT TTTTCTTCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTGT CCCAGATGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCAC CCACCTGCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAAA CTCTGCCGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGA TCAAGGACCCTATGCGAGCCATCGTCCCCATTCTGCTGGATGCCAATGTCAGCAC TTATGACAAAATCCGCATCATCCTTCTCTACATCTTTTTGAAGAATGGCATCACG GAGGAAAACCTGAACAAACTGATCCAGCACGCCCAGATACCCCCGGAGGATAGTG AGATCATCACCAACATGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCT GCGTCGCCGGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAG CTCTCACGGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACA AACTTGACACCAAACACTACCCTTATATCTCTACCCGTTTCTCTGCCTCCTTCAG CACCACCGCCGTCAGCGCCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACAAGGCCCCAGGC GAGTACCGCAGTGGCCCCCGCCTCATATTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTGA ATGAGATGCGCTGCGCCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAAGTGGGAGGTGCT GATAGGATCCACACACATCCTCACCCACAGAACTGCTGGACACACTGAAGAAA CTGAATAAAACAGATGAAGAAATAAGCAGTTAAAAAAATAAGTCGCCCTCCAAA ACACGCCCCATCCCACAGCGCTCCGCAGCTTCCCACCACCGCCCGCCTCAGTTC CTTTGCGTCTGTTGCCTCCCCAGCCCTGCACGCCCTGGCTGGCACTGTTGCCGCT GCATTCTCGTGTTCAGTGATGCCCTCTTCTTGTGTTGAAACAAAAGAAAATAATGC ATTGTGTTTTTTTTAAAAAGAGTATCTTATACATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCAT GTGCAATTGGTGCACAGCAGGAGAAATTTCTGGACTGTTAGGATGAATGGACGCC TTCTCCCCGTTATTTAAGATTTGTGACCTTGTACATAACCCTGGGTGACGTGCAC ATTGCTTGGGTATGGAACGGTAGAAATTTGGGTGTTTTTAAAACCTTGTTTGGGG TTGTTCTGTCTTGTGAGAATCATAGAGATGTCTGTGTTCTTGGAGTATTTCA CACTGAGGACTAATCTGCTATCTTCATTCCAGTCCCTACCCCTCAGTGCCTGCTC TCATCCAAATAACCTGGGAGGTGACAATCAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGG AACAGACCTCTTTGCCTTTCCCAGCGTCTCATACCCCGGTAGTGCAGCTGTGGG TGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGGCCAGCGTCTCTCCACAGCCTGTC ACTGCCCCCTCCCCAGCCTGTGTCCACAGTGTGTGATCCCGAGGGAAGTCCCTCC AGTCTAAGTCACAGTGCCCTGACAGGTGAGAAGCAAACCTCCCGCTGGAAGCCTCC ATCTCTTTGGAAAAACAGTTAGTCTGGAGCCTGTGGCCAGGCCCTTCTGTCCCC AGGCATCATCCCAACAGCTCATTTTCCCTAGTCCGCCTTCGTTCAAGGGTCAGGA ATGGACCAGAACAGATGGGTTCTGGAGGCCCTGAACAGAGGGCTATGGCTGTGG AGAAGGTTCTTGGCCCGTTGGACTCACACAGACCCTGTACCTCTCGGCAAGCAT CTTCAGTCAGATTATCCTCAGTTTTCAGATACTTCATAATACCTTGTGTTGTGTGG GGTCATACATCATCGTGTTTGTAAAGAGAAGATGGTCATTTTATTCTCTGTATAAA ACTTAGCTCTAAAGCAGAACTAAAGCAGCAAATGCAGGAAGGCTGTCTCGCCAT CCTCAAGACTCAGCAGCTCTCATTCTCCAGTGGTGAGCACACCATTTGTGCTGCT GCTGTTGTCTGTAATATAATAACAGTGGAAGTCACAAAAATGTCCCCTGCCAG CCCCCTCGCCGCCCTTGACCTCCTGCAGGCCATGTGTGTATTACTTGTCTAGTGA TGTCTCTCAAAGTGCTGTACGCGAGCTCGGCGCCACCTCCGCCTCCCTTTTCA
--	--

	GCCTGCTCCCCGCCCTCTCTGCTCGCTGCATTGTGGTGTTCTCTTCTCAAGGCTT TGAAATCTCCCCTTGCACTGAGATTAGTCGTCAGATCTCTCCCGTCTCCCTCCC AACTTATACGACCTGATTTTCCTTAGGACGGAACCGCAGGCACCTGCGCCGGGCGT CTTACTCCCGCTGCTTGTCTGTCCCCTCCCTCGGACCAAACAGTGCTCATGCTT CAGGACCTTGTTTGTGCAAGATGTTGGTTTCCCTTTCTCTGTTATTTATATAAAA ATAATTTATCAAAAGGATATTTTAAAAAAGCTAGTCTGTCTTGAACTTGTTTAC CTTAAAATTATCAGAATCTCAGTGTTTGAAAGTACTGAAGCACAAACATATATCA TCTCTGTACCATTCTGTACTAAAGCACTTGAGTCTAATAAATAAAGAAATCAGCA CCCCCT
SEQ ID NO: 25 Isoforma d que codifica STXBP1 (variante de transcrito 4) de humano	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCCAGCGCGCCC ACCTGAGGAGGCGGCGGGGTCCGCAGGCGTTCGCGGGACGAGGAGATCGGAGCCGG GAGACTCGCGCAGCGCCATGGCCCCCATTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGAGAGAG AAAGAGGAAGACTACCTAGACATGTTGCTCCAGAGCAGAATTTCCAGCAGTAGAT TGAACCTTCGGAGGCCGAGTCCCAGCCCAGTGTAAGCTGAGATTATGCATGATGT GATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGGATCAGTTA AGCATGAGGATGCTGTCCTCCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCA TAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGC TGTGTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTT AAGGACCCGCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTCACTGACTCTT GTCCAGATGCCCTGTTTAATGAACTGGTAAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAA AACTCTGACGGAATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCCAGGTCTATTCC TTGGACTCTGCTGACTCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCCACAAGGCTCAGATGA AGAATCCTATACTGGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCTTTGTGCCACCCT GAAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAGGACAATGCCCTGCTG GCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTGATGATCCAACAATGG GGGAGGGCCCAGACAAGGCACGCTCCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGA CCCCAGCTCCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTG CTGCCTATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCGGCATCGGGGAGGCAC GGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACTGCGCCA CAAGCACATCGCAGAGGTGTCCAGGAAGTCACCCGGTCTCTGAAAGATTTTTTCT TCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTGTCCCAGA TGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACCCACCT GCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAAACTCTGC CGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGATCAAGG ACCCATATGCGAGCCATCGTCCCCATTCTGCTGGATGCCAATGTCAGCACTTATGA CAAAATCCGCATCATCCTTCTCTACATCTTTTTGAAGAATGGCATCACGGAGGAA AACCTGAACAACTGATCCAGCACGCCCAGATAACCCCGGAGGATAGTGAGATCA TCACCAACATGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTGC CCGGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCA CGGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAAACTTG ACACCAAACACTACCCTTATATCTCTACCCGTTCTCTGCCTCCTTCAGCACCAC CGCCGTCAGCGCCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACAAGGCCCCAGGCGAGTAC CGCAGTGGCCCCCGCCTCATCATTTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGA TGCGCTGCGCCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAGTGGGAGGTGCTGATAGG TTCTACTCACATTCTTACTCCCACCAAATTTCTCATGGACCTGAGACACCCCGAC TTCAGGGAGTCCTCTAGGGTATCTTTTGAGGATCAGGCTCCAACAATGGAGTGAG AGCCAAAGAAACAAAGATCCACACACATCCTCACCCACAGAACTGCTGGACAC ACTGAAGAACTGAATAAAACAGATGAAGAAATAAGCAGTTAAAAAATAAGTCG CCCCCTCCAAACACGCCCCCATCCACAGCGCTCCGCAGCTTCCCACCACCGCCC

	GCCTCAGTTCCTTTGCGTCTGTTGCCTCCCCAGCCCTGCACGCCCTGGCTGGCAC TGTTGCCGCTGCATTCTCGTGTTTCAGTGATGCCCTCTTCTGTTTGAAACAAAAG AAAATAATGCATTGTGTTTTTTAAAAAGAGTATCTTATACATGTATCCTAAAAAG AGAAGCTCATGTGCAATTGGTGCACAGCAGGAGAAATTTCTGGACTGTAGGATG AATGGACGCCTTCTCCCCGTTATTTAAGATTTGTGACCTTGTACATAACCCCTGGG TGACGTGCACATTGCTTGGGTATGGAACGGTAGAAATTTGGGTGTTTTTAAACC TTGTTTGGGGTTGTTCTGTCTTGTGAGAATCATAGAGATGTCTGTGTTCTTG GAGTATTTACACTGAGGACTAATCTGCTATCTTCATTCCAGTCCCTACCCCTCA GTGCCTGCTCTCATCCAAATAACCTGGGAGGTGACAATCAGGATATCTCAGGAGG TCCAAGGTGGAACAGACCTCTTTGCCTTTCCCAGCGTCTCATACCCCCGGTAGTG CAGCTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGGCCAGCGTCTCTCCTCC ACAGCCTGTCACTGCCCCCTCCCCAGCCTGTGTCCACAGTGCTGTGATCCCGAGG GAAGTCCTCCAGTCTAAGTCACAGTGCCCTGACAGGTGAGAAGCAAACCTCCCGCT GGAAGCCTCCATCTCTTTGGAAAAACAGTTAGTCTGGAGCCTGTGGCCCAGGCCC TTCTGTCCCCAGGCATCATCCCAACAGCTCATTTTCCCTAGTCCGCCTTCGTTCA AGGGTCAGGAATGGACCAGAACAGATGGGTTCTGGAGGCCCCCTGAACAGAGGGCT ATGGCTGTGGAGAAGGTTCTTGGCCCGTTGGACTCACACAGACCCTGTACCCTCT CGGCAAGCATCTTCAGTCAGATTATCCTCAGTTTCAGATACTTCATAATACCTTG TGTTGTGTGGGGTCATACATCATCGTGTTTGTAAGAGAAGATGGTCATTTTATTC TCTGTATAAACTTAGTCTCTAAAGCAGAACTAAAGCAGCAAATGCAGGAAGGCT GTCTCGCCATCCTCAAGACTCAGCAGCTCTCATTCTCCAGTGGTGAGCACACCAT TTGTGCTGCTGCTGTTGTCTGTGAAATATAATAACAGTGGAAGTCACAAAAATGTC CCCTGCCCAGCCCCCTCGCCGCCCTTGACCTCCTGCAGGCCATGTGTGTATTACT TGTCTAGTGATGTCTCTCAAAGTGCTGTACGCGAGCTCGGCGCCACCTCCGCCT CCCTTTCAGAGCCTGCTCCCCGCCCTCTCTGCTCGCTGCATTGTGGTGTTCTCTT CTCAAGGCTTTGAAATCTCCCCCTTGCACTGAGATTAGTCGTCAGATCTCTCCCCG TCTCCCTCCCACTTATACGACCTGATTTCTTAGGACGGAACCGCAGGCACCTG CGCCGGGCGTCTTACTCCCGCTGCTTGTTCTGTCCCCTCCCTCGGACCAAACAGT GCTCATGCTTCAGGACCTTGTTTGTGCAAGATGTTGGTTTCCCTTTCTCTGTTAT TTATATAAAAATAATTTATCAAAAGGATATTTTAAAAAAGCTAGTCTGTCTTGAA ACTTGTTTACCTTAAAATTATCAGAATCTCAGTGTTTGAAAGTACTGAAGCACAA ACATATATCATCTCTGTACCATTCTGTACTAAAGCACTTGAGTCTAATAAATAAA GAAATCAGCACCCCT
SEQ ID NO: 26 Isoforma d que codifica STXBP1 (variante de transcrito 5) de humano	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCCAGCGCGCCC ACCTGAGGAGGCGGCGGGGTCCGCAGGCGTCGCGGGACGAGGAGATCGGAGCCGG GAGACTCGCGCAGCGCCATGGCCCCCATTTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGAGAGAG ATATATACCTAGGAATGGAGTTGCTGGATCTCTATGTTTGGTTATTTGAGGAGCT GCCGGCCTGTTTTCCACATCAGCTGTACCATTTTACATTCTCACCAGCAGTGCAT GACGGTCCAGTGCCCTTTTTATCTTACTGCGCTTAAGGTGTAATTCCTTCTTTCTC AGACTGGACTGTAAATTCTTTGAGAGATTATGCATGATGTGATAAAGAAGGTCAA GAAGAAGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGGATCAGTTAAGCATGAGGATGCTG TCCTCCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGAAG ATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCAC TCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCCGACT GCTAAATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTCACTGACTCTTGTCCAGATGCCCTGT TTAATGAACTGGTAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAAAT CAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCCAGGTCTATTCTTGGACTCTGCTGAC

	TCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGG AGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCTTTGTGCCACCCTGAAGGAGTACCCGGC TGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAGGACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAG GACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTGATGATCCAACAATGGGGGAGGGCCCAGACA AGGCACGCTCCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGACCCCAGCTCCCCTGT GCTCCATGAATTGACTTTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAAAT GATGTATACAAGTATGAGACCAGCGGCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGC TCCTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCAGA GGTGTCCCAGGAAGTCACCCGGTCTCTGAAAGATTTTTCTTCTAGCAAGAGAATG AATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTGTCCCAGATGCTGAAGAAGATGC CTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACCCACCTGCACCTTGCTGAGGA CTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAAACTCTGCCGAGTGGAGCAGGAC CTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGATCAAGGACCCTATGCGAGCCA TCGTCCCCATTCTGCTGGATGCCAATGTCAGCACTTATGACAAAATCCGCATCAT CCTTCTCTACATCTTTTTGAAGAATGGCATCACGGAGGAAAACCTGAACAAACTG ATCCAGCACGCCCAGATACCCCCGGAGGATAGTGAGATCATCACCAACATGGCTC ACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTCGCCGGAGCAAGCCGGA GCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCACGGTGGACTCCGATT ATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAACTTGACACCAAACTACTACC CTTATATCTCTACCCGTTCTCTGCCTCCTTCAGCACCACCGCCGTCAGCGCCCCG CTATGGGCACTGGCATAAGAACAAGGCCCCAGGCGAGTACCGCAGTGGCCCCCGC CTCATCATTTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCCTACG AGGTGACCCAGGCCAACGGAAGTGGGAGGTGCTGATAGGTTCTACTCACATTCT TACTCCCACCAAATTTCTCATGGACCTGAGACACCCCGACTTCAGGGAGTCCTCT AGGGTATCTTTTGAGGATCAGGCTCCAACAATGGAGTGAGAGCCAAAGAAACAAA GATCCACACACATCCTCACCCACAGAACTGCTGGACACACTGAAGAACTGAA TAAAACAGATGAAGAAATAAGCAGTTAAAAAAATAAGTCGCCCTCCAAACACG CCCCCATCCACAGCGCTCCGCAGCTTCCACCACCGCCCGCCTCAGTTCCTTTG CGTCTGTTGCCTCCCCAGCCCTGCACGCCCTGGCTGGCACTGTTGCCGCTGCATT CTCGTGTTCAGTGATGCCCTCTTCTTGTGTTGAAACAAAAGAAAATAATGCATTGT GTTTTTTTAAAAAGAGTATCTTATACATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCATGTGCA ATTGGTGCACAGCAGGAGAAATTTCTGGACTGTTAGGATGAATGGACGCCTTCTC CCCGTTATTTAAGATTTGTGACCTTGTACATAACCCTGGGTGACGTGCACATTGC TTGGGTATGGAACGGTAGAAATTTGGGTGTTTTTAAACCTTGTTTGGGGTTGTT CCTGTCTTGTTGAGAATCATAGAGATGTCTGTGTTCTTGAGTATTTACACTG AGGACTAATCTGCTATCTTCATTCCAGTCCCTACCCCTCAGTGCCTGCTCTCATC CAAATAACCTGGGAGGTGACAATCAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGGAACAG ACCTCTTTGCCTTTCCCAGCGTCTCATACCCCGGTAGTGCAGCTGTGGGTGGAG GCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGGCCAGCGTCCTCCTCCACAGCCTGTCACTGC CCCCCCCCAGCCTGTGTCCACAGTGCTGTGATCCCGAGGGAAGTCTCCAGTCT AAGTCACAGTGCCCTGACAGGTGAGAAGCAAACCTCCGCTGGAAGCCTCCATCTC TTTGAAAAACAGTTAGTCTGGAGCCTGTGGCCAGGCCCTTCTGTCCCCAGGCA TCATCCCAACAGCTCATTTTCCCTAGTCCGCCTTCGTTCAAGGGTCAGGAATGGA CCAGAACAGATGGGTTCTGGAGGCCCTGAACAGAGGGCTATGGCTGTGGAGAAG GTTCTTGCCCCGTTGGACTCACACAGACCCTGTACCCTCTCGGCAAGCATCTTCA GTCAGATTATCCTCAGTTTCAGATACTTCATAATACCTTGTGTTGTGTGGGGTCA TACATCATCGTGTTTGTAAAGAGAAGATGGTCATTTTATTCTCTGTATAAACTTA GCTCTAAAGCAGAACTAAAGCAGCAAATGCAGGAAGGCTGTCTCGCCATCCTCA
--	--

	AGACTCAGCAGCTCTCATTCTCCAGTGGTGAGCACACCATTGTGTGCTGCTGCTGT TGTCGTGAAATATAATAACAGTGGAAGTCACAAAAATGTCCCCTGCCAGCCCCC TCGCCGCCCTTGACCTCCTGCAGGCCATGTGTGTATTACTTGTCTAGTGATGTCC TCTCAAAGTGCTGTACGCGAGCTCGGCGCCACCTCCGCCTCCCTTTCAGAGCCTG CTCCCCGCCCTCTCTGCTCGCTGCATTGTGGTGTCTCTTCTCAAGGCTTTGAAA TCTCCCCTTGCACTGAGATTAGTCGTCAGATCTCTCCCCGTCTCCCTCCCAACTT ATACGACCTGATTTCCCTTAGGACGGAACCGCAGGCACCTGCGCCGGGCGTCTTAC TCCCCGCTGCTTGTTCTGTCCCCCTCCCTCGGACCAAACAGTGCTCATGCTTCAGGA CCTTGTTTGTGCGAAGATGTTGGTTTCCCTTTCTCTGTTATTTATATAAAAAATAAT TTATCAAAAGGATATTTTAAAAAAGCTAGTCTGTCTTGAAACTTGTTTACCTTAA AATTATCAGAATCTCAGTGTTTGAAAGTACTGAAGCACAAACATATATCATCTCT GTACCATTCTGTACTAAAGCACTTGAGTCTAATAAATAAAGAAATCAGCACCCCT
SEQ ID NO: 27 Isoforma e que codifica STXBP1 (variante de transcrito 6) de humano	AGAAAGAGGAAAGACAGGACCCGAGCGGGGTTTCAGGCAGATGGAGCGCGTCGGT AGCCTGTGGCCAGGGATCCCAGCACCGACGGGAAAGAGGAGGCCTGGGTACCCTG CGCCCCGGGCGCGCGCGCGCGTGAGAGATTATGCATGATGTGATAAAGAAGGTC AAGAAGAAGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGGATCAGTTAAGCATGAGGATGC TGTCTCCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGA AGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATC ACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCCGA CTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTCACTGACTCTTGTCAGATGCCCT GTTTAAATGAACTGGTAAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAA ATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCCAGGTCTATTCTTGGACTCTGCTG ACTCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACT GGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCTTTGTGCCACCCTGAAGGAGTACCCG GCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAGGACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCC AGGACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTGATGATCCAACAATGGGGGAGGGCCAGA CAAGGCACGCTCCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCCT GTGCTCCATGAATTGACTTTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAA ATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCGGCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGT GCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCA GAGGTGTCCCAGGAAGTCACCCGGTCTCTGAAAAGATTTTCTTCTAGCAAGAGAA TGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTGTCCCAGATGCTGAAGAAGAT GCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACCCACCTGCACCTTGCTGAG GACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAACTCTGCCGAGTGGAGCAGG ACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGATCAAGGACCCTATGCGAGC CATCGTCCCCATTCTGCTGGATGCCAATGTCAGCACTTATGACAAAATCCGCATC ATCCTTCTCTACATCTTTTTGAAGAATGGCATCACGGAGGAAAACCTGAACAAAC TGATCCAGCACGCCCAGATACCCCCGGAGGATAGTGAGATCATCACCACATGGC TCACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTCGCCGGAGCAAGCCG GAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCACGGTGGACTCCGA TTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAACTTGACACCAAACACTA CCCTTATATCTCTACCCGTTCTCTGCCTCCTTCAGCACCAACCGCCGTCAGCGCC CGCTATGGGCACTGGCATAAGAACAAGCCCCAGGCGAGTACCGCAGTGGCCCCC GCCTCATCATTTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCCTA CGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAAGTGGGAGGTGCTGATAGGATCCACACACATC CTACCCCCACAGAACTGCTGGACACACTGAAGAACTGAATAAAACAGATGAAG AAATAAGCAGTTAAAAAATAAGTCGCCCTCCAAAACACGCCCCCATCCCACAG

	CGCTCCGCAGCTTCCCACCACCGCCCGCCTCAGTTCCTTTGCGTCTGTTGCCTCC CCAGCCCTGCACGCCCTGGCTGGCACTGTTGCCGCTGCATTCTCGTGTTCACTGA TGCCCTCTTCTTGTTTGAAACAAAAGAAAATAATGCATTGTGTTTTTTAAAAAGA GTATCTTATACATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCATGTGCAATTGGTGCACAGCA GGAGAAATTTCTGGACTGTTAGGATGAATGGACGCCTTCTCCCCGTTATTTAAGA TTTGTGACCTTGTACATAACCCTGGGTGACGTGCACATTGCTTGGGTATGGAACG GTAGAAATTTGGGTGTTTTTTAAACCTTGTTTGGGGTGTTCCTGTCCTTGTTGA GAATCATAGAGATGTCTGTGTTCTTGGAGTATTTACACTGAGGACTAATCTGCT ATCTTCATTCCAGTCCCTACCCCTCAGTGCCTGCTCTCATCAAATAACCTGGGA GGTGACAATCAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGGAACAGACCTCTTTGCCTTT CCCAGCGTCTCATACCCCCGGTAGTGCAGCTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGC ACGAAGTCAGGCCAGCGTCTCCTCCACAGCCTGTCACTGCCCCCTCCCCAGCCT GTGTCCACAGTGCTGTGATCCCGAGGGAAGTCTCCAGTCTAAGTCACAGTGCCC TGACAGGTGAGAAGCAAACCTCCCGCTGGAAGCCTCCATCTCTTTGGAAAAACAGT TAGTCTGGAGCCTGTGGCCCAGGCCCTTCTGTCCCCAGGCATCATCCCAACAGCT CATTTTCCCTAGTCCGCCTTCGTTCAAGGGTCAGGAATGGACCAGAACAGATGGG TTCTGGAGGCCCTGAACAGAGGGCTATGGCTGTGGAGAAGGTTCTTGGCCCGTT GGACTCACACAGACCCTGTACCCTCTCGGCAAGCATCTTCAGTCAGATTATCCTC AGTTTCAGATACTTCATAATACCTTGTGTTGTGTGGGGTCATACATCATCGTGTT TGTAAGAGAAGATGGTCATTTTATTCTCTGTATAAACTTAGCTCTAAAGCAGAA ACTAAAGCAGCAAATGCAGGAAGGCTGTCTCGCCATCCTCAAGACTCAGCAGCTC TCATTCTCCAGTGGTGAGCACACCATTTGTGCTGCTGCTGTTGTCGTGAAATATA ATAACAGTGGAAGTCACAAAAATGTCCCCTGCCAGCCCCCTCGCCGCCCTTGAC CTCCTGCAGGCCATGTGTGTATTACTTGTCTAGTGATGTCCTCTCAAAGTGCTGT ACGCGAGCTCGGCGCCACCTCCGCCTCCCTTTTCAAGAGCCTGCTCCCCGCCCTCTC TGCTCGCTGCATTGTGGTGTTCTCTTCTCAAGGCTTTGAAATCTCCCCTTGCACT GAGATTAGTCGTCAGATCTCTCCCGTCTCCCTCCCAACTTATACGACCTGATTT CCTTAGGACGGAACCGCAGGCACCTGCGCCGGGCGTCTTACTCCCGCTGCTTGTT CTGTCCCCTCCCTCGGACCAAACAGTGCTCATGCTTCAGGACCTTGTTTGTGAA GATGTTGGTTTTCCCTTTCTCTGTTATTTATATAAAAATAATTTATCAAAGGATA TTTTAAAAAAGCTAGTCTGTCTTGAACTTGTTTACCTTAAAATTATCAGAATCT CAGTGTGTTGAAAGTACTGAAGCACAAACATATATCATCTCTGTACCATTCTGTAC TAAAGCACTTGAGTCTAATAAATAAAGAAATCAGCACCCCT
SEQ ID NO: 28 Isoforma e que codifica STXBP1 (variante de transcrito 7) de humano	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCCC ACCTGAGGAGGCGGCGGGGTCCGCAGGCGTCGCGGGACGAGGAGATCGGAGCCGG GAGACTCGCGCAGCGCCATGGCCCCCATGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGGAGAGAG ATATATACCTAGGAATGGAGTTGCTGGATCTCTATGTTTGGTTATTTGAGGAGCT GCCGGCCTGTTTTCCACATCAGCTGTACCATTTTACATTCTCACCAGCAGTGCAT GACGGTCCAGTGCCCTTTTTATCTTACTGCGCTTAAGGTGTAATTCCTTCTTCTC AGACTGGACTGTAAATTCTTTGAGAGATTATGCATGATGTGATAAAGAAGGTCAA GAAGAAGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGGATCAGTTAAGCATGAGGATGCTG TCCTCCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGAAG ATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCAC TCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCCGACT GCTAAATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTCACTGACTCTTGTCCAGATGCCCTGT TTAATGAACTGGTAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAACCTCTGACGGAAAT CAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCCAGGTCTATTCTTGGACTCTGCTGAC

	TCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGG AGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCTTTGTGCCACCCTGAAGGAGTACCCGGC TGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAGGACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAG GACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTGATGATCCAACAATGGGGGAGGGCCCAGACA AGGCACGCTCCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGACCCCAGCTCCCCTGT GCTCCATGAATTGACTTTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAAAT GATGTATACAAGTATGAGACCAGCGGCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGC TCCTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCAGA GGTGTCCCAGGAAGTCACCCGGTCTCTGAAAGATTTTTCTTCTAGCAAGAGAATG AATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTGTCCCAGATGCTGAAGAAGATGC CTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACCCACCTGCACCTTGCTGAGGA CTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAAACTCTGCCGAGTGGAGCAGGAC CTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGATCAAGGACCCTATGCGAGCCA TCGTCCCCATTCTGCTGGATGCCAATGTCAGCACTTATGACAAAATCCGCATCAT CCTTCTCTACATCTTTTTGAAGAATGGCATCACGGAGGAAAACCTGAACAACTG ATCCAGCACGCCCAGATACCCCCGGAGGATAGTGAGATCATCACCAACATGGCTC ACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTCGCCGGAGCAAGCCGGA GCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCACGGTGGACTCCGATT ATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAACTTGACACCAAACTACTACC CTTATATCTCTACCCGTTCTCTGCCTCCTTCAGCACCACCGCCGTCAGCGCCCCG CTATGGGCACTGGCATAAGAACAAGGCCCCAGGCGAGTACCGCAGTGGCCCCCGC CTCATCATTTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCCTACG AGGTGACCCAGGCCAACGGAAGTGGGAGGTGCTGATAGGATCCACACACATCCT CACCCACAGAACTGCTGGACACACTGAAGAACTGAATAAAACAGATGAAGAA ATAAGCAGTTAAAAAAATAAGTCGCCCCCTCCAAAACACGCCCCCATCCCACAGCG CTCCGCAGCTTCCCACCACCGCCCGCCTCAGTTCCTTTGCGTCTGTTGCCTCCCC AGCCCTGCACGCCCTGGCTGGCACTGTTGCCGCTGCATTCTCGTGTTTCAGTGATG CCCTCTTCTTGTGTTGAAACAAAAGAAAATAATGCATTGTGTTTTTTAAAAAGAGT ATCTTATACATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCATGTGCAATTGGTGCACAGCAGG AGAAATTTCTGGACTGTTAGGATGAATGGACGCCTTCTCCCCGTTATTTAAGATT TGTGACCTTGTACATAACCCTGGGTGACGTGCACATTGCTTGGGTATGGAACGGT AGAAATTTGGGTGTTTTTAAACCTTGTGTTGGGGTGTTCCTGTCCTTGTTGAGA ATCATAGAGATGTCTGTGTTCTTGGAGTATTTACACTGAGGACTAATCTGCTAT CTTCATTCCAGTCCCTACCCCTCAGTGCCTGCTCTCATCAAATAACCTGGGAGG TGACAAATCAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGGAACAGACCTCTTGCCCTTCC CAGCGTCTCATACCCCCGGTAGTGACGCTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCAC GAAGTCAGGCCAGCGTCCTCCTCCACAGCCTGTCACTGCCCCCTCCCCAGCCTGT GTCCACAGTGCTGTGATCCCGAGGGAAGTCTCCAGTCTAAGTCACAGTGCCCTG ACAGGTGAGAAGCAAACCTCCCGCTGGAAGCCTCCATCTCTTTGAAAAACAGTTA GTCTGGAGCCTGTGGCCCAGGCCCTTCTGTCCCCAGGCATCATCCCAACAGCTCA TTTTCCCTAGTCCGCCTTCGTTCAAGGGTCAGGAATGGACCAGAACAGATGGGTT CTGGAGGCCCCCTGAACAGAGGGCTATGGCTGTGGAGAAGGTTCTTGGCCCGTTGG ACTCACACAGACCCTGTACCCTCTCGGCAAGCATCTTCAGTCAGATTATCCTCAG TTTCAGATACTTCATAATACCTTGTGTTGTGTGGGGTCATACATCATCGTGTGTTG TAAGAGAAGATGGTCATTTTATTCTCTGTATAAACTTAGCTCTAAAGCAGAAAC TAAAGCAGCAAATGCAGGAAGGCTGTCTCGCCATCCTCAAGACTCAGCAGCTCTC ATTCTCCAGTGGTGAGCACACCATTTGTGCTGCTGCTGTTGTGCTGAAATATAAT AACAGTGGAAGTCACAAAAATGTCCCCTGCCCAGCCCCCTCGCCGCCCTTGACCT
--	--

	CCTGCAGGCCATGTGTGTATTACTTGTCTAGTGATGTCCTCTCAAAGTGCTGTAC GCGAGCTCGGCGCCACCTCCGCCTCCCTTTTCAGAGCCTGCTCCCCGCCCTCTCTG CTCGCTGCATTGTGGTGTCTCTTCTCAAGGCTTTGAAATCTCCCCTTGCACTGA GATTAGTCGTCAGATCTCTCCCCGTCTCCCTCCCAACTTATACGACCTGATTTCC TTAGGACGGAACCGCAGGCACCTGCGCCGGGCGTCTTACTCCCGCTGCTTGTCTCT GTCCCCCTCCCTCGGACCAACAGTGCTCATGCTTCAGGACCTTGTTTGTCTGAAGA TGTTGGTTTCCCTTTCTCTGTTATTTATATAAAAAATAATTTATCAAAAGGATATT TTAAAAAAGCTAGTCTGTCTTGAACTTGTTTACCTTAAAATTATCAGAATCTCA GTGTTTGAAGTACTGAAGCACAAACATATATCATCTCTGTACCATTCTGTACTA AAGCACTTGAGTCTAATAAATAAAGAAATCAGCACCCCT
SEQ ID NO: 29 Isoforma e que codifica STXBP1 (variante de transcrito 8) de humano	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCCC ACCTGAGGAGGCGGCGGGGTCCGCAGGCGTGC GGGACGAGGAGATCGGAGCCGG GAGACTCGCGCAGCGCCATGGCCCCCATTTGGCCTCAAAGCTGTTGTCTGGAGAGAG AAAGAGGAAGACTACCTAGACATGTTGCTCCAGAGCAGAATTTCCAGCAGTAGAT TGAACCTTCGGAGGCCGAGTCCCAGCCCAGTGTAAGTCTGAGATTATGCATGATGT GATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGGATCAGTTA AGCATGAGGATGCTGTCCTCCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCA TAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGC TGTGTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTT AAGGACCCGCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTCACTGACTCTT GTCCAGATGCCCTGTTTAATGAACTGGTAAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAA AACTCTGACGGAATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCCAGGTCTATTCC TTGGACTCTGCTGACTCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCCACAAGGCTCAGATGA AGAATCCTATACTGGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCCTTTGTGCCACCCT GAAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAGGACAATGCCCTGCTG GCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTGATGATCCAACAATGG GGGAGGGCCCAGACAAGGCACGCTCCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGA CCCCAGCTCCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTG CTGCCTATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCGGCATCGGGGAGGCAC GGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACTGCGCCA CAAGCACATCGCAGAGGTGTCCAGGAAGTCACCCGGTCTCTGAAAGATTTTCT TCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTGTCCCAGA TGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACCCACCT GCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAAACTCTGC CGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGATCAAGG ACCCTATGCGAGCCATCGTCCCCATTTCTGCTGGATGCCAATGTCAGCACTTATGA CAAAATCCGCATCATCCTTCTCTACATCTTTTTGAAGAATGGCATCACGGAGGAA AACCTGAACAACTGATCCAGCACGCCCAGATAACCCCGGAGGATAGTGAGATCA TCACCAACATGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTCG CCGGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCA CGGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAAACTTG ACACCAAACACTACCCTTATATCTCTACCCGTTCTCTGCCTCCTTACGACACCAC CGCCGTCAGCGCCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACAAGGCCCCAGGCGAGTAC CGCAGTGGCCCCCGCCTCATCATTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGA TGCGCTGCGCCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAAGTGGGAGGTGCTGATAGG ATCCACACACATCCTCACCCACAGAACTGCTGGACACACTGAAGAACTGAAT AAAACAGATGAAGAAATAAGCAGTTAAAAAATAAGTCGCCCTCCAAAACACGC

	CCCCATCCCACAGCGCTCCGCAGCTTCCCACCACCGCCCGCCTCAGTTCCTTTGC GTCTGTTGCCTCCCCAGCCCTGCACGCCCTGGCTGGCACTGTTGCCGCTGCATTC TCGTGTTCAGTGATGCCCTCTTCTTGTGTTTGAACAAAAGAAAATAATGCATTGTG TTTTTTAAAAAGAGTATCTTATACATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCATGTGCAA TTGGTGCACAGCAGGAGAAATTTCTGGACTGTTAGGATGAATGGACGCCTTCTCC CCGTTATTTAAGATTTGTGACCTTGTACATAACCCTGGGTGACGTGCACATTGCT TGGGTATGGAACGGTAGAAATTTGGGTGTTTTTAAAACCTTGTTTGGGGTTGTTT CTGTCTTGTGAGAATCATAGAGATGTCTGTGTTCTTGGAGTATTTACACTGA GGACTAATCTGCTATCTTCATTCCAGTCCCTACCCCTCAGTGCCTGCTCTCATCC AAATAACCTGGGAGGTGACAATCAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGGAACAGA CCTCTTTGCCTTTCCCAGCGTCTCATAACCCCGGTAGTGCAGCTGTGGGTGGAGG CTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGGCCAGCGTCCCTCCACAGCCTGTCACTGCC CCCTCCCCAGCCTGTGTCCACAGTGCTGTGATCCCGAGGGAAGTCCTCCAGTCTA AGTCACAGTGCCCTGACAGGTGAGAAGCAAACCTCCCGCTGGAAGCCTCCATCTCT TTGGAAAAACAGTTAGTCTGGAGCCTGTGGCCCAGGCCCTTCTGTCCCCAGGCAT CATCCCAACAGCTCATTTTTCCCTAGTCCGCCTTCGTTCAAGGGTCAGGAATGGAC CAGAACAGATGGGTCTGGAGGCCCTGAACAGAGGGCTATGGCTGTGGAGAAGG TTCTTGGCCCGTTGGACTCACACAGACCCTGTACCCTCTCGGCAAGCATCTTCAG TCAGATTATCCTCAGTTTCAGATACTTCATAATACCTTGTGTTGTGTGGGGTCAT ACATCATCGTGTGTTGTAAGAGAAGATGGTCATTTTATTCTCTGTATAAACTTAG CTCTAAAGCAGAACTAAAGCAGCAAATGCAGGAAGGCTGTCTCGCCATCCTCAA GACTCAGCAGCTCTCATTCTCCAGTGGTGAGCACACCATTTGTGCTGCTGCTGTT GTCGTGAAATATAATAACAGTGGAAGTCACAAAAATGTCCCTGCCAGCCCCCT CGCCGCCCTTGACCTCCTGCAGGCCATGTGTGTATTACTTGTCTAGTGATGTCCT CTCAAAGTGCTGTACGCGAGCTCGGCGCCACCTCCGCCTCCCTTTCAGAGCCTGC TCCCCGCCCTCTCTGCTCGCTGCATTGTGGTGTCTCTTCTCAAGGCTTTGAAAT CTCCCTTGCACTGAGATTAGTCGTGAGATCTCTCCCGTCTCCCTCCCAACTTA TACGACCTGATTTCCCTTAGGACGGAACCGCAGGCACCTGCGCCGGGCGTCTTACT CCCGCTGCTTGTCTGTCCCCTCCCTCGGACCAAACAGTGCTCATGCTTCAGGAC CTTGTTGTGCGAAGATGTTGGTTTCCCTTTCTCTGTTATTTATATAAAAAATAATT TATCAAAAGGATATTTTTAAAAAAGCTAGTCTGTCTTGAACTTGTTTACCTTAAA ATTATCAGAATCTCAGTGTGTTGAAAGTACTGAAGCACAAACATATATCATCTCTG TACCATTCTGTACTAAAGCACTTGAGTCTAATAAATAAAGAAATCAGCACCCCT
SEQ ID NO: 30 Isoforma e que codifica STXBP1 (variante de transcrito 9) de humano	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCCC ACCTGAGGAGGCGGCGGGGTCCGCAGGCGTCGCGGGACGAGGAGATCGGAGCCGG GAGACTCGCGCAGCGCCATGGCCCCCATTTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGAGAGAG AAAGAGGAAGACTACCTAGACATGTTGCTCCAGAGCAGAATTTCCAGCAGTAGAT TGAACCTTCGGAGGCCGAGTCCCAGCCAGTGTAACCTGGTAAAGAAGATTATGC ATGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGGGA TCAGTTAAGCATGAGGATGCTGTCTCCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACC GAGGGCATAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCCAGCC TGGAGGCTGTGTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAG TGACTTTAAGGACCCGCCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTCACT GACTCTTGTCCAGATGCCCTGTTTAATGAACTGGTAAAATCCCAGCAGCCAAAG TCATCAAACTCTGACGGAATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCCAGGT CTATTCTTGGACTCTGCTGACTCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCCACAAGGCT CAGATGAAGAATCCTATACTGGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCTTTGTG

	CCACCCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAGGACAATGC CCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTGATGATCCA ACAATGGGGGAGGGCCCAGACAAGGCACGCTCCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAG GCTTTGACCCCAGCTCCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCTATGAGTTA TGATCTGCTGCCTATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCGGCATCGGG GAGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCAC TGCGCCACAAGCACATCGCAGAGGTGTCCCAGGAAGTCACCCGGTCTCTGAAAGA TTTTTCTTCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTG TCCCAGATGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCA CCCACCTGCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAA ACTCTGCCGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAG ATCAAGGACCCTATGCGAGCCATCGTCCCCATTCTGCTGGATGCCAATGTCAGCA CTTATGACAAAATCCGCATCATCCTTCTCTACATCTTTTTGAAGAATGGCATCAC GGAGGAAAACCTGAACAACTGATCCAGCACGCCCAGATACCCCCGGAGGATAGT GAGATCATCACCAACATGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGC TGCGTCGCCGGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCA GCTCTCACGGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGAC AAACTTGACACCAAACACTACCCTTATATCTCTACCCGTTCTCTGCCTCCTTCA GCACCACCGCCGTCAGCGCCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACAAGGCCCCAGG CGAGTACCGCAGTGGCCCCCGCCTCATCATTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTG AATGAGATGCGCTGCGCCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAAGTGGGAGGTGC TGATAGGATCCACACACATCCTCACCCACAGAACTGCTGGACACACTGAAGAA ACTGAATAAAACAGATGAAGAAATAAGCAGTTAAAAAAATAAGTCGCCCTCCAA AACACGCCCCCATCCACAGCGCTCCGCAGCTTCCCACCACCGCCCGCCTCAGTT CCTTTGCGTCTGTTGCCTCCCCAGCCCTGCACGCCCTGGCTGGCACTGTTGCCGC TGCATTCTCGTGTTCAAGTATGCCCTCTTCTGTTTGAACAAAAGAAAATAATG CATTGTGTTTTTTAAAAAGAGTATCTTATACATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCA TGTGCAATTGGTGACAGCAGGAGAAATTTCTGGACTGTTAGGATGAATGGACGC CTTCTCCCCGTTATTTAAGATTTGTGACCTTGTACATAACCCCTGGGTGACGTGCA CATTGCTTGGGTATGGAACGGTAGAAATTTGGGTGTTTTTAAACCTTGTTGGG GTTGTTCTGTCTTGTGAGAATCATAGAGATGTCTGTGTTCTTGGAGTATTTT ACACTGAGGACTAATCTGCTATCTTCATTCCAGTCCCTACCCCTCAGTGCCTGCT CTCATCCAAATAACCTGGGAGGTGACAATCAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTG GAACAGACCTCTTTGCCTTTCCAGCGTCTCATACCCCCGGTAGTGCAGCTGTGG GTGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGGCCAGCGTCTCTCCACAGCCTGT CACTGCCCCCTCCCCAGCCTGTGTCCACAGTGCTGTGATCCCCAGGGAAGTCCTC CAGTCTAAGTCACAGTGCCCTGACAGGTGAGAAGCAAACCTCCCGCTGGAAGCCTC CATCTCTTTGGAAAAACAGTTAGTCTGGAGCCTGTGGCCCAGGCCCTTCTGTCCC CAGGCATCATCCCAACAGCTCATTTTCCCTAGTCCGCCTTCGTTCAAGGGTCAGG AATGGACCAGAACAGATGGGTTCTGGAGGCCCTGAACAGAGGGCTATGGCTGTG GAGAAGGTTCTTGGCCCGTTGGACTCACACAGACCCTGTACCCTCTCGGCAAGCA TCTTCAGTCAGATTATCCTCAGTTTCAGATACTTCATAATACCTTGTGTTGTGTG GGGTCATACATCATCGTGTGTTGTAAGAGAAGATGGTCATTTTATTCTCTGTATAA AACTTAGCTCTAAAGCAGAACTAAAGCAGCAAATGCAGGAAGGCTGTCTCGCCA TCCTCAAGACTCAGCAGCTCTCATTCTCCAGTGGTGAGCACACCATTTGTGCTGC TGCTGTTGTGCTGAAATATAATAACAGTGGAAGTCACAAAAATGTCCCCTGCCCA GCCCCCTCGCCGCCCTTGACCTCCTGCAGGCCATGTGTGTATTACTTGTCTAGTG ATGTCCTCTCAAAGTGCTGTACGCGAGCTCGGCGCCACCTCCGCCTCCCTTTCAG
--	--

	AGCCTGCTCCCCGCCCTCTCTGCTCGCTGCATTGTGGTGTCTCTTCTCAAGGCT TTGAAATCTCCCCTTGCACTGAGATTAGTCGTCAGATCTCTCCCCGTCTCCCTCC CAACTTATACGACCTGATTTCCCTTAGGACGGAACCGCAGGCACCTGCGCCGGGCG TCTTACTCCCGCTGCTTGTCTGTCCCCCTCCCTCGGACCAAACAGTGCTCATGCT TCAGGACCTTGTTTGTCTGAAGATGTTGGTTTCCCTTTCTCTGTTATTTATATAAA AATAATTTATCAAAAAGGATATTTTAAAAAAGCTAGTCTGTCTTGAACTTGTTTA CCTTAAAATTATCAGAATCTCAGTGTGTTGAAAGTACTGAAGCACAAACATATATC ATCTCTGTACCATTCTGTACTAAAGCACTTGAGTCTAATAAAATAAGAAATCAGC ACCCCT
SEQ ID NO: 31 Isoforma f que codifica STXBP1 (variante de transcrito 10) de humano	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCCAGCGCGCCC ACCTGAGGAGGCGGCGGGGTCCGCAGGCGTTCGCGGGACGAGGAGATCGGAGCCGG GAGACTCGCGCAGCGCCATGGCCCCCATTTGGCCTCAAAGCTGTTGTCTGGAGAGAA GATTATGCATGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGGAATGGAAGGTGCTG GTGGTGGATCAGTTAAGCATGAGGATGCTGTCTCCTGCTGCAAGATGACAGACA TCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCT CCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCT CTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCT TCTTCACTGACTCTTGTCCAGATGCCCTGTTTAATGAACTGGTAAAATCCCGAGC AGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAAATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAA TCCCAGGTCTATTCCCTTGACTCTGTGACTCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCC ACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGAC CCTTTGTGCCACCCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAG GACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTG ATGATCCAACAATGGGGGAGGGCCAGACAAGGCACGCTCCCAGCTCCTGATCCT GGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCT ATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCG GCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTG GATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCAGAGGTGTCCAGGAAGTCAACCGGTCT CTGAAAGATTTTTCTTCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGC GGGACCTGTCCAGATGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAA GTACTCCACCCACCTGCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACC GTAGACAACTCTGCCGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGG GAGAGAAGATCAAGGACCCTATGCGAGCCATCGTCCCCATTCTGCTGGATGCCAA TGTCAGCACTTATGACAAAATCCGCATCATCCTTCTCTACATCTTTTTGAAGAAT GGCATCACGGAGGAAAACCTGAACAACTGATCCAGCACGCCAGATAACCCCGG AGGATAGTGAGATCATCACCAACATGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCGTCAACGA TTCCACGCTGCGTCGCCGAGCAAGCCGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAG ACCTACCAGCTCTCACGGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTA TTGAGGACAACTTGACACCAAACACTACCCTTATATCTCTACCCGTTCTCTGCT CTCCTTCAGCACCAACCGCCGTCAGCGCCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACAAG GCCCCAGGCGAGTACCGCAGTGGCCCCCGCCTCATATTTTCATCCTTGGGGGTG TGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAAGTG GGAGGTGCTGATAGGGAATGGCCCTTCAGAACCTTGGCTAGGTGACATCAGAAG CTGCTTGTGTATGTAAGGAA AATGGGGCTTCTCCTAAGGATCCACACACATCCTCACCCACAGAACTGCTGG ACACACTGAAGAACTGAATAAAACAGATGAAGAAATAAGCAGTTAAAAAATAA GTCGCCCCCTCCAAAACACGCCCCCATCCCACAGCGCTCCGCAGCTTCCCACCACC GCCCCGCTCAGTTCTTTGCGTCTGTTGCCTCCCCAGCCCTGCACGCCCTGGCTG GCACTGTTGCCGCTGCATTCTCGTGTTTCAGTGATGCCCTCTTCTTGTGTTGAAACA AAAGAAAATAATGCATTGTGTTTTTTAAAAAGAGTATCTTATACATGTATCCTAA AAAGAGAAGCTCATGTGCAATTGGTGCACAGCAGGAGAAATTTCTGGACTGTTAG GATGAATGGACGCCTTCTCCCCGTTATTTAAGATTTGTGACCTTGTACATAACCC

	TGGGTGACGTGCACATTGCTTGGGTATGGAACGGTAGAAATTTGGGTGTTTTTAA AACCTTGTTTTGGGGTTGTTTCTGTCTTGTGAGAATCATAGAGATGTCTGTGTT CTTGAGTATTTTACACTGAGGACTAATCTGCTATCTTCATTCCAGTCCCTACCC CTCAGTGCCTGCTCTCATCCAAATAACCTGGGAGGTGACAATCAGGATATCTCAG GAGGTCCAAGGTGGAACAGACCTCTTTGCCTTTCCCAGCGTCTCATACCCCCGGT AGTGCAGCTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGGCCAGCGTCTCTC CTCCACAGCCTGTCACTGCCCCCTCCCCAGCCTGTGTCCACAGTGCTGTGATCCC GAGGGAAGTCCTCCAGTCTAAGTCACAGTGCCCTGACAGGTGAGAAGCAAACCTCC CGCTGGAAGCCTCCATCTCTTTGGAAAAACAGTTAGTCTGGAGCCTGTGGCCCAG GCCCTTCTGTCCCCAGGCATCATCCCAACAGCTCATTTTCCCTAGTCCGCCCTTCG TTCAAGGGTCAGGAATGGACCAGAACAGATGGGTTCTGGAGGCCCTGAACAGAG GGCTATGGCTGTGGAGAAGGTTCTTGGCCCGTTGGACTCACACAGACCCTGTACC CTCTCGGCAAGCATCTTCAGTCAGATTATCCTCAGTTTCAGATACTTCATAATAC CTTGTGTTGTGTGGGGTCATACATCATCGTGTGTGTAAGAGAAGATGGTCATTTT ATTCTCTGTATAAACTTAGCTCTAAAGCAGAACTAAAGCAGCAAATGCAGGAA GGCTGTCTCGCCATCCTCAAGACTCAGCAGCTCTCATTCTCCAGTGGTGAGCACA CCATTTGTGCTGCTGCTGTTGTGCTGAAATATAATAACAGTGGAAGTCACAAAAA TGTCCTGTCGCCAGCCCCCTCGCCGCCCTTGACCTCCTGCAGGCCATGTGTGTAT TACTTGTCTAGTGATGTCCTCTCAAAGTGCTGTACGCGAGCTCGGCGCCACCTCC GCCTCCCTTTTCCAGAGCCTGCTCCCCGCCCTCTCTGCTCGCTGCATTGTGGTGTTT TCTTCTCAAGGCTTTGAAATCTCCCCTTGCACTGAGATTAGTCGTGATCTCTC CCCGTCTCCCTCCCAACTTATACGACCTGATTTCTTAGGACGGAACCGCAGGCA CCTGCGCCGGGCGTCTTACTCCCGCTGCTTGTGTTCTGTCCCCCTCCCTCGGACCAA CAGTGCTCATGCTTCAGGACCTTGTGTTGTGCGAAGATGTTGGTTTCCCTTTCTCTG TTATTTATATAAAAAATAATTTATCAAAAGGATATTTTAAAAAAGCTAGTCTGTCT TGAAACTTGTTTACCTTAAAATTATCAGAATCTCAGTGTTTGAAAGTACTGAAGC ACAAACATATATCATCTCTGTACCATTCTGTACTAAAGCACTTGAGTCTAATAAA TAAAGAAATCAGCACCCCT
SEQ ID NO: 32 Isoforma g que codifica STXBP1 (variante de transcrito 11) de humano	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCCC ACCTGAGGAGGCGGCGGGGTCCGCAGGCGTGC GGGACGAGGAGATCGGAGCCGG GAGACTCGCGCAGCGCCATGGCCCCCATTTGGCTCAAAGCTGTTGTGCGGAGAGAA GATTATGCATGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGGAATGGAAGGTGCTG GTGGTGGATCAGTTAAGCATGAGGATGCTGTCTCCTGCTGCAAGATGACAGACA TCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCT CCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCT CTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCT TCTTCACTGACTCTTGTCCAGATGCCCTGTTTAATGAACTGGTAAAATCCCGAGC AGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAAATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAA TCCCAGGTCTATTCTTGGACTCTGCTGACTCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCC ACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGAC CCTTTGTGCCACCCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAG GACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTG ATGATCCAACAATGGGGGAGGGCCAGACAAGGCACGCTCCCAGCTCCTGATCCT GGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCT ATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCG GCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTG GATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCAGAGGTGTCCCAGGAAGTCACCCGGTCT

	CTGAAAGATTTTTCTTCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGC GGGACCTGTCCAGATGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAAGAGCTCAGCAA GTACTCCACCCACCTGCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACC GTAGACAAACTCTGCCGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGG GAGAGAAGATCAAGGACCCTATGCGAGCCATCGTCCCCATTCTGCTGGATGCCAA TGTCAGCACTTATGACAAAATCCGCATCATCCTTCTCTACATCTTTTTGAAGAAT GGCATCACGGAGGAAAACCTGAACAAACTGATCCAGCACGCCCAGATACCCCCGG AGGATAGTGAGATCATCACCAACATGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGA TTCCACGCTGCGTCGCCGGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAG ACCTACCAGCTCTCACGGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTA TTGAGGACAACTTGACACCAAACACTACCCTTATATCTCTACCCGTTCCCTCTGC CTCCTTCAGCACCACCGCCGTCAGCGCCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACAAG GCCCCAGGCGAGTACCGCAGTGGCCCCCGCCTCATCATTTTTTCATCCTTGGGGGTG TGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAAGTG GGAGGTGCTGATAGTGCCCGTGGAGGCGGGAAGCTGAGCCCGGCTCCCAGGAAGC ACAGTGAGGGCTCAGCCATTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGA TGATGGTGATGATGATGATGCTGCTGCTGTTGACGATGAGTCCAAGCCAAGCCTG GGGAGAAAAGAATAAATAGTCTCATAAATTTAAAAAAGCCCAATGCTCATCAAGA AGAGAACAGATAAACTGTGTATTACCCCAATGGTGAGTTTAAAGCAGTTAAAAAT GCATGACACACAGTTGCATATGTCAACATGAATAGATCTCAGACACTTAACAATG AGTGAAAAGAGCACATTATGGGAGGACACAGACAGGATAGTGCATTTATATAAAG CTTCAATGTTGCAGGCTGAAAGAGTGAGGGTCGTGATCAACTCAGTATCCTGGAG GCTACATGGGTAAACAGCAAACCTGTTCTCATAAATGCAGAATGTTGGCAAACCTGA CAAACCTGCATCTGCCGCCCAGAAGGAATGCGGAGGGCAGCCACTCCCTAAGCGCA GTTTTCTTGATGATTAGGTACATCTGAAGCCTGTTAGCAATAATGTGAACCTGTGA TCAATTAAGCAGCTGACCAATCATTACCTCCTCTTCCCTGCTCTTTCTACCCAGT AAATACAAAGGGCTGTAGAAGCTCAGAGCTGCTGCTTTTGCTCAGTAGAAGCAGG GAGTCCCTCTTCTTCTTCCCCGACCCCTTCTTTTAAACAGTTTCTTTTAAAGTTT TCATTTCTGCGTTCATCCTCCTTCATTCAGTCCCGTAGTAACCGTGGCAAACCAC GGCACTTCAAACCTCATAAAAAGCACCACATATTGCTTATTTGGATACATATGT TGTAATGTGTGAAAACATGCATGGGAATGACAAATACCAAAGTCAGGATAGTGA CTGGCCATGGGGAAGGGATGGTTATTATTGTCGTCTTATATCTTCAATTCCAAAT GAGCCACGGGCTTAAAAGTACTTCATTGAATAAAAAAAAACCAACAATGTATTAA TGCAA
SEQ ID NO: 33 Isoforma h que codifica STXBP1 (variante de transcrito 12) de humano	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCCAGCGCGCCC ACCTGAGGAGGCGGCGGGGTCCGCAGGCGTCGCGGGACGAGGAGATCGGAGCCGG GAGACTCGCGCAGCGCCATGGCCCCCATTTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGAGAGAA GATTATGCATGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGGAATGGAAGGTGCTG GTGGTGGATCAGTTAAGCATGAGGATGCTGTCTCCTGCTGCAAGATGACAGACA TCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCT CCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCT CTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCCGACTGCTAAATACCGGGGCTGCACACGTCT TCTTCACTGACTCTTGTCCAGATGCCCTGTTTAATGAACTGGTAAATCCCGAGC AGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAAATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAA TCCCAGGTCTATTCTTGGACTCTGCTGACTCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCC ACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGAC CCTTTGTGCCACCCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAG

	GACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTG ATGATCCAACAATGGGGGAGGGCCCAGACAAGGCACGCTCCCAGCTCCTGATCCT GGATCGAGGCTTTGACCCCAGCTCCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCT ATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAAATGATGTATACAAGGAAGTCACCCGGT CTCTGAAAGATTTTTCTTCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCAT GCGGGACCTGTCCCAGATGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGC AAGTACTCCACCCACCTGCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCA CCGTAGACAAACTCTGCCGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGA GGGAGAGAAGATCAAGGACCCTATGCGAGCCATCGTCCCCATTCTGCTGGATGCC AATGTCAGCACTTATGACAAAATCCGCATCATCCTTCTCTACATCTTTTTGAAGA ATGGCATCACGGAGGAAAACCTGAACAACTGATCCAGCACGCCCAGATACCCCC GGAGGATAGTGAGATCATCACCAACATGGCTCACCTCGGCGTGGCCATCGTCACC GATTCCACGCTGCGTCGCCGGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGC AGACCTACCAGCTCTCACGGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACAC TATTGAGGACAAACTTGACACCAAACACTACCCCTATATCTCTACCCGTTCCCTCT GCCTCCTTCAGCACACCACCGCCGTCAGCGCCCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACA AGGCCCCAGGCGAGTACCGCAGTGGCCCCCGCCTCATCATTTTCATCCTTGGGGG TGTGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAAG TGGGAGGTGCTGATAGGTTCTACTCACATTCTTACTCCCACCAAATTTCTCATGG ACCTGAGACACCCCGACTTCAGGGAGTCTCTAGGGTATCTTTTGAGGATCAGGC TCCAACAATGGAGTGAGAGCCAAAGAAACAAAGATCCACACACATCCTCACCCCA CAGAACTGCTGGACACACTGAAGAACTGAATAAAACAGATGAAGAAATAAGCA GTTAAAAAATAAGTCGCCCCCTCCAAAACACGCCCCCATCCCACAGCGCTCCGCA GCTTCCCACCACCGCCCGCCTCAGTTCCTTTGCGTCTGTTGCCTCCCCAGCCCTG CACGCCCTGGCTGGCACTGTTGCCGCTGCATTCTCGTGTTCAGTGATGCCCTCTT CTTGTTTGAACAAAAGAAAATAATGCATTGTGTTTTTTAAAAAGAGTATCTTAT ACATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCATGTGCAATTGGTGCACAGCAGGAGAAATT TCTGGACTGTTAGGATGAATGGACGCCTTCTCCCCGTTATTTAAGATTTGTGACC TTGTACATAACCCTGGGTGACGTGCACATTGCTTGGGTATGGAACGGTAGAAATT TGGGTGTTTTTAAACCTTGTTTGGGGTTGTTCCCTGTCCTTGTTGAGAATCATAG AGATGTCTGTGTTCTTGGAGTATTTACACTGAGGACTAATCTGCTATCTTCATT CCAGTCCCTACCCCTCAGTGCCTGCTCTCATCAAATAACCTGGGAGGTGACAAT CAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGGAACAGACCTCTTTGCCTTTCCCAGCGTC TCATACCCCCGGTAGTGCAGCTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCA GGCCAGCGTCCTCCTCCACAGCCTGTCACTGCCCCCTCCCCAGCCTGTGTCCACA GTGCTGTGATCCCGAGGGAAGTCTCCAGTCTAAGTCACAGTGCCCTGACAGGTG AGAAGCAAACCTCCCGCTGGAAGCCTCCATCTCTTTGGAAAAACAGTTAGTCTGGA GCCTGTGGCCCAGGCCCTTCTGTCCCCAGGCATCATCCCAACAGCTCATTTTCCC TAGTCCGCCTTCGTTCAAGGGTCAGGAATGGACCAGAACAGATGGGTTCTGGAGG CCCCGTAACAGAGGGCTATGGCTGTGGAGAAGGTTCTTGGCCCGTTGGACTCACA CAGACCTGTACCCCTCTCGGCAAGCATCTTCAGTCAGATTATCCTCAGTTTCAGA TACTTCATAATACCTTGTGTTGTGTGGGGTCATACATCATCGTGTGTTGTAAGAGA AGATGGTCATTTTATTCTCTGTATAAACTTAGCTCTAAAGCAGAACTAAAGCA GCAAATGCAGGAAGGCTGTCTCGCCATCCTCAAGACTCAGCAGCTCTCATTCTCC AGTGGTGAGCACACCATTTGTGCTGCTGCTGTTGTGCGTGAAATATAATAACAGTG GAAGTCACAAAAATGTCCCCTGCCAGCCCCCTCGCCGCCCTTGACCTCCTGCAG GCCATGTGTGTATTACTTGTCTAGTGATGTCCCTCTCAAAGTGCTGTACGCGAGCT CGGCGCCACCTCCGCCTCCCTTTTCAGAGCCTGCTCCCCGCCCTCTCTGCTCGCTG
--	---

	CATTGTGGTGTTCCTCTTCTCAAGGCTTTGAAATCTCCCCTTGCACTGAGATTAGT CGTCAGATCTCTCCCCGTCTCCCTCCCAACTTATACGACCTGATTTTCCTTAGGAC GGAACCGCAGGCACCTGCGCCGGGCGTCTTACTCCCGCTGCTTGTTCTGTCCCCT CCCTCGGACCAAACAGTGCTCATGCTTCAGGACCTTGTTTGTCTGAAGATGTTGGT TTCCCTTTCTCTGTTATTTATATAAAAATAATTTATCAAAAGGATATTTTAAAAA AGCTAGTCTGTCTTGAACTTGTTTACCTTAAAATTATCAGAATCTCAGTGTTTG AAAGTACTGAAGCACAAACATATATCATCTCTGTACCATTCTGTACTAAAGCACT TGAGTCTAATAAATAAAGAAATCAGCACCCCT
SEQ ID NO: 34 Secuencia de ADN de AAVtt	TTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATAT TTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTCAGTGTTACAACCAATTAACC AATTCTGAACATTATCGCGAGCCCATTTATACCTGAATATGGCTCATAACACCCCC TTGTTTGCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCCATGCCGAACCTCA GAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTTGGGGACTCCCCATGCGAGAGTAG GGAAGTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTC GCCCCGGCTAATTAGGGGGTGTCGCCCTTCGCTGAAGTCCTGTATTAGAGGTCAC GTGAGTGTTTTGCGACATTTTGCGACACCATGTGGTCACGCTGGGTATTTAAGCC CGAGTGAGCACGCAGGGTCTCCATTTTGAAGCGGGAGGTTTGAACGCGCAGCCGC CATGCCGGGGTTTTACGAGATTGTGATTAAGGTCCCCAGCGACCTTGACGAGCAT CTGCCCCGGCATTCTTGACAGCTTTGTGAACTGGGTGGCCGAGAAGGAATGGGAGT TGCCGCCAGATTCTGACATGGATCTGAATCTGATTGAGCAGGCACCCCTGACCGT GGCCGAGAAGCTGCAGCGCGACTTTCTGACGGAATGGCGCCGTGTGAGTAAGGCC CCGGAGGCCCTTTTCTTTGTGCAATTTGAGAAGGGAGAGAGCTACTTCCACATGC ACGTGCTCGTGAAACCACCGGGGTGAAATCCATGGTTTTTGGGACGTTTCCTGAG TCAGATTGCGGAAAACTGATTCAGAGAATTTACCGCGGGATCGAGCCGACTTTG CCAAACTGGTTTCGCGGTCACAAAGACCAGAAATGGCGCCGGAGGCGGGAACAAGG TGGTGGATGAGTGCTACATCCCCAATTACTTGCTCCCCAAAACCCAGCCTGAGCT CCAGTGGGCGTGGACTAATATGGAACAGTATTTAAGCGCCTGTTTGAATCTCACG GAGCGTAAACGGTTGGTGGCGCAGCATCTGACGCACGTGTGCGAGACGCAGGAGC AGAACAAGAGAATCAGAATCCCAATTCTGATGCGCCGGTGATCAGATCAAAAAC TTCAGCCAGGTACATGGAGCTGGTCGGGTGGCTCGTGGACAAGGGGATTACCTCG GAGAAGCAGTGGATCCAGGAGGACCAGGCCTCATACATCTCCTTCAATGCGGCCT CCAACCTCGCGGTCCCAAATCAAGGCTGCCTTGGAACAATGCGGGAAAGATTATGAG CCTGACTAAAACCGCCCCCGACTACCTGGTGGGCCAGCAGCCCGTGGAGGACATT TCCAGCAATCGGATTTATAAAATTTTGGAACTAAACGGGTACGATCCCCAATATG CGGCTTCCGTCTTTCTGGGATGGGCCACGAAAAAGTTTCGGCAAGAGGAACACCAT CTGGCTGTTTGGGCCTGCAACTACCGGGAAGACCAACATCGCGGAGGCCATAGCC CACACTGTGCCCTTCTACGGGTGCGTAAACTGGACCAATGAGAAGTTTCCCTTCA ACGACTGTGTGACAAGATGGTGATCTGGTGGGAGGAGGGGAAGATGACCGCCAA GGTCGTGGAGTCGGCCAAAGCCATTCTCGGAGGAAGCAAGGTGCGCGTGGACCAG AAATGCAAGTCCTCGGCCAGATAGACCCGACTCCCGTGATCGTCACCTCCAACA CCAACATGTGCGCCGTGATTGACGGGAACTCAACGACCTTCGAACACCAGCAGCC GTTGCAAGACCGGATGTTCAAATTTGAACTCACCCGCCGTCTGGATCATGACTTT GGGAAGGTCACCAAGCAGGAAGTCAAAGACTTTTTCCGGTGGGCAAAGGATCACG TGGTTGAGGTGGAGCATGAATTCTACGTCAAAAAGGGTGGAGCCAAGAAAAGACC CGCCCCCAGTGACGCAGATATAAGTGAGCCCCAACGGGTGCGCGAGTCAGTTGCG CAGCCATCGACGTCAGACGCGGAAGCTTCGATCAACTACGCAGACAGGTACCAAA ACAAATGTTCTCGTCACGTGGGCATGAATCTGATGCTGTTTCCCTGCAGACAATG

	CGAGAGAATGAATCAGAATTCAAATATCTGCTTCACTCACGGACAGAAAGACTGT TTAGAGTGCTTTCCCGTGTGAGAAATCTCAACCCGTTTCTGTGCTCAAAAAGGCGT ATCAGAAACTGTGCTACATTTCATCATATCATGGGAAAGGTGCCAGACGCTTGCAC TGCCTGCGATCTGGTCAATGTGGATTTGGATGACTGCATCTTTGAACAATAAATG ATTTAAATCAGGTATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACACT CTCTCTGAAGGAATAAGACAGTGGTGGAGCTCAAACCTGGCCCACCACCACCAA AGCCCGCAGAGCGGCATAAGGACGACAGCAGGGGTCTTGTGCTTCCTGGGTACAA GTACCTCGGACCCCTTCAACGGACTCGACAAGGGAGAGCCGGTCAACGAGGCAGAC GCCGCGGCCCTCGAGCAGCAGAAAGCCTACGACCGGCAGCTCGACAGCGGAGACA ACCCGTACCTCAAGTACAACCACGCCGACGCGGAGTTTCAGGAGCGCCTTAAAGA AGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGACGAGCAGTCTTCCAGGCGAAAAAGAGG ATCCTTGAACCTCTGGGCCTGGTTGAGGAACCTGTTAAGACGGCTCCGGGAAAAA AGAGGCCGGTAGAGCACTCTCCTGCCGAGCCAGACTCCTCCTCGGGAACCGGAAA GAGCGGCCAGCAGCCTGCAAGAAAAAGATTGAATTTTGGTCAGACTGGAGACGCA GACTCAGTACCTGACCCCCAGCCTCTCGGACAGCCACCAGCAGCCCCCTCTGGTC TGGGAACTAATACGATGGCTAGCGGCAGTGGCGCACCAATGGCAGACAATAACGA GGGCGCCGACGAGTGGGTAAATTCCTCGGGAATTTGGCATTGCGATTCCACATGG ATGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTGGGCCCTGCCACCTACA ACAACCACCTCTACAAACAAATTTCCAGCCAATCAGGAGCCTCGAACGACAATCA CTACTTTGGCTACAGCACCCCTTGGGGGTATTTTGACTTCAACAGATTCCACTGC CACTTTTCACCACGTGACTGGCAAAGACTCATCAACAACAACTGGGGATTCCGAC CCAAGAGACTCAGCTTCAAGCTCTTTAACATTCAAGTCAAAGAGGTCACGCAGAA TGACGGTACGACGACGATTGCCAATAACCTTACCAGCACGGTTCAGGTGTTTACT GACTCGGAGTACCAGCTCCCGTACGTCCTCGGCTCGGCGCATCAAGGATGCCTCC CGCCGTTCACAGCAGACGTCTTCATGGTGCCACAGTATGGATACCTCACCCTGAA CAACGGGAGTCAGGCAGTAGGACGCTCTTCATTTTACTGCCTGGAGTACTTTCTCT TCTCAGATGCTGCGTACCGGAAACAACCTTTACCTTCAGCTACACTTTTGAGGACG TTCTTTTCCACAGCAGCTACGCTCACAGCCAGAGTCTGGACCGTCTCATGAATCC TCTCATCGACCAGTACCTGTATTACTTGAGCAGAACAAACACTCCAAGTGAACC ACCACGATGTCAAGGCTTCAGTTTTCTCAGGCCGAGCGAGTGACATTCCGGGACC AGTCTAGGAACTGGCTTCCTGGACCTGTTACCGCCAGCAGCGAGTATCAAAGAC AGCCGCGGATAACAACAACAGTGACTACTCGTGGACTGGAGCTACCAAGTACCAC CTCAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCGGGCCCCGCCATGGCAAGCCACAAGG ACGATGAAGAAAAGTACTTTCTCAGAGCGGGGTCTCATCTTTGGGAAGCAAGA CTCAGGCAAAACAAATGTGGACATTGAAAAGGTCATGATTACAGACGAAGAGGAA ATCAGGACAACCAATCCCGTGGCTACGGAGCAGTATGGTTCTGTATCTACCAACC TCCAGAGCGGCAACACCCAAGCAGCTACCAGCGATGTCAACACACAAGGCGTTCT TCCAGGCATGGTCTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTTCAGGGGCCCATCTGGGCA AAGATTCCACACACGGACGGACATTTTCACCCCCTCTCCCCCTCATGGGTGGATTCTG GACTTAAACACCCCTCCTCCACAGATTCTCATCAAGAACCCCCGGTACCTGCGAA TCCTTCGACCACCTTCAGTGCGGCAAAGTTTGCTTCCTTCATCACACAGTACTCC ACGGGACAGGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAAC GCTGGAATCCCGAAATTCAGTACACTTCCAATAACAAGTCTGTTAATGTGGA CTTTACTGTGGACACTAATGGCGTGTATTTCAGAGCCTCGCCCCATTGGCACCAGA TACCTGACTCGTAATCTGTAATTGCTTGTTAATCAATAAACCGTTTAATTCGTTT CAGTTGAACCTTTGGTCTCTGCGCGTCAAAGGGCGACACAAAATTTATTCTAAAT GCATAATAAATACTGATAACATCTTATAGTTTGTATTATATTTTGTATTATCGTT GACATGTATAATTTTCTAGAGCGGCCGAGATCTCAGCTGGATATCAAAAACCTG
--	---

	ATTTTCCCTTTATTATTTTCGAGATTTATTTTCTTAATTCTCTTTAACAACTAG AAATATTGTATATACAAAAATCATAAATAATAGATGAATAGTTTAATTATAGGT GTTTCATCAATCGAAAAAGCAACGTATCTTATTTAAAGTGCGTTGCTTTTTTCTCA TTTATAAGGTTAAATAATTCTCATATATCAAGCAAAGTGACAGGCGCCCTTAAAT ATTCTGACAAATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCATAAAAAAACCCGCCGAAGCG GGTTTTTACGTTATTTGCGGATTAACGATTACTCGTTATCAGAACCGCCAGGGG GCCCCGAGCTTAAGACTGGCCGTCGTTTTACAACACAGAAAGAGTTTGTAGAAACG CAAAAAGGCCATCCGTCAGGGGCCCTTCTGCTTAGTTTGATGCCTGGCAGTTCCCT ACTCTCGCCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTCGGCTG CGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAG GGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCG TAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCAT CACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGAT ACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCC GCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGAAGCGTGCGCTTTCTCAT AGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCT GTGTGCACGAACCCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCG TCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGT AACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGT GGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAA GCCAGTTACCTTCGGAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACC GCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAG GATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGA CGCGCGGTAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGCTTGCGCCGTCCCGTCA AGTCAGCGTAATGCTCTGCTTTTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGC AATTTATTTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTA ATGAAGGAGAAAACTACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCG GTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCTCGTCA AAAAAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGA ATGGCAAAAGTTTATGCATTTCTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACG CTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAACCGTTATTCATTCTGTGATTGCGCC TGAGCGAGGCGAAATACGCGATCGCTGTTAAAGGACAATTACAAACAGGAATCG AGTGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATC AGGATATTCTTCTAATACCTGGAACGCTGTTTTTCCGGGGATCGCAGTGGTGAGT AACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGTGGCATAA ATTCCGTGAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCT ACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAAGCGA TAGATTGTCGCACCTGATTGCCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATA AATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCCTCGACGTTTCCCGTTGAATATG GCTCATATTCTTCCTT
SEQ ID NO: 35	GAGCAGAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG
MYC TAG	
SEQ ID NO: 36	TACCCTTACGATGTACCGGATTACGCA
HA TAG	

SEQ ID NO: 37	GCGCTCCCTCCTCTCGGAGAGAGGGCTGTGGTAAAACCCGTCCGGAAATTGGCCG CCGCTGCCGCCACCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGAGCGGAGGAGGAGGAGGAGG CGAGGAGGAGAGACTGTGAGTGGGACCGCCAAGGCCGCGGGCGGGGACCCTTGCT GGGGGGCGGGTAGGGGCGGGACGTGGCGCGGGAGGGGCCCCGCGGGGTGCGGCGAC ACGGCTGGCGGTTGGCGTCCCTCCTCTCTACCCCTCCCCCTCCCTCTGCCGCCGGT GGTGGCTTTCTCCACTCGTCTCCCGCAATCGCGAGCGACGGTTCTCAGCGCGATC TCCCTGGAGCCACCTTCGATTGACGCCCTCCCGCTGCCCGCCCCATCTGTGCGCA TCCTAGGCCCCAGCTGTGCAAGCGCCCTTGTCGTCTGGGCTTCGCCAGTTGGGGC TGCGCGCGCTCCTGCCCTTCTTGGGGCTTTGGGGCTCGGCACTGTCGCGCGCCCCG CGGTCCCGGCCTCTCCCTGGATCGCGCTGTCCCTTCTCCCTCGCGCGCCCCCAC TCCCGTTACTTGCTCCCCCTCACACACACAGACTGGCGCGCGTGCGCAGTCCAT CTCCCGTTGGGAGAGTGCGCCACAAGGGCTCCTGAGCTCTTACCCCCATCTCTGG GTTTTGCTCCCTCCTCCTCCTCTCCCATTCGGTGACTTTTTGCCCCCACTGCAAG CGAGTCGGTCCATCAGCTCCATTCCCCACTTGGCAGGAACAAGTTGAGGGTTATT GTCCACCCACAAAAAGACTAGACATTTTGTTCCTAGGTCCCACAACATCATATA AAGAGTTGGTTGTAGTTCTCATCAGGAACCGTGGGCAAGGGACTGTGCGTTCCTC AGCACTCGAAGCTCTTCCGTGAGACCTTGCCCGCAGGGTGCTCTGGTTCTTTGGG GTTGCTGTGCTGTGGCTTCGGAATTTGAGCGTCTTCCCACCTCCCTCCCCCTCC TTCGCCAGCGTTCTGTCTACAAGAAAGAATAGGCAGGTGTCTTGGATATCGTAG TTGCTAATCGCCTATACACTGTTCTATTACACCTTTCTGCTAAGGATAGGGTTTT TGTTTTTGGTTTTTGGTTTTTGTTCCCACCTCCAGTTTTGGTTTTAGTTTTTGGTTTT GGCATTTAGGGTTTTTTGGGGGGGAGTAATATCTTGTGGTAAAGACCCATCTGAC CCAAGATACCTTTTTTCTCATACTGGAACCTAGGCAGCAGTTGCTATTTCCCTG AGTTAGCAATAGTTTTACAGTATTTTGAGGCCTTTTGTCCATAATTCTCACGGAA TCCCTCAGGGATCAGATTAGCTGCTGTTGGGATCAGGAAATTGGGTTACACCGCT GAAATCTCTTGCTGGGGCCCTTGTTTTGAATTGGAAAGTCAGGAGGCTGGAACGA AGGCTCACAAGTTAACAGTGCCAGCTGCTCTTCCAGAAGCCCTGGATTACAGTCCC ACCAATCCATCGCGGGTCACAACCATCTGTAACCTCAGTCCCAAGGGGTCCGAAG CCCTCTTCTGGCTTTGCCCTATTATTTTATTTATCTTATCTGTTTTTGTCTTGTC ATCTGGCAAGCCCAGGGGGCCATTGGGTGCAACTTATAAACTGACTTCTGTATCT TAAGAAGCCAACCATACAGTGCTTACATTCCAGAAAAAAATCTGCCACTTTAAC AGCACTAGAACTAGGGTTTAGAGAAGTATCATAAAGGTCAAATATCTTTGACCAA TATCACCAGCAACCTAAAGCTGTTAAGAAATCTTTGGGCCCCAGCTTGACCCAAG GATACAGTATCCTAGGGAAGTTACCAAAATCAGAGATAGTATGCAGCAGCCAGGG GTCTCATGTGTGGCACTCAAGCTCACCTATACTCACTACTGTGCAGACAGCTGTG TTCTCTGTAATACTTACATATTTGTTTAATACTTCAGGGAGGAAAAGTCAGAAGA CCAGGATCTCCAGGGCCTCA
SEQ ID NO: 38	GSTHILTPTKFLMDLRHPDFRESSRVSFEDQAPTME
Munc18-1a (aa 568-603)	
SEQ ID NO: 39	GSTHILTPQKLLDTLKKLNKTDEEISS
Munc18-1b (aa 568-594)	

SEQ ID NO: 40 Cebador directo	GATCCAGACATGATAAGATACATTG
SEQ ID NO: 41 Cebador inverso	GCAATAGCATCACAAATTTTCAC
SEQ ID NO: 42 Sonda 6- Fam/Zen/3'IB FQ	TGGACAAACCACAACCTAGAATGCA
SEQ ID NO: 43 Péptido de STXBP1	DNALLAQLIQDK
SEQ ID NO: 44 Péptido de STXBP1	YETSGIGEAR
SEQ ID NO: 45 Péptido de STXBP1	ISEQTYQLSR
SEQ ID NO: 46 Péptido de STXBP1 (isoforma larga específica)	WEVLIGSTHILTPK
SEQ ID NO: 47 Péptido de STXBP1 (isoforma corta específica).	WEVLIGSTHILTPQK

EJEMPLOS

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1: Diseño, generación y clonación de constructos

Los plásmidos utilizados en este estudio se construyeron mediante técnicas de ADN recombinantes. Los plásmidos de cadena principal Cis de AAV se sintetizaron *de novo* y contuvieron dos repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV, un casete de resistencia a kanamicina, un origen procariota de replicación, y una secuencia de poliadenilación de SV40. Las secuencias de ADN que codifican la variante de la isoforma X1 de STXBP1 de humano (que comprende la SEQ ID NO: 7) se sintetizaron *de novo* con sitios de restricción de clonación convenientes. Se sintetizaron los activadores individuales *de novo* con sitios de restricción convenientes. Se sintetizaron la hemaglutinina de la influenza humana (HA) o identificadores (*tags*, marcadores secuenciales) de Myc (de acuerdo con la SEQ ID NO: 33 y 32, respectivamente) como oligonucleótidos mediante Integrated DNA Technologies™ (Coralville, IA, EE.UU.) y se insertaron en la terminal amino o carboxi. Se sometieron a prueba siete diferentes activadores (MECP2-intrón, MECP2, hNSE, CamKII, hSyn, hSTXBP1p, CAG) para el gen STXBP1 de humano.

En la Figura 3 se muestra un dibujo esquemático de los constructos designados. En la Figura, “prom” significa activador; “INT” se refiere a intrón, “h” significa humano, SV40 se refiere a la secuencia de poliadenilación de SV40; “tag” representa un identificador de HA o Myc, ubicado ya sea en el extremo N o el C de un constructo.

Ejemplo 2: Evaluación de la expresión de STXBP1 con diferentes activadores

Cultivo celular

Las líneas celulares de AD-HEK293 derivadas de seres humanos (Agilent Technologies™, Santa Clara, CA, EE.UU.) y Neuro-2A (ATCC™, Manassas, VA) derivadas de ratones se hicieron pasar por DMEM + 10 % FBS + Penicilina/Estreptomicina 1 % (todo proveniente de Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, EE.UU.). Se diferenciaron las células Neuro-2a mediante suplementación de medios de crecimiento con 10 µM de ácido retinoico (MilliporeSigma™, Burlington, MA, EE.UU.) durante 72 horas como se describió con anterioridad (Tremblay, R.G. et al. 2010). Las células se transfectaron usando reactivo de transfección X-tremeGene 360 (Roche, Mannheim, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante. También se incluyó una transfección de control, con plásmido de control.

Inmunofluorescencia y microscopía

Los experimentos con imágenes se realizaron en un microscopio epifluorescente Zeiss Axio Observer 7 (Carl Zeiss AG™, Oberkochen, Alemania) equipado con una lente de objetivo de 40x, y una cámara monocromo con flash enfriado Hamamatsu Orca 4 (Hamamatsu Photonics KK™, Hamamatsu City, Japan). Las células transfectadas de AD-HEK293 y Neuro-2a se fijaron con paraformaldehído 4 % (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, 19440), y se aplicó tinción con el anti-STXBP1 policlonal de conejo (MilliporeSigma™, Burlington, MA, EE.UU.) a una relación de 1:500. Luego, se aplicó tinción a las células con conjugado de anticuerpos secundarios anti-conejo de asno a Alexa Fluor 488, a 1:1000, antes de obtener imágenes.

Figura 4: (A) Imágenes por inmunofluorescencia de células AD-HEK293 transfectadas con plásmidos de hSTXBP1 activadas por diversos activadores (CAG, MECP2 y MECP2-intrón) detectadas con anticuerpo anti-STXBP1. (B) La sección de magnificación muestra que STXBP1 se localiza hacia la membrana celular. AD = adherente, NC = control negativo.

Como se observa en la Figura 4, las células transfectadas demuestran diferente expresión de nivel de transgén de STXBP1 de humano con el accionar del activador ubicuo CAG o los activadores neuro-específicos (MECP2 y MECP2-intrón).

También se analizaron las células Neuro-2A transfectadas con los plásmidos de STXBP1 activados por activador ubicuo CAG y activadores neuro-específicos (MECP2 y MECP2-intrón), como se muestra en la Figura 5.

Figura 5: (A) Imágenes por inmunofluorescencia de células Neuro-2a transfectadas con plásmidos hSTXBP1 activados por varios activadores (CAG, MECP2 y MECP2-intrón) detectados con anticuerpo anti-STXBP1. (B) Magnificación que muestra que STXBP1 se localiza hacia la membrana celular. NC= control negativo.

La STXBP1 es una proteína sistólica que interactúa con un conjunto de proteínas asociadas a membranas. Las imágenes aumentadas de AD-HEK293 y Neuro-2A transfectadas muestran que STXBP1 expresada desde dichos plásmidos se localiza hacia la membrana plasmática (Figura 4(B)) o tanto a los procesos neuronales como a la membrana plasmática, como estaba previsto (Figura 5(B)).

Análisis Western blot

Las células AD-HEK 293 transfectadas se recolectaron en tampón 1X Cell Lysis (Cell Signaling Technology™, Danvers, MA, EE.UU.) con contenido de 1X Proteasa Halt y cóctel inhibidor de fosfatasa (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El tampón de muestra de dodecilsulfato de litio (LDS, *Lithium Dodecyl Sulfate*) suplementado con agente reductor al 10 % (ambos de Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, EE.UU.) se agregó a los lisados de proteína hasta una concentración final de 1X. Las muestras se resolvieron mediante electroforesis en gel de 1D SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate–PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio). Para cada muestra, se cargaron 30 µg de proteínas por carril. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Li-Cor Biosciences™, Lincoln, NE, EE.UU.) usando un aparato de transferencia semiseco (Bio-Rad Laboratories™, Hercules CA). Después de la transferencia, las membranas se incubaron en solución bloqueante (Li-Cor Biosciences™, Lincoln, NE, EE.UU.) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas, luego, se incubaron con solución bloqueante con contenido de anticuerpos primarios durante la noche, a 4 °C. Los siguientes anticuerpos primarios se utilizaron para este análisis: anti-STXBP1 policlonal de conejo (MilliporeSigma™, Burlington, MA, EE.UU.) a 1:1000, anti-STXBP1 policlonal de cabra (Abnova, Taoyuan, Taiwan) a 1:1000, anti-c-myc policlonal de conejo a [SIC] 1,1000 (MilliporeSigma™, Burlington, MA, EE.UU.), anti-HA monoclonal de conejo a 1:1000 (Cell Signalling Technology™, Danvers, MA, EE.UU.), anti-GAPDH monoclonal de ratón a 1:1000 (MilliporeSigma™, Burlington, MA, EE.UU.). Las membranas se lavaron tres veces con solución PBST (*Phosphate Buffered Saline con Tween*, solución salina tamponada con fosfato con Tween), se colocaron en solución bloqueante con contenido de anticuerpos secundarios anti-cabra IRDye 680RD de asno o anti-conejo IRDye 680RD de asno o anti-ratón 800CW de asno (1:15.000; Li-Cor Biosciences™, Lincoln, NE, EE.UU.), adecuados para la detección en el espectro de rojo lejano, durante 1 hora a temperatura ambiente. Las proteínas se visualizaron utilizando un dispositivo para imágenes de rojo lejano Li-Cor Odyssey CLx (Li-Cor Biosciences™, Lincoln, NE, EE.UU.).

La masa molecular del monómero STXBP1 en condiciones reductoras está prevista en aproximadamente 70 kDa y se detectó la proteína mediante el análisis *Western blot* como un monómero. La detección de GAPDH se utilizó como un control de carga. Dichos resultados muestran que se logró una fuerte expresión mediante diversos activadores en Neuro-2A diferenciadas (Figura 6).

Figura 6: Análisis *Western blot* de células Neuro-2a transfectadas con hSTXBP1 activadas por various activadores (CAG, MECP2 y MECP2-intrón). Se muestran dos réplicas técnicas

de cada condición. NC = control negativo, 1 = MECP2-intrón-hSTXBP1, 2 = CAG-hSTXBP1, 3 = MECP2-hSTXBP1.

Estos resultados también muestran que se logró una fuerte expresión tanto por constructos identificados en extremo N como en el C, activados por el activador CAG (Figura 7).

Figura 7: Análisis *Western blot* de (A) HSTXBP1 identificada por Myc, activada por activador CAG en células AD-HEK293 detectadas con anticuerpo anti-Myc y (B) HSTXBP1 identificada por HA, activada por activador hSYN en células AD-HEK293, células SH-SY5Y y células Neuro-2a detectadas con anticuerpo anti-HA. Se muestran dos réplicas técnicas de cada condición. (C) También se detectaron proteínas identificadas por epítipo en células AD-HEK293 usando anticuerpos anti-STXBP1. NC = control negativo, 1 = CAG-hSTXBP1-Myc, 2 = CAG-Myc-hSTXBP1, 3 = hSYN-HA-hSTXBP1. La banda de proteína de fondo en el carril NC en (A) se debe a la detección de Myc endógeno a través del anticuerpo anti-Myc.

Ejemplo 3: Identificación y análisis de variantes de origen natural y variantes patológicas

Se buscaron datos en la base de datos ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), un archivo público de acceso libre con informes de las relaciones entre fenotipos y variaciones humanas, con pruebas de respaldo, a fin de identificar las variantes génicas de STXBP1 usando el término de búsqueda “STXBP1” y “patogénico” o “probablemente patogénico”. La lista de variantes patológicas se complementó con las mutaciones publicadas en la bibliografía científica revisada por pares y se seleccionó manualmente de la búsqueda de PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando los términos de búsqueda “STXBP1, Munc18, variante, mutación” y fue definido como patológico por los autores para identificar las variantes patológicas de STXBP1 que no se informaban en ClinVar.

Luego, se identificaron las variantes patológicas y variantes probablemente patológicas que conllevaron a un cambio en la proteína STXBP1. (Tablas 5 y 6 respectivamente).

Tabla 5:

Variante patológicas (con referencia a la SEQ ID NO: 9)	
Cambio de proteínas	
R190Q	Y531*

C516*, C549*, C552*, C538*	M294fs, M316fs, M327fs, M330fs
D371fs, D385fs, D382fs, D349fs	N489fs, N511fs, N522fs, N525fs
D76H, D90H	R278P, R289P, R292P
E12fs	R464fs, R428fs, R450fs, R461fs
E221fs, E218fs, E207fs	R388*
E273*	R100fs
E384*, E406*, E417*, E420*	C354Y
E39*, E53*	S533fs
F115fs	P480L
G193V	H245D
K340fs, K307fs, K329fs, K343fs	A297T
P125Q, P136Q, P139Q	C354R
Q203*	C366fs
R551H	D224fs
S155fs, S141fs, S152fs	E299fs, E302fs, E266fs, E288fs
S89fs	E302*
W478*	E337fs, E304fs, E326fs, E340fs
Y198*, Y209*, Y212*	F237fs
Y198*, Y209*, Y212*	G222fs, G233fs, G236fs
Y266*	G507E, G540E, G543E, G529E
E27*	I393fs
E418*, E407*, E421*, E385*	I490fs
E527*, E516*, E530*, E494*	I50fs
E67*, E81*	I539del
G508C, G530C, G541C, G544C	K196*
G544D	K328fs, K364fs, K350fs, K361fs
H498fs, H462fs, H495fs, H484fs	K447fs, K458fs, K461fs, K425fs
I232fs	K98fs, K84fs

K111fs, K122fs, K125fs	L130fs
M252fs	L36*
M443R	L87fs, L73fs
Q336*	N134fs
S440*, S462*, S473*, S476*	P433fs
V84D	Q250*
Y330fs, Y344fs, Y308fs, Y341fs	Q338*
Y519*	Q359*
C180Y	Q558*
R122*	Q576fs
R292H	R157fs, R168fs, R171fs
R190W	R500fs, R522fs, R533fs, R536fs
R406C	R522fs, R500fs, R533fs, R536fs
R235Q	R551L
R235*	R551P
G544V	S292fs, S328fs, S314fs, S325fs
K461fs	S300fs
R551C	S42fs
R367*, R331*, R353*, R364*	T504fs
E470*	W28*
W522*	W563*
A214fs	Y140*
G319fs	Y344*, Y322*, Y355*, Y358*
G544fs	Y402fs
R292L	Y551*, Y554*, Y518*, Y540*
Y250*, Y261*, Y264*	S476*
K120fs	E283K
I88fs	H523fs

	Q229*
--	-------

Tabla 6:

Variantes probablemente patológicas (con referencia a la SEQ ID NO: 9)	
Cambio de proteínas	
G530R, G541R, G508R, G544R	S28Y, S42Y
H311D, H333D, H347D, H344D	Y75C
T129P	R406H, R370H, R403H, R392H
A102del, A88del	L426P
D248Y, D259Y, D262Y	E171G, E182G, E185G
H89P, H103P	E207fs, E218fs, E221fs
K194fs, K205fs, K208fs	L390R, L412R, L423R, L426R
L41Q, L27Q	A517S
P65L, P79L	E487D
Y145H	G236D
W274R, W285R, W288R	H293Y
R406L	I232N
R551S	I390V
P139L	I485N
R403G, R392G, R370G, R406G	L256P
T361I	L291P
K32E, K46E	P335S
E455del, E477del, E488del, E491del	T570A
P444S, P466S, P477S, P480S	N548D
Y358fs	T248I

Las variantes génicas de STXBP1 pueden incluir mutaciones de sentido alterado, que generan sustituciones de aminoácidos. Por ejemplo, R190Q en la Tabla 5 significa que la arginina en la posición 190 con referencia a la SEQ ID NO: 9, se reemplaza por glutamina.

También pueden producirse otras mutaciones. Un tipo de mutación que se identificó fue una mutación que abarca la inserción o delección de nucleótidos en los cuales el número de pares de bases cambiados no es divisible por tres, lo que lleva a la creación de una nueva secuencia de aminoácidos, un desplazamiento, indicado como “fs”. Si la mutación altera el marco de lectura correcto, toda la secuencia de ADN después de la mutación se leerá en forma incorrecta. Por ejemplo, E12fs en la Tabla 5 significa que el ácido glutámico en la posición 12 con referencia a la SEQ ID NO: 9 está cambiado debido a un desplazamiento de nucleótidos, lo que trae como resultado una proteína anormal con una secuencia de aminoácidos incorrecta.

Otro tipo de mutación observada en las variantes fue una mutación al nivel del ADN que elimina uno o más residuos de aminoácido en la proteína. Este tipo de mutación se indica como una delección (del) en las Tablas. Por ejemplo, I539del en la Tabla 5 significa que la isoleucina en la posición 539 con referencia a la SEQ ID NO: 9 está eliminada.

Otras mutaciones incluyeron la introducción de codón de parada, indicado mediante un asterisco (*), lo cual significa que la traducción de la proteína se detiene en esta posición, lo cual trae como resultado una proteína acortada o truncada. Por ejemplo, Y531* en la Tabla 5 significa que la mutación de parada se produce en el codón que normalmente codifica la tirosina 531 con referencia a la SEQ ID NO: 9, lo cual termina la traducción de la proteína en esta posición.

Las variantes de origen natural en la población sana se derivaron de gnomAD (The Genome Aggregation Database - <https://gnomad.broadinstitute.org/> v2.1.1), una información genética con contenido de conjunto de datos de control disponible públicamente de 60.146 muestras provenientes de individuos no relacionados, usando el término de búsqueda “STXBP1”. Las variantes obtenidas del conjunto de datos de control incluyen variantes de sentido alterado, que alteran codones de inicio (*start-lost*) y que crean un codón de parada (*stop-gained*) que resultan en un cambio de aminoácido. Las variantes de origen natural que traen como resultado un cambio en aminoácidos se informan en la Tabla 7.

Tabla 7:

Variantes de origen natural (con referencia a la SEQ ID NO: 9)				
Ala113Thr	Asp207Asn	Ile289Val	Pro67Leu	Val84Ile
Ala181Asp	Asp210Asn	Ile450Val	Pro94Leu	Val9Ile
Ala389Ser	Asp436Gly	Ile490Thr	Pro95Leu	Ala514dup

Ala430Thr	Asp49His	Leu169Met	Ser149Phe	Phe595LeufsTer30
Ala444Val	Asp586Asn	Leu414Ser	Ser328Thr	Val593TyrfTer32
Ala514Thr	Asp597Asn	Lys161Arg	Ser533Thr	
Ala527Thr	Gln154His	Lys25Asn	Ser70Thr	
Arg100Gln	Gln338Arg	Lys277Arg	Thr129Ile	
Arg100Trp	Glu12Asp	Lys314Asn	Thr401Ile	
Arg171His	Gly222Ser	Lys364Arg	Thr419Met	
Arg192Gln	Gly520Val	Met15Val	Thr455Met	
Arg305Gln	Gly529Ser	Met38Thr	Thr588Ile	
Arg305Trp	His16Arg	Met602Val	Tyr519Cys	
Arg457Cys	His357Pro	Phe91Leu	Val104Ile	
Arg505Cys	Ile168Val	Pro434Leu	Val448Met	
Arg583Ser	Ile271Val	Pro462Leu	Val451Ile	
Arg64Cys				
Asn398Ser				
Asn548Ser				

Ejemplo 4: Producción de partículas víricas

Producción de AAV

Los plásmidos trans que contienen las secuencias Rep de AAV2 seguidas por las secuencias de cápside AAV9.hu14 (en adelante denominada AAV9) o AAV-de tipo real (en adelante denominada AAVtt) (de acuerdo con la SEQ ID NO: 17 y 34, respectivamente) se sintetizaron *de novo* por medio de ATUM™ (Newark, CA, EE.UU.). El plásmido auxiliar de AAV pALD-X80 se adquirió a través de Aldevron, LLC™ (Fargo, ND, EE.UU.).

Los vectores de AAV no replicantes se produjeron mediante el método de triple transfección. Las células Expi293 (Thermo Fisher™, Waltham, MA, EE.UU.) se hicieron pasar cada entre 3 y 4 días, usando medios de expresión Expi293 (Thermo Fisher™, Waltham, MA, EE.UU.) en matraces de agitación, a una densidad de siembra de 3,0 E+05 – 5,5 E+05 células/mL. Las células Expi293 se cultivaron en un agitador orbital a 125 rpm en

una incubadora Eppendorf fijada a 37 °C, con CO₂ al 5 %. Para configurar los matraces de producción, un matraz de agitación de 125 mL se inoculó el día anterior a la transfección a 1,5 E+05 células/mL en un volumen total comprendido entre 30 y 66 mL por preparación vírica. La densidad celular viable se calculó usando un Vi-Cell Blu (Beckman Coulter™, Pasadena, CA, EE.UU.).

Como se indica a continuación, se creó un complejo de transfección para cada matraz para el matraz de producción, con un volumen de trabajo de 30 mL: 180 µL de polietilenimina (PEI) MAX a 1 mg/mL (Polysciences Inc™, Warrington, PA, EE.UU.) se diluyó en 1,5 mL de medio libre de suero OptiPRO (Thermo Fisher™, Waltham, MA, EE.UU.), se mezclaron en vórtex en la configuración 8, cuatro veces, y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. En forma separada, se diluyeron 20 µg de plásmido en Cis (como se indica en la Tabla 10), 30 µg del plásmido Rep/Cap (AAV9 o AAVtt), y 40 µg del plásmido auxiliar (pALD-X80) en 1,5 mL de medio libre de suero OptiPRO, se mezclaron en vórtex en la configuración 8, cuatro veces, y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Estas dos mezclas luego se combinaron, mezclaron en vórtex en la configuración 8, cuatro veces, y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego, los complejos de transfección se agregaron a los matraces de agitación con contenido de células. Las células se cultivaron con la mezcla de transfección a 37 °C, con agitación constante a 125 rpm.

Después de 96 horas, se incorporó en los matraces el tampón de lisis de AAV concentrado hasta una concentración final de 1X (150 mM NaCl, 120 mM Tris-HCl [pH = 8,0], 2 mM MgCl₂, 0,1 % Triton X-100), y Benzonasa (MilliporeSigma™, Burlington, MA, EE.UU.) hasta una concentración final de 50 U/mL. Esta mezcla se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación constante a 125 rpm. La mezcla se clarificó mediante centrifugación a 2880 x g durante 10 minutos a 23 °C. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta futuro análisis.

Determinación de la concentración del AAV

Se retiró cada muestra de -80 °C y se la dejó descongelar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Una vez que se descongeló la muestra, se mezcló en vórtex brevemente y se centrifugó durante un minuto. A continuación, se agregó 10 µL de muestra a un pocillo individual de una placa para PCR de 96 pocillos combinada con tampón 10X DNAsa, 50 U DNAsa, y agua libre de DNAsa (todos de Promega™, Madison, WI, EE.UU.) hasta un volumen total de 100 µL en cada pocillo.

Luego, la placa se transfirió a un ciclador térmico Bio-Rad™ (Hercules, CA, EE.UU.) y se calentó durante 30 minutos a 37 °C, luego, se enfrió a 4 °C. A continuación, las muestras se diluyeron en forma seriada, tal como se describe en la Tabla 8.

Table 8:

Paso de dilución	Factor de dilución intermedio	Muestra intermedia	Volumen intermedio (µL)	Volumen de diluyente (µL)	Volumen total (µL)	Factor de dilución total
D0	10	Muestras tratadas con DNAsa	100	NA	100	10
D1	1.5	D0	100	50	150	1,5 E+01
D2	10	D1	10	90	100	1,5 E+02
D3	10	D2	10	90	100	1,5 E+03
D4	10	D3	10	90	100	1,5 E+04
D5	10	D4	10	90	100	1,5 E+05

Se mezclaron (5) µL de diluciones D2, D3, D4, y D5 con 20 µL de una mezcla maestra de ddPCR (*digital droplet PCR*, PCR de gotículas digitales) compuesta por Supremix para sondas (No dUTP; Bio-Rad™, Hercules, CA, EE.UU.), cebador directo GATCCAGACATGATAAGATACATTG (SEQ ID NO: 40), cebador inverso GCAATAGCATCACAAATTTTCAC (SEQ ID NO: 41), sonda 6-Fam/Zen/3'IB FQ: TGGACAAACCACAACACTAGAATGCA (SEQ ID NO: 42), y agua libre de DNAsa hasta una concentración final de 1X. Este conjunto cebador tiene por diana la región poliA de SV40 del transgén. Cada muestra se pasó por duplicado en una placa de PCR de 96 pocillos.

La placa se selló por calor con una cobertura de aluminio, se mezcló en vórtex por pulso y se centrifugó a 1000 x g durante 5 minutos. La placa se colocó en el generador de gotículas Bio-Rad™ QX-200 y se generaron gotículas de conformidad con las instrucciones del fabricante.

Después de la generación de gotículas, la placa se selló por calor con una cubierta de aluminio y se colocó en un termociclador BioRad™ programado para hacer funcionar el ciclo descrito en la Tabla 9.

Tabla 9:

Configuración de amplificación de PCR (la nivelación completa se fija en 2,5 °C/segundos)			
Paso de ciclo	Temperatura	Duración	Número de ciclos
Activación de enzimas	95 °C	10 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	30 segundos	39
Hibridación/extensión	56 °C	1 minuto	
Desactivación de enzimas	98 °C	10 minutos	1
Mantenimiento	4 °C	Infinito	1

Una vez completado, la placa se colocó en un dispositivo de generación de gotículas Bio-Rad™ QX200 para la lectura de gotículas, de conformidad con la instrucción del fabricante. La concentración de genomas de vector (VG/mL) se cuantificó usando la siguiente fórmula: VG/ML: $X = [(aY)(1000/b)]D$, en donde:

X es VG/mL;

a es el volumen de la reacción de ddPCR (25 µl);

Y es la lectura de ddPCR en copias por microlitro;

b es el volumen de vector diluyente en la ddPCR (5 µL);

D es la dilución total aplicada al material de prueba.

Los criterios de aceptación del ensayo se definieron de la siguiente forma:

El porcentaje de CV entre las réplicas debe ser $\leq 15\%$; si $>15\%$ se debe omitir un periférico. Si se omite un periférico y el porcentaje de CV sigue siendo $> 15\%$, se debe repetir el ensayo. El porcentaje de CV de inter-dilución debe ser $\leq 20\%$ y las diluciones informadas deben ser al menos dos diluciones consecutivas. Si el porcentaje de CV es $> 20\%$, se puede omitir una dilución, siempre que las diluciones informadas sean al menos dos diluciones consecutivas. Si las diluciones promediadas todavía son $> 20\%$, debe repetirse el ensayo. Cada pocillo de reacción debe tener ≥ 1000 gotículas aceptadas. Si tiene <10.000 gotículas, se deberá excluir dicho pocillo del análisis.

Cuantificación de partículas víricas mediante ELISA de cápside de AAV

Se determinó la concentración de la partícula vírica mediante kits de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*, enzimoimmunoanálisis absorbente) (PROGEN™ Biotechnik GmbH, Heidelberg, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para AAV9, se utilizó el anticuerpo ADK9 monoclonal de ratón, tanto para los pasos de captura como de detección. Para AAVtt, se empleó anticuerpo monoclonal A20R, tanto para los pasos de

captura como de detección. Se realizaron los lavados en el tampón de ensayo (ASSB) 1X provisto entre cada paso, usando una lavadora de microplacas Molecular Devices™ (San Jose, CA, EE.UU.) AquaMax 4000. Las muestras se detectaron con un lector de placas Molecular Devices™ SpectraMax M5e. Las concentraciones de cápsides se interpolaron a partir de la curva estándar y se informan en la Tabla 10.

Tabla 10:

Plásmido en Cis	Cápside	Total de partículas víricas (VP)	Concentraciones de cápside (VP/mL)	Genomas víricos totales (VG)	Concentraciones de genoma vírico (VG/mL)
MECP2-hSTXBP1	AAV9	2,15 E+13	7,17 E+11	7,77 E+11	2,59 E+10
MECP2-intrón-hSTXBP1	AAV9	1,94 E+13	6,47 E+11	6,72 E+11	2,24 E+10
MECP2-hSTXBP1	AAVTT	6,72 E+12	2,24 E+11	6,06 E+11	2,02 E+10
MECP2-intrón-hSTXBP1	AAVTT	4,38 E+12	1,46 E+11	5,04 E+11	1,68 E+10

Las concentraciones de genomas víricos obtenidas por ddPCR y las concentraciones de cápsides obtenidas mediante ELISA indicaron que podrían producirse en forma exitosa tanto las partículas víricas AAV9 como AAVtt que comprenden un vector vírico con un ácido nucleico que comprende un activador ligado operativamente indicado con un transgén de STXBP1 de humano.

Ejemplo 5: expresión lentivírica de casetes de STXBP1 en neuronas glutamatérgicas diferenciadas NGN2

Se utilizó una línea de iPSC con edición génica (EBiSC, Ref: BIONI010-C-13) que porta un casete de expresión de NGN2 inducible por DOX para generar neuronas glutamatérgicas derivadas de iPSC. En este protocolo, el factor de transcripción de NGN2 se indujo mediante doxiciclina durante 9 días para cebar la diferenciación neuronal. En la división

(DIV) 21, las neuronas NGN2 derivadas de iPSC fueron transducidas con diluciones seriadas de vectores lentivíricos con expresión de STXBP1 de humano (SEQ ID NO: 9) bajo el control de activador hSyn o MECP2. Los vectores lentivíricos se produjeron en células HEK 293 usando un sistema de tercera generación, para mayor seguridad. En DIV28, el análisis inmunocitoquímico (ICC, *ImmunoCytoChemistry*) se realizó de la siguiente forma: se fijaron células con paraformaldehído 2 % y con tinción con un anticuerpo anti-STXBP1 policlonal primario de conejo (Sigma, Ref: HPA008209) en una dilución de 1:250. Luego, se realizó la tinción de células con un anticuerpo secundario anti-conejo de cabra conjugado con Alexa Fluor 568 en una dilución de 1:1000. Se obtuvieron imágenes con un instrumento InCell analyser 6000, con parámetros empíricos.

Las imágenes representativas de la ICC de las células transducidas con vectores lentivíricos con una multiplicidad de infecciones (MOI, *Multiplicity de Infection*) de 2 se muestran en la Figura 8.

Figura 8: Transducción de vector lentivírico de casetes de SXTBP1 en neuronas glutamatérgicas derivadas de iPSC. Las imágenes muestran ilustraciones representativas de la expresión de STXBP1 en condiciones con control (sin transducir) y después de la transducción de casetes bajo el control de los activadores hSyn o MECP2.

Las imágenes se tomaron usando el mismo entorno de adquisición para todas las condiciones. La comparación de la señal con las células no transducidas permitió la visualización de la sobreexpresión de STXBP1 en las neuronas NGN2 derivadas de iPSC humanas. La STXBP1 bajo el control del activador hSYN dio como resultado una mayor expresión que con el activador MECP2 (resumido en la Tabla 11)

Tabla 11: Expresión de niveles de STXBP1 después de la transducción lentivírica en neuronas glutamatérgicas derivadas de iPSC

Sin transducir	hSYN-STXBP1	MECP2-STXBP1
No detectadas	++	+

(+) niveles de expresión relativa observados por análisis de ICC

Ejemplo 6: Transducción de AAV-9 de casetes de STXBP1 en neuronas primarias de ratón

Los vectores AAV9 se produjeron como se describe en el Ejemplo 4 y las características de cápside se enumeran en la Tabla 12. La proteína STXBP1 expresada por transgén (SEQ ID NO: 9) fusionada a un identificador de HA en el extremo N, y la expresión fue activada por

los siguientes activadores: hSyn, MECP2 o MECP2-intrón. La proteína identificada por HA se utilizó para diferenciar la expresión de transgén de niveles de STXBP1 endógena. Se utilizó una cápside de AAV9 con un casete de CAG-eGFP-NLS como un vector de control para la eficacia de la transducción. Se investigó la expresión de STXBP1 en *vitro* mediante la transducción de neuronas corticales primarias de ratón. Las células no transducidas se utilizaron como un control para la expresión endógena de STXBP1.

Tabla 12: Propiedades del vector vírico AAV9

Casete	Cápside	Concentraciones de genomas víricos (vg/mL)	Endotoxina (<10 EU/mL)
hSyn-eGFP	AAV9	1,36E+13	Aprobado
MECP2-HA-hSTXBP1	AAV9	1,39 E+13	Aprobado
MECP2-intrón-HA-hSTXBP1	AAV9	1,35 E+13	Aprobado
hSyn-HA-hSTXBP1	AAV9	1,28 E+13	Aprobado
CAG-HA-hSTXBP1	AAV9	1,22 E+13	Aprobado
CAG-eGFP	AAV9	1,30 E+13	Aprobado

Las células neuronales corticales primarias de ratón se prepararon a partir de tejido cortical de embriones de ratón E17. Los tejidos corticales se disociaron usando papaína durante 30 minutos, a 37 °C, y se mantuvieron en cultivo en medio Neurobasal™ suplementado con suplemento B27 2 %, GlutaMAX-I 1 mM y penicilina-estreptomicina 50 unidades/ml. Cada semana se realizó el cambio de la mitad del medio.

En la división (DIV) 7, las células fueron transducidas con los diferentes constructos de AAV9 en dos diferentes MOI (2,5 E+6 GC/célula y 5,0 E+5 GC/célula). El nivel de transducción se confirmó al incluir el constructo hSyn-eGFP-NLS, que era alto en ambas condiciones de MOI. En DIV13, las células se fijaron con paraformaldehído 2 % y se sometieron a tinción con el anticuerpo anti-STXPB1 policlonal primario de conejo (1:250; Sigma, Ref: HPA008209) y mediante tinción identificadora anti-HA (1:100; Ref: 2367S, Cell Signaling Technology). Las imágenes se obtuvieron con un instrumento InCell analyser 6000, con parámetros empíricos.

Figura 9: Transducción de AAV9 de STXBP1 en neuronas primarias de ratón (A) Imágenes representativas de tinción de STXBP1 en neuronas corticales primarias de ratón transducidas con el vector vírico AAV9 a MOI 5,0 E+5 GC/célula. Las ilustraciones muestran condiciones con control (sin transducir) y la expresión de STXBP1 bajo el control de los activadores hSyn, MECP2 o MECP2-intrón (B) Comparación de la tinción de HA (derecha) con la tinción de STXBP1 (izquierda) en las mismas neuronas corticales primarias de ratón.

Con el uso de parámetros de adquisición similares se confirmó el aumento de la expresión de niveles de STXBP1 para los tres activadores en comparación con las células no transducidas (Figura 9A), lo que sugiere que la transducción de AAV9 puede lograr la expresión de STXBP1 sobre niveles de los valores iniciales (*baseline*). El activador MECP2 con intrón mostró los máximos niveles de expresión, seguido por hSyn y MECP2 (Tabla 13). Más aun, la colocalización de anti-HA con tinción de STXBP1 se observó para todos los vectores víricos estudiados; se muestra una imagen representativa en la Figura 9B (véanse las flechas).

Tabla 13: Transducción de AAV9 de SXTBP1 en neuronas primarias de ratón bajo el control de diferentes activadores neuronales

	Sin transducción	hSyn	MECP2	MECP2-intrón
STXBP1	-	++	+	+++

(+) niveles de expresión relativa observados mediante análisis de ICC

Para demostrar que la transducción de STXBP1 fue específica para células neuronales, se realizó la contra-tinción de cultivos primarios de ratón con un anticuerpo dirigido contra el marcador pan neuronal MAP2 (1:5000; Ref: ab5392; Abcam™, Cambridge, MA, EE.UU.).

Figura 10: Colocalización de sobreexpresión de STXBP1 en neuronas positivas MAP2. Las imágenes son ilustraciones representativas de tinción identificadora anti-HA (paneles izquierdos) y tinción anti-MAP2 (paneles derechos) en neuronas primarias de ratón después de la transducción de los vectores víricos AAV9. Las flechas indican ejemplos de células que expresan STXBP1 (HA) y el marcador neuronal (MAP2).

La Figura 10 muestra la colocalización del marcador neuronal (MAP2) con la tinción anti-HA en las neuronas corticales primarias de ratón transducidas (véanse las flechas). Estos datos confirmaron la expresión neuronal del producto de transgén de STXBP1 identificado por HA

bajo el control de los diferentes activadores neuronales. La intensidad de la señal de identificador de HA (Tabla 14) se correlaciona con los niveles de STXBP1 (Tabla 13), lo que sugiere que la concentración del activador se debe categorizar de la siguiente forma: MECP2-intrón > hSyn > MECP2.

Tabla 14: Expresión y localización de identificador de HA en neuronas primarias de ratón

	Sin transducción	hSyn-HA_STXBP1	MECP2-HA_STXBP1	MECP2-intrón-HA_STXBP
Señal de identificación por HA	-	++	+	+++
Colocalización		Sí	Sí	Sí

(+) niveles de expresión relativa observados por análisis de ICC

Ejemplo 7: expresión en vivo de STXBP1 después de transducción mediada por AAV-9 en cerebro de ratón

Se investigó la transducción mediada por AAV9 de STXBP1 en cerebro de ratón *in vivo*. Se administraron los vectores víricos por inyección bilateral intracerebroventricular (ICV) en el cerebro de ratones neonatales 1 día después de nacer (PND, *Post-Natal Day* 1). La metodología para las inyecciones neonatales ICV ha sido descrita previamente (Bertrand-Mathon, et al. 2015; Kim, et al. 2014; Hamodi, et al. 2020). Los animales inyectados se monitorearon durante un período de 5 semanas y la expresión y distribución de STXBP1 se analizó mediante lecturas bioquímicas en tejidos cerebrales.

Los experimentos incluyeron 5 grupos: Control (el vehículo inyectado), Virus de control (AAV9/hSyn_eGFP), AAV9/hSyn-HA-STXBP1, AAV9/MECP2-HA-STXBP1 y AAV9/MECP2-intrón-HA-STXBP1. Los vectores de AAV9 fueron los mismos que se describen en la Tabla 12. En la Tabla 15 se muestra un resumen de las condiciones experimentales *in vivo*.

Tabla 15: Resumen de condiciones experimentales *in vivo*

Edad en el tratamiento	Vía de administración	Casete del vector vírico	Concentración	Evaluación en vida	Evaluación terminal
	ICV inyectado bilateralmente	AAV9/hSyn-STXBP1	1,28 E+13 GC/mL	Signos clínicos,	Recolección de cerebro y

Día 1 posnatal PND1	2 ul/ hemisferio	AAV9/ MECP2- STXBP1	1,39 E+13 GC/mL	efectos adversos, peso corporal, mortalidad durante 5 semanas después de la inyección	órganos 5 semanas después de la inyección para el análisis bioquímico, histopatología, inmunohisto- química, expresión de transgén.
		AAV9/ MECP2- intrón STXBP1	1,35 E+13 GC/mL		
		AAV9/ hSyn_EGF P	1,36 E+13 GC/mL		
		Vehículo	(solución salina tamponada con fosfato estéril 1X)		

Las diferencias de peso corporal se monitorearon durante el curso del estudio (5 semanas después de la inyección) para evaluar la salud general de los ratones. No hubo diferencias significativas en los pesos corporales de los diferentes grupos de casetes en el momento de la última evaluación. Ninguno de los grupos mostró signos clínicos de toxicidad. En forma adicional, no hubo signos obvios de morbilidad o demoras en el desarrollo en los ratones salvajes adultos tratados con AAV9/hSyn-HA-STXBP1, AAV9/MECP2-HA-STXBP1 o AAV9/MECP2-intrón-HA-STXBP1. Los resultados de este experimento demostraron que los casetes del vector vírico exhibieron tolerancia a largo plazo y baja toxicidad y, por consiguiente, pueden emplearse con seguridad en un entorno preclínico.

A las 5 semanas después de la inyección, se recolectaron los tejidos cerebrales, se diseccionaron y se sometieron a análisis bioquímico. Se extrajo ADN/ARN de la corteza frontal izquierda e hipocampo, mientras que se extrajeron proteínas de la corteza frontal derecha coincidente. La extracción de ADN/ARN se realizó utilizando el kit AllPrep mini kit (Qiagen, 80204), siguiendo las instrucciones del fabricante, y con la inclusión de un tratamiento de DNasa para la extracción de ARN. Los tejidos se sometieron a lisis en tampón RLT Plus (suplementado con β -mercaptoetanol) usando el instrumento Precellys 24 (Bertin Technologies). La concentración de ADN se midió y ajustó a 20 ng/ μ L para todas las muestras. Luego, se sometieron 40 ng a qPCR (PCR cuantitativa) usando cebadores/sondas específicos para la señal de poliA de SV40 (presente en todos los casetes de AAV). Se analizó la cantidad de genomas de ratón usando el kit ValidPrime®

(tataabioenter, A106P25). La secuencia de ValidPrime® es específica para un *locus* sin transcripción de ADN_g (ADN genómico) que está presente en exactamente una copia por genoma normal haploide. Para ambas qPCR, los números de copias se determinaron usando el método de curva estándar. Se midió la concentración de ARN, y 500 ng de ARN se sometieron a RT (*Reverse Transcription*, transcripción inversa) usando el kit de alta capacidad denominado High Capacity cDNA RT Kit + inhibidor de RNasa (Applied Biosystems, número de catálogo 4374966). Los ADN_c obtenidos se sometieron a qPCR de señal de STXBP1 de humano, así como también dos genes de referencia para la normalización de los resultados obtenidos. Se determinó la expresión relativa y se ajustó al promedio del valor para todos los grupos. Para la extracción de la proteína, los tejidos se sometieron a lisis en tampón RIPA (Pierce, 89900) con inclusión de 2x cóctel de inhibidores de fosfatasa y proteasa concentrado (Cell Signaling Technology, número 5872) usando el instrumento Precellys 24 (Bertin Technologies) y un sistema de enfriamiento. Las muestras se dejaron sobre hielo durante 30 minutos, se centrifugaron y se recolectó el sobrenadante como el extracto de proteína final. Se determinó la concentración de proteína usando el kit denominado BCA Protein Assay Kit (Pierce, 23227) y se mezcló 7,5 µg de proteína con tampón Laemli y β-mercaptoetanol y se incubó a 90 °C durante 10 minutos antes de SDS-Page. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se analizaron mediante *Western blot*. Las membranas se incubaron en solución bloqueante (Ref: 927-50000; Li-Cor) durante 1 hora, a 4 °C, seguido por incubación con los anticuerpos anti-HA primarios monoclonales de ratón (1:2000; Ref: 2367S, Cell Signaling Technology) y anti GAPDH monoclonales de ratón (1:10000; Ref: G8795, Sigma). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron el anticuerpo secundario anti-ratón IgG de asno IRDye® 680RD (1:20000; Ref: 926-68072, Li-Cor) y el anticuerpo secundario anti-conejo IgG de asno IRDye® 800CW (1:20000; Ref: 926-32213, Li-Cor).

Figura 11: Análisis de las copias de ADN de vector vírico. Datos de qPCR de SV40pA (señal poliA de virus símico 40) normalizado mediante el número de genomas diploide de ratón del hipocampo izquierdo y corteza frontal izquierda de ratones de 5 semanas de edad después del tratamiento con AAV. Se muestran los datos para el vehículo y los cuatro grupos transducidos con AAV9 (virus de control, hSyn, MECP2, MECP2-intrón). Los resultados se muestran como la media ± SD.

Figura 12: Análisis de expresión de ARNm de STXBP1. Los datos se expresan como la expresión relativa normalizada con respecto a dos genes de referencia y graduados con respecto al promedio de la expresión de todos los grupos (media ± SD). El análisis se realizó a partir de tejidos del hipocampo izquierdo y corteza frontal izquierda de ratones de 5

semanas de edad después del tratamiento con AAV. Se muestran los datos para el vehículo y los cuatro grupos transducidos con AAV9 (virus de control, hSyn, MECP2, MECP2-intrón).

Figura 13: Análisis de proteínas mediante *Western blot*. (A) Un *Western blot* que muestra la expresión de identificador de HA para los diferentes casetes en la corteza (n = entre 5 y 7 por grupo). Se utilizó GAPDH como un control de carga. (B) Cuantificación de las intensidades de banda identificadas por HA, cada muestra está normalizada con respecto al control de carga de GAPDH. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD.

Tal como se ilustra en la Figura 11, se detectaron copias de ADN de vector significativas por genomas diploide de ratón en el extracto de ADN y demostraron una transducción eficaz de AAV9 entre los diferentes vectores víricos en el hipocampo y la corteza (N= entre 5 y 7 ratones). Se observó expresión de transgén de STXBP1 de humano (ARNm) para los tres casetes y una expresión mucho más fuerte se observó para el casete de MECP2-intrón en comparación con hSyn y MECP2 (Figura 12). El análisis *Western blot* de la proteína STXBP1 identificada por HA confirmó la expresión del producto de transgén específico en vivo en la corteza prefrontal para los tres casetes estudiados (Figuras 13 A y B). En conjunto, los datos permitieron una categorización general de la potencia del activador entre los vectores víricos. El MECP2-intrón mostró la máxima expresión de STXBP1 con identificador de HA seguido por hSyn y MECP2. Estos datos estuvieron en línea con los datos en *vitro* en neuronas corticales primarias de ratón, en donde se observó una categorización relativa similar.

Ejemplo 8: distribución en vivo de STXBP1 después de transducción mediada por AAV-9 en cerebro de ratón

La distribución de la expresión de STXBP1 en el cerebro de ratón después de la inyección en PND1 de los vectores AAV9 se investigó por medio de inmunohistoquímica (IHC). Los tejidos de cerebro de ratón se recolectaron de los mismos animales, tal como se describe en el Ejemplo 7.

Las secciones congeladas fijadas (espesor de 12 μ m; secciones sagitales) se generaron con un crióstato-microtomo y se almacenaron a -80 °C. La totalidad de los siguientes pasos de incubación se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Las criosecciones se enjuagaron 10 min en PBS 1X, y luego se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios: GFP (1:2000; número 1020, Aves), HA (identificador de hemaglutinina; 1:5000; número 3724, Cell Signaling), NeuN (1:2000; ab177487, Abcam), GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*, proteína fibrilar ácida glial) (1:2000; número 173006, Synaptic Systems), parvalbúmina

(1:500; PV235, Swant), sola o en combinación para doble inmunofluorescencia, diluida en PBS con contenido de Triton 0,3 % X-100, durante la noche, en una cámara humidificadora. Después de la incubación, las secciones se lavaron 3 veces con PBS, luego se incubaron durante 1 hora con los anticuerpos secundarios conjugados por Alexa adecuados (anti-ratón, conejo, pollo, conjugados a Alexa 488 o 647). Luego, se sometieron a contratinción con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (dilución de 300 nM) para rotular los núcleos celulares, y se lavaron 3 veces con PBS. Las secciones se montaron finalmente con medios de montaje antidecoloración con Prolong Gold (Life Technologies) y se aplicó en un cubreobjetos. Se obtuvieron imágenes digitales de secciones con tinción usando un escáner de portaobjetos AxioScan Z1 con un objetivo de 20x (Zeiss) y se analizaron usando el software Zen 3 (Zeiss).

Para estudiar la distribución de células transducidas en el cerebro que expresa un transgén a partir de un activador neuronal, las crías de ratón se inyectaron por vía icv con AAV9/hSyn_eGFP en PND1. Los animales se sacrificaron 1 mes después de la administración del virus se realizó la disección de los cerebros y se procesaron para inmunohistoquímica para rotular GFP.

Figura 14: Distribución de células infectadas en el cerebro de ratón usando indicador GFP proveniente del virus AAV9-hSyn-NLS-eGFP-NLS. (A) Sección sagital de un cerebro de ratón que recibió AAV9-hSyn1-NLS-GFP-NLS icv, sacrificado 1 mes después, y con inmunotinción para marcaje de GFP. La distribución de células que expresan GFP se observó desde el frente hacia la parte posterior del cerebro completo. Algunas de las regiones cerebrales principales que muestran células GFP+ están resaltadas con rectángulos. (B-G): Alta magnificación de las regiones cerebrales que muestran células GFP+ de A (las flechas apuntan a las células GFP+).

Figura 15: Caracterización de células que expresan indicador GFP de virus AAV9-hSyn-NLS-eGFP-NLS. Se llevó a cabo un marcaje inmunofluorescente doble para detectar (A-F) GFP y el marcador neuronal NeuN, (G-L) GFP y el marcador astrocítico GFAP. Las células positivas tanto para (A-C) GFP como para (D-F) NeuN se observaron en todas las regiones cerebrales (las flechas apuntan hacia las células con doble marcaje) lo que indica que las neuronas fueron transducidas y que expresaron el gen indicador. Por el contrario, no se detectó señal de GFP (G-I) en las células GFAP positivas (J-L), lo que sugiere que los astrocitos no estaban expresando el gen indicador.

Figura 16: Distribución de la proteína de fusión HA-STXBP1 desde diferentes activadores en el cerebro de ratón después de la administración de AAV9. Se estudió la distribución de

STXBP1 identificada por HA sobreexpresada desde diferentes activadores en el cerebro de ratones por medio de inmunohistoquímica contra HA. Como condiciones de control negativas, no se observó señal de HA en animales que recibieron (A) PBS solamente o (B) virus AAV9-hSyn-GFP icv. (C) Como un control negativo (NC) de la selectividad de anticuerpos, no se observó señal de HA en animales que recibieron virus AAV9-MECP2-intrón-HA-STXBP1, pero para los cuales el anticuerpo de HA primario fue omitido durante el procedimiento de inmunohistoquímica. (D-F) La señal de HA se observó en el cerebro de todos los animales inyectados con los diferentes virus que expresan HA-STXBP1 a partir de los diferentes activadores. Los 3 activadores conllevaron a un patrón común de distribución de HA a través del cerebro completo, con una expresión principal observada en la corteza cerebral, hipocampo, cuerpo estriado, bulbos olfativos, sustancia negra y fascículos en el prosencéfalo. Las notables diferencias en distribución de HA entre los activadores se informan en la Tabla 16.

Figura 17: Distribución de la proteína de fusión HA-STXBP1 desde diferentes activadores en el hipocampo después de la administración de AAV9. Se llevó a cabo un marcaje inmunofluorescente doble para detectar (A-C) HA y (D-F) el marcador neuronal NeuN que se utilizó para identificar las diferentes partes del hipocampo. Los 3 activadores conllevaron a la expresión de HA en todo el hipocampo, principalmente en las proyecciones neuronales (Mol, LMol, Or, MF) y, ocasionalmente, en pericariones. (F) El activador MECP2-intrón conllevó a una cobertura mejor y mayor intensidad de la señal de HA en comparación con los otros 2 activadores (D, E). LMol: capa molecular lacunosa del hipocampo; MF: fibras musgosas; Mol: capa molecular del giro dentado; Or: capa de *oriens*.

Figura 18: Caracterización de células que expresan HA-STXBP1 desde diferentes activadores. Se llevó a cabo el marcaje inmunofluorescente doble para detectar (A-C) HA y (D-F) el marcador neuronal NeuN. Los pericariones que fueron positivos para HA, y observados ocasionalmente en diferentes regiones del cerebro, también fueron positivos para NeuN, lo que respalda que los 3 activadores activan la expresión del transgén en las neuronas. Las flechas apuntan hacia las células con doble marcaje.

En general, las células GFP+ se observaron en la totalidad del cerebro desde los bulbos olfativos hasta el cerebelo y tronco encefálico (Figura 14A-G). Un alto número de células infectadas se observaron marcadamente en el cuerpo estriado (Figura 14D), corteza cerebral (Figura 14B), hipocampo (Figura 14C) y bulbos olfativos. Un doble inmunomarcaje confirmó que la GFP se expresó exclusivamente por neuronas, tal como se confirmó por

colocalización entre GFP y el marcador neuronal NeuN (Figura 15A-F) y la ausencia de colocalización de GFP con el marcador astrocítico GFAP (Figura 15G-L).

La distribución tisular de STXBP1 identificada por HA sobreexpresada a partir de 3 diferentes activadores neuronales, hSyn, MECP2 o MECP2-intrón, se analizó al realizar inmunohistoquímica contra HA (Figura 16). Los 3 activadores conllevaron a un patrón común de la expresión de HA a través del cerebro completo (Figura 16D-F); las principales regiones donde se observó la tinción de HA fueron la corteza cerebral, el hipocampo, el cuerpo estriado, los bulbos olfativos, la sustancia negra y los fascículos en el prosencéfalo. La señal de HA fue detectada en el cerebelo solamente en los animales inyectados con el AAV, con inclusión del activador MECP2-intrón (Figura 16F); el activador MECP2-intrón proporcionó la mejor cobertura de señal e intensidad de señal de HA a través del cerebro en comparación con los otros 2 activadores (Figura 16D-F). Se brinda un resumen de la distribución cerebral de HA de los 3 activadores en la Tabla 16. De importancia, en términos del objetivo de desarrollar un abordaje terapéutico para tratar la epilepsia, se observó la expresión de HA en el hipocampo y la corteza, una región clave que participa en la epileptogénesis y la generación de las crisis. La totalidad de los activadores conllevó a la expresión de HA en todo el hipocampo (Figura 17), principalmente, en las proyecciones neuronales (fibras musgosas, capa molecular del giro dentado, las capas *lacunosum molecular* y la capa de oriens del hipocampo). La máxima intensidad de señal de HA se observó con el activador MECP2-intrón; el activador hSYN generó un nivel intermedio de expresión mientras que el activador MECP2 proporcionó la intensidad de señal de mayor debilidad (Figura 17A-C). A nivel celular, la expresión de HA se observó principalmente en el neuropilo y, ocasionalmente, en pericariones (Figura 18A-C) que están colocalizados con el marcador neuronal NeuN (Figura 18D-F), lo que sugiere que los 3 activadores accionan la expresión en las neuronas.

Tabla 16: Resumen de la distribución de producto de transgén de HA-STXBP1 para diferentes activadores en el cerebro de ratón

	hSyn	MECP2	MECP2-intrón
Corteza	x	x	x
Hipocampo	x	x	x
Bulbos olfativos	x	x	x
Cuerpo estriado	x	x	x

Tálamo	x	x	x
Fascículos (prosencéfalo)	x	x	x
Hipotálamo	x		x
Mesencéfalo	x		x
Sustancia negra	x	x	x
Núcleos cerebelosos			x
Bulbo raquídeo			x

(x) expresión de tejido confirmada

Ejemplo 9: Caracterización de expresión de variante de STXBP1 en cerebro de ratón WT y heterocigótico STXBP1 (HET)

Para evaluar la expresión de las variantes de la proteína STXBP1 en condiciones normales y patológicas, se generó un modelo transgénico de ratón que recapitula la epilepsia humana mediada por haploinsuficiencia de STXBP1, y esto fue descrito por Kovacevic et al. (2018). Este modelo de ratón se adquirió a través de una licencia de la Universidad de Amsterdam. El modelo heterocigótico se generó con ratones floxeados *Stxbp1* (*Stxbp1fl/fl*) con sitios loxP en cualquiera de los lados del exón 2 en el gen *Stxbp1*. *Stxbp1fl/fl* se cruzaron a Ella-Cre (Jax: 003724) para deletar el exón 2 *Stxbp1* en la línea germinal que da como resultado ratones mutantes *Stxbp1fl/-* nulos. El alelo floxeado se ha cruzado a C57BL/6J lo que genera la cepa de ratón *Stxbp1+/-* KO HET. La delección del exón 2 en un alelo conlleva a un codón finalizador prematuro y da como resultado expresión de una proteína truncada y no funcional STXBP1. Todos los experimentos in vivo fueron realizados en cumplimiento de las guías emitidas por el Comité de ética para experimentación con animales de conformidad con la legislación de Bélgica. Los experimentos se llevaron a cabo en concordancia con las directivas del Consejo del Comité europeo (2010/63/EU). Se hizo todo lo posible por minimizar el sufrimiento de los animales.

Para evaluar la expresión de las variantes de STXBP1 endógenas, se sacrificaron ratones macho heterocigóticos KO (*STXBP1+/-*) y salvajes (WT) de la misma camada (*STXBP1+/+*) entre 5 y 7 semanas después de nacer y se recolectaron tejidos cerebrales, se disecaron y analizaron mediante lecturas bioquímicas. Se extrajo ARN de la corteza caudal (hemisferio derecho) mientras que se extrajo proteína de corteza frontal (medial) derecha coincidente

para análisis *Western blot* (WB) y de la mitad lateral de la corteza frontal para análisis de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).

Análisis de ARN

Para la extracción de ARN, las muestras se transfirieron a tubos Precellys con contenido de tampón para lisis RLT Plus (con 10 µl/ml de β-mercaptoetanol) (Precellys Lysing Kit CK14 -2 ml (VWR, 432-3751)). Se realizó el tratamiento de DNasa para el ARN. La extracción de ARN se realizó con KingFisher Flex (ThermoFisher), usando el kit Mag-Bind Total RNA 96 (Omega, M6731). La concentración de ARN se midió con Nanodrop, y 500 ng de ARN se sometió a transcripción inversa usando el kit High Capacity cDNA RT + inhibidor de RNasa (catálogo número 4374966, ThermoFisher). A continuación, el ADNc obtenido se analizó por qPCR, en triplicados, usando cebadores y sondas comercialmente disponibles y adaptados, isoformas STXBP1 de ratón y STXBP1-larga de ratón y humano y STXBP1-corta de ratón y humano, así como también dos genes de referencia. El nivel de expresión de ARNm se obtuvo calculando el valor de $2^{-\Delta Ct}$, donde la expresión de cada gen se normalizó con respecto al promedio de los dos genes de referencia.

Análisis *Western Blot*

Para la extracción de la proteína, el tejido se sometió a lisis en tampón RIPA (Sigma R0278) con contenido de cóctel de inhibidores 2x proteasa y fosfatasa (Cell Signaling Technology número 5872) usando el instrumento Precellys 24 (Bertin Technologies) y sistema de enfriamiento. Las muestras se dejaron en hielo durante 30 min, se centrifugaron y el sobrenadante se recolectó como el extracto de proteína final. La concentración de proteína se determinó usando el ensayo BCA Protein (Thermo Scientific™) y se mezclaron 10 µg de proteína con tampón Laemmli y β-mercaptoetanol y se incubó a 90 °C durante 10 minutos antes de SDS-Page. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y luego se sometieron a procedimiento estándar de *Western Blot*. En primer lugar, las membranas se incubaron en solución bloqueante (Ref: 927-50000; Li-Cor) durante 1 hora a RT. los siguientes anticuerpos primario se incubaron durante la noche a 4 °C: anti-STXBP1 policlonal de cabra (1:1000, Ref:PAB6504, Abnova) anti-STXBP1 policlonal de conejo (1:1000, Ref:116002, SySy), anti-STXBP1 policlonal de conejo (1:1000, Ref:HPA008209, Sigma), anti-sintaxina-1A monoclonal de ratón (1:2500, Ref:110111, SySy), anti-β-actina monoclonal de ratón (1:10000, A2228, Sigma) y anti-β-actina monoclonal de conejo (1:10000, 8457P, Cell Signaling Technology). Los anticuerpos secundarios se incubaron 1 h a RT, y se utilizaron los siguientes: anticuerpo secundario de IgG anti-ratón de asno IRDye® 680RD (1:20000; Ref: 926-68072, Li-Cor), anticuerpo secundario de IgG anti-conejo de

asno IRDye® 800CW (1:20000; Ref: 926-32213, Li-Cor) y anticuerpo secundario de IgG anti-cabra de asno IRDye® 800CW (1:20000; Ref: 926-32214, Li-Cor).

Análisis de LC-MS

Para el análisis de LC-MS, las muestras de tejido se homogeneizaron en inhibidor de proteasa SDS 5 %/50 mM TEAB/1x usando un homogenizador de tejido Precellys (Bertin-Instruments). Luego, la concentración de proteína se determinó mediante BCA (Pierce, A53227), se redujo y alquiló 100 µg de cada muestra. La limpieza y digestión de la muestra se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos S-Trap según las instrucciones del fabricante (Protifi Llc, Huntington, NY) y usando Trypsin/Lys-C (Promega, V5072). Las muestras digeridas se eluyeron de la placa y se secaron al vacío, antes de la resuspensión para el análisis de LC-MS. El tampón de resuspensión contenía péptidos AQUA altamente rotulados (Thermo, Paisley, Reino Unido) a 50 fmol/µl en ácido fórmico al 0,1 % en agua. Para el total de muestras lisadas, los péptidos de STXBP1 se midieron usando un dispositivo Waters Acquity UPLC clase M con una fuente IonKey, conectado a Waters Xevo TQ-XS. Los péptidos se atraparon en una columna Waters nanoEase M/Z Sym100 C18 (5 µm, 300 µm x 25 mm) y se separaron con un dispositivo Waters Peptide BEH C18 iKey (150 µm x 100 mm, 130Å 1,7 µm). Se aplicó un gradiente de 17 min a un índice de flujo de 3 µl/min, con fase móvil A (ácido fórmico al 0,1 %/H₂O 100 %) y fase móvil B (ácido fórmico al 0,1 %/ acetónitrilo 100 %). El gradiente utilizado fue: B 1,0% durante desde 0 hasta 1 min, B entre 1,0 y 25 % desde 1 hasta 3 min, B entre 25 y 40 % desde 3 hasta 6 min, B entre 40 y 99 % desde 6 hasta 9 min, B entre 99 y 1 % desde 12 hasta 13 min. La temperatura de la columna se fijó en 50 °C. Se utilizó un método de monitoreo de reacciones múltiples (MRM, *Multiple Reaction Monitoring*) programadas con los siguientes parámetros de fuente: voltaje capilar – 3,8 kV, temperatura de la fuente – 150 °C, gas de cono – 150 L/hr, gas de nebulizador – 5,3 bar. El gas NanoFlow – 0,3 bar. Para todos los análisis, los péptidos monitoreados fueron: DNALLAQLIQDK (SEQ ID NO: 43), YETSGIGEAR (SEQ ID NO: 44), ISEQTYQLSR (SEQ ID NO: 45), WEVLIGSTHILTPK (SEQ ID NO: 46) (específica de la isoforma larga), y WEVLIGSTHILTPQK (SEQ ID NO: 47) (específica de la isoforma corta). Se monitorearon tres transiciones por péptido. El análisis de los datos se realizó en Skyline (MacLean et al., 2010). Cada análisis incluyó una curva estándar de 8 puntos y muestras QC (baja, mediana, alta, n=2). Estas consistieron en homogenados en blanco, de hígado de ratón combinado, aumentado con proteína STXBP1 con identificador HA purificada preparada a partir de la expresión recombinante en E. coli. Las muestras QC endógenas consisten en homogenado de membrana de cerebro de ratón combinada (en blanco y aumentada con STXBP1 adicional) también se incluyó. La cuantificación de la proteína total

y la isoforma corta se realizó contra dicha curva estándar. La cuantificación relativa de los péptidos específicos de la isoforma se realizó contra su respectivo estándar interno.

Figura 19: Análisis de niveles de ARNm de la variante de STXBP1 en cerebro de ratón mediante qPCR. El análisis de ARNm de las muestras de tejido cerebral de la corteza caudal (hemisferio derecho) de compañeros de camada WT (salvajes) y los ratones HET (heterocigóticos) (n = 11 a 13 por grupo). (A): análisis de la expresión de ARNm de STXBP1 endógena total (sonda común que reconoce todos los transcritos de STXBP1). (B) y (C): análisis de la expresión de ARNm de las variantes de STXBP1, usando dos sondas distintas que reconocen específicamente la isoforma de la proteína larga (B) o la isoforma corta (C). Los datos se muestran como nivel de expresión de ARNm, al calcular el valor de $2^{-\Delta Ct}$, donde la expresión se normalizó con respecto al promedio de los dos genes de referencia. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD.

Figura 20: Análisis de niveles de proteína STXBP1 en cerebro de ratón mediante *Western blot*. Se analizaron las muestras de tejido de la corteza frontal (medial) derecha de ratones compañeros de camada WT (salvajes) y HET (heterocigóticos) (n = 11 a 13 por grupo). (A): Los resultados de *Western blot* que representan la expresión de proteína total STXBP1. (B): Datos de cuantificación de los respectivos *Western blot* en (A). Se usó B-actina como un control de carga, para la normalización. El grupo "WT" se usó como el grupo de gradación. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD.

Figure 21: Análisis de niveles de proteína de la variante de STXBP1 en cerebro de ratón por LC-MS. Se analizaron las muestras de tejido de la mitad lateral de la corteza frontal de ratones compañeros de camada WT (salvajes) y HET (heterocigóticos) (n = 11 a 13 por grupo). (A): Cuantificación de péptido STXBP1 total frente a isoforma larga de STXBP1 frente a isoforma corta de STXBP1. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD. (B): Resultados de *Western blot* que representan las isoformas corta y larga de STXBP1. (C): datos de cuantificación combinados de los respectivos *Western blot* en (B). Se utilizó B-actina como un control de carga. Los datos se muestran como la relación entre la intensidad de banda de cada isoforma de STXBP1 y la respectiva banda de B-actina. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD.

Figura 22: Análisis de niveles de proteína Sintaxina-1A (STX1A) en cerebro de ratón mediante *Western blot*. La cuantificación de la expresión de la proteína STX1A en las muestras de tejido de cerebro de ratón (n = 11 a 13 por grupo). Se utilizó B-actina como un

control de carga, para la normalización. El grupo "WT" se utilizó como el grupo de gradación. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD.

Los resultados de análisis de transcrito de ARN en ratones WT y KO heterocigóticos (+/-) (a los referidos como HET en las figuras) se muestran en la Figura 19 (A-C). Los niveles de transcrito de ARNm de ratón endógeno de STXBP1 total se reducen en ratones HET (Figura 19 (A)). También se observó que la isoforma corta y la isoforma larga de STXBP1 se reducen en ratones HET (37-43%) cuando se compara con compañeros de camada WT (Figura 19 (B,C)). El análisis *Western blot* de STXBP1 total confirmó una reducción de proteína de 60 a 70 % en ratones HET cuando se compara con animales WT (Figura 20). La cuantificación de isoformas de la proteína STXBP1 mediante LC-MS (Figura 21) indicó que la variante de STXBP1 corta es la más abundante en el cerebro de ratón de WT y animales HET, cuando se compara con los niveles generales de la isoforma larga (Figura 21 (A)). La cuantificación de péptidos de STXBP1 en animales HET indicó que el total de variantes corta y larga de STXBP1 se reduce en un 60 % cuando se compara con los compañeros de camada WT. Los datos de *Western blot* también confirmaron la misma reducción general en las isoformas corta y larga de STXBP1 en animales HET cuando se compara con los animales WT (Figura 21, Panel B y C).

Se ha informado que STXBP1 actúa como una chaperona for la proteína sintaxina-1A (STX1A), lo que asegura el transporte intracelular (*trafficking*), acoplamiento (*docking*) y liberación (*release*) de vesículas sinápticas (Dulubova I. et al. 2007, Saitsu H. et al. 2008). Tal como se ilustra en la Figura 22, la haploinsuficiencia de STXBP1 da como resultado una reducción de entre 50 y 60 % de niveles de proteína STX1A en ratones HET cuando se compara con compañeros de camada WT.

En conjunto, los datos proporcionan, por primera vez, una caracterización extensa de los niveles de expresión de la isoformas de STXBP1 en el cerebro de ratón y la validación de la reducción de ARNm de la variante de STXBP1 endógena y los niveles de proteína en el modelo transgénico de ratón que recapitula la haploinsuficiencia de STXBP1 humana.

Ejemplo 10: sobreexpresión mediada por AAV de las variantes de STXBP1 en un modelo de ratón con haploinsuficiencia

Los vectores víricos se administraron por inyección intracerebroventricular (ICV) bilateral en el cerebro de ratones neonatos de un día de vida después del nacimiento (PND1) como se describe en el Ejemplo 7. La metodología para las inyecciones neonatales ICV se describió

previamente (Bertrand-Mathon, et al. 2015; Kim, et al. 2014; Hamodi, et al. 2020). Los animales inyectados se monitorearon durante un período de 7 semanas y la expresión y distribución de STXBP1 se analizó por lecturas bioquímicas en tejidos cerebrales. Los experimentos incluyeron los siguientes grupos:

- Heterocigóticos KO (STXBP1+/-) (a los referidos como HET)
- Ratones macho compañeros de camada salvajes (STXBP1+/+) (a los referidos como WT)
- Ratones HET inyectados bilateralmente con uno de dos vectores víricos descritos en la Tabla 17

Tabla 17: Propiedades del vector vírico AAV9

ID del Vector	Activador	Variante de STXBP1	Cápside	Valoración de genoma vírico (vg/mL)	Endotoxina (<10 EU/mL)
AAV9(L)	Mecp2_intrón (SEQ ID NO:3 + SEQ ID NO:37)	Variante larga (SEQ ID NO:9)	AAV9	9,43E12	Aprobado
AAV9(S)	Mecp2_intrón (SEQ ID NO:3 + SEQ ID NO:37)	Variante corta (SEQ ID NO:10)	AAV9	6,91E12	Aprobado

Se inyectó un grupo adicional de ratones WT y HET con vehículo-PBS para usar como control. Un resumen de las condiciones experimentales in vivo se muestra en la Tabla 18.

Después de 7 semanas de la inyección, los tejidos cerebrales se recolectaron, disecaron y sometieron a análisis bioquímico. Se extrajeron ADN/ARN de la corteza caudal (hemisferio derecho) mientras que las proteínas se extrajeron de la corteza frontal (medial) derecha coincidente. El ADN y ARN se extrajeron ambos con la misma composición con tampón de lisis, como se describe en el Ejemplo 7. El tratamiento de Proteinasa K y RNasa se llevó a cabo para el ADN. El ADN se extrajo usando el kit Mag-Bind™ HDQ Blood DNA & Tissue 96 Kit (Omega, M6399). La concentración de ADN se midió usando el fluorómetro Qubit™

Flex (ThermoFisher) con el kit de ensayo Qubit™ dsDNA BR (ThermoFisher, Q32853), y la cantidad de ADN total se ajustó para todas las muestras, en donde se utilizó 40 ng para qPCR con cebadores/sondas específicos para la señal de poliA SV40 20 (presente en todos los casetes de AAV). La cantidad de genomas de ratón se analizó usando el kit ValidPrime® (tataabio, A106P25). La secuencia ValidPrime® es específica para un locus no transcrito de ADN que está presente en exactamente una copia por genoma normal haploide. Para ambos SV40p y ValidPrime®, se determinó la cantidad de copias absoluta usando el método de curva estándar.

Los pasos de extracción de ARN y conversión en ADNc se describen en el Ejemplo 7. El ADNc obtenido se analizó por qPCR, en triplicados, usando cebadores y sondas comercialmente disponibles y adaptados, tales como poliA SV40, STXBP1 de ser humano, STXBP1 de ratón, STX1A de ratón, la isoforma larga de STXBP1 de ratón y humana y la isoforma corta de STXBP1 de ratón y humana, así como también dos genes de referencia. El nivel de expresión de ARNm se obtuvo calculando el valor de $2^{-\Delta Ct}$, donde la expresión de cada gen se normalizó con respecto al promedio de los dos genes de referencia. La extracción de la proteína y los análisis *Western blot* se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 7.

Figura 23: Análisis de la eficacia de transducción de AAV en cerebro de ratón mediante qPCR (7 semanas después de la inyección) (A) Cuantificación absoluta mediante qPCR de copias de genoma vírico en ratones WT inyectados con vehículo-PBS (WT), ratones HET inyectados con vehículo-PBS (HET), ratones HET inyectados con STXBP1 variante larga (HET-AAV9(L)) y ratones HET inyectados con STXBP1 variante corta (HET-AAV9(S)). Las muestras se recolectaron de la corteza caudal (hemisferio derecho) y se cuantificaron usando SV40pA normalizado con respecto al número absoluto de genoma de ratón diploide. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD. Por grupo, se analizaron n= entre 14 y 15 animales y se aplicó ANOVA no paramétrico de una vía (prueba de Kruskal-Wallis) seguido por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* de Dunn. No se observó diferencia significativa entre los grupos transducidos. (B) Análisis de la expresión de ARNm de PoliA SV40 y (C) STXBP1 específica de ser humano. Los datos se muestran como nivel de expresión de ARNm, al calcular el valor de $2^{-\Delta Ct}$, donde la expresión se normalizó con respecto al promedio de los dos genes de referencia. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD. Por grupo, se analizaron n=14 a 15 animales, y se aplicó ANOVA no paramétrico de una vía (prueba de Kruskal-Wallis) seguido por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* de Dunn. No se observó diferencia significativa entre los grupos transducidos.

Figura 24: Análisis de expresión de variante de STXBP1 después del tratamiento con AAV en cerebro de ratón mediante qPCR (7 semanas después de la inyección). Se realizó el análisis de la expresión de ARNm de la variante de STXBP1 usando sondas que miden específicamente los niveles (de ratón y humanos) totales de la variante corta (A) o la variante larga (B). Los datos se muestran como el nivel de expresión de ARNm, al calcular el valor de $2^{-\Delta Ct}$, donde la expresión se normalizó con respecto al promedio de los dos genes de referencia. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD. Por grupo, se analizaron n= 14 a 16 animales.

Figura 25: Análisis de la expresión de la variante de STXBP1 después del tratamiento con AAV en cerebro de ratón por *Western blot* (7 semanas después de la inyección). El análisis de proteínas por *Western blot* de las muestras de corteza frontal (medial) derecha, en ratones WT inyectados con vehículo-PBS (WT), ratones HET inyectados con vehículo-PBS (HET), ratones HET inyectados con la variante larga de STXBP1 (HET-AAV9(L)) y ratones HET inyectados con la variante corta de STXBP1 (HET-AAV9(S))

(A) Cuantificación de los datos de *Western blot* para la expresión de la proteína STXBP1 total (variante larga y corta).

(B) Cuantificación de los datos de *Western blot* para la expresión de la variante larga de la proteína STXBP1.

(C) Cuantificación de los datos de *Western blot* para la expresión de la variante corta de la proteína STXBP1.

(D) Cuantificación de los datos de *Western blot* para la expresión de la proteína Syntaxina-1A

Se utilizó B-actina como un control de carga, para la normalización de cada intensidad de banda de STXBP1 y STX1A. El grupo WT con vehículo (WT) se usó como el grupo de gradación. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD. Los datos se analizaron usando ANOVA no paramétrico de una vía (prueba de Kruskal-Wallis) seguido por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* de Dunn (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Figura 26: La distribución en el cerebro de la expresión de STXBP1 con identificador HA después del tratamiento con AAV en cerebro de ratón mediante inmunohistoquímica (7 semanas después de la inyección). La tinción con identificador HA se realizó con secciones sagitales de ratones HET inyectados con la variante larga de STXBP1 con identificador HA y se comparó con los ratones tratados con vehículo (PBS). Un ejemplo de sección cerebral representativa se muestra para el grupo tratado con AAV (animal 6023) y el grupo tratado con vehículo (animal 6009). Se observó una fuerte tinción por HA en grandes regiones

cerebrales en el animal 6023 (tratado con AAV) mientras que no se observó tinción por HA en los grupos tratados con PBS (animal 6009).

Tal como se ilustra en la Figura 23 (A), se detectaron copias significativas de genoma vírico por genomas de ratón diploide en el cerebro de ratón de grupos tratados con AAV, lo que demuestra una transducción vírica eficaz con los dos casetes que codifican la variante larga y corta de STXBP1. Ambos transgenes de STXBP1 humano (Figura 23 (B)) y expresión de SV40pA (ARNm) (Figura 23 (C)) solamente se detectaron en grupos transducidos con vectores víricos, lo que muestra una tendencia de expresión similar con las cantidades de ADN vírico inyectadas.

La transducción de AAV9 de animales HET dio como resultado una sólida y selectiva sobreexpresión de las variantes corta y larga de STXBP1 sin afectar los niveles de expresión de la variante de ratón endógena (Figura 24).

El análisis *Western blot* confirmó una significativa sobreexpresión de niveles totales de STXBP1 en ambos grupos tratados con AAV, cuando se compara con ratones HET inyectados con vehículo-PBS, tal como se ilustra en la Figura 25 (A). Las cuantificaciones por *Western blot*, usando un anticuerpo que reconoce específicamente la isoforma larga de STXBP1, mostró una significativa sobreexpresión específica de la variante larga solo en el grupo tratado con AAV con el casete de STXBP1-larga (Figura 25, (B)). Similarmente, usando un anticuerpo específico para la isoforma corta de STXBP1, se observó una significativa sobreexpresión específica de proteína solo para el grupo transducido con el casete de STXBP1-corta en comparación con los animales HET inyectados con PBS (Figura 25, (C)). Más aun, el tratamiento con AAV ya sea con la variante corta o larga rescató parcialmente los niveles de proteína sintaxina-1A (STX1A), que aumentaron significativamente cuando se compara con ratones HET inyectados con vehículo-PBS, tal como se ilustra en la Figura 25 (D). El aumento en niveles de STX1A en los grupos tratados con AAV confirma, además, un impacto funcional de la expresión del producto de transgén de STXBP1 humana.

En general, los animales HET tratados ya sea con la variante corta o larga mostraron sobreexpresión eficaz del producto de transgén STXBP1 humano y dio como resultado un rescate similar de haploinsuficiencia de STXBP1 en este modelo de ratón.

La distribución de la expresión del producto de transgén STXBP1 en el cerebro de ratón después de la inyección de PND1 del vector de AAV9 se investigó mediante

inmunohistoquímica (IHC), usando un grupo de animales adicional con un casete vírico que codifica la fusión con identificador HA con la variante larga de STXBP1 (como se describe en el Ejemplo 7). Las secciones congeladas fijadas (12 µm de espesor; secciones sagitales) se generaron con un micrótopo criostático y se almacenaron a -80 °C. El procedimiento de tinción y método de detección son tal como se describe en el Ejemplo 8.

Tal como se ilustra en la Figura 26, se detectó la expresión de la proteína STXBP1 del transgén mediado por AAV después de 7 semanas a través de la rotulación con identificador de HA en todo el cerebro (animal 6023), en secciones sagitales, principalmente en el cuerpo estriado, hipocampo, corteza cerebral, hipotálamo, *pallidum* y tabique. No se observó gran señal de HA a través de dichas regiones en animales HET (animal 6009) que solo recibieron PBS. Los datos de IHC confirman que la transducción mediada por AAV de un casete Mecp2_intrón_STXBP1 (larga) genera una expresión cerebral amplia de la proteína STXBP1.

Ejemplo 11: Terapia génica de AAV para el rescate de fenotipo de crisis en modelo de enfermedad heterocigótica de STXBP1

Para evaluar la eficacia de vectores AAV en condiciones normales y patológicas, se generó un modelo transgénico de ratón que recapitula epilepsia humana mediada por haploinsuficiencia de STXBP1 y que ha sido descrito por Kovacevic et al. (2018). Dicho modelo de ratón se adquirió a través de una licencia de la Universidad de Amsterdam. El modelo heterocigótico se generó con ratones floxeados *Stxbp1* (*Stxbp1^{fl/fl}*) con sitios loxP en cualquiera de los lados del exón 2 en el gen *Stxbp1*. *Stxbp1^{fl/fl}* se cruzaron a *Ella-Cre* (Jax: 003724) para deletar el exón 2 *Stxbp1* en la línea germinal, lo que da como resultado ratones mutantes *Stxbp1^{fl/-}*-nulos. El alelo floxeado se ha cruzado a C57BL/6J lo que genera la cepa de ratón *Stxbp1^{+/-}* KO HET. La delección del exón 2 en un alelo conlleva a un codón finalizador prematuro y da como resultado la expresión de una proteína truncada y no funcional STXBP1. Todos los experimentos in vivo fueron realizados en cumplimiento de las guías emitidas por el Comité de ética para experimentación con animales de conformidad con la legislación de Bélgica. Los experimentos se llevaron a cabo en concordancia con las directivas del Consejo del Comité europeo (2010/63/EU). Se hizo todo lo posible por minimizar el sufrimiento de los animales.

Los ratones macho heterocigóticos (HET) KO y de compañeros de camada salvajes (WT) se inyectaron bilateralmente en el ventrículo lateral con uno de los dos los vectores víricos que codifican la variante larga o la corta de STXBP1 (véase la Tabla 17) en el día posnatal 1.

Las condiciones experimentales se resumen en la Tabla 18. Se inyectó un grupo adicional de ratones de cada genotipo con vehículo-PBS para usar como control. Se monitorearon los signos clínicos una vez por semana durante el curso de las 3 semanas después de la inyección y diariamente desde la semana 3 a la 7 después de la inyección a fin de evaluar el estado de salud general de los ratones. Se observó mortalidad limitada en los grupos relacionados con los procedimientos de la metodología y conducta agresiva, aunque no estuvo relacionada con el tratamiento o el genotipo.

Tabla 18: Resumen de condiciones experimentales in vivo

Genotipo	Edad en el tratamiento	Vía de administración	Tratamiento	Valoración	Tamaño de muestra	Evaluación en vida	Monitoreo de crisis	Evaluación final
HET	Día posnatal 1	ICV bilateral 2µl/ hemisferio	AAV9(L)*	9,43 E12 GC/mL	N=15	Signos clínicos, efectos adversos, aumento de peso corporal y mortalidad durante 7 semanas después de la inyección	Grabación de video-telemetría in vivo de EGG (6-7 semanas después de la inyección)	Recolección de cerebro, plasma y órganos a las 7 semanas después de la inyección para análisis bioquímico, histo patología, inmunohistoquímica, expresión de transgén
			AAV9(S)*	6,91 E12 GC/mL	N=16			
			Vehículo-PBS--	--	N=19			
WT	Día posnatal 1	ICV bilateral 2µl/ hemisferio	Vehículo-PBS--	--	N=10			

*Descriptos en la Tabla 17

Seis semanas después de las inyecciones, se llevaron a cabo registros de video telemetría de EEG (electroencefalograma) inalámbricos in vivo durante 1 semana para evaluar la manifestación e crisis. Los ratones STXBP1+/- fueron quirúrgicamente implantados con un transmisor de telemetría subcutánea y electrodos de EEG corticales 5 semanas después de las inyecciones. La cirugía se realizó en condiciones de esterilidad y asepsia. Los ratones anestesiados (isoflurano en inducción de oxígeno: 5 % a 2 l/min, mantenimiento 2,5 a 1,5 % a 1,5 l/min) se colocaron en un marco estereotáxico con almohadillas térmicas, se perforó la superficie del cráneo de la corteza prefrontal (sobre el temporal) para el electrodo de la grabación y sobre la superficie del cráneo del cerebelo (detrás de lambda (λ)) para electrodo de referencia. Luego, se implantó un transmisor de Open Source Instruments (OSI)

A3028S2 ECoG en forma subcutánea sobre la espalda con los alambres adosados con extensión subcutánea hasta el cráneo, donde los electrodos de grabación y referencia estaban ubicados a través de cada perforación, alrededor de 0,5 mm en el parénquima cerebral. Cada electrodo se fijó en su lugar con un tornillo (Plastics One). Todo el ensamble se sostuvo en su lugar con cemento de cianoacrilato y dental formando un pequeño casco circular y la espalda se cerró con material para sutura de náilon absorbible. La medicación y control analgésico posterior a la cirugía incluyó una segunda dosis de Carprofen (10 mg/kg) 24 horas después de la dosis previa a la cirugía. Después de la cirugía, los ratones se recuperaron en cámara de calor durante 2 a 3 horas. Para las grabaciones de videotelemetría de EEG inalámbrico in vivo, los ratones se agruparon (2 a 3 ratones/jaula). Se colocó las jaulas de los ratones en compartimientos Faraday para facilitar las grabaciones. El monitoreo del bienestar de los ratones implantados se llevó a cabo una vez por día durante 2 semanas. Los ratones se pesaron diariamente durante 4 días y luego, semanalmente. Todas las grabaciones se hicieron en una sala de grabación destinada a ese fin, con control de temperatura y humedad para disminuir la interferencia ambiental y mejorar la recepción de las señales de transmisión. Las señales se transmitieron por radio desde el transmisor implantado hacia las antenas colocadas dentro de los compartimientos Faraday. La señal de EEG de un canal de grabación se digitó a 256 Hz (Filtro de paso de banda: 0,3 a 80 Hz). Las descargas de punta-onda (SWD), típicas de crisis de ausencia, se analizaron con un software de detección de crisis automatizado interno. EL algoritmo de detección de las SWD se basó en el análisis de la duración del evento (> 2 s), el análisis de la frecuencia de banda (5 a 9 Hz) y la identificación de frecuencias armónicas fundamentales específicas. Cada SWD detectada por el algoritmo se confirmó mediante al menos un observador experimentado en forma que respetaba el ciego. Consecuentemente, el análisis EEG se realizó durante este período para los diferentes grupos con vector del casete y con vehículo. Se excluyó un total de 4 animales del análisis debido a la aparición de artefactos técnicos en la señal de EEG en los grupos tratados con el vector: (AAV9-MECP2+INTRON-hSTXBP1 (Variante larga) (2 de 17), y AAV9-MECP2+INTRON-hSTXBP1 (Variante corta) (2 de 18).

Figura 27: Análisis de descargas de punta-onda (SWD) después del tratamiento con AAV en STXBP1 de cerebro de ratón HET mediante EEG (6 a 7 semanas) (A,B) y 24 semanas (C,D) después de la inyección. (A) Promedio del número de SWD en ratones WT inyectados con vehículo-PBS (WT, n=10), ratones HET inyectados con vehículo-PBS (HET, n=19), ratones HET inyectados con STXBP1 variante larga (HET-AAV9(L), n=15) y ratones HET inyectados con STXBP1 variante corta (HET-AAV9(S), n=16). Las SWD se analizaron 6 a 7 semanas después de la inyección durante un período de 24 h durante 7 días

consecutivos. (B) Análisis del número de animales que están “sin crisis” (sin ninguna SWD detectada durante las grabaciones) y animales “con crisis” (SWD detectada durante las grabaciones). (C) Promedio del número de SWD en ratones WT inyectados con vehículo-PBS (WT, n=5), ratones HET inyectados con vehículo-PBS (HET, n=12), ratones HET inyectados con STXBP1 variante larga (HET-AAV9(L), n=9) y ratones HET inyectados con STXBP1 variante corta (HET-AAV9(S), n=11). Las SWD se analizaron 24 semanas después de la inyección a lo largo de un período de 24 h durante 7 días consecutivos. (D) Análisis del número de animales que están “sin crisis” (sin ninguna SWD detectada durante las grabaciones) y animales “con crisis” (SWD detectada durante las grabaciones) 24 semanas después de la inyección. La diferencia entre grupos se analizó por ANOVA no paramétrico de una vía (prueba de Kruskal-Wallis) seguido por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* de Dunn (**** $p < 0,0001$), (** $p < 0,001$) y para el análisis de “sin crisis” se usó una prueba de contingencia de chi cuadrado.

Tal como se ilustra en la Figura 27 (A), el promedio del número de SWD por día registrado a lo largo de 7 días consecutivos durante 24 horas se redujo significativamente en 70 % y 65 % en ratones HET tratados ya sea con la variante larga (HET-AAV9(L)) y variante corta (HET-AAV9(S)), en comparación con el grupo con vehículo. Los ratones HET tratados con la variante larga mostraron 26 % de animales sin crisis (Figura 27 (B), diferencias significativas en comparación con la variante corta). El análisis de EEG detallado no detectó la aparición de crisis convulsivas en los animales tratados durante las grabaciones (1 semana, 24/7).

La diferencia entre grupos para la frecuencia de SWD se analizó por ANOVA no paramétrico de una vía seguido por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* (**** $p < 0,0001$) y para el análisis de “sin crisis” se usó una prueba de contingencia de chi cuadrado.

Además, se realizó análisis bioquímico e histopatológico con los tejidos cerebrales y de órganos de animales inyectados con los diferentes grupos. Para la evaluación de expresión de transgén, se sacrificaron ratones 7 semanas después de la inyección, siguiendo la misma metodología que se describe en el Ejemplo 7. Se recolectó la corteza caudal y se sometió a extracción de ADN/ARN y se utilizó la mitad de la corteza frontal media coincidente para la extracción de la proteína usando la misma metodología descrita en el Ejemplo 7.

Se realizó un estudio longitudinal de 6 meses de duración en un grupo separado de animales para medir la persistencia de los efectos del tratamiento con terapia génica de SXTBP1 usando el mismo diseño experimental. Veinticuatro semanas después de las inyecciones, se llevaron a cabo las grabaciones in vivo de videotelemedría por EEG (electroencefalograma) inalámbrico durante 1 semana para evaluar la aparición de crisis. Tal como se ilustra en la Figura 27 (C), el promedio del número de SWD por día registrado a lo largo de 7 días consecutivos durante 24 horas se redujo significativamente en 95 % y 92 % en ratones HET tratados ya sea con la variante larga (HET-AAV9(L)) o la variante corta (HET-AAV9(S)) respectivamente, en comparación con el grupo con vehículo. Los ratones HET tratados con la variante larga o la variante corta mostraron respectivamente 78 % y 64 % de animales sin crisis (Figura 27 (D)). El análisis de EEG detallado no detectó la aparición de crisis convulsivas en los animales tratados durante las grabaciones (1 semana, 24/7).

Ejemplo 12: Terapia génica de AAV para rescatar fenotipos de conducta en modelo de enfermedad heterocigótica de STXBP1

Para evaluar la eficacia de la terapia génica mediada por AAV en diferentes fenotipos de enfermedad conductual en ratones macho heterocigóticos STXBP1 KO (HET) y sus compañeros de camada salvajes (WT) con sexo y edad coincidente, los vectores víricos que codifican la variante larga o la corta de la STXBP1 humana bajo el control del activador *Mecp2*_intrón (véase la Tabla 17) se inyectaron bilateralmente en el ventrículo lateral. Dichos grupos de animales se separaron con respecto a los utilizados en el Ejemplo 11.

Los animales tratados se sometieron a una batería de pruebas conductuales desde las 4 semanas hasta las 22 semanas de edad. Un grupo adicional de ratones de cada genotipo se inyectó con vehículo-PBS para usar como control. Todos los experimentos conductuales fueron realizados en cumplimiento de las guías emitidas por el Comité de ética para experimentación con animales de conformidad con la legislación de Bélgica. Los experimentos se llevaron a cabo en concordancia con las directivas del Consejo del Comité europeo (2010/63/EU). Se hizo todo lo posible por minimizar el sufrimiento de los animales.

Figura 28: Análisis de peso corporal después del tratamiento con AAV en STXBP1 de ratones HET (1 a 22 semanas después de la inyección) (A) Promedio de pesos corporales como una función de la edad en ratones WT (n=17) y ratones HET(n=16) inyectados con vehículo-PBS. La diferencia entre grupos se analizó por ANOVA de mediciones repetidas de dos vías seguido por una prueba de comparaciones múltiples post hoc LSD de Fisher sin corrección (*<p.0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001). (B) Promedio de peso corporal

medido a las 22 semanas de edad en ratones WT inyectados con vehículo-PBS (WT, n=17) y ratones HET inyectados con vehículo-PBS (HET, n=16), ratones HET inyectados con STXBP1 variante larga (HET-AAV9(L), n=10) y ratones HET inyectados con STXBP1 variante corta (HET-AAV9(S), n=13). La diferencia entre grupos se analizó por ANOVA paramétrico de una vía seguido por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* LSD de Fisher sin corrección (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; ns, no significativo). Los gráficos de barras son la media $\pm$ SEM.

Figura 29: Análisis de fijación de miembros posteriores después del tratamiento con AAV en STXBP1 de ratones HET(4 a 22 semanas después de la inyección) (A) Promedio de puntaje de fijación de miembros posteriores como función de la edad en ratones WT inyectados con vehículo-PBS (WT, n=17) y ratones HET inyectados con vehículo-PBS (HET, n=16), ratones HET inyectados con STXBP1 variante larga (HET-AAV9(L), n=10) y ratones HET inyectados con STXBP1 variante corta (HET-AAV9(S), n=13). (B) Promedio de puntaje de fijación de miembros posteriores registrado a las 22 semanas de edad en ratones WT inyectados con vehículo-PBS (n=17) y ratones HET inyectados con vehículo-PBS (n=16), AAV9/MECP2-int-STXBP1-L (n=10) y AAV9/MECP2-int-STXBP1-S (n=13). La diferencia entre los grupos se analizó por ANOVA no paramétrico de una vía (prueba de Kruskal-Wallis) seguido por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* de Dunn sin corrección (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; ns, no significativo). Los gráficos de barras son la media $\pm$ SEM.

Figura 30: Análisis de STXBP1 de ratones HET en la prueba de colgado de alambre después del tratamiento con AAV (8 semanas después de la inyección). Se midió la latencia hasta la caída en las prueba del colgado de alambre de las cuatro extremidades a las 8 semanas de edad en ratones WT inyectados con vehículo-PBS (WT, n=17) y ratones HET inyectados con vehículo-PBS (HET, n=16), ratones HET inyectados con STXBP1 variante larga (HET-AAV9(L), n=10) y ratones HET inyectados con STXBP1 variante corta (HET-AAV9(S), n=13). La diferencia entre grupos se analizó por ANOVA paramétrico de una vía seguido por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* LSD de Fisher sin corrección (**** $p < 0,0001$; ns, no significativo). Los gráficos de barras son la media $\pm$ SEM.

Figura 31: Análisis de STXBP1 de ratones HET en la prueba de miedo condicionado después del tratamiento con AAV (10 semanas después de la inyección) (A) Promedio de conducta congelada durante la prueba de la memoria de miedo contextual realizada a las 10 semanas de edad 24 h después de la fase de entrenamiento de miedo condicionado en ratones WT inyectados con vehículo-PBS (WT, n=17) y ratones HET inyectados con

vehículo-PBS (HET, n=16), ratones HET inyectados con STXBP1 variante larga (HET-AAV9(L), n=10) y ratones HET inyectados con STXBP1 variante corta (HET-AAV9(S), n=13). La diferencia entre grupos se analizó por ANOVA paramétrico de una vía seguido por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* LSD de Fisher sin corrección (* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$). (B) Promedio de conducta congelada durante la prueba de memoria del miedo con señal realizada en los mismos animales que en (A) 1 h después de la prueba de memoria de miedo contextual. La diferencia entre grupos se analizó por ANOVA paramétrico de una vía seguido por una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* LSD de Fisher sin corrección (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Los gráficos de barras son la media $\pm$ SEM.

Peso corporal

Se siguió el peso corporal de los animales en forma semanal desde 1 hasta 22 semanas después de las inyecciones. Como se indica en la Figura 28 (A), los ratones HET inyectados con vehículo-PBS mostraron una disminución consistente y significativa en peso corporal de 1 a 22 semanas de edad cuando se compara con sus compañeros de camada WT inyectados con vehículo-PBS. Dicho déficit en peso podría rescatarse mediante el tratamiento con AAV con la variante larga de STXBP1 (HET-AAV9(L)) que muestra una diferencia significativa con respecto al grupo HET con vehículo-PBS a las 22 semanas (Figura 28 (B)). El grupo con variante corta de STXBP1 mostró una tendencia de aumento de peso corporal a las 22 semanas de edad.

Fijación de miembros posteriores

Se registró la fijación de miembros posteriores (Guyenet et al., 2010) una vez a la semana desde las 4 hasta las 10 semanas de edad y una vez cada 3 semanas desde 10 hasta 22 semanas de edad. Los ratones se suspendieron por sus colas y se observó la posición de sus miembros posteriores durante 10 s. Si los miembros posteriores se mantenían con ángulo hacia afuera en forma consistente, alejados del abdomen, se asignaba un puntaje de 0. Si un miembro posterior se retraía hacia el abdomen más del 50 % del tiempo de suspensión, recibía un puntaje de 1. Si se retraían ambos miembros posteriores hacia el abdomen durante más del 50 % del tiempo de suspensión, recibía un puntaje de 2. Si sus miembros posteriores estaban totalmente retraídos y tocando el abdomen más del 50 % del tiempo de suspensión, recibía un puntaje de 3. Cada ratón se observó tres veces y se usó el valor del promedio de puntaje para el análisis estadístico.

La Figura 29 (A) muestra la progresión del puntaje de la fijación de los miembros posteriores en los cuatro grupos de animales entre semana 4 y 22. A las 5 semanas de edad, los

ratones HET tratados con vehículo (HET-veh) comenzaron a mostrar fijación de miembros posteriores que se estabilizó a las 7 semanas de edad cuando se compara con el control de compañeros de camada WT (WT-veh), lo que indica el desarrollo de distonía en el modelo de haploinsuficiencia de STXBP1. El tratamiento con AAV ya sea con la variante larga o la corta de STXBP1 en ratones HET atenuó la progresión de la fijación de miembros posteriores en comparación con el grupo HET con vehículo a lo largo del período de 5 a 22 semanas. A las 22 semanas de edad, la extensión de la fijación de miembros posteriores registrada en los ratones HET tratados con la variante larga de STXBP1 fue similar al grupo WT de control (sin diferencia significativa, ns), lo cual indica la recuperación del fenotipo de distonía (Figura 29 (B)). La variante corta de STXBP1 disminuyó significativamente el puntaje de gravedad de la fijación de miembros posteriores en los ratones HET a las 22 semanas de edad, aunque sin restaurar el fenotipo de distonía con respecto al nivel de WT (Figura 29 (B)).

Prueba del colgado de alambre

Ocho semanas después del tratamiento con AAV los ratones se sometieron a la prueba del colgado de alambre de los cuatro miembros (Klein et al., 2012) para evaluar la fortaleza muscular. Los ratones se colocaron sobre una malla metálica, luego se invirtieron y se hicieron ondas suaves, de manera que el ratón se aferrara al alambre. Se registró la latencia hasta la caída, con un tiempo de cierre de 90 s. Tal como se muestra en la Figura 30, los ratones HET inyectados con vehículo-PBS mostraron un aumento significativo en la latencia hasta la caída a las 8 semanas de edad cuando se compara con sus compañeros de camada WT tratados con vehículo-PBS. El aumento en latencia hasta la caída fue abolido en los ratones HET tratados con AAV que codifican ya sea las variantes larga o corta humanas STXBP1, lo que sugiere un rescate completo del fenotipo en el modelo de haploinsuficiencia (Figura 30).

Prueba de miedo condicionado

Diez semanas después del tratamiento con AAV se utilizó un paradigma de miedo condicionado de Pavlov (Curzon et al., 2009) para evaluar el aprendizaje asociativo y la memoria, en el cual un ratón aprende a asociar un entorno específico (es decir, el contexto) y un sonido (es decir, la señal) con choque eléctrico en las patas. La memoria del miedo se manifiesta por congelamiento del ratón, luego se expone subsiguientemente a este contexto específico o señal sin los choques eléctricos. La prueba de miedo condicionado se realizó en un recinto que tiene un piso con grilla para transmitir los choques eléctricos (Ugo Basile). Se usó una cámara sobre el recinto para monitorear al ratón. Durante una fase de entrenamiento de 6 min, se colocó un ratón en el recinto (intensidad de la luz de 114 a 116

lux, una pared gris, piso con grilla visible) durante 2 min de período de habituación, para evaluar el congelamiento inicial, y luego se encendió un sonido (78 a 80 dB, 4 kHz) durante 30 s inmediatamente seguido por un leve choque en las patas (2 s, 0,5 mA). Se repitió la misma asociación de sonido-choque en las patas dos veces más después de la primera, con un intervalo de 1 min. Después de la fase de entrenamiento, el ratón volvió a su jaula. Después de 24 h, el ratón fue sometido a prueba para la memoria de miedo contextual. A tal fin, el ratón se colocó en el mismo recinto de entrenamiento y se monitoreó su conducta de congelamiento durante 5 min sin ningún sonido o estímulo de choque en las patas. Luego el ratón retornó a su jaula en la que habita. Una hora después, el ratón se transfirió al recinto después de haber sido alterado con 3 paredes cuadrículadas, sin grilla de metal visible, piso blanco e intensidad de luz entre y 14 y 16 lux para crear un nuevo contexto para la prueba de memoria de miedo con señal. Después de 2 min de período de habituación en el recinto para medir el congelamiento inicial, se usó el mismo sonido de señal que se utilizó en la fase de entrenamiento, que se encendió cuatro veces durante 30 s sin los choques en las patas mientras que se monitoreaba la conducta de congelamiento durante un tiempo de ensayo de 7,5 min. El tiempo de congelamiento se determinó usando un sistema automatizado basado en videos usando el software Ethovision (Noldus).

La Figure 31 muestra los resultados para la prueba contextual (Fig 31 (A)) y la prueba con señal (Fig 31 (B)) para los cuatro grupos de animales. La STXBP1 de ratones HET tratados con vehículo-PBS mostró una gran reducción tanto en conductas de congelamiento en contexto e inducidas por señal cuando se compara con sus compañeros de camada WT, lo que indica un déficit en aprendizaje asociativo y memoria en el modelo de haploinsuficiencia de STXBP1 (Figura 31 (A,B)). El tratamiento con AAV con las variantes larga y corta de STXBP1 conllevó a un aumento en la conducta de congelamiento en la prueba contextual y con señal (Figura 31 (A,B)). Los efectos del tratamiento con la variante larga fueron significativamente diferentes de los grupos HET tratados con vehículo, lo que indica un rescate de las conductas de congelamiento contextuales e inducidas por señal. El tratamiento con la variante de STXBP1 corta generó un significativo aumento en la prueba con señal cuando se compara con los animales HET tratados con vehículo (Fig 31 (B)) y mostró una tendencia al aumento del congelamiento en la prueba contextual (Fig 31 (A)). En general, el tratamiento con AAV con las variantes de STXBP1 tuvo el potencial de recuperar los déficits de aprendizaje asociativo y memoria observados en el modelo de ratón con haploinsuficiencia de STXBP1.

Tabla 19: Generalidad de los síntomas patológicos de conducta en el modelo de ratón con haploinsuficiencia de STXBP1.

Las observaciones en los ratones HET STXBP1 en comparación con los compañeros de camada WT y se clasificaron con disminución (↓) o aumento (↑). Los efectos del tratamiento con AAV que incluyen ya sea la sobreexpresión de la variante larga o la corta de STXBP1 se indicaron como “recuperación” (cambio estadísticamente significativo con respecto a los ratones HET tratados con vehículo) o “tendencia” (cambio observado pero no estadísticamente significativo).

			Grupos de tratamiento con AAV	
Síntomas	Prueba	Observaciones en HET (frente a WT)	Variante larga	Variante corta
Déficit de crecimiento	<i>Peso corporal</i>	↓	recuperación	<i>tendencia</i>
Epilepsia	<i>Crisis (SWD)</i>	↑	recuperación	recuperación
Disfunción motora	<i>Fijación de miembros posteriores (disonía)</i>	↑	recuperación	recuperación
	<i>Colgado de alambre (fuerza muscular)</i>	↑	recuperación	recuperación
Trastornos psiquiátricos	<i>Miedo condicionado (memoria de aprendizaje asociativo)</i>	↓	recuperación	<i>tendencia</i>

REFERENCIAS

Abramov D, Guiberson NGL, Burre J (2020). STXBP1 encephalopathies: Clinical spectrum, disease mechanisms, and therapeutic strategies. *Journal of neurochemistry*.

Bertrand-Mathon et al. (2015). Increasing the effectiveness of intracerebral injections in adult and neonatal mice: a neurosurgical point of view. *Neuroscience Bulletin*, Springer Verlag, 2015, 31 (6), pp.685-696. hal-01196282.

Chen W, Cai ZL, Chao ES, Chen H, Longley CM, Hao S, et al. (2020). Stxbp1/Munc18-1 haploinsufficiency impairs inhibition and mediates key neurological features of STXBP1 encephalopathy. *eLife* 9.

Curzon et al. (2009) *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, Chapter 2.

Dulubova I et al. (2007) Munc18–1 binds directly to the neuronal SNARE complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 2697–2702.

Guyenet et al. (2010) A simple composite phenotype scoring system for evaluating mouse models of cerebellar ataxia, *J Vis Exp.* 21:1787.

Hamada N, Iwamoto I, Tabata H, Nagata KI (2017). MUNC18-1 gene abnormalities are involved in neurodevelopmental disorders through defective cortical architecture during brain development. *Acta Neuropathol Commun* 5: 92.

Hamodi, A. et al. (2020). Transverse sinus injections drive robust whole-brain expression of transgenes. *eLIFE* . DOI: 10.7554/eLife.53639.

Kalidas S, Santosh V, Shareef MM, Shankar SK, Christopher R, Shetty KT (2000). Expression of p67 (Munc-18) in adult human brain and neuroectodermal tumors of human central nervous system. *Acta Neuropathol* 99: 191-198.

Kim, J.Y et al. (2014). Intracerebroventricular Viral Injection of the Neonatal Mouse Brain for Persistent and Widespread Neuronal Transduction. *J. Vis. Exp.* (91), e51863, doi:10.3791/51863 (2014).

Klein et al. (2012) Noninvasive in vivo assessment of muscle impairment in the mdx mouse model – a comparison of two common wire hanging methods with two different results, *J Neurosci Methods* 203:292-7.

Kovacevic J, Maroteaux G, Schut D, Loos M, Dubey M, Pitsch J, et al. (2018). Protein instability, haploinsufficiency, and cortical hyper-excitability underlie STXBP1 encephalopathy. *Brain : a journal of neurology* 141(5): 1350-1374.

MacLean B, et al. (2010). Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* 26(7) 966-968.

Meijer M, Cijssouw T, Toonen RF, Verhage M (2015). Synaptic Effects of Munc18-1 Alternative Splicing in Excitatory Hippocampal Neurons. *PloS one* 10: e0138950.

Orock A, Logan S, Deak F (2018). Munc18-1 haploinsufficiency impairs learning and memory by reduced synaptic vesicular release in a model of Ohtahara syndrome. *Molecular and cellular neurosciences* 88: 33-42.

Patzke C, Han Y, Covy J, Yi F, Maxeiner S, Wernig M, et al. (2015). Analysis of conditional heterozygous STXBP1 mutations in human neurons. *The Journal of clinical investigation* 125: 3560-3571.

Ramos-Miguel A, Hercher C, Beasley CL, Barr AM, Bayer TA, Falkai P, et al. (2015). Loss of Munc18-1 long splice variant in GABAergic terminals is associated with cognitive decline and increased risk of dementia in a community sample. *Molecular neurodegeneration* 10: 65.

Saito H, Kato M, Mizuguchi T, Hamada K, Osaka H, Tohyama J, et al. (2008). De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nature Genetics* 40(6): 782-788.

Stamberger H, Nikanorova M, Willemsen MH, Accorsi P, Angriman M, Baier H, et al. (2016). STXBP1 encephalopathy: A neurodevelopmental disorder including epilepsy. *Neurology* 86: 954-962.

Swanson DA, Steel JM, Valle D (1998). Identification and characterization of the human ortholog of rat STXBP1, a protein implicated in vesicle trafficking and neurotransmitter release. *Genomics* 48: 373-376.

Toonen RF, Wierda K, Sons MS, de Wit H, Cornelisse LN, Brussaard A, et al. (2006). Munc18-1 expression levels control synapse recovery by regulating readily releasable pool size. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 18332-18337.

Tremblay, R.G. et al. (2010). Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. *J Neurosci Methods* 186, 60-67, doi:10.1016/j.jneumeth.2009.11.004.

Uriguen L, Gil-Pisa I, Munarriz-Cuezva E, Berrocoso E, Pascau J, Soto-Montenegro ML, et al. (2013). Behavioral, neurochemical and morphological changes induced by the overexpression of munc18-1a in brain of mice: relevance to schizophrenia. *Translational psychiatry* 3: e221.

Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, Brussaard AB, Heeroma JH, Vermeer H, et al. (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* 287: 864-869.

REVINDICACIONES

1. Un constructo de ácido nucleico que comprende un transgén caracterizado porque codifica:
 - i. una proteína de unión a la syntaxina 1 (STXBP1) que comprende la isoforma a, b, c, d, e, f, g o h, que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 respectivamente; o
 - ii. una secuencia que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con respecto a las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 y que mantiene la funcionalidad como STXBP1; o
 - iii. una variante de origen natural que comprende, con referencia a la SEQ ID NO: 9, una o más mutaciones, como se observa en la Tabla 7.
2. El constructo de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el transgén codifica:
 - i. la variante de transcrito 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 de STXBP1, que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 o 33 respectivamente; o
 - ii. una secuencia que tiene al menos 95 % o 96 % o 97 % o 98 % o 99 % o 99,5 % de identidad de secuencia con respecto a las SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 o 33.
3. El constructo de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el transgén codifica la isoforma a de STXBP1 y comprende una secuencia de ADNc de la SEQ ID NO: 7; o una secuencia que tiene al menos 95 % o 96 % o 97 % o 98 % o 99 % o 99,5 % de identidad de secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 7.
4. El constructo de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque, además, comprende un activador ligado operativamente con dicho transgén, en el cual dicho activador comprende:
 - i. un activador CAG 1,6 kb de la SEQ ID NO: 1; o
 - ii. un activador hSYN de la SEQ ID NO: 2; o
 - iii. un activador MECP2 de la SEQ ID NO: 3; o
 - iv. un activador hNSE de la SEQ ID NO: 4; o
 - v. un activador CamKII de la SEQ ID NO: 5; o
 - vi. un activador hSTXBP1 endógeno de la SEQ ID NO: 6; o

- vii. un activador MECP2 de la SEQ ID NO: 3 operativamente ligado en una orientación 5' hacia 3' a un MECP2-intrón de la SEQ ID NO: 37.
5. El constructo de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el constructo comprende una secuencia de señal de poliadenilación de SV40 de la SEQ ID NO: 8.
6. Un vector vírico que comprende el constructo de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el vector vírico comprende, además, una repetición terminal invertida (ITR) en el flanco 5' y/o 3' de dicho constructo de ácido nucleico.
7. El vector vírico de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado porque la 5'ITR y/o la 3'ITR comprenden la ITR de un virus adenoasociado (AAV) natural.
8. El vector vírico de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, caracterizado porque la 3'ITR comprende la SEQ ID NO: 18 y/o la 5'ITR comprende la SEQ ID NO: 19.
9. Una partícula vírica que comprende un constructo de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o un vector vírico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.
10. La partícula vírica de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizada porque comprende una proteína de cápside de VP1 proveniente de un AAV seleccionado entre el grupo que consiste en AAV2, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9, AAV10, AAVtt o sus combinaciones.
11. La partícula vírica de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizada porque la proteína de cápside proviene de AAVtt o AAV9 y comprende la SEQ ID NO: 20 o 21 respectivamente, o una secuencia que tiene al menos 98,5 % o 99 % o 99,5 % de identidad de secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 20 o 21.
12. La partícula vírica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 para uso en terapia.

13. La partícula vírica para el uso de acuerdo con la reivindicación 12 en el tratamiento y/o prevención de un trastorno genético de STXBP1 asociado con encefalopatía epiléptica de inicio temprano grave.
14. La partícula vírica para el uso de acuerdo con la reivindicación 12 o la reivindicación 13 en el tratamiento del síndrome de Ohtahara, el síndrome de West o el síndrome de Dravet.
15. Un método para tratar y/o prevenir una enfermedad que se caracteriza por la pérdida de la actividad funcional de STXBP1, caracterizado porque comprende administrar una partícula vírica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 a un sujeto que lo necesita.
16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado porque dicha enfermedad está asociada con al menos una mutación en un paciente, lo que conlleva a una variante de STXBP1 patológica, en el cual dicha variante de STXBP1 patológica comprende, con referencia a la SEQ ID NO:9, una mutación o combinación de mutaciones, tal como se observa en la Tabla 5 y/o la Tabla 6.

RESUMEN

La presente invención se refiere a un constructo de ácido nucleico que comprende un transgén que codifica la proteína de unión a la syntaxina 1 (STXBP1, Munc-18), un vector vírico para encapsidado de dicho ácido nucleico en una partícula vírica; y el uso de dicha partícula vírica para tratar una enfermedad asociada con una pérdida de la actividad funcional de STXBP1.

Figura 1

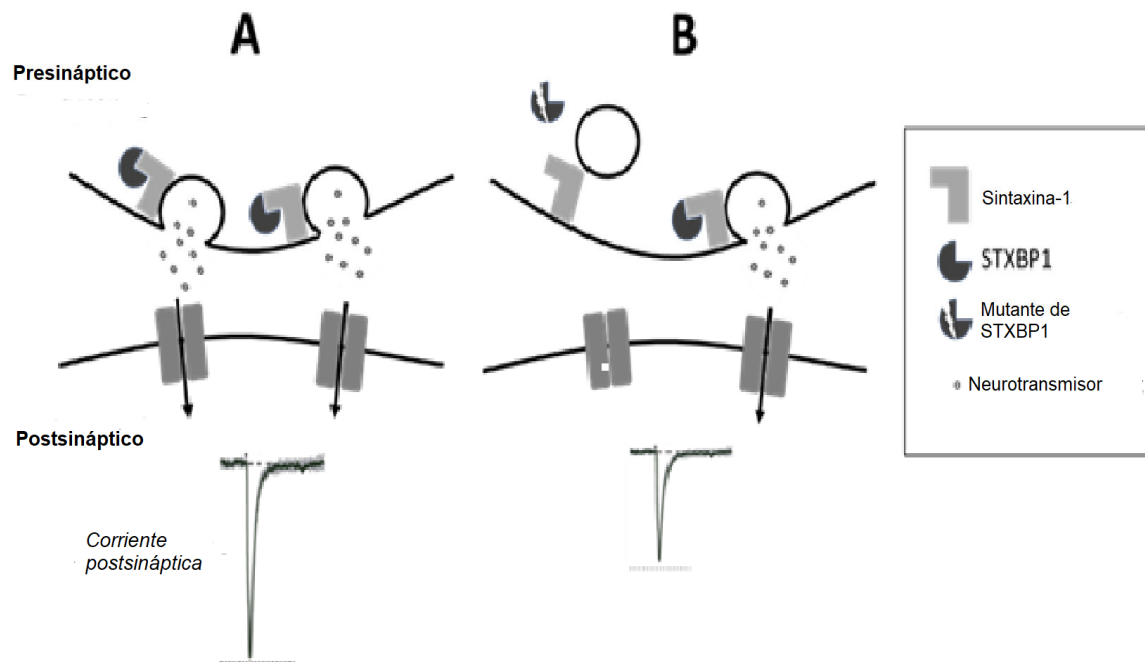


Figura 2

Mouse_STXBPl_IsoA_NP_001107041.1	mapiglkavvgekimbhdkvkkkkkgewkvlvvdqslmrmlssccckmtmdimtegitived	60
Human_STXBPl_IsoA_NP_003156.1	mapiglkavvgekimbhdkvkkkkkgewkvlvvdqslmrmlssccckmtmdimtegitived	60
RhesusMacaque_STXBPl_IsoA_XP_014972082.1	mapiglkavvgekimbhdkvkkkkkgewkvlvvdqslmrmlssccckmtmdimtegitived	60

Mouse_STXBPl_IsoA_NP_001107041.1	inkrreplpsleavylitpseksvhsldsfkdpptakyrpahvfftdscpdalfnelvk	120
Human_STXBPl_IsoA_NP_003156.1	inkrreplpsleavylitpseksvhsldsfkdpptakyrpahvfftdscpdalfnelvk	120
RhesusMacaque_STXBPl_IsoA_XP_014972082.1	inkrreplpsleavylitpseksvhsldsfkdpptakyrpahvfftdscpdalfnelvk	120

Mouse_STXBPl_IsoA_NP_001107041.1	sraakvikltteiniaflpyesqvysldsdadsfqsfsphkaqmknilerlaeqiatlc	180
Human_STXBPl_IsoA_NP_003156.1	sraakvikltteiniaflpyesqvysldsdadsfqsfsphkaqmknilerlaeqiatlc	180
RhesusMacaque_STXBPl_IsoA_XP_014972082.1	sraakvikltteiniaflpyesqvysldsdadsfqsfsphkaqmknilerlaeqiatlc	180

Mouse_STXBPl_IsoA_NP_001107041.1	atlkpepavryrgeykdnallaqliqdkldaykaddptmgegdskarsqlilidrgfdps	240
Human_STXBPl_IsoA_NP_003156.1	atlkpepavryrgeykdnallaqliqdkldaykaddptmgegdskarsqlilidrgfdps	240
RhesusMacaque_STXBPl_IsoA_XP_014972082.1	atlkpepavryrgeykdnallaqliqdkldaykaddptmgegdskarsqlilidrgfdps	240

Mouse_STXBPl_IsoA_NP_001107041.1	spvlheltfqamsydlpiendvykyetstgigearvkevlldedddliwialrhkhiaevs	300
Human_STXBPl_IsoA_NP_003156.1	spvlheltfqamsydlpiendvykyetstgigearvkevlldedddliwialrhkhiaevs	300
RhesusMacaque_STXBPl_IsoA_XP_014972082.1	spvlheltfqamsydlpiendvykyetstgigearvkevlldedddliwialrhkhiaevs	300

Mouse_STXBPl_IsoA_NP_001107041.1	qevtrslkdfssskrmntgekttmrdlsqmlkkmpqyqkelskysthlhlaedcmkhyqg	360
Human_STXBPl_IsoA_NP_003156.1	qevtrslkdfssskrmntgekttmrdlsqmlkkmpqyqkelskysthlhlaedcmkhyqg	360
RhesusMacaque_STXBPl_IsoA_XP_014972082.1	qevtrslkdfssskrmntgekttmrdlsqmlkkmpqyqkelskysthlhlaedcmkhyqg	360

Mouse_STXBPl_IsoA_NP_001107041.1	tvdklcrveqdlamgtdaegekikdpmraivpilldanvstydkiriilliyiflknkite	420
Human_STXBPl_IsoA_NP_003156.1	tvdklcrveqdlamgtdaegekikdpmraivpilldanvstydkiriilliyiflknkite	420
RhesusMacaque_STXBPl_IsoA_XP_014972082.1	tvdklcrveqdlamgtdaegekikdpmraivpilldanvstydkiriilliyiflknkite	420

Mouse_STXBPl_IsoA_NP_001107041.1	enlnklighaqippedseiitnmahlgvpivtdstlrrrskperkeriseqtyqlsrwtp	480
Human_STXBPl_IsoA_NP_003156.1	enlnklighaqippedseiitnmahlgvpivtdstlrrrskperkeriseqtyqlsrwtp	480
RhesusMacaque_STXBPl_IsoA_XP_014972082.1	enlnklighaqippedseiitnmahlgvpivtdstlrrrskperkeriseqtyqlsrwtp	480

Mouse_STXBPl_IsoA_NP_001107041.1	iikdimedtiiedkldtkhypyistrssasfsttavsaryghwhknkapeyrsgprliif	540
Human_STXBPl_IsoA_NP_003156.1	iikdimedtiiedkldtkhypyistrssasfsttavsaryghwhknkapeyrsgprliif	540
RhesusMacaque_STXBPl_IsoA_XP_014972082.1	iikdimedtiiedkldtkhypyistrssasfsttavsaryghwhknkapeyrsgprliif	540

Mouse_STXBPl_IsoA_NP_001107041.1	ilggvslnemrcayevtqangkwevligsthiptkflmdlrhpdfressrvsfedqap	600
Human_STXBPl_IsoA_NP_003156.1	ilggvslnemrcayevtqangkwevligsthiptkflmdlrhpdfressrvsfedqap	600
RhesusMacaque_STXBPl_IsoA_XP_014972082.1	ilggvslnemrcayevtqangkwevligsthiptkflmdlrhpdfressrvsfedqap	600

Mouse_STXBPl_IsoA_NP_001107041.1	tme 603	
Human_STXBPl_IsoA_NP_003156.1	tme 603	
RhesusMacaque_STXBPl_IsoA_XP_014972082.1	tme 603	

Figura 3



Figura 4

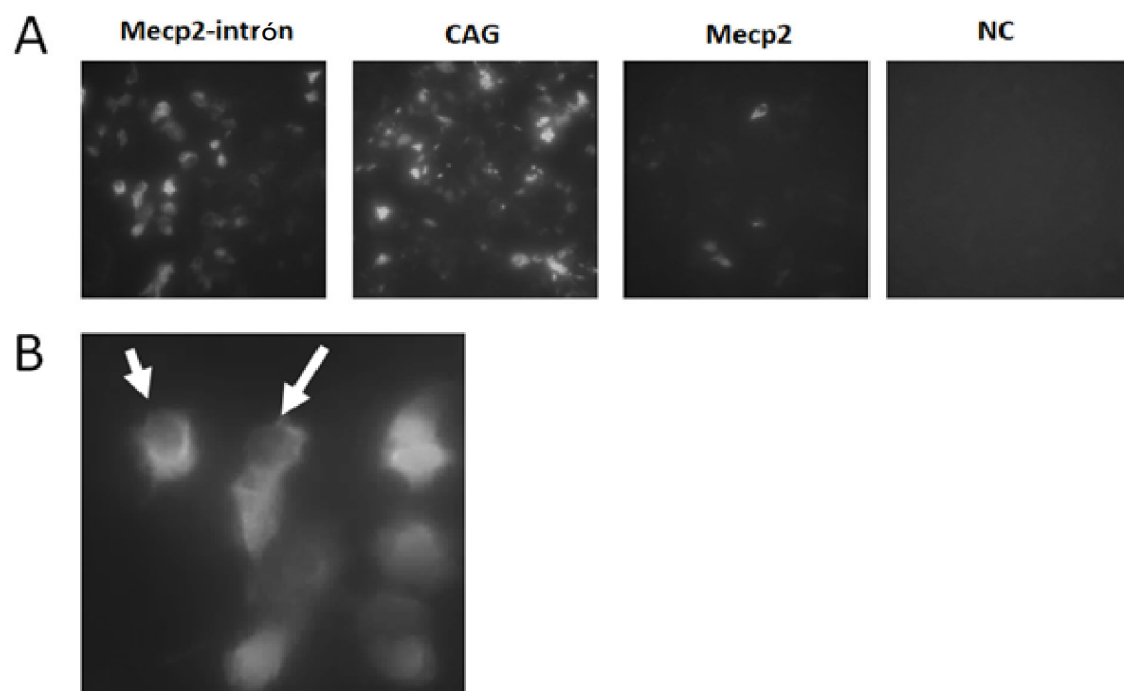


Figura 5

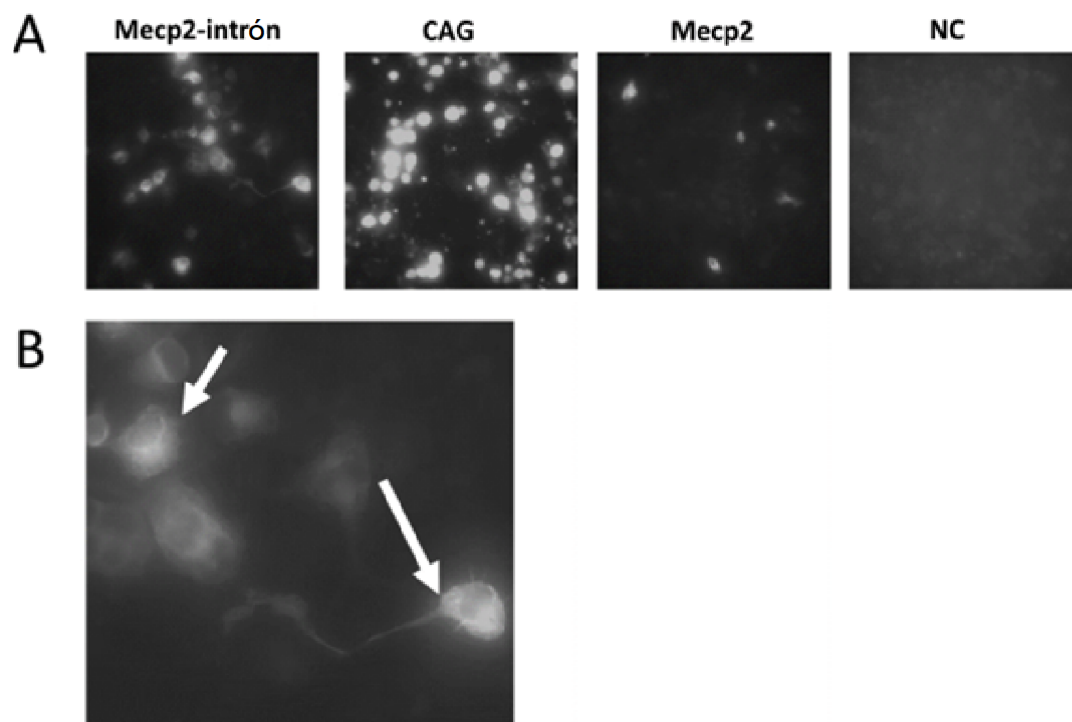


Figura 6

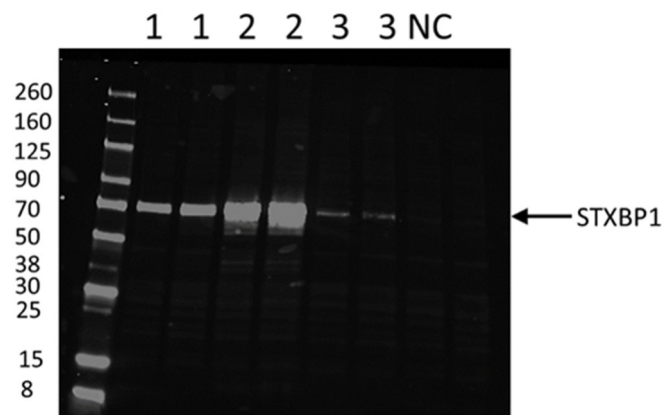


Figura 7

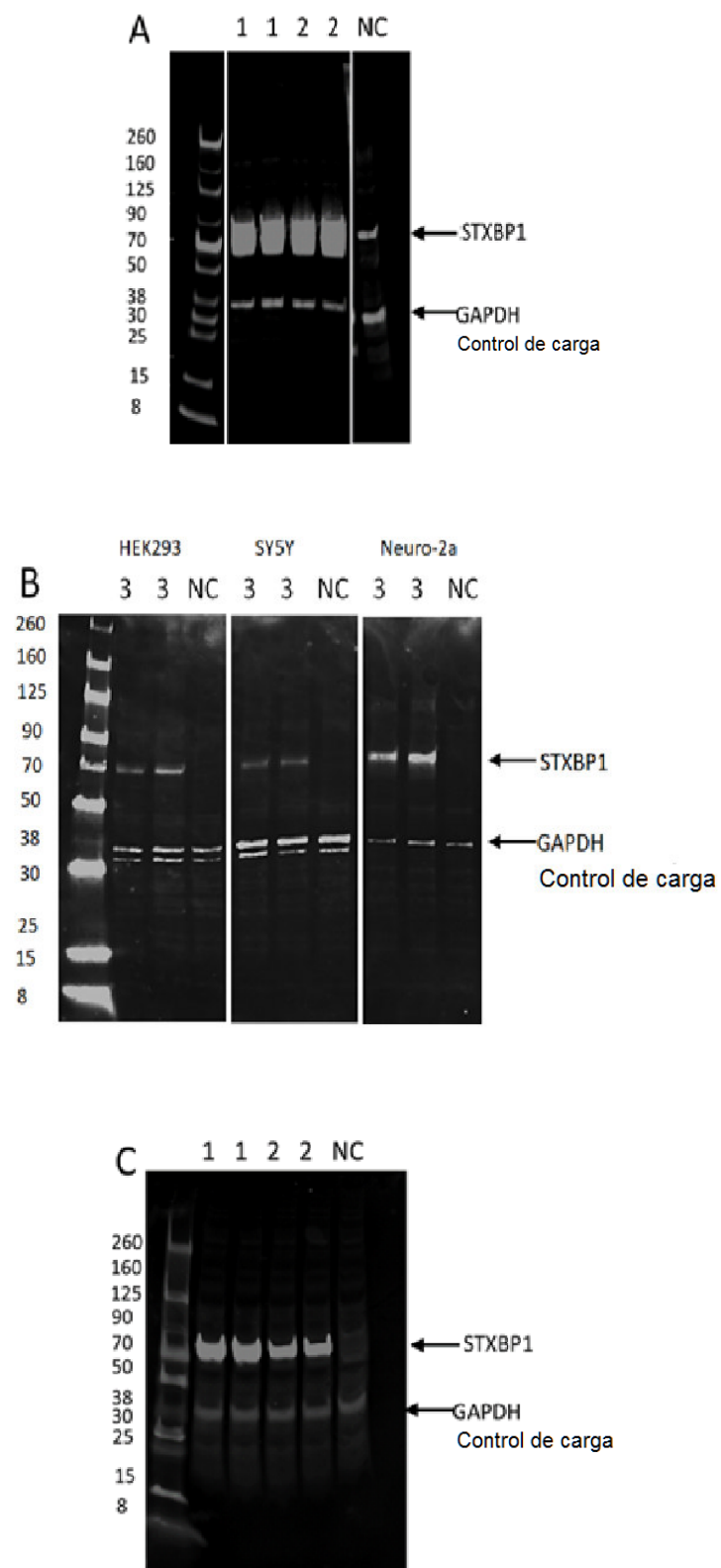


Figura 8

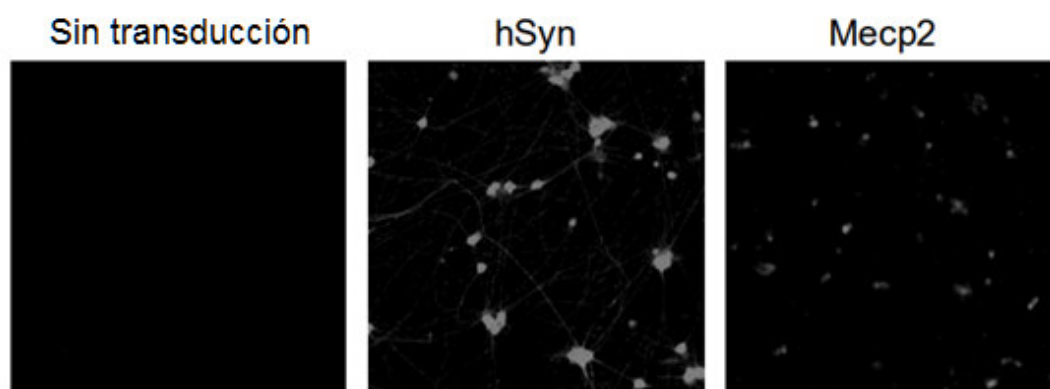


Figura 9

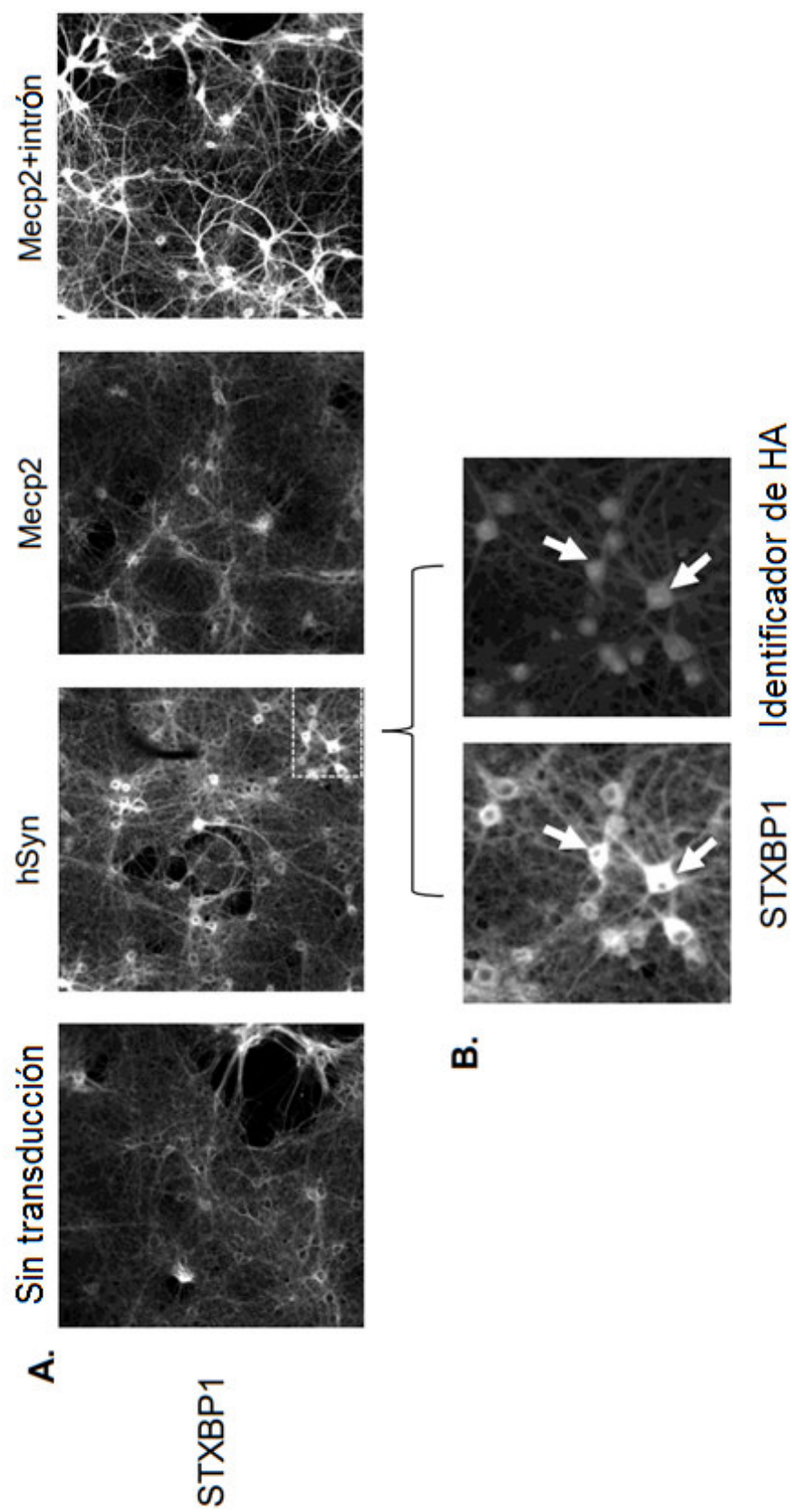


Figura 10

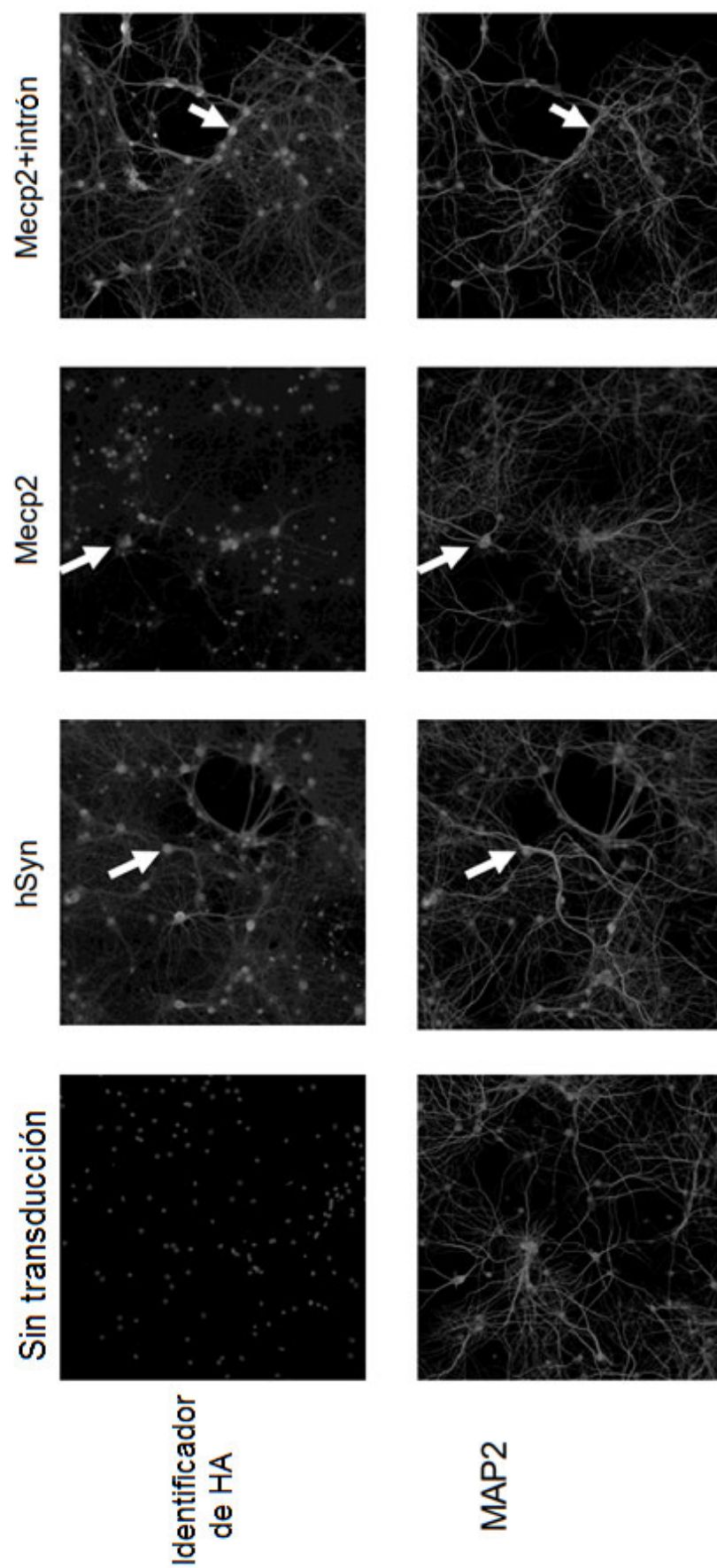


Figura 11

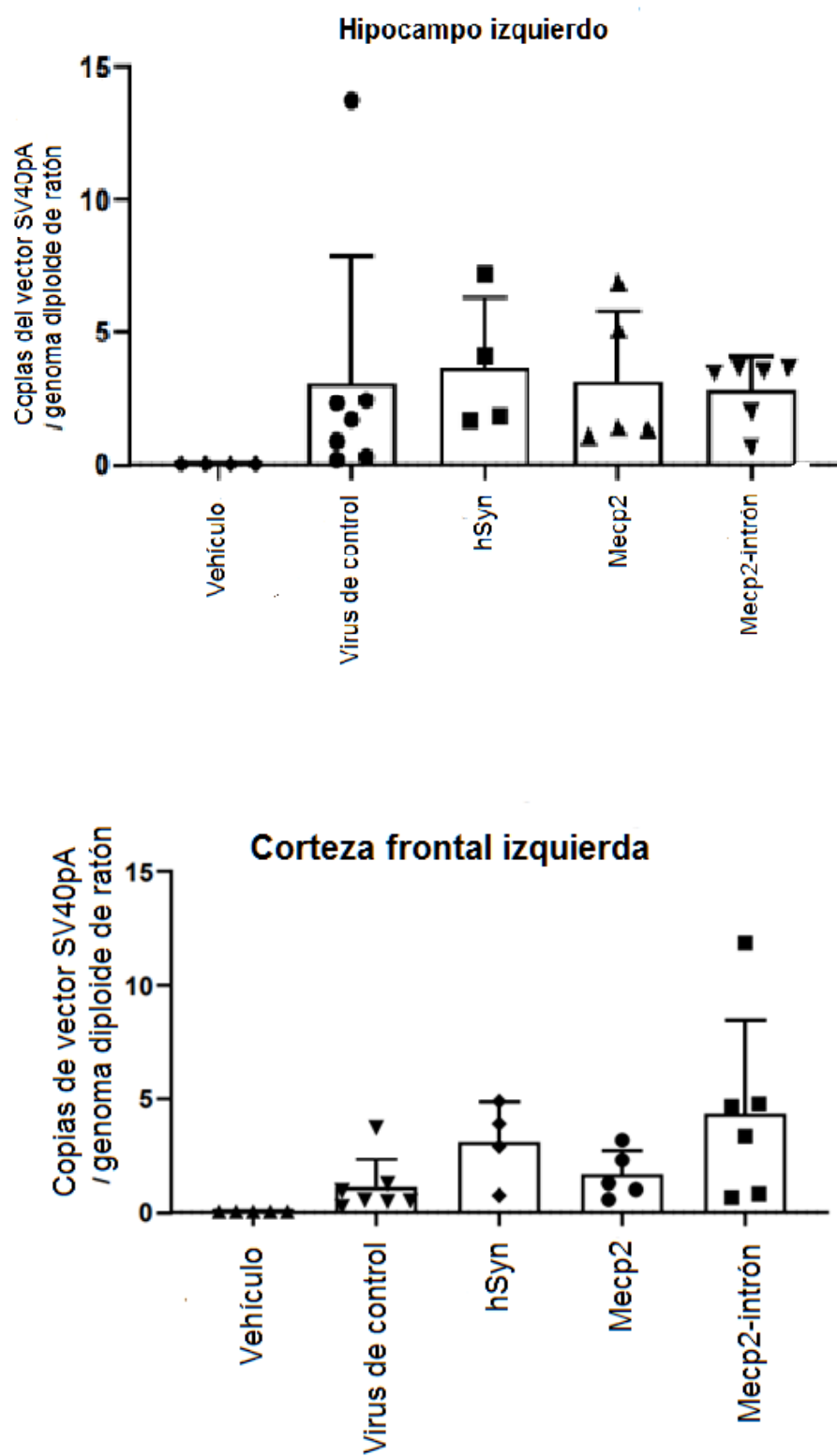


Figura 12

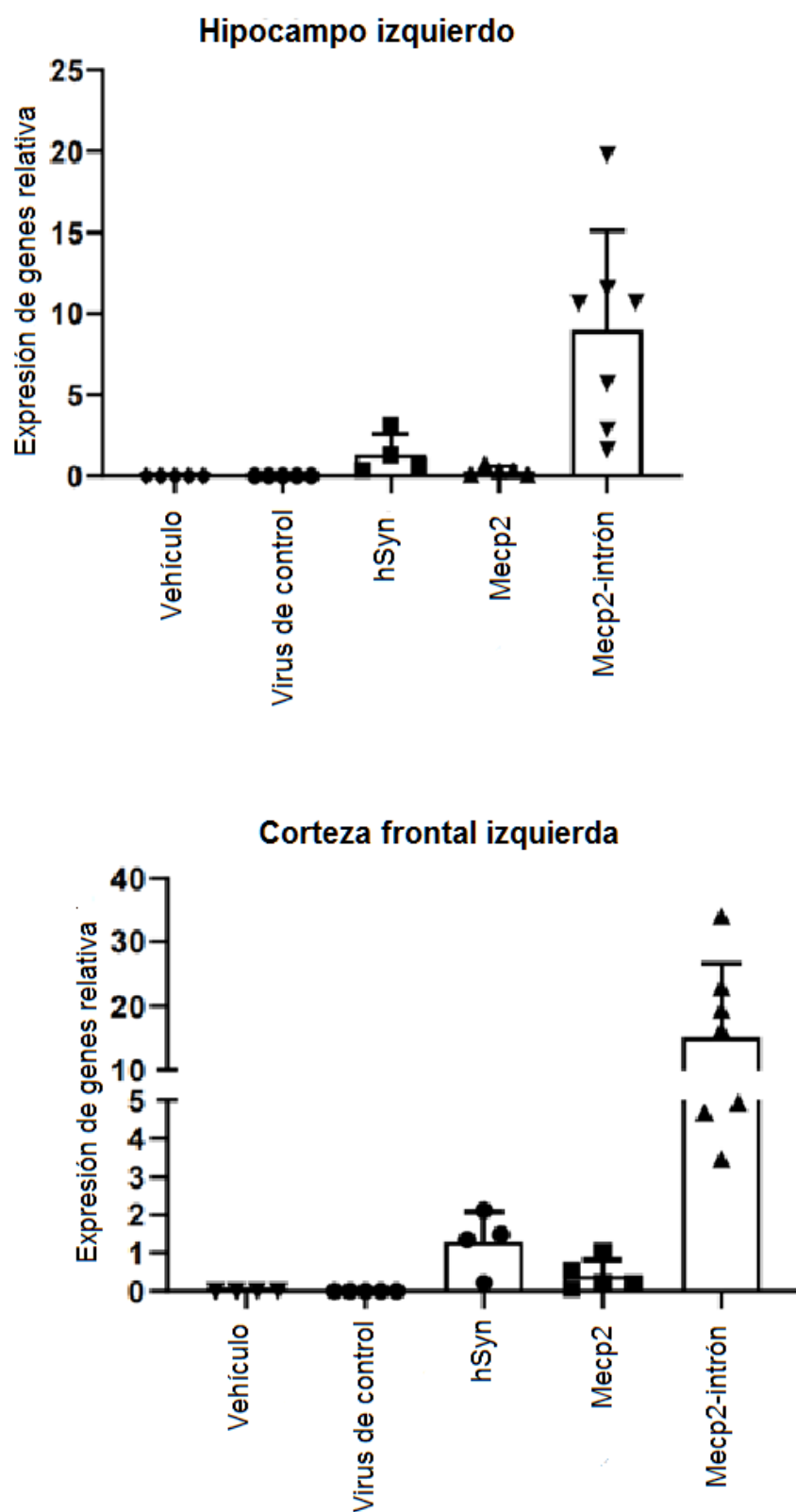


Figura 13

A.

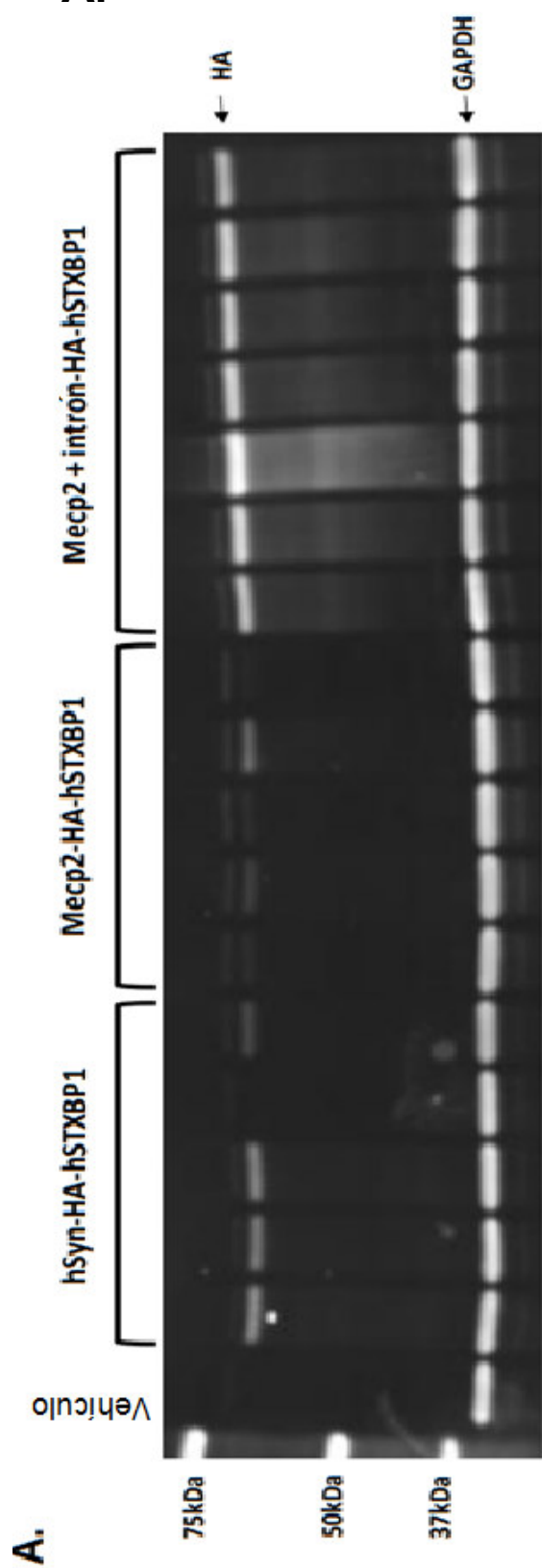


Figura 13 (continuación)

B.

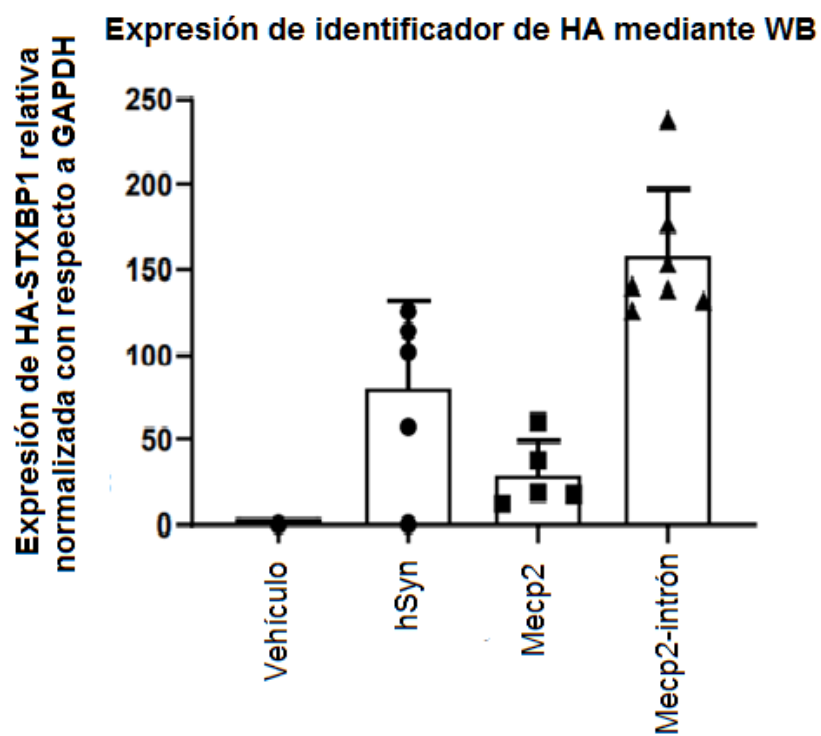


Figura 14

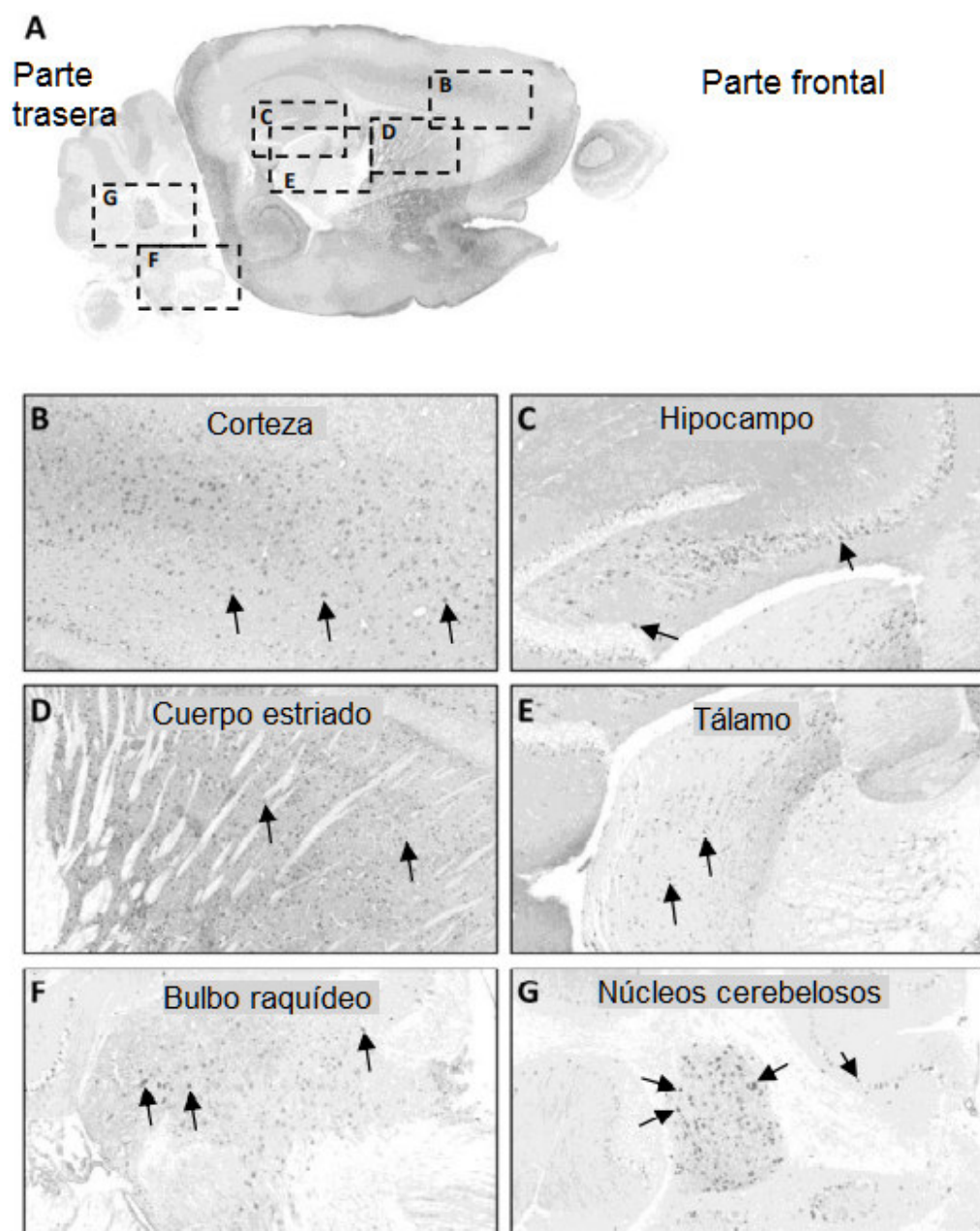


Figura 15

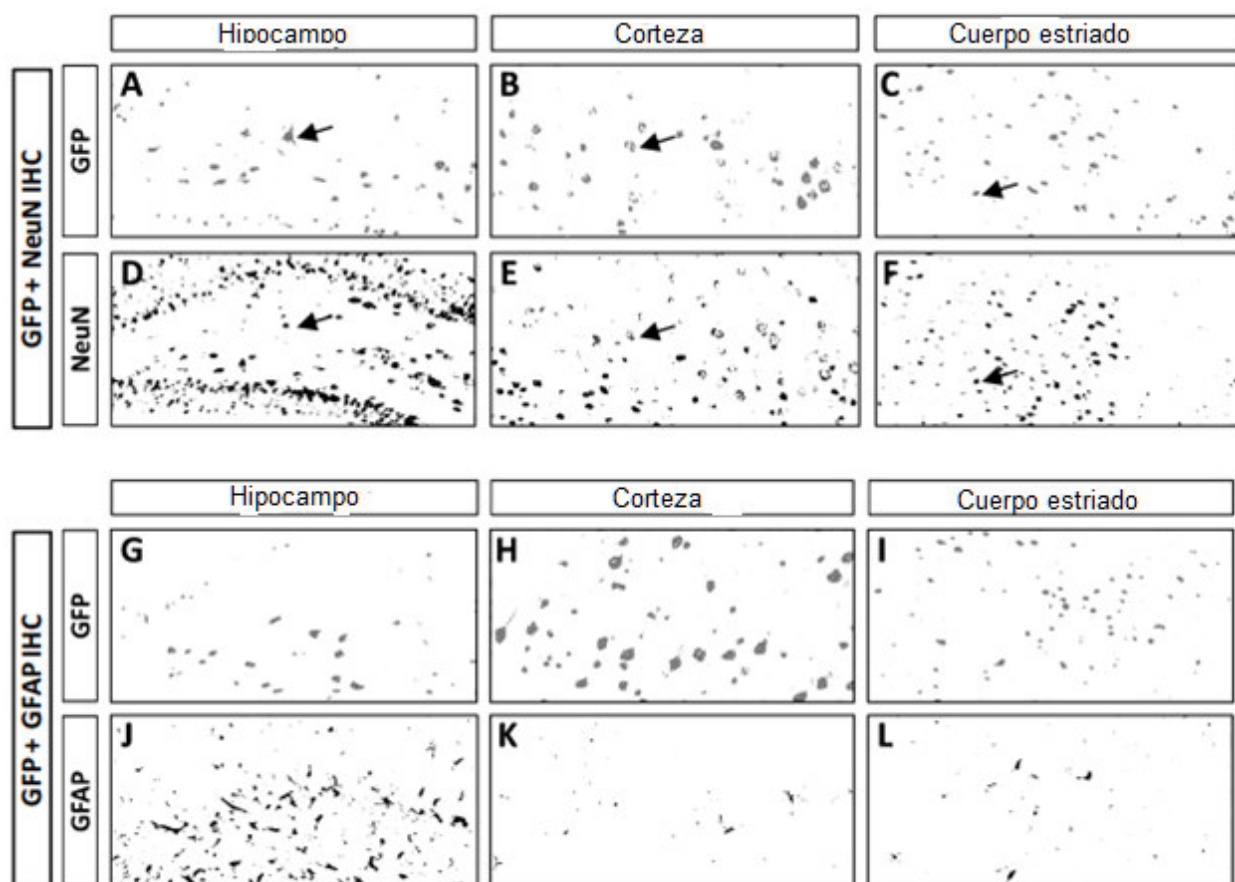


Figura 16

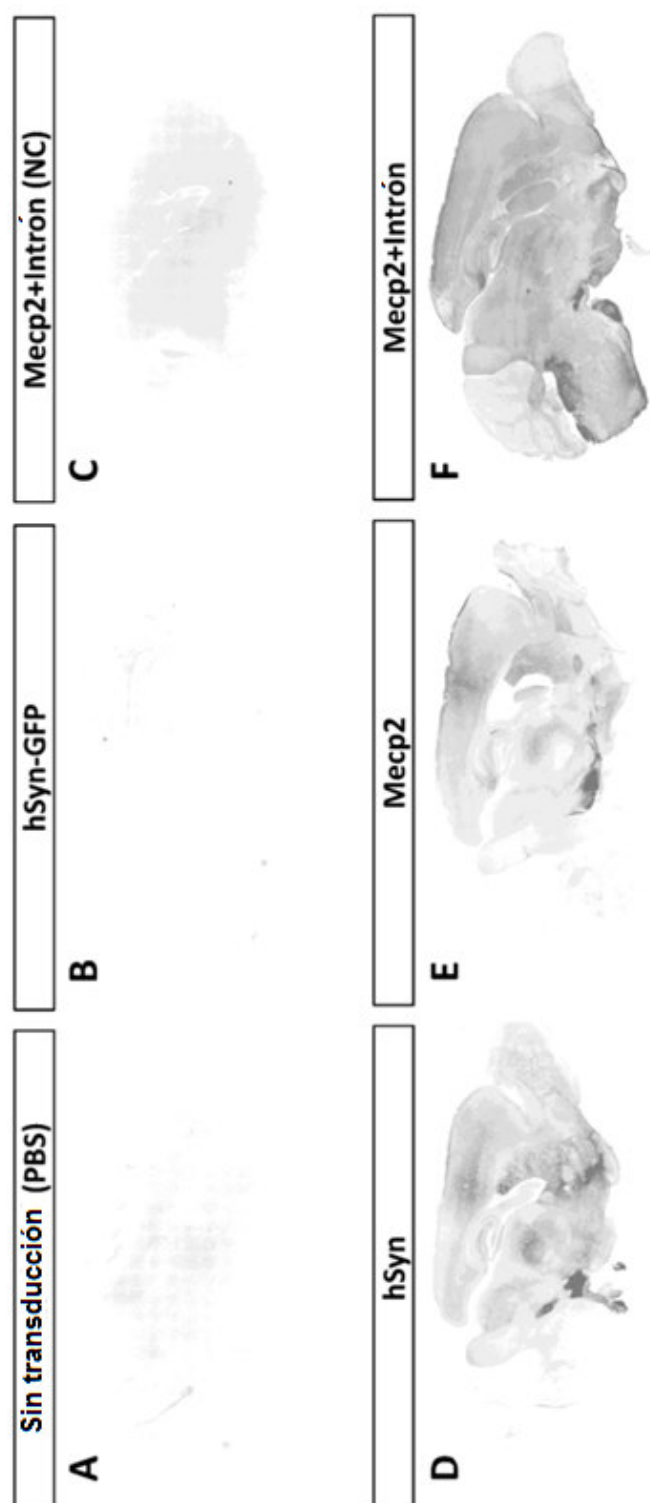


Figura 17

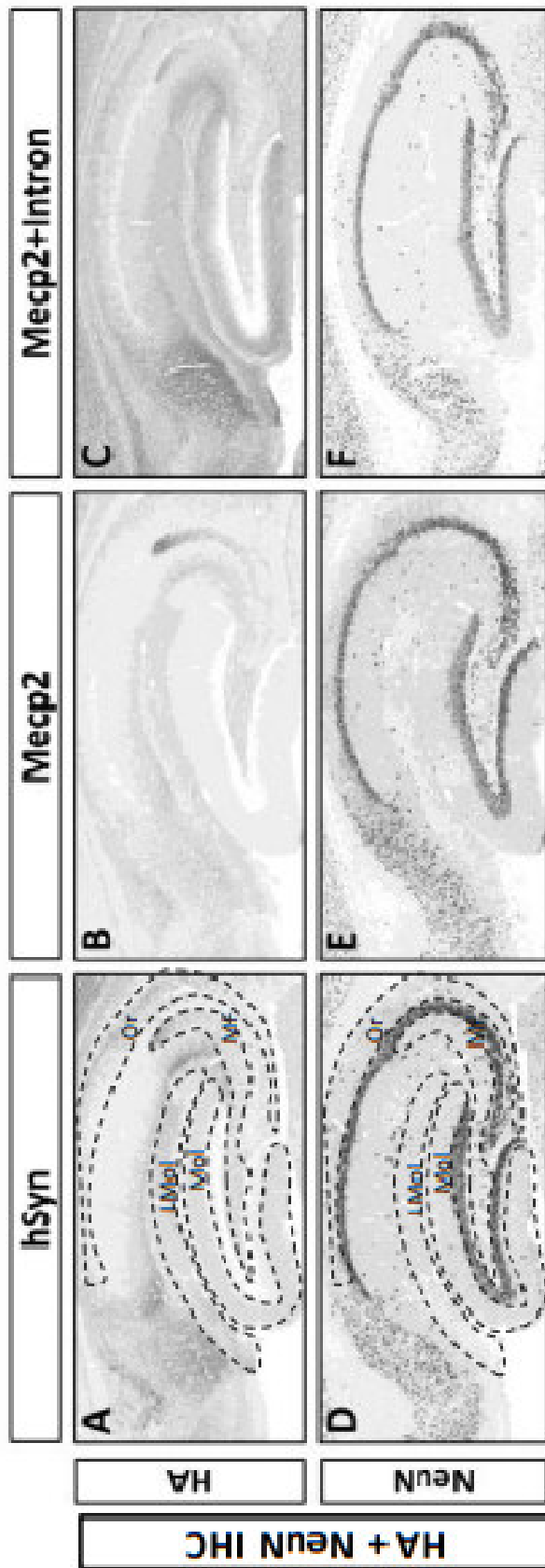


Figura 18

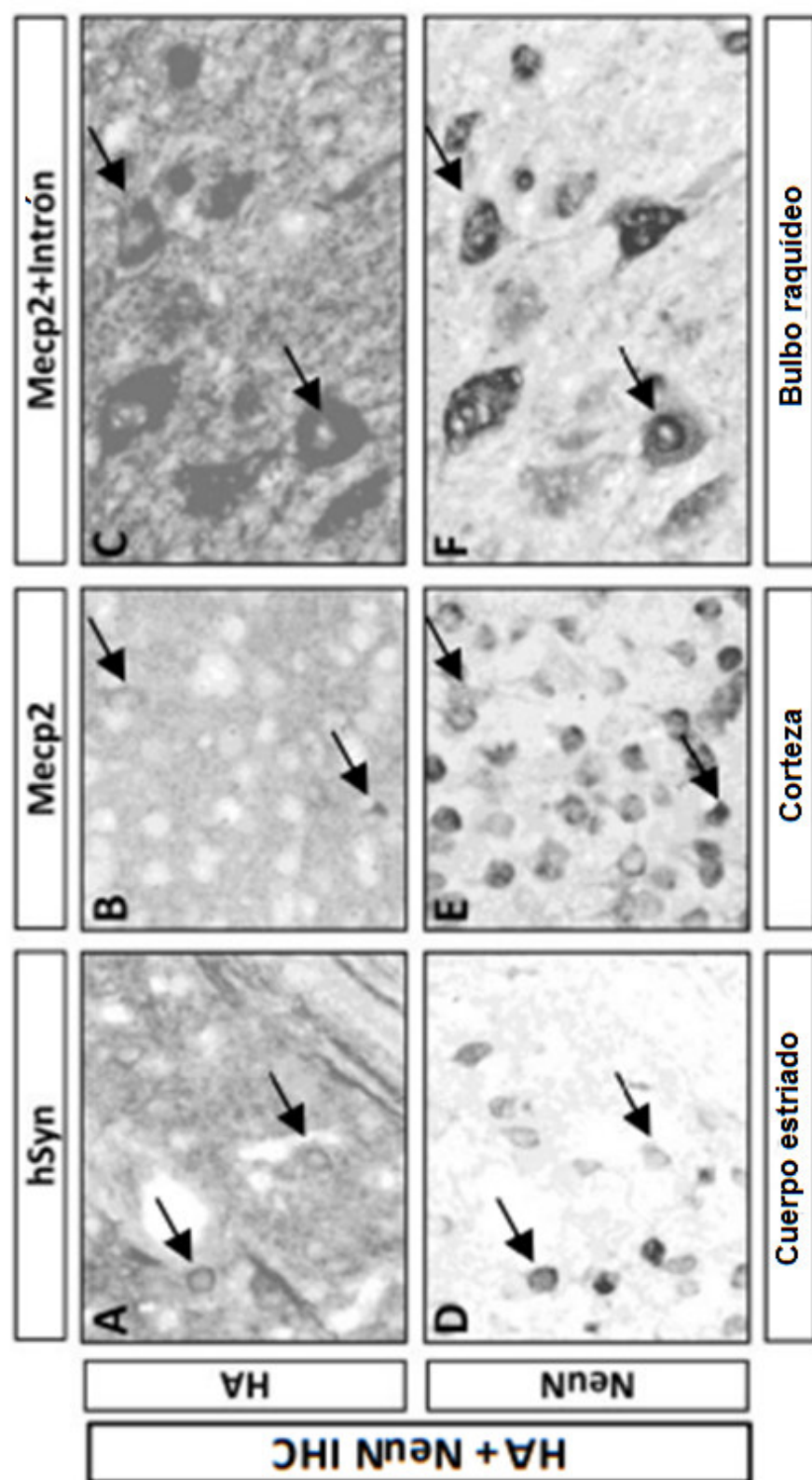
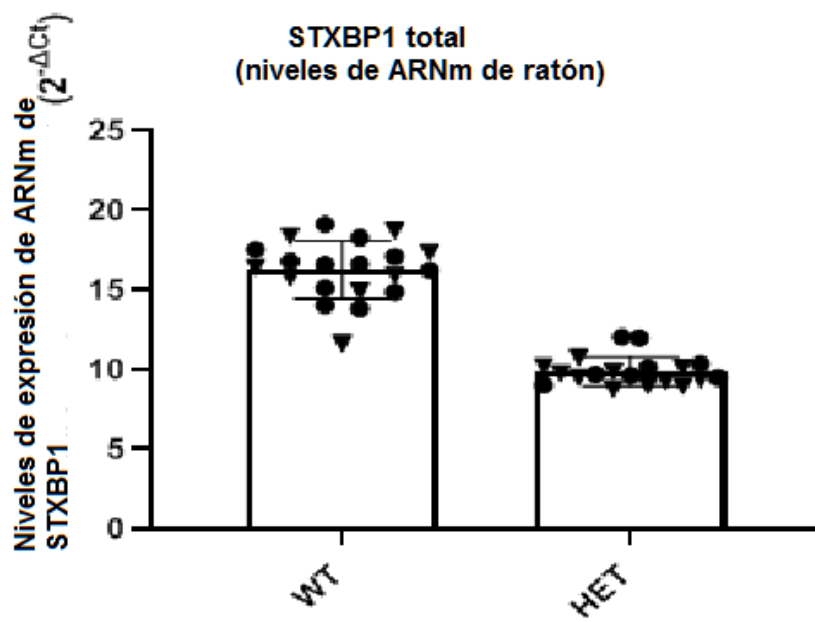


Figura 19

A



B

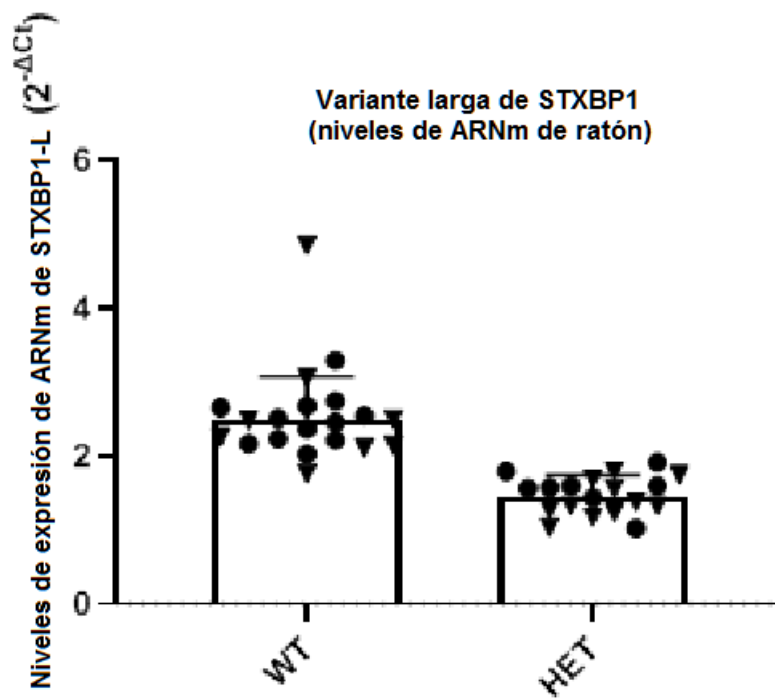


Figura 19 (continuación)

C

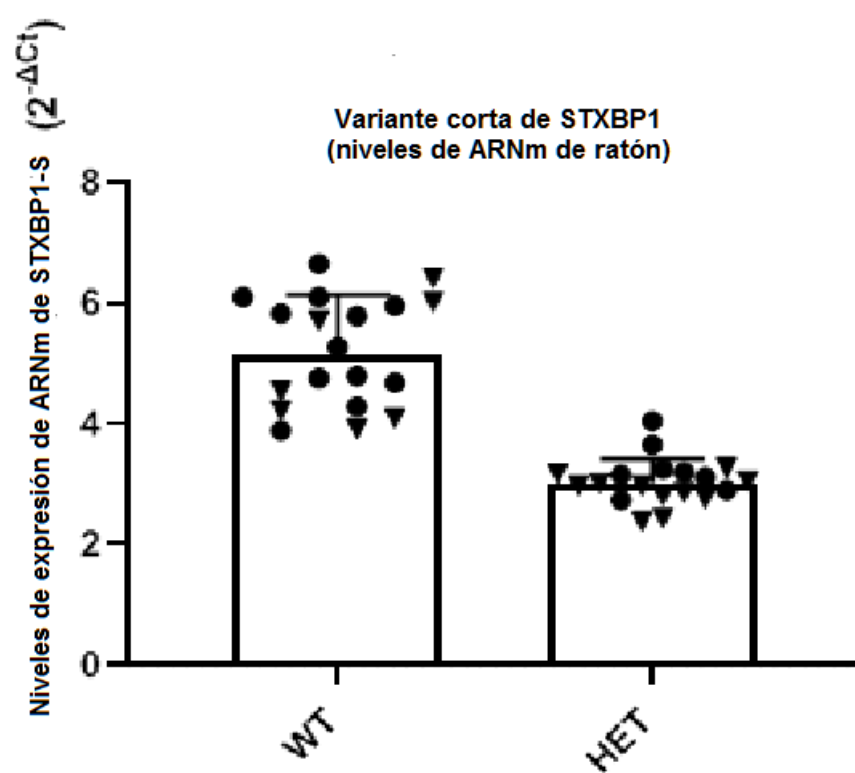
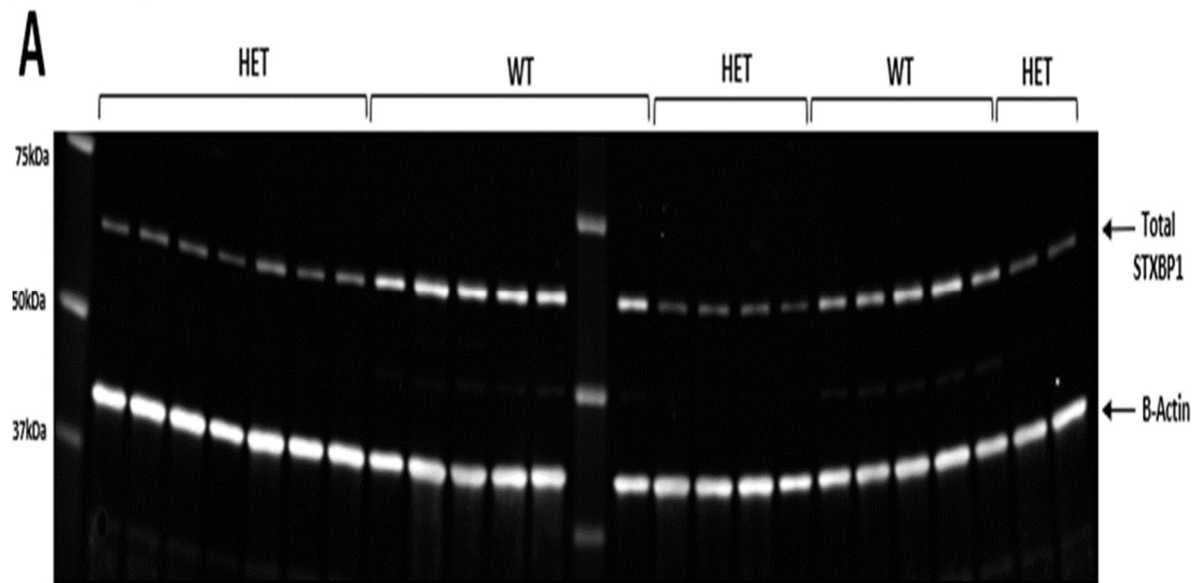


Figura 20



B

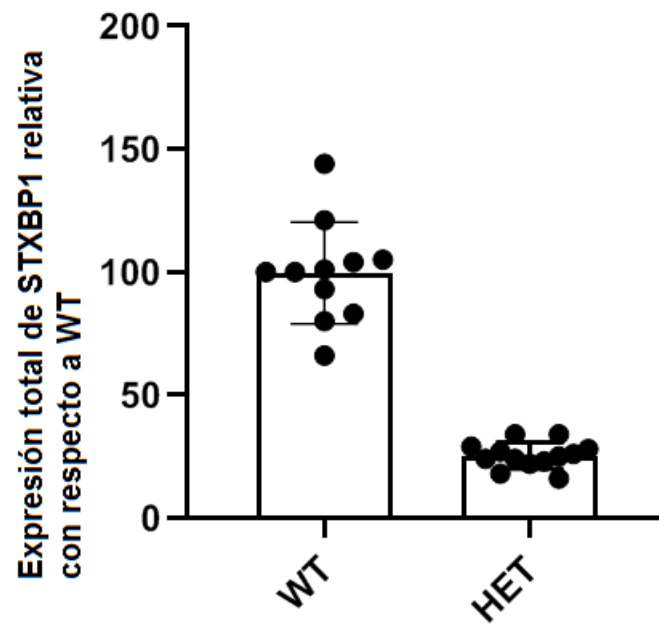
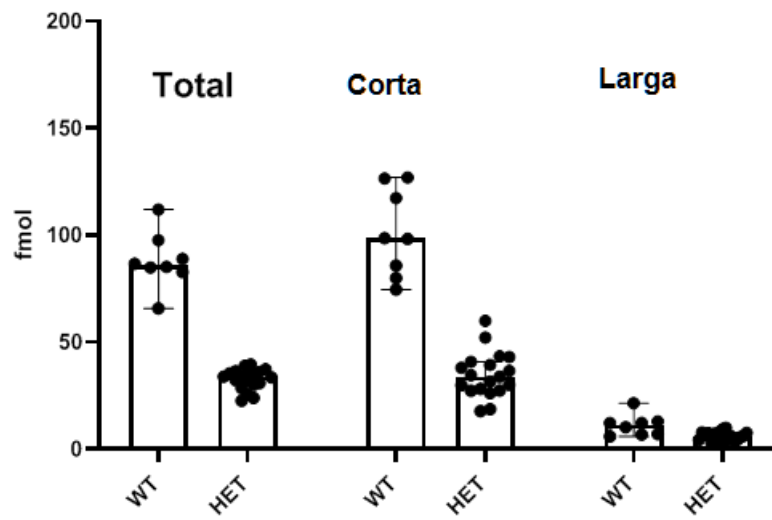


Figura 21

A



B

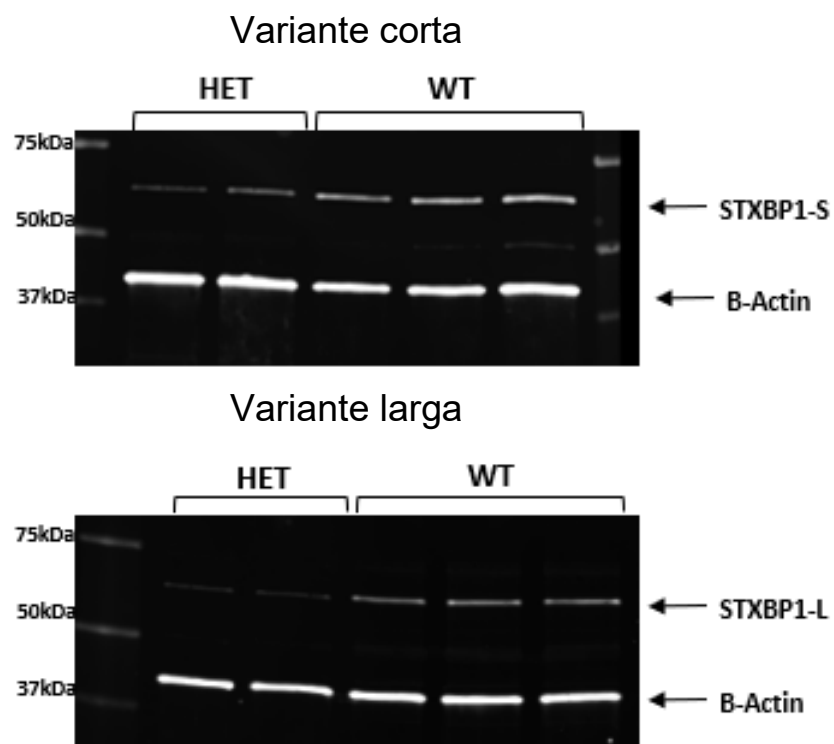


Figura 21 (continuación)

C

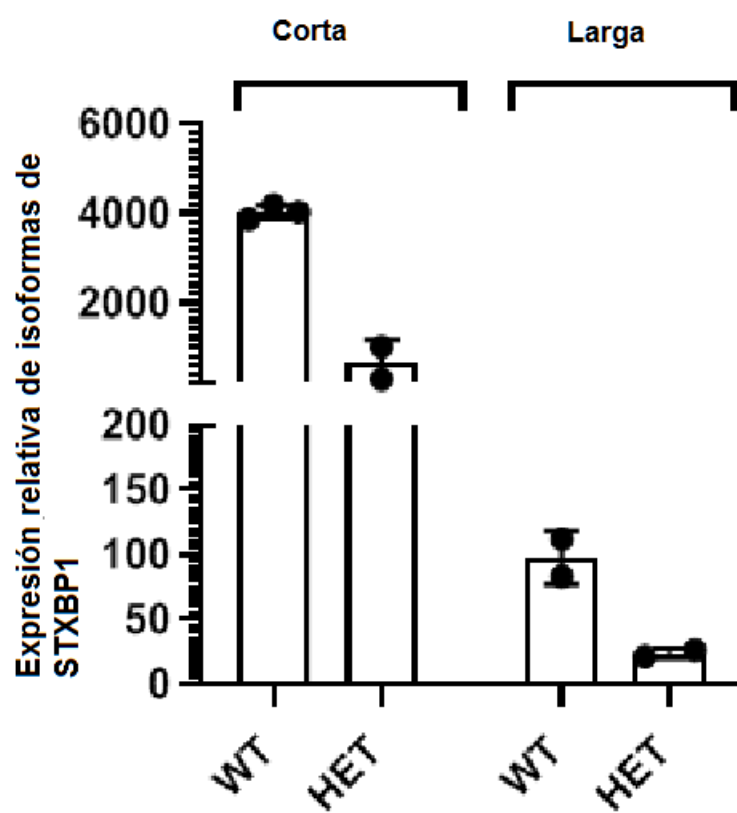


Figura 22

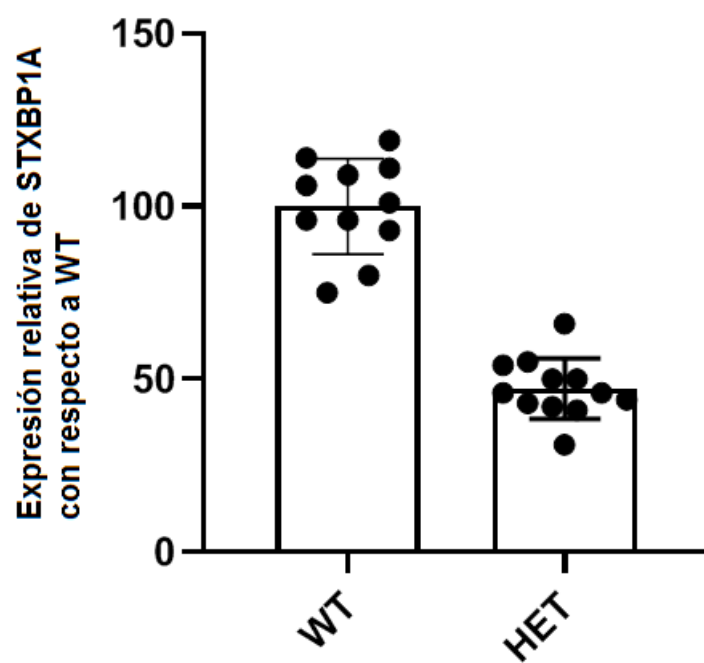
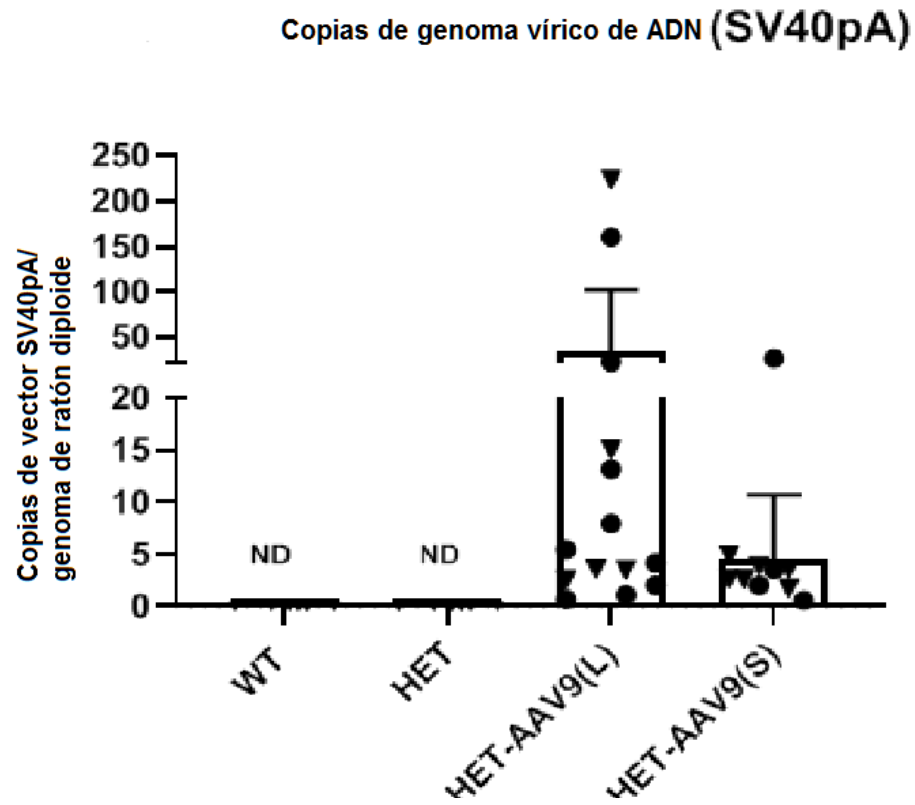


Figura 23

A



B

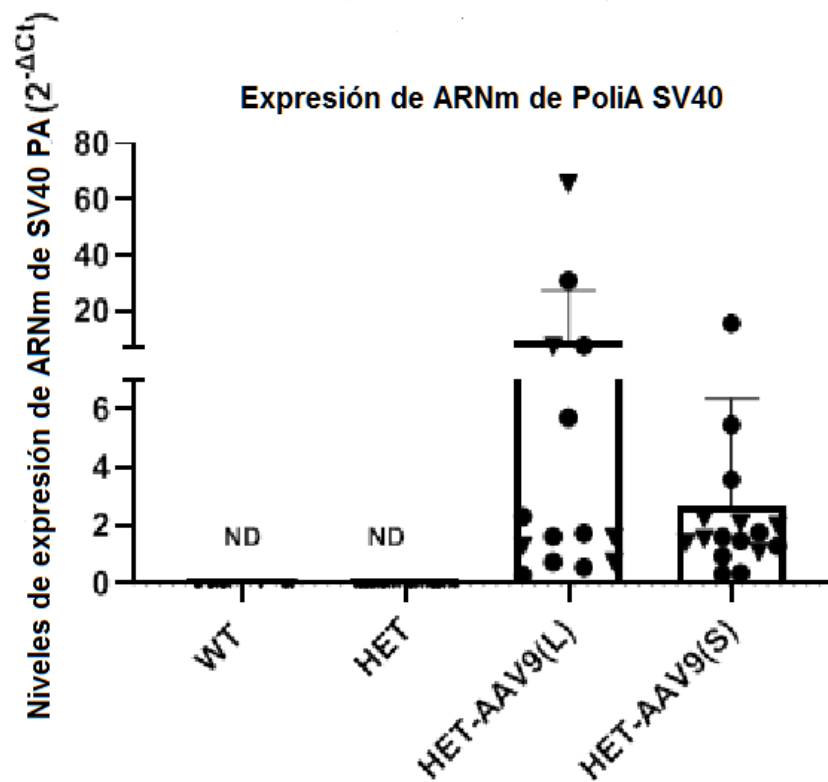


Figura 23 (continuación).

C

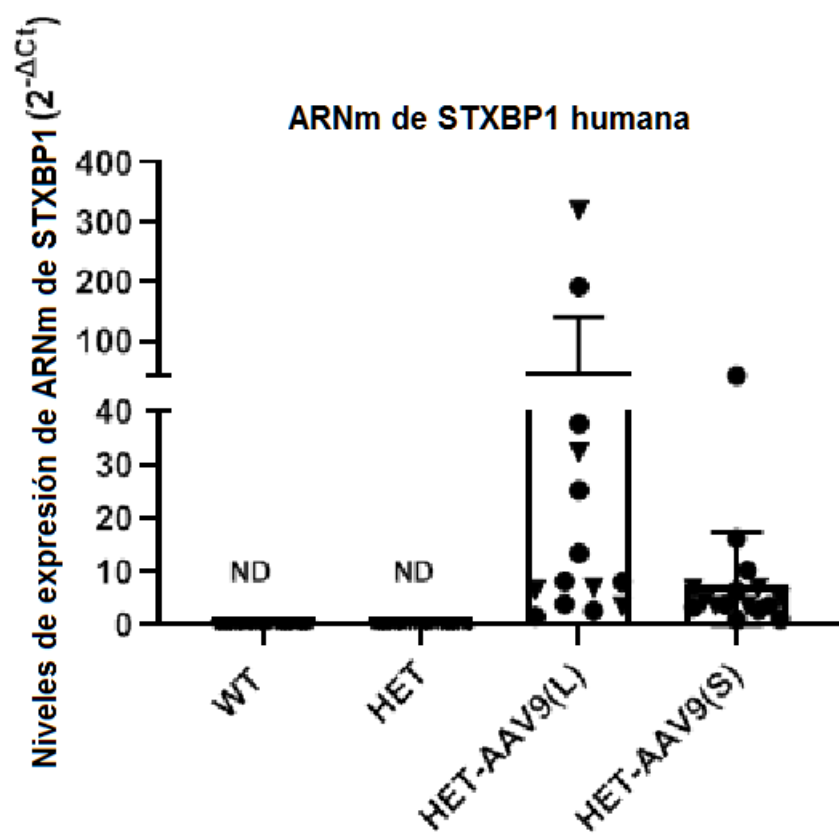
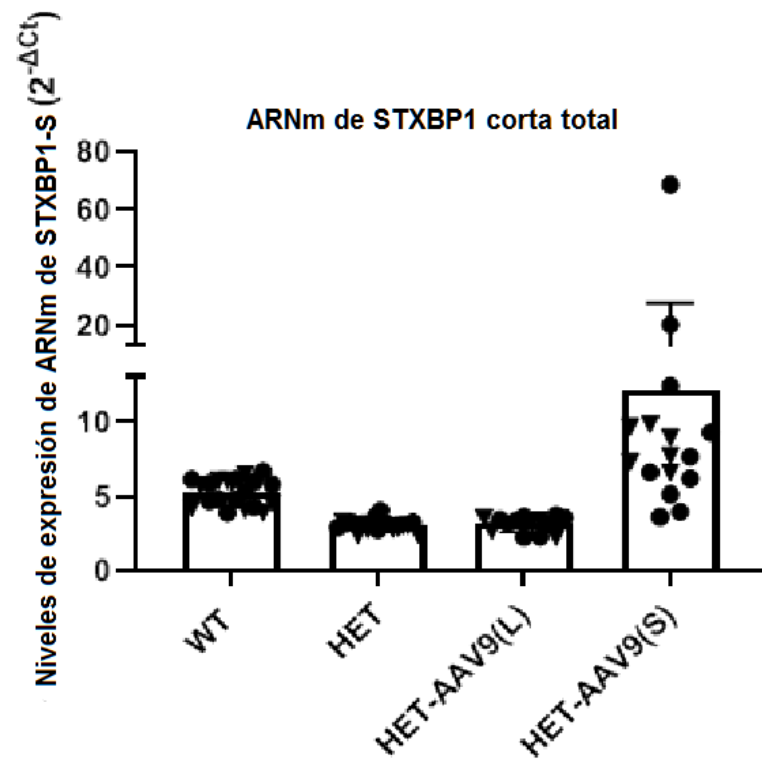


Figura 24

A



B

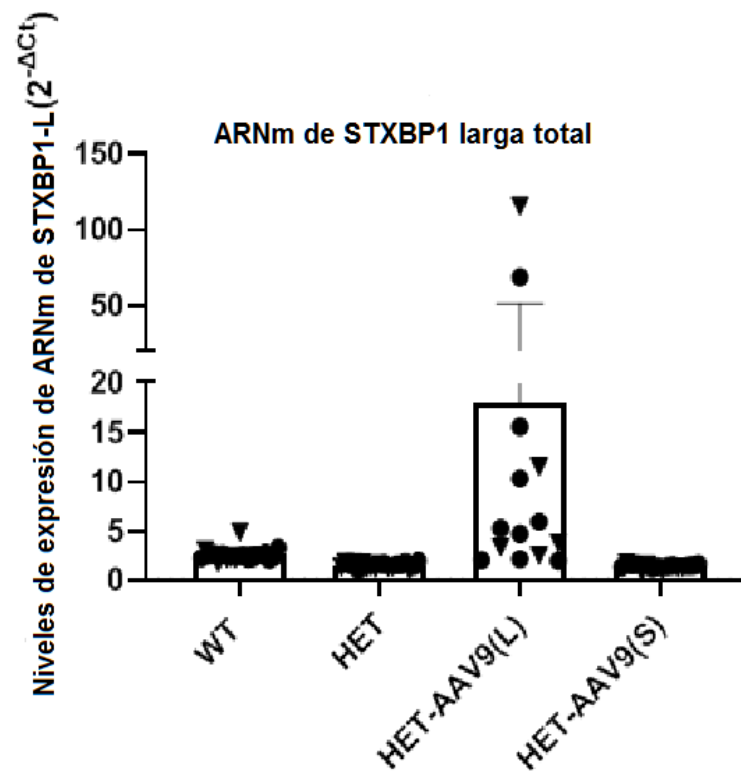
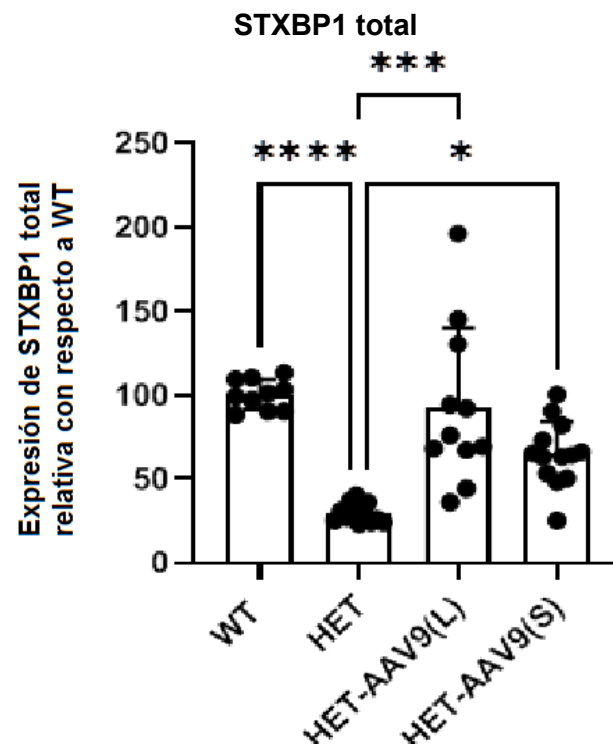


Figura 25

A



B

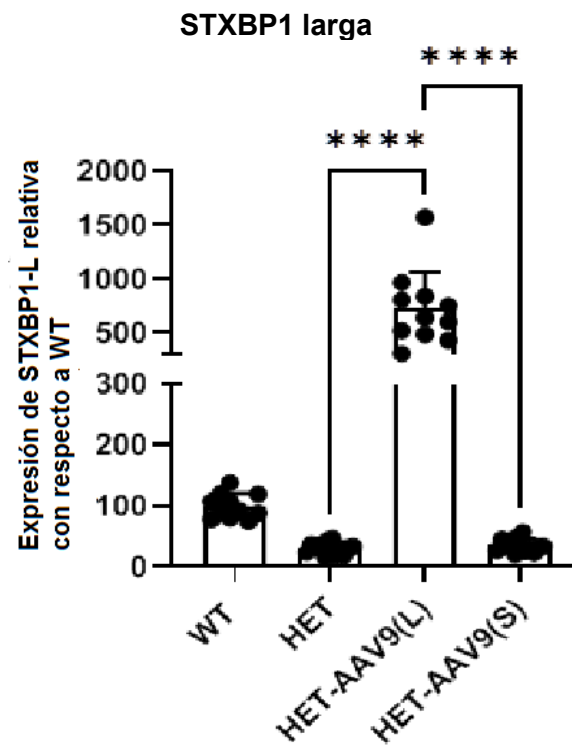
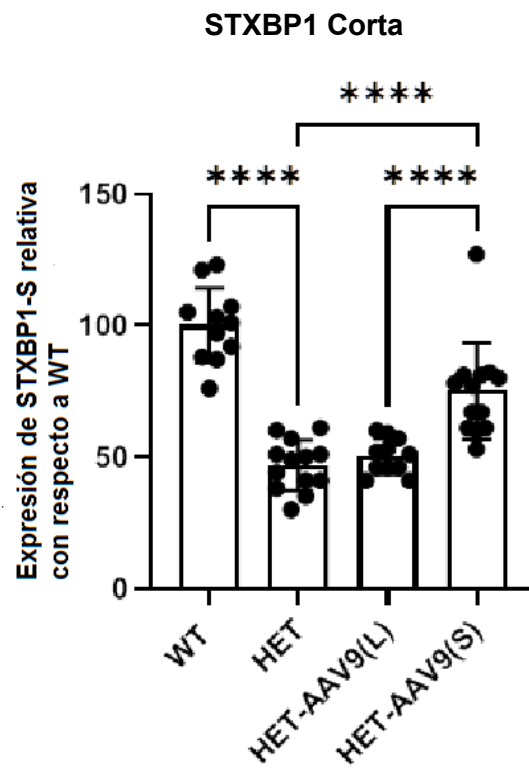


Figura 25 (continuación)

C



D

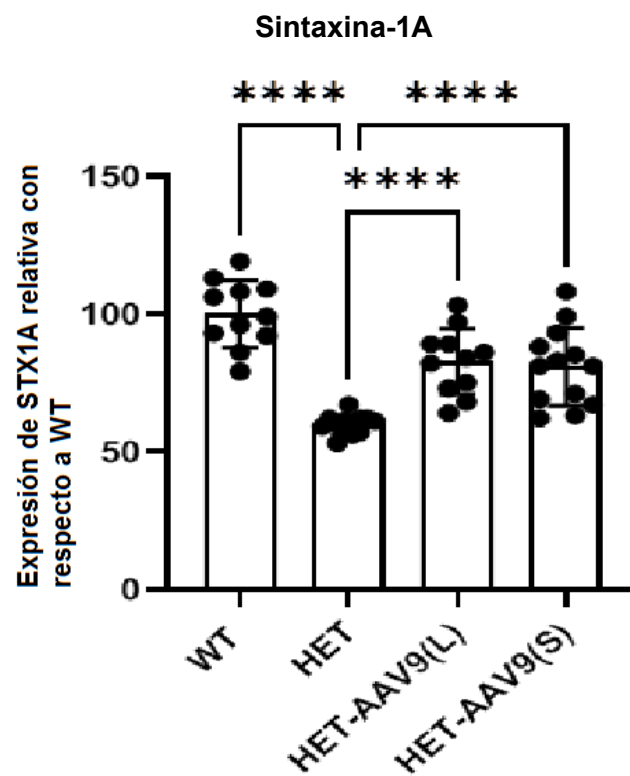


Figura 26

HET + AAV9 STXBP1_Long_HA



HET + PBS

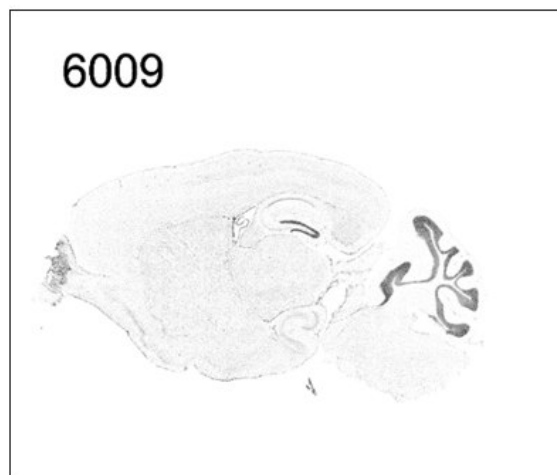
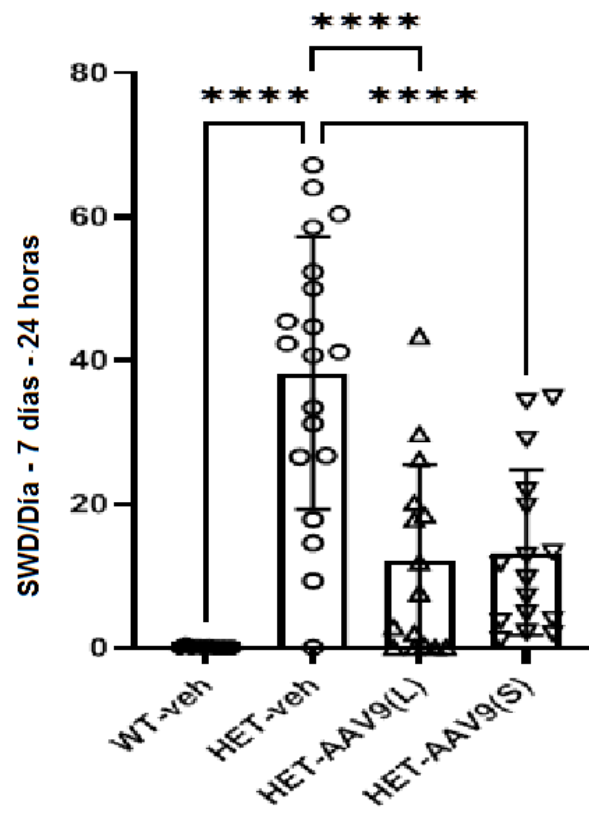


Figura 27.

A



B

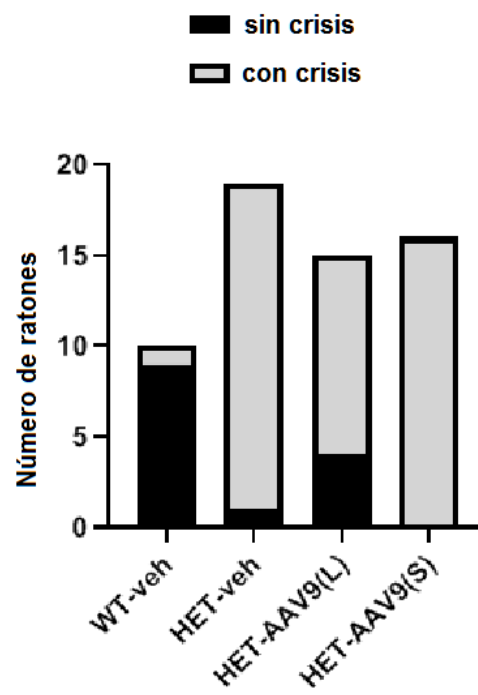
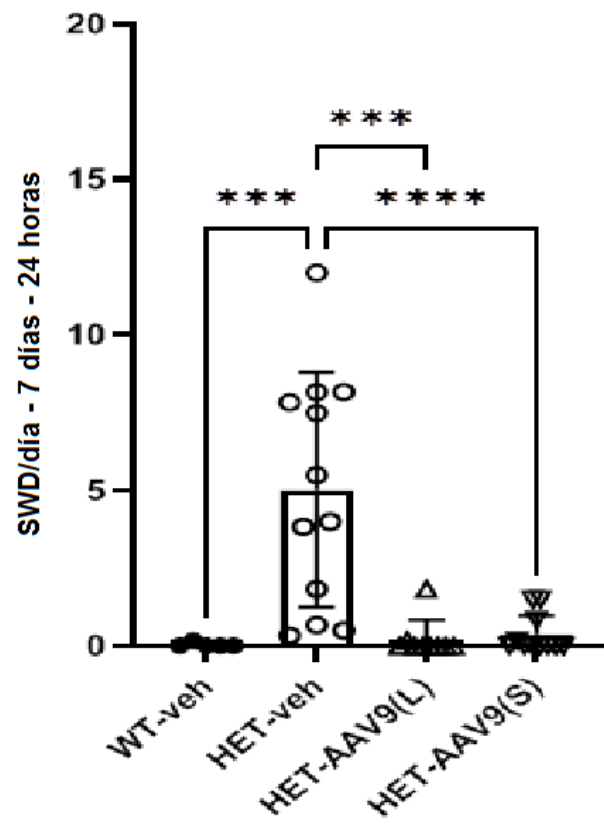


Figura 27 (continuación)

C



D

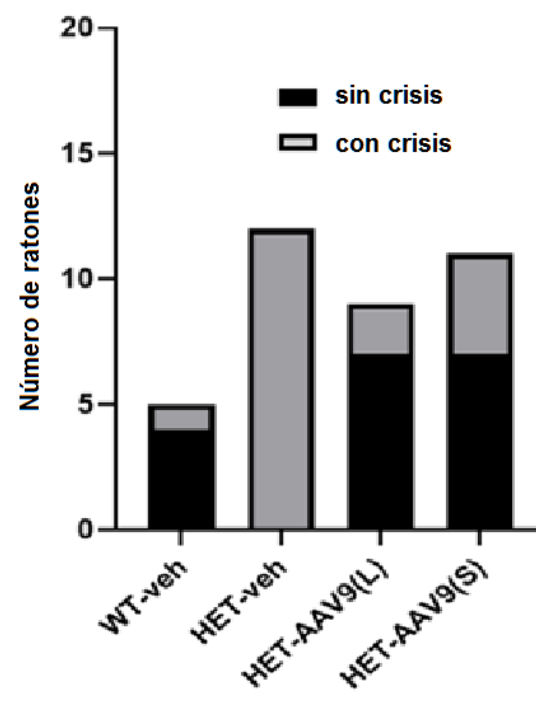
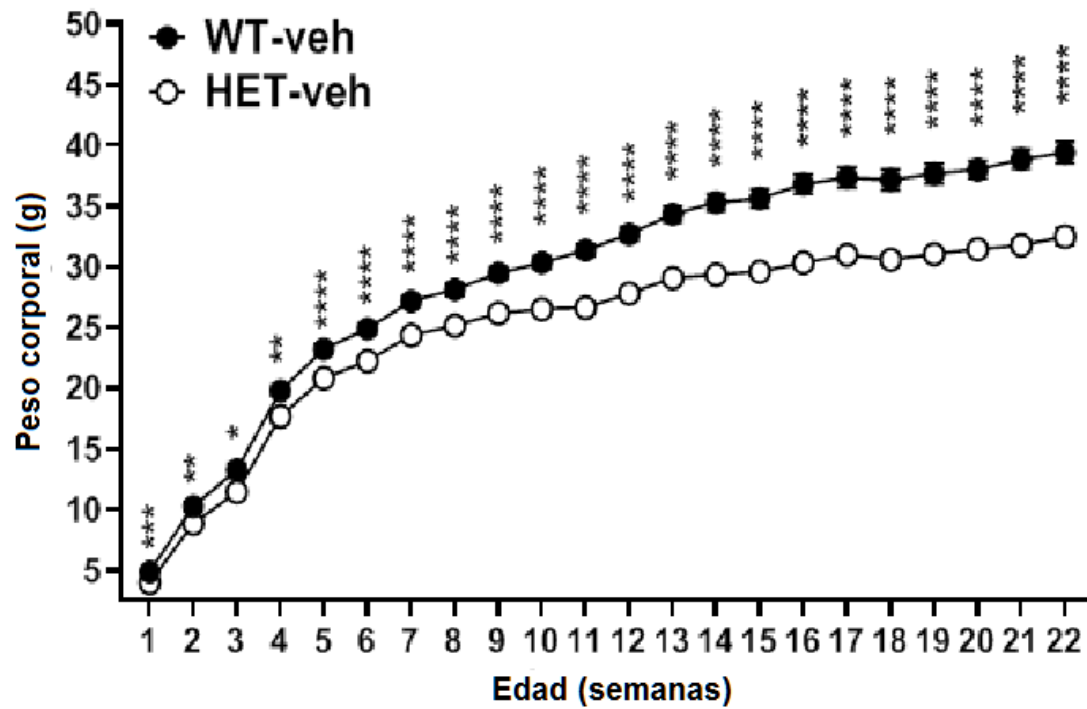


Figura 28

A



B

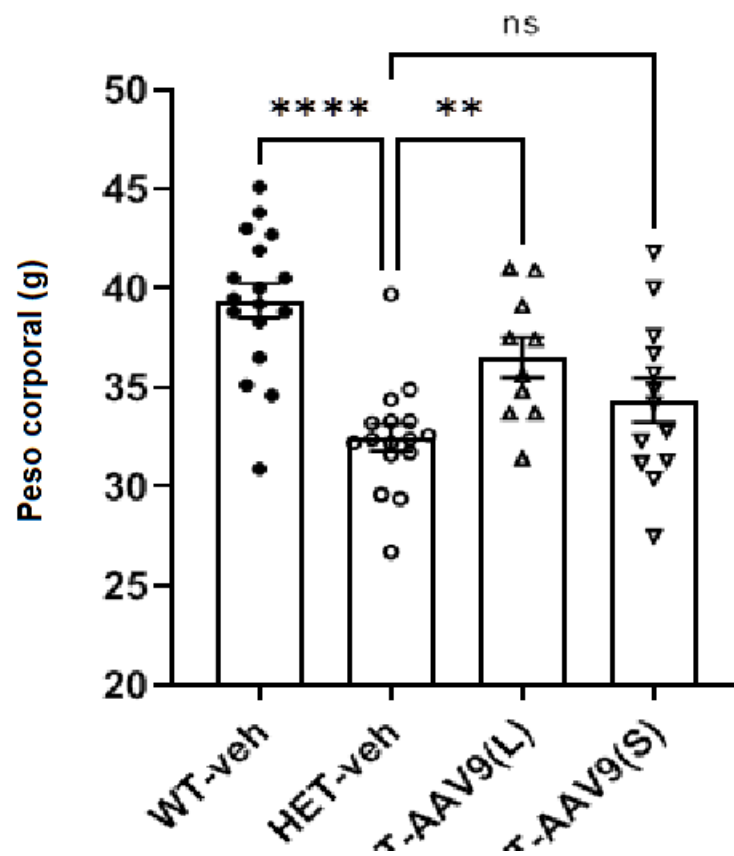
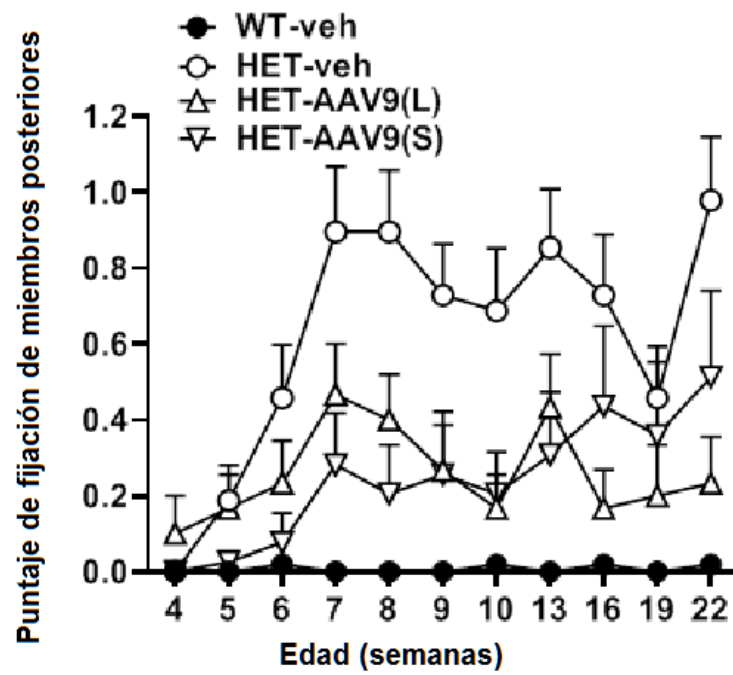


Figura 29
A



B

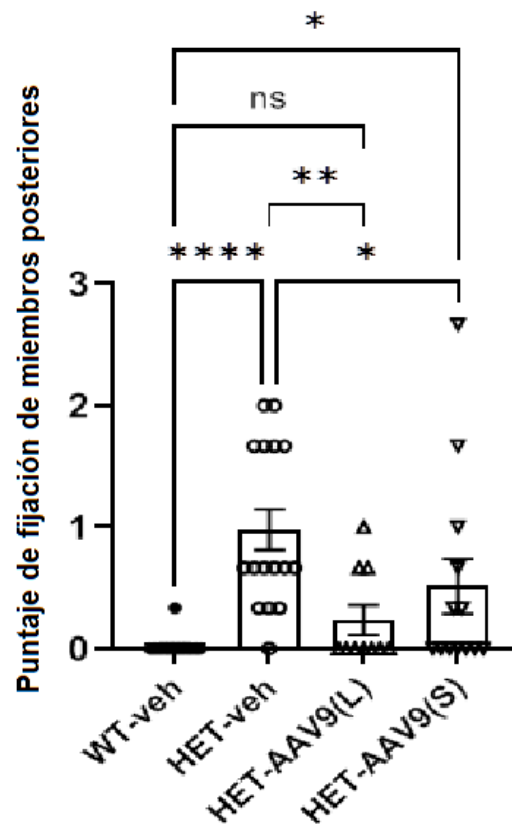


Figura 30

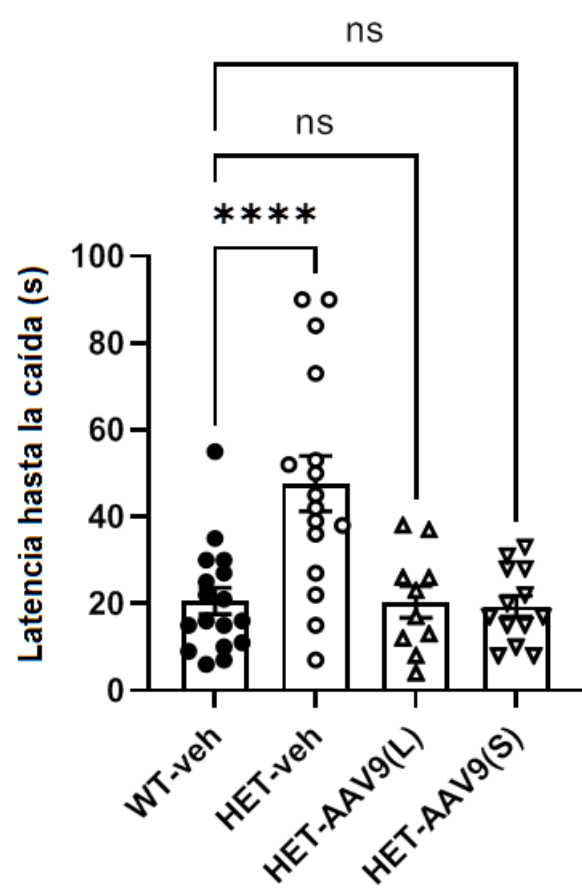
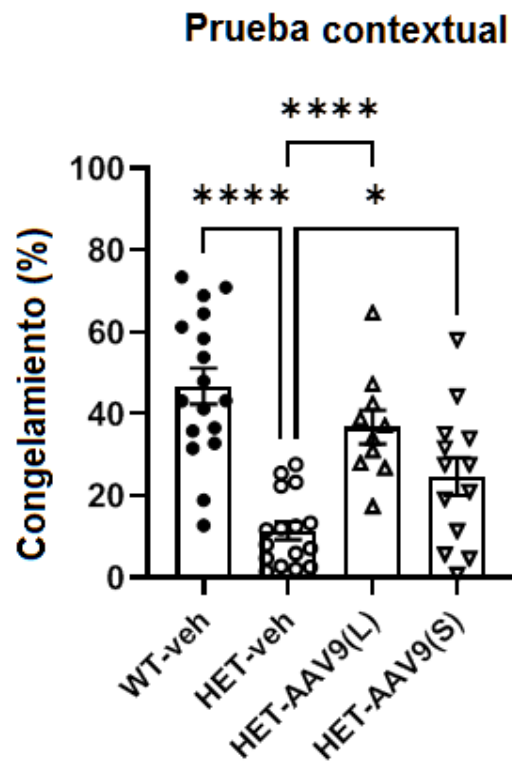


Figura 31
A



B

