

MÉTODO

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a métodos para reducir los efectos secundarios de los fármacos neuromoduladores, incrementar la eficacia de fármacos neuromoduladores y a métodos para reducir la excitabilidad de neuronas. La invención también se refiere a vectores de terapia génica útiles para llevar a cabo los métodos de la invención.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los trastornos neurológicos se caracterizan por una actividad anormal en las neuronas y circuitos dentro del sistema nervioso central (SNC). Con frecuencia, esta actividad anormal se transmite a las neuronas de salida del SNC, las neuronas motoras, lo que provoca contracciones musculares inapropiadas y disfunción sensitiva y motora.

Se han desarrollado terapias farmacológicas dirigidas a mejorar la actividad anormal típicamente mediante la modulación de los canales iónicos que transportan corrientes excitatorias e inhibitorias. Sin embargo, los fármacos suministrados al sistema nervioso es difícil y las terapias existentes suelen tener efectos secundarios indeseables debido a su baja especificidad.

Así, aunque los fármacos neuromoduladores desarrollados para trastornos neurológicos han mostrado algún beneficio terapéutico, éste se ha sido limitado por efectos no deseados en neuronas no disfuncionales y otros sistemas que expresan el objetivo (cardiovascular, respiratorio, gastrointestinal, etc.).

Canales de potasio (K^+) son proteínas de membrana que permiten el flujo rápido y selectivo de iones K^+ a través de la membrana celular, y así generando señales eléctricas en las células. Los canales de K^+ dependientes de voltaje (canales K_v), presentes en todas las células animales excitables, se abren y se cierran en

cambios en el potencial transmembrana. Los canales Kv son uno de los componentes clave en la generación y propagación de impulsos eléctricos en el sistema nervioso. Ante cambios en el potencial transmembrana, estos canales se abren y permiten el flujo pasivo de iones desde la célula para restaurar el potencial de membrana en reposo. La activación de canales Kv es por lo tanto considerada inhibitoria para la acción de generación de potencial.

Existen 40 genes de canales de potasio dependientes de voltaje en humanos, pertenecientes a 12 subfamilias (Kv1–Kv12). Estas subfamilias suelen estar restringidas a ubicaciones específicas o tipos celulares/tisulares y se observan tanto en tejidos excitables como no excitables. La notable diversidad de los canales Kv se debe a la combinación de sus subunidades. Dentro de cada una de las familias Kv1, Kv2, Kv3, Kv4 y Kv7, pueden formarse canales homoméricos y heteroméricos con un rango de propiedades funcionales. Los miembros de la familia Kv2 también pueden ensamblarse con miembros de las familias Kv5, Kv6, Kv8 o Kv9, con más patrones de expresión restringidos en el sistema nervioso y el músculo liso.

En los canales de potasio dependientes de voltaje en neuronas, se dirigen a varios compartimentos subcelulares, y pueden estar presentes canales con diferentes composiciones de subunidades en diferentes subpoblaciones de neuronas.

La estructura tetramérica de los canales Kv se conforma de dos dominios funcional y estructuralmente independientes: un poro de conducción iónica y dominios sensores de voltaje. El poro de conducción se conforma por cuatro subunidades las cuales están dispuestas simétricamente alrededor de la trayectoria de conducción. Los dominios sensores de voltaje se posicionan en la periferia del canal y consiste de cuatro segmentos transmembrana (S1-S4). La reorganización estructural de los dominios sensores de voltaje en respuesta a cambios en el potencial de membrana, y en particular de S4, que incluye aminoácidos cargados positivamente en cada tercera posición, produce cambios conformacionales en el poro de conducción, que pueden abrir u obstruir la trayectoria de conducción iónica. El mecanismo de activación por

voltaje aún no se comprende completamente.

La familia Kv7 de canales de potasio (K^+) dependientes de voltaje consisten de cinco miembros (Kv7.1-7,5) codificados por los genes KCNQ1-5, respectivamente. Los canales Kv7 se ensamblan como tetrámeros de subunidades α idénticas o compatibles, cada subunidad α que consiste de seis segmentos transmembrana (S1-S6) y extremos N- y C-terminales citoplasmáticos. El Kv7 se expresa ampliamente tanto en el SNC como en otros tejidos; con Kv7,2 y 7,3 en particular, se conocen por controlar la excitabilidad neuronal.

Los canales Kv7,2 y 7,3 normalmente forman heterómeros entre sí para incrementar la conductancia y son raramente expresados como homómeros de baja conductancia. Los canales Kv7,2 y 7,3 se expresan en la mayoría de los subtipos neuronales y tienden a localizarse en el segmento inicial del axón, donde se inician los potenciales de acción (espigas). Por lo tanto, las conductancias de Kv7,3 y Kv7,2 se consideran inhibidores particularmente potentes de la generación de potenciales de acción y de la actividad en la misma neurona, así como en sus objetivos (por ejemplo, la inhibición de las neuronas motoras reduce la actividad muscular).

Los fármacos neuromoduladores dirigidos a los canales Kv7 para tratar trastornos asociados a la hiperexcitabilidad neuronal. La retigabina es un anticonvulsivo que actúa principalmente como abridor de canales de potasio Kv7,2-Kv7,5 y, como modulador alostérico positivo del GABA a concentraciones altas. El término “abridor de canal” se refiere a un desplazamiento hacia la izquierda en la dependencia del voltaje para la apertura del canal, hacia potenciales más negativos. En presencia de retigabina, los canales Kv7 se abren a potenciales más negativos, contribuyendo así a la hiperpolarización de la membrana y a la estabilización del voltaje.

También se ha demostrado que la retigabina estabiliza el canal Kv7,2/7,3 (heteromérico) abierto, lo que ralentiza su desactivación con poco cambio en la dependencia del voltaje. El efecto general es una mayor conductancia de potasio, una

hiperpolarización del potencial de membrana y, por consiguiente, la inhibición de la generación del potencial de acción. Este efecto de la retigabina se observa a concentraciones inferiores a 10 μM , *in vitro* (Corbin-Leftwich et al., 2016; Villalba-Galea, 2020). La administración oral de retigabina a dosis de 600-1200 mg al día, que corresponde a una concentración plasmática media de 0,83 μM (Gunthorpe et al., 2012), ha demostrado una eficacia clínica de hasta el 45 % en la reducción de convulsiones en humanos con epilepsia (Brodie et al., 2010; French et al., 2011). Cabe destacar que, mientras el CE50 de retigabina es de 0.6 μM para los canales Kv7,3, la mayoría de los canales del sistema nervioso son heterómeros Kv7,2/7,3, cuya CE50 es de 1,6 μM . Para algunos pacientes, estas dosis resultan en decoloración del ojo y piel lo que conduce a restringir su indicación. Posteriormente, retigabina fue retirada voluntariamente por motivos comerciales (Brickel et al., 2020).

El interés farmacéutico en Kv7 como un objetivo terapéutica persiste. En al menos 3 activadores con potencia incrementada, selectividad incrementada por Kv7,2/7,3 y una carencia de efectos secundarios cosméticos se encuentran en ensayos clínicos y han mostrado resultados favorables. Sin embargo, debido a la ubicuidad de la expresión de Kv7,2/Kv7,3 en el sistema nervioso, los efectos secundarios neuronales (somnolencia, fatiga, etc.) son actualmente inevitables. Si bien los nuevos activadores de Kv7,2/7,3 presentan mejores perfiles de seguridad, los efectos secundarios neuronales solo pueden reducirse aumentando la selectividad exclusivamente por las neuronas disfuncionales.

La quimiogenética es un método mediante el cual se diseñan por ingeniería proteínas para interactuar con activadores químicos de moléculas pequeñas previamente desconocidos. Desde la década de 1990, se han desarrollado numerosas plataformas quimiogenéticas que han sido desarrolladas que han sido particularmente útiles para los neurocientíficos que desean modular la actividad neuronal en poblaciones específicas. Varias clases de proteínas se han diseñado por ingeniería de esta manera que incluye enzimas cinasas, no cinasa, canales iónicos activados por

ligandos y receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Las más utilizadas ampliamente se conocen como receptores diseñados activados por fármacos diseñados (DREADD).

Los DREADD son GPCR diseñados por ingeniería para responder a ligandos sintéticos que cruzan la barrera hematoencefálica (tal como el N-óxido de clozapina y la olanzapina), pero no a su ligando natural, la acetilcolina.

En uso, un inserto del vector viral el gen que codifica la proteína DREADD en la célula para ser estudiada. Se pueden utilizar diversos serotipos virales, promotores y rutas de administración para seleccionar las células objetivo. Una vez transducida, la célula infectada toma dos o tres semanas en expresar la proteína receptora diseñada por ingeniería la cual entonces será activada usando un ligando DREADD. De esta manera, la actividad puede ser modulada específicamente en las neuronas objetivo, con una mínima influencia en las células fuera de objetivo.

Aquí se describe un método similar al empleado por los DREADD, en el cual se expresa un canal iónico sensible a fármacos específicos en las neuronas para modular su actividad. Cabe destacar que este método invierte el concepto actual de forma importante, el método cambia el concepto existente de diseñar específicamente emparejados de receptores novo, y fármaco y reutiliza canales iónicos de tipo silvestre y mutantes para reducir o eliminar los efectos secundarios de los fármacos que actúan sobre los canales. El método expresa positivamente canales de tipo silvestre o mutados.

Además, el método descrito beneficiosamente usa canales que pueden ser ya sea abiertas (agonistas) o cerradas (antagonistas) dependiendo del fármaco utilizado. En contraste directo, la activación de DREADD induce cambios unidireccionales en la excitabilidad (ya sean excitatorios o inhibitorios).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente descripción se refiere a un método quimiogénético que permite

modular la actividad en neuronas objetivo, así aumentando la eficacia de los fármacos mientras se reducen sus efectos secundarios, al menos en parte, debido a la capacidad para utilizar una dosis menor. El método involucra usar una metodología de terapia génica mediante un vector de suministro (por ejemplo, AAV) para expresar positivamente (regular positivamente) un canal iónico terapéutico en neuronas objetivo, de modo que la conductancia del canal (y, por lo tanto, la actividad neuronal) pueda modularse con dosis bajas de fármacos activadores e inhibidores específicos. Es decir, el método aumenta específicamente la sensibilidad de las neuronas disfuncionales a los fármacos moduladores.

Se ha mostrado que la expresión positiva, mediada por AAV, del canal de potasio dependiente de voltaje Kv7,3 (codificado por KCNQ3) permite que un activador de Kv7, tal como la retigabina, para reducir significativamente la excitabilidad de las neuronas humanas, tanto a nivel de neurona individual y poblacional. A bajas concentraciones (0,3-3 μ M), la retigabina redujo el número de potenciales de acción en neuronas sensoriales y motoras derivadas de hPSC individuales. A las mismas dosis, la retigabina tiene un efecto mínimo en las neuronas control que expresan únicamente proteína fluorescente verde (GFP). Usando matrices de multielectrodos, hemos mostrado que la retigabina fue también efectiva en la actividad explosiva espontánea de reducir selectivamente de una red de miles de neuronas motoras (MN) que expresa positivamente Kv7,3, pero no en neuronas que expresan GFP. Los resultados in vitro se tradujeron a un modelo de ratón de espasticidad, en el cual las MN hiperactivas provocan contracciones musculares excesivas (espasmos musculares). En este modelo, la expresión positiva de Kv7,3 en neuronas motoras mediante inyección intramuscular de un constructo AAV-Kv7 permitió que una dosis baja de retigabina (2 mg/kg) para reducir la intensidad y la duración de los espasmos musculares. Sin embargo, la misma dosis no redujo significativamente la espasticidad en ratones inyectados con un constructo AAV-GFP. Se confirmó que la reducción de la excitabilidad de MNs se confirmó como el mecanismo para la reducción en

espasticidad, como 3 μ M de retigabina reducida en disparo de AP en Kv7,3 que expresa en neuronas motoras de ratón, pero no en aquellas que expresan GFP. Adicionalmente, se ha mostrado que la introducción de una mutación puntual en el residuo de aminoácido 315 (Zaika et al., 2008; Gómez-Posada et al., 2010) de la proteína Kv7,3 reduce la excitabilidad de neurona motora en el valor de referencia in vitro e in vivo, e incrementa aún más los tamaños de efecto de la retigabina a las concentraciones probadas in vitro.

La terapia utilizará AAV para expresa positivamente subunidades del canal iónico Kv7,3 y sus variaciones de las mismas, ya sea como homómeros o heterómeros Kv7,2 /7,3, en neuronas hiperexcitables de pacientes con trastornos neurológicos, y utilizará dosis bajas de moduladores del canal para normalizar la actividad.

De conformidad con un primer aspecto, se proporciona un método para incrementar la eficacia de un fármaco neuromodulador que comprende los siguientes pasos:

- a. introducir una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad del canal iónico Kv7,3 que comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID.1 a SEQ ID.8 o una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la subunidad del canal iónico Kv7,3 de cualquiera de las SEQ ID.9 a SEQ ID.16 a una neurona objetivo mediante un vector,
- b. expresa positivamente la subunidad del canal iónico en la neurona objetivo de manera que forma canales iónicos funcionales, y
- c. administrar una dosis menor del fármaco neuromodulador.

Ventajosamente, al incrementar la eficacia del fármaco, se puede administrar una dosis menor para obtener el mismo efecto terapéutico. Esto, beneficiosamente, significa que la ocurrencia de efectos secundarios se pueden reducir.

Así, en un segundo aspecto se proporciona un método para reducir los efectos secundarios de un fármaco neuromodulador que comprende los siguientes pasos:

a. introducir una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad del canal iónico Kv7,3 que comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID.1 a SEQ ID.8 o una secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la subunidad del canal iónico Kv7,3 de cualquiera de las SEQ ID.9 a SEQ ID.16 a una neurona objetivo mediante un vector,

b. expresa positivamente la subunidad del canal iónico en la neurona objetivo de manera que forma canales iónicos funcionales, y

c. administrar una dosis menor del fármaco neuromodulador.

Los efectos secundarios de los fármacos neuromoduladores pueden variar de menor a serios y pueden afectar la calidad de vida del paciente. Por ejemplo, para retigabina, los NIH enumeran los efectos adversos más comunes, que se presentan en más del 10 % de los sujetos en los ensayos clínicos, incluyen paso anormal, confusión, mareo, fatiga, dolor de cabeza, náuseas, somnolencia, trastornos del habla, temblor, infección del tracto urinario y visión borrosa (Harris y Murphy, 2011).

En algunos casos, los efectos secundarios (efectos adversos) pueden llevar a la retirada de fármacos del mercado, ya que la dosis necesaria produce efectos adversos inaceptables. Si se reduce la dosis, se pueden disminuir los efectos adversos y, potencialmente, reducir el uso del fármaco puede potencialmente ser restaurado.

En un tercer aspecto se proporciona un método para incrementar el índice terapéutico de un fármaco neuromodulador que comprende los pasos:

a. introducir una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad del canal iónico Kv7,3 que comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID.1 a SEQ ID.8 o una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la subunidad del canal iónico Kv7,3 de cualquiera de las SEQ ID.9 a SEQ ID.16 a una neurona objetivo mediante un vector,

b. expresa positivamente la subunidad del canal iónico en la neurona objetivo de manera que forma canales iónicos funcionales, y

c. administrar el fármaco neuromodulador.

Un cuarto aspecto proporciona un vector de terapia génica que comprende una secuencia de nucleótido que codifica una subunidad del canal iónico Kv7,3 que comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID.1 a SEQ ID.8 o una secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de aminoácido de la subunidad del canal iónico Kv7,3 de cualquiera de las SEQ ID.9 a SEQ ID.16, en donde, cuando el vector transduce una neurona objetivo, la expresión de la subunidad del canal iónico Kv7,3 se regula a la alza y se forman canales iónicos funcionales.

Ventajosamente, el suministro de la secuencia de nucleótido a una población de neuronas objetivo específicos resulta en que la carga útil de nucleótidos sólo se transduce en las neuronas que exhiben una excitabilidad incrementada. Estas neuronas expresa positivamente los canales iónicos, lo que proporciona más objetivos para los fármacos neuromoduladores los cuales, a su vez, permite que una dosis menor del fármaco para ser efectivo, resultando en menos efectos secundarios. Dirigir las neuronas de esta manera también significa que la actividad fuera de objetivo es menos probable.

En un quinto aspecto se proporciona un vector de terapia génica de partículas virales AAV que comprende:

- a. una cápside de AAV que transduce selectivamente las neuronas objetivo, y
- b. una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad del canal iónico Kv7,3 que comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID.1 a SEQ ID.8 o una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la subunidad del canal iónico Kv7,3 de cualquiera de las SEQ ID.9 a SEQ ID.16, en donde, cuando el vector transduce las neuronas objetivo, se regula positivamente la expresión de la subunidad del canal iónico Kv7,3 y se forman canales iónicos funcionales.

En otro aspecto, se proporciona un vector de terapia génica que comprende una cápside de AAV que transduce selectivamente las neuronas objetivo y una

secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad del canal iónico Kv7,3 que comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID.1 a SEQ ID.8 o una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la subunidad del canal iónico Kv7,3 de cualquiera de las SEQ ID.9 a SEQ ID.16, para su uso en la regulación positiva de la expresión de la subunidad del canal iónico Kv7,3 por la neurona objetivo de manera que forme canales iónicos funcionales en un sujeto que tiene un trastorno neurológico asociado con una excitabilidad neuronal incrementada.

En un aspecto adicional, se proporciona un vector de terapia génica que comprende una cápside de AAV que transduce selectivamente las neuronas objetivo y una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácido de subunidad del canal iónico Kv7,3 de cualquiera de las SEQ ID.1 a SEQ ID.8 o una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácido de la subunidad del canal iónico Kv7,3 de cualquiera de las SEQ ID.9 a SEQ ID.16, para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno neurológico, en donde, una vez que el vector ha transducido la neurona objetivo, la expresión del canal iónico Kv7,3 por la neurona objetivo se regula positivamente, de modo que se puede administrar efectivamente una dosis inferior de un fármaco neuromodulador al sujeto.

En otro aspecto, se proporciona el uso de un vector de terapia génica que comprende una secuencia de nucleótido que codifica una subunidad del canal iónico Kv7,3 que comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID.1 a SEQ ID.8 o una secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la subunidad del canal iónico Kv7,3 de cualquiera de las SEQ ID.9 a SEQ ID.16 en la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento de un trastorno neurológico asociado con una excitabilidad incrementada de las neuronas, tal como en donde el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en: epilepsia, espasticidad, BNFS, enfermedad de Parkinson, dolor nociceptivo y dolor no nociceptivo, ELA.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Para una mejor comprensión de la invención y para mostrar cómo puede llevarse a la práctica, a continuación se describirán, a modo de ejemplo únicamente, modalidades, métodos y procesos de conformidad con la presente invención con referencia a los dibujos adjuntos en los cuales:

La figura 1 muestra los constructos de AAV utilizados para la transducción de neuronas con Kv7,3 (constructo superior) o Kv7,3 A315T (constructo inferior). Nótese que se incluyó una secuencia de GFP corriente abajo de Kv7,3 y Kv7,3 A315T mediante enlazadores T2A, lo que significa que la fluorescencia de GFP indica la expresión de Kv7,3.

La figura 2 muestra que la transducción AAV de neuronas hIPSC mediante induce a la expresión de proteínas codificadas por transgenes empaquetados en los constructos AAV (A). Específicamente, en el ejemplo presentado, se transdujeron neuronas hIPSC con AAV para inducir la expresión de ya sea la proteína fluorescente verde (AAV-GFP) o de los canales Kv7,3 humanos y GFP (AAV-Kv7,3).

La figura 2 muestra también los puntos finales evaluados usando electrofisiología de fijación en parche en el valor de referencia (expresión de Kv7,3 o GFP sin fármaco activador (B) y siguiendo la exposición al activador (retigabina, C). Los puntos finales evaluados son: reobase (entrada de corriente mínima para evocar un potencial de acción), número de potenciales de acción a 3x la reobase y potencial de membrana en reposo. En la presencia de retigabina, la excitabilidad neuronal se reduce como se muestra por un incremento en la reobase, una disminución en el número de potenciales de acción a 3x de reobase y la hiperpolarización del potencial de membrana en reposo.

La figura 3 muestra que la expresión positiva del valor de referencia de Kv7,3 no altera significativamente la excitabilidad de las neuronas sensoriales hIPSC en comparación con las neuronas control transducidas con AAV-GFP. El panel (A) muestra el número medio de potenciales de acción generados para cada valor de

entrada para AAV-GFP (línea discontinua) y AAV-Kv7,3 (línea continua). Las áreas sombreadas muestran los intervalos de confianza del 95 %. Se determinó que los niveles de excitabilidad eran similares debido a los tamaños del efecto extremadamente pequeños medidos por Aps/500 ms (B), el RMP (C) y reobase (D). En estos gráficos de estimación de Cummings, cada punto representa el número de potenciales de acción generados a 3x la reobase en las neuronas transducidas con AAV-GFP (gris ligero) o AAV-Kv7,3 (gris oscuro). En el lado derecho del gráfico, se representan los tamaños del efecto G de Hedges y los intervalos de confianza del 95 % para datos remuestreados mediante carga inicial de programas (1000 repeticiones).

La figura 4 muestra que la retigabina suministrada a una concentraciones de 0,3 μ M, 1 μ M y 3 μ M tiene un efecto limitado en la excitabilidad de las neuronas sensoriales hIPSC transducidas con AAV-GFP, como se determinó midiendo el número de potenciales de acción a 3x la reobase. Sin embargo, se midieron tamaños del efecto de gran magnitud a las mismas concentraciones en las neuronas transducidas con AAV-Kv7,3. En cada una de las gráficas de estimación (A, B y C), las gráficas superiores son líneas que representan el cambio en el número AP entre los registros realizados antes y después de la exposición a la retigabina. Las gráficas inferiores muestran los tamaños del efecto G de Hedges e intervalos de confianza.

La figura 5 muestra que la retigabina suministrada a concentraciones de 0,3 μ M, 1 μ M y 3 μ M, tiene efectos limitados sobre la excitabilidad de las neuronas sensoriales hIPSC transducidas con AAV-GFP, como se determinó mediante la medición de la reobase (corriente mínima para generar un potencial de acción). Sin embargo, se midieron los tamaños de efecto de gran magnitud a las mismas concentraciones en las neuronas transducidas con AAV-Kv7,3.

La figura 6 muestra que la retigabina suministrada a concentraciones de 0,3 μ M, 1 μ M y 3 μ M, tiene efectos pequeños y moderados sobre la excitabilidad de las neuronas sensoriales hIPSC transducidas con AAV-GFP, como se determinó mediante la medición del potencial de membrana en reposo (PMR). Sin embargo, se midieron

tamaños de efectos grandes y muy grandes a las mismas concentraciones en las neuronas transducidas con AAV-Kv7,3.

La figura 7 muestra que la expresión del valor de referencia de Kv7,3_{A315T} (línea discontinua) reduce significativamente la excitabilidad de las neuronas sensoriales hIPSC. Se mostró una disminución en los niveles de excitabilidad debido a la incapacidad de las neuronas transducidas con AAV-Kv7,3_{A315T} para generar más de 3 potenciales de acción (A, B). El RMP también se encontraba hiperpolarizado en el valor de referencia (C), pero la reobase no presentó cambios sustanciales (D).

La figura 8 muestra que la retigabina suministrada a concentraciones de 0,3 μ M, 1 μ M y 3 μ M causó aumentos muy grandes en la reobase de las neuronas transducidas con AAV-Kv7,3_{A315T}. La magnitud del efecto fue al menos 2-3 veces mayor para AAV-Kv7,3_{A315T} en comparación con AAV-GFP. Obsérvese la diferencia de escala tanto para la reobase (eje primario) como para el tamaño del efecto g de Hedges apareado (eje secundario).

La figura 9 muestra que la retigabina suministrada a concentraciones de 0,3 μ M, 1 μ M y 3 μ M causó efectos muy grandes en la hiperpolarización del RMP de las neuronas sensoriales hIPSC transducidas con AAV-Kv7,3_{A315T}. Los tamaños del efecto, también son al menos 2-3 veces más grandes que en las neuronas hIPSC transducidas con AAV-GFP.

La figura 10 muestra la expresión positiva de Kv7,3 en neuronas motoras derivadas de hIPSC mediante manchado Western (A) y ELISA (B). Obsérvese que las bandas fuertes alrededor de 80 kDa.

La figura 11 muestra que la expresión positiva de Kv7,3 en neuronas motoras derivadas de hIPSC induce una pequeña reducción del valor de referencia en la relación frecuencia-corriente (A-B); sin embargo, la generación de potenciales de acción a 3x de reobase (C) y reobase (D) no se vio afectada. (E-H) La expresión positiva de Kv7,3 aumentó la sensibilidad de las MNs de hIPSC a retigabina. Las concentraciones bajo 3 μ M no afectaron la excitabilidad de las neuronas transducidas

con AAV-GFP, pero redujeron la generación de AP hasta en un 80 % en las neuronas transducidas con AAV-Kv7,3. La expresión positiva de Kv7,3 también incrementó la eficacia de la retigabina, como lo demuestra el aumento en los efectos máximos sobre la frecuencia de PA (G) y traslape de FI (H).

La figura 12 muestra que la expresión positiva de Kv7,3 aumenta la sensibilidad de las MN a RTG a nivel poblacional, como se midió usando una placa de arreglo de microelectrodos (MEA). Las MN de hPSC se cultivan en una placa de cavidades con electrodos grabados de modo que la actividad espontánea se puede registrar. El 50 % de los cavidades se tratan con AAV-GFP y el 50 % con AAV-Kv7,3. Tras un tiempo de transducción suficiente, se registra la actividad espontánea en el valor de referencia (0 μ M) y posteriormente con concentraciones incrementadas de RTG. La RTG no afecta la viabilidad de las neuronas motoras, evaluada mediante la impedancia del electrodo (A). Sin embargo, las MN tratadas con RTG muestran una mayor sensibilidad a RTG como es evidenciada por el desplazamiento hacia la izquierda en la curva de respuesta a la dosis para retigabina y la frecuencia de ráfagas de potenciales de acción espontáneos (B), la duración de las ráfagas (C) o el número total de espigas. Los ejemplos representativos mostrados E-F de la actividad registrada en cavidades tratados con AAV-GFP (E) o AAV-Kv7,3 (F) después de la adición de 1.8 μ M de RTG. Las líneas verticales en los paneles superiores indican la frecuencia de ráfagas de la red. Abajo se muestran diagramas de puntos de la actividad de los potenciales de acción registrados por cada uno de los 16 electrodos (filas). Los ejemplos representativos G-H muestran explosiones individuales de MNs en cavidades tratadas con AAV-GFP (G) o AAV-Kv7,3 (H). Cada fila es la actividad de acción registrada por un único electrodo. A la derecha de cada gráfico se muestra una leyenda de calor que indica el cambio en la frecuencia de acción.

La figura 13 muestra que, en un modelo neonatal de ratón con espasticidad inducida por lesión medular, se puede lograr la expresión positiva de Kv7,3 en neuronas motoras tras la inyección intramuscular de AAV-Kv7,3. (A) Muestra un

manchado Western de Kv7,3 en médulas espinales obtenidas 2 semanas después de la inyección y la lesión medular. Obsérvese que las bandas fuertes con el peso molecular esperado para Kv7,3 en las muestras de médula espinal de ratones tratados con AAV-Kv7,3, pero no en las de ratones tratados con AAV-GFP. (B) Muestra la expresión de Kv7,3 específicamente en MNs usando inmunohistoquímica. (C-D) Muestra los cambios en la duración de espasmos musculares después de la administración de 2 mg/kg de RTG en ratones tratados con AAV-GFP y AAV-Kv7,3. E-F muestra el cambio en la intensidad del espasmo (número de potenciales de acción por espasmo) después de la administración de 2 mg/kg de RTG en ratones tratados con AAV-GFP y AAV-Kv7,3. Las G-H muestran registros electromiográficos (EMG) representativos del efecto de 2 mg/kg de RTG en ratones tratados con AAV-GFP y AAV-Kv7,3. Los rastros superiores son pre RTG y los rastros inferiores a 20 minutos después de RTG.

La figura 14 muestra que la expresión positiva de Kv7,3 en neuronas motoras mediante inyección intramuscular de AAV-Kv7,3 no afecta significativamente las propiedades electrofisiológicas del valor de referencia de las neuronas motoras en un modelo neonatal de ratón con espasticidad. Se realizaron registros en cortes de médula espinal de ratones con espasticidad. (A) muestra que la excitabilidad de MNs no se redujo, ya que el número de potenciales de acción evocados a 2x la reobase no presentó diferencias entre los controles AAV-GFP y las MNs transducidas con AAV-SRx-C490. (B) muestra que el umbral para evocar un único potencial de acción no presentó diferencias en las MNs transducidas con AAV-SRx-C490. (C) muestra que el potencial de membrana en reposo (PMR) no presentó diferencias entre los grupos. (D) muestra que el tamaño de MN no presentó diferencias entre los grupos. (E-H) muestra que 3 μ M de retigabina redujeron significativamente las MN de ratones tratados con AAV-SRx-C490 pero no en ratones tratados con AAV-GFP, como se evaluó por el cambio en el número de potenciales de acción al 2x del umbral y la reobase.

La figura 15 muestra que las neuronas motoras de ratones con espasticidad

tratados con AAV-GFP generan trenes repetitivos de potenciales de acción (A); sin embargo, las neuronas motoras de ratones inyectados con un constructo viral para expresa positivamente una forma mutada de Kv7 (A315T) son incapaces de generar respectivamente. Esto sugiere una reducción significativa y permanente de la excitabilidad de estas neuronas motoras.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Como se emplea en el presente documento, “incrementar la eficacia” significa un incremento en la capacidad de producir el resultado deseado. Esto puede lograrse mejorando la respuesta al fármaco, en lugar de mejorar su efectividad del fármaco. La eficacia mejorada significa que el mismo nivel de respuesta se puede lograr utilizando menos del fármaco.

Por lo tanto, incrementado la eficacia significa que se puede utilizar una dosis menor.

Como se emplea en el presente documento, el fármaco neuromodulador se refiere a un canal de potasio dependiente de voltaje. Los fármacos conocidos se incluyen, pero no se limitan a, retigabina y derivados de los mismos (véase Musella et al., 2022 por ejemplo), BHV-7000 y Xen496, Xen 1101, flupirtina, diclofenaco, BMS-204352, ácido meclofenámico, ETX -123, linopirdina.

En una modalidad, el fármaco neuromodulador es un abridor de canal.

En una modalidad, el fármaco neuromodulador es un bloqueador de canales.

En una modalidad, el fármaco neuromodulador se selecciona entre: Retigabina o un derivado de la misma, BHV-7000 y Xen496, Xen 1101, flupirtina, diclofenaco, BMS-204352, ácido meclofenámico, ETX -123, linopirdina.

Tal como se emplea en este documento, la introducción de una secuencia de nucleótidos se refiere a la transducción o transfección de una célula, como una neurona, con una o más secuencias de nucleótidos, ya sea para complementar el material genético existente con más de lo que ya está presente, o para proporcionar

nuevas secuencias de nucleótidos.

La subunidad Kv7,3 del canal iónico es un monómero de un canal de potasio dependiente de voltaje que se ensambla para formar un canal iónico tetramérico funcional. El Kv7,3 puede ensamblarse como un homómero o como heterómero con otras subunidades Kv7, que incluye Kv7,2 y Kv7,5, u otras subunidades auxiliares (por ejemplo, KCNE).

Los canales iónicos Kv7,3, tal como se emplean en este documento, se refieren tanto al homómero Kv7,3 como a los heterómeros que contienen Kv7,3.

Como se emplea en el presente documento, una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad del canal iónico Kv7,3 se refiere a una secuencia de nucleótidos (ARN o ADN) que codifica la subunidad del canal iónico Kv7,3.

En una modalidad, la secuencia de nucleótido comprende la secuencia de SEQ ID.1 o una variante de SEQ ID.1 que codifica la misma secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID.1.

En una modalidad, la secuencia de nucleótido comprende la secuencia de SEQ ID.2 o una variante de SEQ ID.2 que codifica la misma secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID.2.

En una modalidad, la secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de SEQ ID.3 o una variante de SEQ ID.3 que codifica la misma secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID.3.

En una modalidad, la secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de SEQ ID.4 o una variante de SEQ ID.4 que codifica la misma secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID.4.

En una modalidad, la secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de SEQ ID.5 o una variante de SEQ ID.5 que codifica la misma secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID.5.

En una modalidad, la secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de SEQ ID.6 o una variante de SEQ ID.6 que codifica la misma secuencia de

aminoácidos codificada por SEQ ID.6.

En una modalidad, la secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de SEQ ID.7 o una variante de SEQ ID.7 que codifica la misma secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID.7.

En una modalidad, la secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de SEQ ID.8 o una variante de SEQ ID.8 que codifica la misma secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID.8.

En una modalidad, la subunidad del canal iónico Kv7,3 comprende o consiste de la secuencia de aminoácidos de conformidad con la SEQ ID.9.

En una modalidad, la subunidad del canal iónico Kv7,3 comprende o consiste de la secuencia de aminoácidos de conformidad con la SEQ ID. 10.

En una modalidad, la subunidad del canal iónico Kv7,3 comprende o consiste de la secuencia de aminoácidos de conformidad con SEQ ID.11.

En una modalidad, la subunidad del canal iónico Kv7,3 comprende o consiste de la secuencia de aminoácidos de conformidad con SEQ ID.12.

En una modalidad, la subunidad del canal iónico Kv7,3 comprende o consiste de la secuencia de aminoácidos de conformidad con SEQ ID.13.

En una modalidad, la subunidad del canal iónico Kv7,3 comprende o consiste de la secuencia de aminoácidos de conformidad con SEQ ID.14.

En una modalidad, la subunidad del canal iónico Kv7,3 comprende o consiste de la secuencia de aminoácidos de conformidad con SEQ ID.15.

En una modalidad, la subunidad del canal iónico Kv7,3 comprende o consiste de la secuencia de aminoácidos de conformidad con SEQ ID.16.

En una modalidad, la secuencia de nucleótidos codifica la subunidad del canal iónico Kv7,3 de conformidad con cualquiera de los ID de SEQ 9 a 16.

En ciertas modalidades, la subunidad del canal iónico Kv7,3 puede comprender una mutación en el residuo de aminoácido 315 de SEQ ID.9. Por ejemplo, A315T, A315S, A315V, A315C, A315N, A315Q o A315Y.

En una modalidad, la subunidad del canal iónico es Kv7,3 de tipo silvestre.

En una modalidad, la subunidad del canal iónico no es Kv7,3 de tipo silvestre.

Un canal iónico funcional como el empleado aquí significa que la subunidad del canal iónico se ha ensamblado en un tetrámero, ya sea como homómero o como heterómero, y está ubicada en la membrana neuronal en una posición adecuada para actuar como un canal de potasio dependiente de voltaje.

Como se emplea en el presente documento, el término neurona incluye una neurona y una porción o porciones de la misma (por ejemplo, el cuerpo celular neuronal, el axón o un dendrito). El término neurona designa las células del sistema nervioso que son eléctricamente activas e incluye un cuerpo celular (o soma) y hasta dos tipos de extensiones o proyecciones: dendritas, mediante las cuales se transmite la mayoría de las señales neuronales al cuerpo celular, y axones, mediante los cuales se transmiten la mayoría de las señales neuronales desde el cuerpo celular a las células efectoras, como las neuronas objetivo o músculo. Las neuronas pueden transmitir información desde los tejidos y órganos al sistema nervioso central (neuronas aferentes o sensoriales) y transmitir señales desde el sistema nervioso central a las células efectoras (neuronas eferentes o motoras). Otras neuronas, denominadas interneuronas, conectan neuronas dentro del sistema nervioso central (el cerebro y la médula espinal). Otras neuronas, denominadas neuronas de proyección, extienden de sus axones de una región del sistema nervioso a otra.

En algunas modalidades, la neurona se involucra en la actividad sensoriomotora.

En algunas modalidades, la neurona es una neurona motora (motoneurona).

En algunas modalidades, la neurona es una neurona sensorial.

En algunas modalidades, la neurona es una neurona eferente autónoma.

En algunas modalidades, la neurona es una neurona sensorial autónoma.

En algunas modalidades, la neurona es una neurona del núcleo subtalámico.

Como se emplea en el presente documento, un vector se refiere a cualquier

vector de transferencia génica adecuado conocido en la técnica. Esto incluye, pero no se limitan a, vectores virales (que incluye el virus adeno asociado, el adenovirus y el lentivirus) y métodos no virales (como el ADN desnudo o los métodos de transferencia química). Típicamente, el vector es un vector de terapia génica.

La expresión positiva, tal como se emplea aquí, es sinónimo de regulación positiva de un gen y se refiere a un aumento en la expresión de un gen relativo a una célula (neurona) que no ha sido transfectada ni transducida. Para que sea efectiva, la neurona debe expresar niveles más altos de canales iónicos Kv7,3 ensamblados, ya sea como homómeros o heterómeros de Kv7,3, por ejemplo, heterómeros Kv7,2 /7,3.

En el presente documento, la expresión “administrar una dosis menor” se refiere a la exposición posterior de una neurona que expresa positivamente el gen introducido a una dosis inferior de un fármaco que puede normalmente ser administrada a un paciente para ser terapéuticamente efectivo. Por ejemplo, para tratar la epilepsia, la retigabina se administraba típicamente a una dosis de 600-1200 mg al día, lo que corresponde a una concentración plasmática media de 0,83 μM . Mediante el método actual, se ha mostrado que las concentraciones inferiores a 0,5 μM son eficaces en neuronas humanas *in vitro*. Sin limitarse a la teoría, los inventores consideran que esto permitiría administrar *in vivo una dosis efectiva inferior a 0,5 μM* .

En una modalidad, la dosis terapéuticamente efectiva del fármaco neuromodulador se reduce hasta en un 100%. Por ejemplo, aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 95%, 90% o 95%.

Si bien no se desea limitarse a la teoría, los inventores creen que la expresión positiva de Kv7,3 puede tener un efecto del valor de referencia que reduce la excitabilidad de las neuronas incluso en ausencia de un fármaco neuromodulador. Por lo tanto, en algunas modalidades, no se requiere la administración de un fármaco neuromodulador.

Se prevé que la reducción de la dosis terapéuticamente efectiva sea

suficiente para disminuir los efectos secundarios del fármaco neuromodulador a niveles clínicamente aceptables. Los expertos en la materia comprenderán qué se entiende por niveles clínicamente aceptables.

Tal como se emplea en este documento, "incrementar la eficacia del fármaco" se refiere al efecto terapéutico incrementado de una dosis determinada del fármaco en las neuronas transducidas que expresa positivamente el transgén en relación con las neuronas no transducidas.

Tal como se emplea en el presente documento, "reducir los efectos secundarios" se refiere a la disminución o eliminación de los efectos secundarios indeseables relacionados con la administración de un fármaco a un sujeto a una dosis determinada.

Por ejemplo, se descubrió que el fármaco neuromodulador retigabina (ezogabina), el cual se comercializa como anticonvulsivo, causaba somnolencia, mareo, tinnitus y vértigo, confusión y dificultad para hablar a dosis terapéuticas (600-1200 mg). Entre los efectos secundarios menos comunes se incluían temblor, pérdida de memoria, trastornos de la marcha y visión doble. En 2013, la FDA advirtió al público que la ezogabina puede causar decoloración azulada de la piel y anomalías oculares caracterizadas por cambios en la pigmentación de la retina. Si bien no desean limitarse a la teoría, los inventores consideran que el aumento de la expresión de Kv7,3 en las neuronas hiperexcitables asociadas con las crisis epilépticas permitiría ampliar el rango terapéutico de la retigabina a dosis más bajas, reduciendo o eliminando así los efectos secundarios anteriores. Es decir, se incrementaría el índice terapéutico de la retigabina. De hecho, los ensayos que incluyeron dosis más bajas de retigabina (300-1200 mg) informaron menos efectos adversos dermatológicos, oftalmológicos y neurológicos (Lerche et al., 2015; Brickel et al., 2020).

Como se emplea en el presente documento, el vector de terapia génica es un vector adecuado para métodos de terapia génica. Si bien aquí se describen cápsides de AAV, cabe señalar que otros vectores pueden ser adecuados y utilizarse sin que

ello suponga una desviación del alcance de la presente invención.

Típicamente, la terapia génica se utiliza para tratar trastornos o condiciones neurológicas. Un ejemplo de trastorno o condición neurológica que puede tratarse con terapia génica es la espasticidad. La espasticidad es un síntoma neurológico que sufren personas con diversos trastornos neurológicos, que incluyen pero no se limitan a esclerosis múltiple, apoplejía, lesión cerebral traumática, lesión medular, enfermedad de la motoneurona y parálisis cerebral. La espasticidad resulta por la excitación excesiva de los músculos por las neuronas motoras, que, debido a la enfermedad, se vuelven hiperexcitables.

La excitabilidad de las neuronas está determinada por la frecuencia de los potenciales de acción generados en respuesta a un estímulo dado. El incremento de la excitabilidad es indicado mediante una o más de las medidas que se describen a continuación.

El incremento de la excitabilidad, tal como se emplea en este documento, se define como una neurona que presenta al menos una de las siguientes:

- a. Un incremento (despolarización) del voltaje de reposo de una neurona (potencial de membrana en reposo - PMR) de tal manera que se acerca al umbral para la generación de un potencial de acción.
- b. Una disminución en la magnitud del estímulo requerido para causar que las neuronas generen potenciales de acción (Reobase).
- c. Un incremento en el número de potenciales de acción generados por un estímulo dado (Frecuencia) en comparación con una neurona con niveles de excitabilidad "normales".
- d. Generación persistente de potenciales de acción más allá del cese del estímulo responsable de iniciar el fuego.
- e. Un aumento en la frecuencia de los potenciales de acción en una población de neuronas (2-100 000) registrados utilizando una matriz de microelectrodos (matriz de microelectrodos-MEA).

f. Un aumento en el número o duración de las ráfagas de potenciales de acción registradas por un MEA, definido como al menos 5 potenciales de acción consecutivos con intervalos de 100 ms o menos entre cada potencial de acción.

Por ejemplo, una neurona hiperexcitable puede tener un RMP de -55 mV, lo cual es con dureza 15 mV más positivo de lo esperado en las neuronas y más cercano al umbral para la generación de un potencial de acción (~-40 mV). Si una magnitud de estímulo de 50 picoamperios (pA) provoca que una neurona normal para generar un potencial de acción (reobase = 50 pA), 25 pA podrían ser suficientes en una neurona hiperexcitable (reobase = 25 pA). De manera similar, si una magnitud de estímulo de 100 pA provoca que una neurona normal genere 10 potenciales de acción en 1 segundo (frecuencia = 10 Hz), una neurona hiperexcitable podría generar 20 con la misma magnitud de estímulo (frecuencia = 20 Hz).

Además, en las neuronas hiperexcitables, la generación de potenciales de acción suele persistir más allá de la desaparición del estímulo, a diferencia de las neuronas normales. Este es el caso en la espasticidad, con ello las neuronas generan más potenciales de acción durante periodos más prolongados, y a menudo en respuesta a un estímulo menor.

Típicamente, el vector de terapia génica es un vector AAV que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad del canal iónico Kv7,3. Esta subunidad de canal iónico puede ser de tipo silvestre, codificada por la EC ID No. 1, o mutante, codificada por la SEQ ID.2, o una secuencia equivalente que codifique las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID.3 o ID.4, respectivamente.

Las partículas virales de AAV, tal como se emplean en este documento, son partículas virales de virus adenoasociado que comprenden un genoma de ADN monocatenario empaquetado dentro de una envoltura viral capaz de transducir una célula, por ejemplo, una neurona objetivo. En particular, las partículas virales de AAV empleadas en este documento incluyen la secuencia de nucleótidos de conformidad con SEQ ID.1 o SEQ ID.2. En algunas modalidades las partículas virales pueden

carecer de nucleótidos que codifiquen la replicación; es decir, son deficientes en replicación.

Los AAV son virus pequeños pertenecientes al género dependoparvovirus que contienen una sola hebra de ADN de hasta ~4,9 kb. El genoma del AAV contiene tres proteínas de la cápside: VP1, VP2 y VP3, todas ellas traducidas a partir de un único ARNm mediante empalme alternativo. En la naturaleza, se han identificado múltiples serotipos de AAV, cada uno con secuencias únicas del gen de la cápside y, por lo tanto, con tropismos distintos, si bien los serotipos silvestres suelen ser capaces de infectar múltiples tipos de tejidos y células. Estos serotipos se designan con números: AAV1, AAV2, etc. Se ha demostrado que la modificación de las secuencias de la cápside mediante métodos de recombinación de ADN puede generar secuencias no nativas con propiedades y tropismo específicos, dirigidas hacia (o contra) células o tejidos particulares, y que evaden el sistema inmunitario (Vandenberghe et al., 2009). Como se emplean en el presente, las partículas virales de AAV transducen selectivamente neuronas objetivo, como las neuronas motoras.

Como se emplea en el presente la cápside del AAV, se refiere a la cápside de los virus adenoasociados. Se sabe que la cápside del AAV posee una selectividad notable debido a su composición (está formada por una mezcla de VP1, VP2 y VP3, con un total de 60 monómeros dispuestos en simetría icosaédrica en una proporción 1:1:10) y a modificaciones postraduccionales. Las proteínas de la cápside del AAV contienen 12 regiones de superficie hipervariables, pero el genoma, en general, presenta genes de replicación y estructurales altamente conservados entre los serotipos.

La cápside del AAV empleada aquí puede transducir selectivamente un tipo celular particular, tal como las neuronas, tal como en lugar del tejido muscular, y puede transducir selectivamente neuronas objetivo sobre otras neuronas, incluso partes específicas de neuronas, como el axón.

En uso, la cápside del AAV que contiene la secuencia de nucleótidos de

conformidad con cualquiera de alguna de SEQ ID Nos. 1 a 8 (la partícula viral) se administra a un sujeto, la partícula viral infecta neuronas objetivo, que se convierten en neuronas transducidas. Las neuronas transducidas expresa positivamente las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de nucleótidos, las cuales se ensamblan para formar canales iónicos funcionales que contienen Kv7,3 (ya sea homómeros o heterómeros). En general, el tiempo transcurrido desde el suministro de las partículas virales al sujeto hasta la expresión positiva de los canales iónicos funcionales es de aproximadamente 3 semanas. Una vez transcurrido el tiempo adecuado para que las neuronas transducidas sobreexpresen los canales iónicos, el sujeto puede ser tratado con un fármaco neuromodulador, como retigabina, a una dosis menor.

La transducción selectiva, tal como se emplea aquí, se refiere a la capacidad de la cápside del AAV para transducir selectivamente un tipo celular con preferencia sobre otro. La especificidad puede ser neuronas en preferencia por las células musculares. Alternativamente, puede ser la preferencia por las neuronas motoras en preferencia de las neuronas sensoriales, por ejemplo.

Un sujeto como se emplea en el presente documento, se refiere a un ser humano o a un mamífero no humano. Típicamente, el sujeto presenta un trastorno neurológico asociado a una mayor excitabilidad neuronal.

En algunas modalidades, el sujeto tiene un trastorno neurológico asociado con una disfunción de los canales iónicos Kv7,3.

En algunas modalidades, el sujeto presenta síntomas caracterizados por hiperexcitabilidad neuronal que puede o no estar asociada con disfunción de los canales iónicos Kv7,3.

En algunas modalidades, el sujeto presenta un trastorno neurológico y/o síntomas caracterizados por hiperexcitabilidad neuronal que pueden o no estar asociados con disfunción de los canales Kv.

El término “trastorno neurológico asociado a una mayor excitabilidad

neuronal”, tal como se emplea en este documento, se refiere a cualquier afección en la que el exceso de actividad neuronal produce síntomas relacionados con tal trastorno neurológico. Por ejemplo: epilepsia, espasticidad, convulsiones neonatales familiares benignas (CNFB), dolor nociceptivo, dolor no nociceptivo, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple.

En una modalidad, el trastorno neurológico se asocia con la hiperexcitabilidad de las neuronas, tal como las neuronas motoras.

En una modalidad, el trastorno neurológico se asocia con una mayor excitabilidad de las neuronas.

En una modalidad, el trastorno neurológico se selecciona entre epilepsia, espasticidad, BNFS, dolor nociceptivo, dolor no nociceptivo, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple.

El término “tratar o tratamiento”, tal como se emplea en el presente documento, se refiere a la reversión de una afección, la mejora o el alivio de los síntomas asociados con una afección o la prevención del desarrollo/empeoramiento de una condición.

El término “tratamiento” incluye tratamientos y terapias combinadas, en las que se combinan dos o más tratamientos o terapias, por ejemplo, de forma secuencial o simultánea. Por ejemplo, el vector se puede administrar uno o más días antes de que se administre el fármaco neuromodulador al sujeto.

Una dosis menor, tal como la empleada en este documento, se refiere a una dosis inferior a la considerada efectiva en un sujeto (o en la parte inferior de un rango efectiva) y, por lo tanto, no causa efectos secundarios o reduce su gravedad, manteniendo al mismo tiempo la eficacia terapéutica.

La cantidad terapéuticamente efectiva, tal como se emplea en el presente documento, significa una cantidad del compuesto que es efectiva para tratar el trastorno o la afección mencionados.

En algunas modalidades, los canales Kv7,3 expresados positivamente

pueden ensamblarse como heterómeros, tal como los heterómeros Kv7,2/7,3 o Kv7,3/7,5. Las proporciones de subunidades de estos heterómeros pueden variar y permitir perfeccionar el método descrito en este documento.

De forma similar, en algunas modalidades, la proporción de subunidades Kv7,3 de tipo silvestre y mutantes puede diferir para permitir el refinamiento del método. Esto podría aplicarse tanto a heterómeros como a homómeros.

En algunas modalidades, los canales Kv7,3 expresados positivamente pueden ensamblarse como homómeros.

Los canales homoméricos Kv7,3 pueden tener una conducción mínima, de modo que su efecto sobre la excitabilidad del valor de referencia de la neurona transducida, pero aún permite al fármaco neuromodulador actuar en la neurona transducida a una dosis menor.

La reobase, tal como se emplea aquí, se refiere al valor mínimo de inyección de corriente requerido para despolarizar el potencial de membrana neuronal lo suficiente como para generar un único potencial de acción.

El potencial de membrana en reposo, tal como se emplea aquí, se refiere a la diferencia de voltaje potencial registrada entre los compartimentos neuronales intracelular y extracelular en ausencia de cualquier inyección de corriente. Este valor de voltaje se registra usando técnicas electrofisiológicas como la técnica tal como fijación de parche de la célula completa.

Como se emplea en el presente, “desplazar el potencial de membrana en reposo (PMR) de la neurona objetivo lejos del umbral” significa que el valor de voltaje en estado de reposo de la neurona es más negativo (hiperpolarizado) y, por lo tanto, se requiere una mayor magnitud de estímulo para despolarizarla el voltaje hasta un nivel en el que se generen potenciales de acción. Por ejemplo, un PMR típico de una neurona puede ser de -65 mV, lo que significa que se necesitan 500 pA de corriente (estímulo) para despolarizar la neurona lo suficiente como para alcanzar el potencial de membrana umbral necesario para generar potenciales de acción (-45 mV). Si el

PMR se vuelve más negativo (-75 mV), entonces se aleja aún más del umbral y, por consiguiente, requiere una mayor inyección de corriente para alcanzar el umbral y generar potenciales de acción.

La reducción de la excitabilidad de la neurona objetivo, tal como se emplea en el presente documento, significa al menos una de las siguientes:

a. Hiperpolarización del potencial de membrana en reposo de una neurona, de manera que se aleje aún más del umbral para la generación de un potencial de acción.

b. Aumentar la magnitud del estímulo necesario para causar que las neuronas generen potenciales de acción (Reobase).

c. Disminuir el número de potenciales de acción generados por un estímulo eléctrico o estímulos químicos (Frecuencia de AP).

d. Reducir o eliminar la generación persistente de potenciales de acción más allá del cese del estímulo responsable de iniciar la descarga.

e. Reducir la frecuencia de los potenciales de acción espontáneos en ausencia de estímulo.

f. Reducir la duración o la frecuencia de las ráfagas de potenciales de acción espontáneos (las ráfagas se definen como al menos 5 potenciales de acción consecutivos con intervalos de 100 ms o menos).

La reducción de la excitabilidad se puede medir usando la técnica de fijación en parche de célula completa en modo de pinzamiento de corriente, inyectando pulsos de corriente rectangulares de magnitud creciente y registrando la variación del voltaje y la frecuencia de generación de potenciales de acción durante la duración del pulso. El potencial de membrana en reposo se mide en condiciones estables, mientras no ocurra la inyección (por ejemplo, el voltaje no varía más de 1-2 mV). La reobase se mide como la corriente mínima de entrada, de una duración determinada, necesaria para generar al menos un potencial de acción. La frecuencia potencial de acción se mide como el número de potenciales de acción generados durante un periodo de

tiempo específico, usualmente igual a la duración del pulso de corriente inyectado en la neurona.

La reducción de la excitabilidad también puede medirse mediante una matriz de microelectrodos (MEA), que consiste en una placa de cavidades con varios contactos de electrodo ubicados en la superficie de la base de cada cavidad. Se cultiva una población de neuronas en contacto con los electrodos de cada cavidad, de manera que su actividad pueda registrarse como potenciales de acción extracelulares (espigas). Las neuronas cultivadas en MEA producen potenciales de acción espontáneos, a menudo denominados espigas. Cinco o más espigas consecutivas registradas con intervalos de 100 ms o menos se denominan ráfagas. La frecuencia de las espigas espontáneas y las características de las ráfagas (frecuencia, duración de ráfaga, etc.) pueden utilizarse para determinar la excitabilidad neuronal.

En algunas modalidades, la regulación positiva de la subunidad del canal iónico Kv7,3 por la neurona transducida reduce la actividad de las células inervadas por las terminaciones axónicas de la misma neurona. Por ejemplo, la actividad del músculo gastrocnemio, medida por electromiografía (EMG), como un resultado de la regulación positiva de las subunidades del canal iónico Kv7,3 en las neuronas motoras del gastrocnemio. La actividad muscular reducida se caracteriza por uno o más de los siguientes: amplitud reducida de la acción muscular del compuesto evocada por la estimulación de las fibras nerviosas aferentes periféricas; duración reducida de la actividad EMG persistente después de la estimulación de las fibras nerviosas aferentes; frecuencia reducida, duración reducida de la actividad EMG espontánea; amplitud reducida de la actividad EMG espontánea; rigidez reducida de un músculo determinado por un médico capacitado; y rango incrementado de movimiento en las articulaciones asociadas al músculo afectado, como se determinó por un médico capacitado.

La invención también comprende métodos de tratamiento que implican la inyección de vectores virales AAV que comprenden la secuencia de nucleótidos SEQ

ID.1 o SEQ ID.2 en el cerebro o la médula espinal de un sujeto, o mediante inyección intramuscular; estos vectores virales AAV pueden luego transducir las neuronas objetivo.

La expresión de la secuencia de nucleótidos conduce a la expresión positiva de los canales iónicos Kv7,3 en estas neuronas. De este modo, el sujeto puede entonces ser tratado con un fármaco neuromodulador a una dosis menor que la que anteriormente se requería para obtener un efecto terapéutico. Esta menor dosis, a su vez, reduce los efectos secundarios y la toxicidad. El objetivo de curar, aliviar los síntomas y/o mejorar la calidad de vida de los pacientes con enfermedades causadas por neuronas hiperexcitables se logra sin efectos secundarios indeseables (o con menos efectos secundarios y de menor gravedad).

Los fármacos con efectos secundarios prohibitivos pueden volverse utilizables empleando el método aquí descrito, simplemente permitiendo que una dosis menor que sea efectiva en células específicas.

En algunas modalidades, el método implica que el vector de terapia génica o la partícula viral AAV infecte retrógradamente las neuronas con el fin de suministrar material genético a las neuronas, con el propósito de tratar enfermedades causadas por, o asociadas con, la disfunción del canal iónico Kv7.

En el caso de A315T, un canal con alta tasa de inserción en la membrana y niveles elevados de conductancia, es probable que solo se requieran niveles bajos de expresión para que sea efectivo. Esto significa que el virus puede suministrarse en cantidades menores, lo que reduce la probabilidad de inmunogenicidad y los costos.

En una modalidad, el método es un método ex vivo.

En el contexto de esta especificación, "que comprende" debe interpretarse como "que incluye".

También se pretende que los aspectos de la invención que comprenden ciertos elementos se extiendan a modalidades alternativas que "consisten" o "consisten esencialmente" de los elementos relevantes.

Cuando sea técnicamente apropiado, las modalidades de la invención se podrán combinar.

Las modalidades descritas en el presente documento comprenden ciertas características/elementos. La descripción también abarca modalidades separadas que consisten o consisten esencialmente en tales características/elementos.

El término "aproximadamente", tal como se emplea en el presente documento, se refiere a $\pm 10\%$.

Las referencias técnicas, tales como patentes y solicitudes, se incorporan al presente documento a modo de referencia.

Cualquier modalidad específica y explícita aquí citada puede formar la base de una renuncia, ya sea por sí sola o en combinación con una o más modalidades adicionales.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

Cultivo celular

Las células progenitoras de neuronas sensoriales derivadas de células iPSC humanas (Axol Bioscience) se descongelaron y se sembraron a baja densidad sobre una monocapa de astrocitos corticales de rata en cubreobjetos de vidrio recubiertos con poli-D-lisina. Los cultivos se realizaron en medio NbActiv 4 (Neurobasal/B 27 suplementado con MAXIMIZER, GDNF, NGF, BDNF y NT 3) para promover la maduración celular hacia un fenotipo neuronal diferenciado.

AAV

pAAV- CMV- EGFP, pAAV -CMV- hKCNQ3 - T2A-EGFP y pAAV -CMV- hKCNQ3_(A315T)-T2A-EGFP a cavidades que contenían cultivos neuronales a los 7 días in vitro y se realizaron registros de fijación en parche 1 (DIV15-16) o 2 semanas después (DIV21-23).

Electrofisiología de fijación en parche

Se emplearon métodos estándar de fijación en parche. La composición de la solución de registro externa fue de 140 mM NaCl, 25 mM KCl y 2 mM La solución de registro interna contenía CaCl_2 , 3 mM MgCl_2 , 10 mM glucosa, 10 mM HEPES, pH 7,3. La solución de registro interna contenía gluconato de potasio 120 mM, KCl 20 mM, MgCl_2 3 mM, EGTA 2,5 mM, CaCl_2 0,5 mM, Na_2 -ATP 2.4 mM, Li_2GTP 0,3 mM, HEPES 10 mM, pH 7,3. Tras establecer la configuración de célula completa, se midieron las propiedades pasivas de la membrana de cada célula (capacitancia y resistencia) en modo de fijación de voltaje. Todas las mediciones de excitabilidad se realizaron en modo de fijación de corriente.

Registros de matrices multielectrodo

Las neuronas se cultivaron como se describió anteriormente en placas de 24 cavidades con 16 electrodos por cavidad, de manera que las neuronas estuvieran en contacto directo con electrodos individuales. La actividad de disparo espontáneo entonces se registró después de 30 días. Los registros se realizaron en condiciones del valor de referencia (sin fármaco) y posteriormente con concentraciones incrementadas del fármaco activador.

Modelo de espasticidad del ratón

Se practicó una sección medular completa a ratones neonatos (día postnatal 0) entre los segmentos torácicos 9^{no} y 10^{mo} para inducir espasticidad. Durante la misma cirugía, se inyectaron AAV en ambos músculos gastrocnemios.

Registro EMG

Entre 10 y 14 días después de la lesión medular, se insertaron electrodos EMG en los músculos inyectados para registrar la actividad eléctrica antes y después de la administración intraperitoneal de un fármaco activador (retigabina). Se probaron

diferentes dosis en días distintos.

Electrofisiología de fijación en parche en cortes de médula espinal de ratón

La médula espinal se extrajo bajo anestesia terminal y se cortó en rodajas de 300 μm con un vibrátomo. Posteriormente, se realizaron registros de fijación en parche en neuronas motoras que expresan GFP, como se describió anteriormente (electrofisiología de fijación en parche).

PÁRRAFOS

1. Un método para aumentar la eficacia de un fármaco neuromodulador que comprende los siguientes pasos:

a. introducir una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad del canal iónico Kv7.3 que comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID.1 a SEQ ID.8 o una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la subunidad del canal iónico Kv7.3 de cualquiera de las SEQ ID.9 a SEQ ID.16 a una neurona objetivo vía un vector,

b. sobreexpresar la subunidad del canal iónico en la neurona objetivo de manera que forme canales iónicos funcionales, y

c. administrar una dosis menor del fármaco neuromodulador.

2. Un método para reducir los efectos secundarios de un fármaco neuromodulador que comprende los siguientes pasos:

a. introducir una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad del canal iónico Kv7.3 que comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID.1 a SEQ ID.8 o una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la subunidad del canal iónico Kv7.3 de cualquiera de las SEQ ID.9 a SEQ ID.16 a una neurona objetivo vía un vector,

b. sobreexpresar la subunidad del canal iónico en la neurona objetivo de manera que forme canales iónicos funcionales, y

- c. administrar una dosis menor del fármaco neuromodulador.
- 3. Un método para aumentar el índice terapéutico de un fármaco neuromodulador que comprende los siguientes pasos:
 - a. introducir una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad del canal iónico Kv7.3 que comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID.1 a SEQ ID.8 o una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la subunidad del canal iónico Kv7.3 de cualquiera de las SEQ ID.9 a SEQ ID.16 a una neurona objetivo vía un vector,
 - b. sobreexpresar la subunidad del canal iónico en la neurona objetivo de manera que forme canales iónicos funcionales, y
 - c. administrar el fármaco neuromodulador.
- 4. Un método para reducir la excitabilidad de una neurona que comprende los siguientes pasos:
 - a. introducir una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad del canal iónico Kv7.3 que comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID.1 a SEQ ID.8 o una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la subunidad del canal iónico Kv7.3 de cualquiera de las SEQ ID.9 a SEQ ID.16 a la neurona objetivo vía un vector,
 - b. sobreexpresar la subunidad del canal iónico en la neurona objetivo de manera que forme canales iónicos funcionales, y
 - c. opcionalmente, administrar un fármaco neuromodulador.
- 5. Un método para tratar un trastorno neurológico que comprende los siguientes pasos:
 - a. administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz del vector de terapia génica que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad del canal iónico Kv7.3 que comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID.1 a SEQ ID.8 o una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la subunidad del canal iónico Kv7.3 de cualquiera de las

SEQ ID.9 a SEQ ID.16;

b. aumentar la expresión de la subunidad del canal iónico Kv7.3 en una neurona objetivo de forma que forme canales iónicos funcionales, y

c. administrar una dosis más baja de un fármaco neuromodulador conocido por actuar sobre los canales iónicos Kv7.3.

6. Un vector de terapia génica que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad del canal iónico Kv7.3 que comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID.1 a SEQ ID.8 o una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la subunidad del canal iónico Kv7.3 de cualquiera de las SEQ ID.9 a SEQ ID.16, de modo que, cuando el vector transduce una neurona objetivo, se sobreexpone la expresión de la subunidad del canal iónico Kv7.3 y se forman canales iónicos funcionales.

7. Un vector de terapia génica de acuerdo con el párrafo 6, en donde el vector transduce selectivamente la neurona objetivo.

8. Un vector de terapia génica de partículas virales AAV que comprende:

a. una cápside de AAV que transduce selectivamente las neuronas objetivo, y

b. una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad del canal iónico Kv7.3 que comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID.1 a SEQ ID.8 o una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la subunidad del canal iónico Kv7.3 de cualquiera de las SEQ ID.9 a SEQ ID.16,

en donde, cuando el vector transduce las neuronas objetivo, se sobreexpone la expresión de la subunidad del canal iónico Kv7.3 y se forman canales iónicos funcionales.

9. Un vector de terapia génica que comprende una cápside AAV que transduce selectivamente las neuronas objetivo y una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad del canal iónico Kv7.3 que comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID.1 a SEQ ID.8 o una secuencia de nucleótidos que codifica la

secuencia de aminoácidos de la subunidad del canal iónico Kv7.3 de cualquiera de las SEQ ID.9 a SEQ ID.16, para su uso en la sobrerregulación de la expresión de la subunidad del canal iónico Kv7.3 por la neurona objetivo de manera que forme canales iónicos funcionales en un sujeto que tiene un trastorno neurológico asociado con una mayor excitabilidad neuronal.

10. Un vector de terapia génica que comprende una cápside de AAV que transduce selectivamente las neuronas objetivo y una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad del canal iónico Kv7.3 que comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID.1 a SEQ ID.8 o una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la subunidad del canal iónico Kv7.3 de cualquiera de las SEQ ID.9 a SEQ ID.16, para su uso en el tratamiento de un sujeto que padece un trastorno neurológico, en donde, una vez que el vector ha transducido la neurona objetivo, la expresión del canal iónico Kv7.3 por la neurona objetivo se sobrerregula, de modo que se puede administrar eficazmente una dosis menor de un fármaco neuromodulador al sujeto.

11. El método de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 5 o el vector de terapia génica de acuerdo con el párrafo 10, en donde el fármaco neuromodulador se selecciona de Retigabina/Ezogabina y derivados de las mismas, BHV-7000 y Xen496, Xen 1101, flupirtina, diclofenaco, BMS-204352, ácido meclofenámico, ETX-123 y linopirdina.

12. El método o el vector de terapia génica de acuerdo con cualquier párrafo anterior, en donde el canal iónico Kv7.3 se expresa como un homómero Kv7.3, un heterómero Kv7.2/7.3 o un heterómero Kv7.3/7.5.

13. El método o vector de terapia génica de acuerdo con el párrafo 12, en donde el canal iónico Kv7.3 se expresa funcionalmente como un homómero.

14. El método o el vector de terapia génica de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores, en donde las neuronas objetivo son las neuronas motoras.

15. El método o el vector de terapia génica de acuerdo con cualquiera de

los párrafos 5 o 9 a 14, en donde el trastorno neurológico está asociado con una mayor excitabilidad de las neuronas.

16. El método o el vector de terapia génica de acuerdo con cualquiera de los párrafos 5 o 9 a 15, en donde el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en: epilepsia, espasticidad, BNFS, enfermedad de Parkinson, dolor nociceptivo y dolor no nociceptivo.

17. El método o el vector de terapia génica de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores, en donde la sobreexpresión de la subunidad del canal iónico Kv7.3 reduce la rebase de la neurona objetivo en presencia del fármaco neuromodulador.

18. El método o el vector de terapia génica de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores, en donde la sobreexpresión de la subunidad del canal iónico Kv7.3 desplaza el potencial de membrana en reposo de la neurona objetivo alejándolo del umbral en presencia del fármaco neuromodulador.

19. El método o el vector de terapia génica de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores, en donde la sobreexpresión de la subunidad del canal iónico Kv7.3 reduce la excitabilidad de la neurona objetivo.

20. El método o el vector de terapia génica de acuerdo con cualquier párrafo anterior, en donde la sobreexpresión de la subunidad del canal iónico Kv7.3 reduce la excitabilidad de una pluralidad de neuronas objetivo, según se registra utilizando un dispositivo de matriz de microelectrodos (MME).

21. El método o el vector de terapia génica de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores, en donde la sobreexpresión de la subunidad del canal iónico Kv7.3 por la neurona objetivo reduce la actividad de las células inervadas por las terminales axónicas de la neurona objetivo.

22. El método de los párrafos 19 a 21 en donde la reducción de la excitabilidad de la neurona objetivo, o la reducción de la actividad de las células inervadas por las terminales axónicas de la neurona objetivo, ocurre o aumenta en

presencia del fármaco neuromodulador.

23. Uso del vector de terapia génica de acuerdo con los párrafos 6 a 10 en la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de afecciones mejoradas mediante la sobrerregulación de la expresión de los canales iónicos Kv7.3.

24. Uso del vector de terapia génica de acuerdo con los párrafos 6 a 10 en la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un trastorno neurológico asociado con una mayor excitabilidad de las neuronas, como por ejemplo cuando el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en: epilepsia, espasticidad, BNFS, enfermedad de Parkinson, ELA, dolor nociceptivo y dolor no nociceptivo.

25. Uso de un vector de terapia génica de acuerdo con los párrafos 6 a 10 en la preparación de un medicamento para uso como antiespástico.

REFERENCIAS

Gómez-Posada, J. C. et al. A Pore Residue of the KCNQ3 Potassium M-Channel Subunit Controls Surface Expression. *Journal of Neuroscience* 30, 9316–9323 (2010).

Zaika, O., Hernandez, C. C., Bal, M., Tolstykh, G. P. & Shapiro, M. S. Determinants within the Turret and Pore-Loop Domains of KCNQ3 K⁺ Channels Governing Functional Activity. *Biophys J* 95, 5121–5137 (2008).

Musella, S. et al. Beyond Retigabine: Design, Synthesis, and Pharmacological Characterization of a Potent and Chemically Stable Neuronal Kv7 Channel Activator with Anticonvulsant Activity. *J Med Chem* 65, 11340–11364 (2022).

Corbin-Leftwich, A. et al. Retigabine holds KV7 channels open and stabilizes the resting potential. *Journal of General Physiology* 147, 229–241 (2016).

Gunthorpe, M., Large, C., Epilepsia, R. S.- & 2012, undefined. The mechanism of action of retigabine (ezogabine), a first-in-class K⁺ channel opener for the treatment of epilepsy. *Wiley Online Library* 53, 412–424 (2012).

French, J. A. et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of ezogabine (retigabine) in partial epilepsy. *Neurology* 76, 1555–1563 (2011).

Villalba-Galea, C. A. Modulation of KV7 Channel Deactivation by PI(4,5)P2. *Front Pharmacol* 11, (2020).

Brickel, N. et al. Safety of retigabine in adults with partial-onset seizures after long-term exposure: focus on unexpected ophthalmological and dermatological events. *Epilepsy & Behavior* 102, 106580 (2020).

Lerche, H. et al. Efficacy and safety of ezogabine/retigabine as adjunctive therapy to specified single antiepileptic medications in an open-label study of adults with partial-onset seizures. *Seizure* 30, 93–100 (2015).

Harris, J.A. and Murphy, J.A. Retigabine (ezogabine) as add-on therapy for partial-onset seizures: an update for clinicians. *Ther Adv Chronic Dis.* 2011 Nov; 2(6): 371-6.

SECUENCIAS

SEQ ID 1 - tipo silvestre Kv7,3

>ENA|AAC96101|AAC96101.1 Homo sapiens (human) canal de potasio

ATGGGGCTCAAGGCGCGCAGGGCGGCGGGGGCGGCTGGCGGCGGCGGCGACG
GGGGCGGC

GGAGGCGGCGGGGCGGCTAACCCAGCCGGAGGGGACGCGGCGGCGGCCGGC
GACGAGGAG

CGGAAAGTGGGGCTGGCGCCCGGCGACGTGGAGCAAGTCACCTTGGCGCTCGG
GGCCGGA

GCCGACAAAGACGGGACCCTGCTGCTGGAGGGCGGCGGCCGCGACGAGGGGC
AGCGGAGG

ACCCCGCAGGGCATCGGGCTCCTGGCCAAGACCCCGCTGAGCCGCCAGTCAA
GAGAAAC

AACGCCAAGTACCGGCGCATCCAACTTTGATCTACGACGCCCTGGAGAGACCG
CGGGGC
TGGGCGCTGCTTTACCACGCGTTGGTGTTCCTGATTGTCCTGGGGTGCTTGATTC
TGGCT
GTCCTGACCACATTCAAGGAGTATGAGACTGTCTCGGGAGACTGGCTTCTGTTAC
TGGAG
ACATTTGCTATTTTCATCTTTGGAGCCGAGTTTGCTTTGAGGATCTGGGCTGCTGG
ATGT
TGCTGCCGATACAAAGGCTGGCGGGGCCGACTGAAGTTTGCCAGGAAGCCCCTG
TGCATG
TTGGACATCTTTGTGCTGATTGCCTCTGTGCCAGTGGTTGCTGTGGGAAACCAAG
GCAAT
GTTCTGGCCACCTCCCTGCGAAGCCTGCGCTTCCTGCAGATCCTGCGCATGCTG
CGGATG
GACCGGAGAGGTGGCACCTGGAAGCTTCTGGGCTCAGCCATCTGTGCCCACAGC
AAAGAA
CTCATCACGGCCTGGTACATCGGTTTTCTGACACTCATCCTTTCTTCATTTCTTGT
CTAC
CTGGTTGAGAAAGACGTCCCAGAGGTGGATGCACAAGGAGAGGAGATGAAAGAG
GAGTTT
GAGACCTATGCAGATGCCCTGTGGTGGGGCCTGATCACACTGGCCACCATTGGC
TATGGA
GACAAGACACCCAAAACGTGGGAAGGCCGTCTGATTGCCGCCACCTTTTCCTTAA
TTGGC
GTCTCCTTTTTTGCCCTTCCAGCGGGCATCCTGGGGTCCGGGCTGGCCCTCAAG
GTGCAG
GAGCAACACCGTCAGAAGCACTTTGAGAAAAGGAGGAAGCCAGCTGCTGAGCTC
ATTCAG

GCTGCCTGGAGGTATTATGCTACCAACCCCAACAGGATTGACCTGGTGGCGACAT
GGAGA
TTTTATGAATCAGTCGTCTCTTTTCCTTTCTTCAGGAAAGAACAGCTGGAGGCAGC
ATCC
AGCCAAAAGCTGGGTCTCTTGGATCGGGTTCGCCTTTCTAATCCTCGTGGTAGCA
ATACT
AAAGGAAAGCTATTTACCCCTCTGAATGTAGATGCCATAGAAGAAAGTCCTTCTAA
AGAA
CCAAAGCCTGTTGGCTTAAACAATAAAGAGCGTTTCCGCACGGCCTTCCGCATGA
AAGCC
TACGCTTTCTGGCAGAGTTCTGAAGATGCCGGGACAGGTGACCCCATGGCGGAA
GACAGG
GGCTATGGGAATGACTTCCCCATCGAAGACATGATCCCCACCCTGAAGGCCGCC
ATCCGA
GCCGTCAGAATTCTACAATTCCGTCTCTATAAAAAAAATTCAAGGAGACTTTGAG
GCCT
TACGATGTGAAGGATGTGATTGAGCAGTATTCTGCCGGGCATCTCGACATGCTTT
CCAGG
ATAAAGTACCTTCAGACGAGAATAGATATGATTTTCACCCCTGGACCTCCCTCCAC
GCCA
AAACACAAGAAGTCTCAGAAAGGGTCAGCATTACCTTCCCATCCCAGCAATCTC
CCAGG
AATGAACCATATGTAGCCAGACCATCCACATCAGAAATCGAAGACCAAAGCATGAT
GGGG
AAGTTTGTAAAAGTTGAAAGACAGGTTTCAGGACATGGGGAAGAAGCTGGACTTCC
TCGTG
GATATGCACATGCAACACATGGAACGGTTGCAGGTGCAGGTACGGAGTATTACC
CAACC

AAGGGCACCTCCTCGCCAGCTGAAGCAGAGAAGAAGGAGGACAACAGGTATTCC
GATTTG
AAAACCATCATCTGCAACTATTCTGAGACAGGCCCCCGGAACCACCCTACAGCT
TCCAC
CAGGTGACCATTGACAAAGTCAGCCCCTATGGGTTTTTTGCACATGACCCTGTGA
ACCTG
CCCCGAGGGGGACCCAGTTCTGGAAAGGTTTCAGGCAACTCCTCCTTCCTCAGCA
ACAACG
TATGTGGAGAGGCCACGGTCCTGCCTATCTTGACTCTTCTCGACTCCCGAGTGA
GCTGC
CACTCCCAGGCTGACCTGCAGGGCCCCTACTCGGACCGAATCTCCCCCGGCAG
AGACGT
AGCATCACGCGAGACAGTGACACACCTCTGTCCCTGATGTGGTCAACCACGAG
GAGCTG
GAGAGGTCTCCAAGTGGCTTCAGCATCTCCCAGGACAGAGATGATTATGTGTTCCG
GCCCC
AATGGGGGGTTCGAGCTGGATGAGGGAGAAGCGGTACCTCGCCGAGGGTGAGAC
GGACACA
GACACGGACCCCTTCACGCCCAGCGGCTCCATGCCTCTGTGTCGTCCACAGGGGAT
GGGATT
TCTGATTCAGTATGGACCCCTTCCAATAAGCCCATTAA

SEQ ID 2 – Kv7,3 A315T

>ENA|AAC96101|AAC96101.1 Homo sapiens (human) canal de potasio A315T

ATGGGGCTCAAGGCGCGCAGGGCGGCGGGGGCGGCTGGCGGCGGCGGCGACG
GGGGCGGC

GGAGGCGGCGGGGCGGCTAACCCAGCCGGAGGGGACGCGGCGGCGGCCGGC
GACGAGGAG
CGGAAAGTGGGGCTGGCGCCCGGCGACGTGGAGCAAGTCACCTTGGCGCTCGG
GGCCGGA
GCCGACAAAGACGGGACCCTGCTGCTGGAGGGCGGCGGCCGCGACGAGGGGC
AGCGGAGG
ACCCCGCAGGGCATCGGGCTCCTGGCCAAGACCCCGCTGAGCCGCCAGTCAA
GAGAAAC
AACGCCAAGTACCGGCGCATCCAACTTTGATCTACGACGCCCTGGAGAGACCG
CGGGGC
TGGGCGCTGCTTTACCACGCGTTGGTGTTCTGATTGTCCTGGGGTGCTTGATTG
TGGCT
GTCCTGACCACATTCAAGGAGTATGAGACTGTCTCGGGAGACTGGCTTCTGTTAC
TGGAG
ACATTTGCTATTTTCATCTTTGGAGCCGAGTTTGCTTTGAGGATCTGGGCTGCTGG
ATGT
TGCTGCCGATACAAAGGCTGGCGGGGCGGACTGAAGTTTGCCAGGAAGCCCCTG
TGCATG
TTGGACATCTTTGTGCTGATTGCCTCTGTGCCAGTGGTTGCTGTGGGAAACCAAG
GCAAT
GTTCTGGCCACCTCCCTGCGAAGCCTGCGCTTCCTGCAGATCCTGCGCATGCTG
CGGATG
GACCGGAGAGGTGGCACCTGGAAGCTTCTGGGCTCAGCCATCTGTGCCACAGC
AAAGAA
CTCATCACGGCCTGGTACATCGGTTTCCTGACACTCATCCTTTCTTCATTTCTTGT
CTAC
CTGGTTGAGAAAGACGTCCCAGAGGTGGATGCACAAGGAGAGGAGATGAAAGAG
GAGTTT

GAGACCTATGCAGATGCCCTGTGGTGGGGCCTGATCACACTGACCACCATTGGC
TATGGA
GACAAGACACCCAAAACGTGGGAAGGCCGTCTGATTGCCGCCACCTTTTCCTTAA
TTGGC
GTCTCCTTTTTTGCCCTTCCAGCGGGCATCCTGGGGTCCGGGCTGGCCCTCAAG
GTGCAG
GAGCAACACCGTCAGAAGCACTTTGAGAAAAGGAGGAAGCCAGCTGCTGAGCTC
ATTCAG
GCTGCCTGGAGGTATTATGCTACCAACCCCAACAGGATTGACCTGGTGGCGACAT
GGAGA
TTTTATGAATCAGTCGTCTCTTTTCCTTTCTTCAGGAAAGAACAGCTGGAGGCAGC
ATCC
AGCCAAAAGCTGGGTCTCTTGGATCGGGTTCGCCTTTCTAATCCTCGTGGTAGCA
ATACT
AAAGGAAAGCTATTTACCCCTCTGAATGTAGATGCCATAGAAGAAAGTCCTTCTAA
AGAA
CCAAAGCCTGTTGGCTTAAACAATAAAGAGCGTTTCCGCACGGCCTTCCGCATGA
AAGCC
TACGCTTTCTGGCAGAGTTCTGAAGATGCCGGGACAGGTGACCCCATGGCGGAA
GACAGG
GGCTATGGGAATGACTTCCCCATCGAAGACATGATCCCCACCCTGAAGGCCGCC
ATCCGA
GCCGTCAGAATTCTACAATTCCGTCTCTATAAAAAAAAAATTCAAGGAGACTTTGAG
GCCT
TACGATGTGAAGGATGTGATTGAGCAGTATTCTGCCGGGCATCTCGACATGCTTT
CCAGG
ATAAAGTACCTTCAGACGAGAATAGATATGATTTTCACCCCTGGACCTCCCTCCAC
GCCA

AAACACAAGAAGTCTCAGAAAGGGTCAGCATTACCTTCCCATCCCAGCAATCTC
CCAGG
AATGAACCATATGTAGCCAGACCATCCACATCAGAAATCGAAGACCAAAGCATGAT
GGGG
AAGTTTGTAAAAGTTGAAAGACAGGTTTCAGGACATGGGGAAGAAGCTGGACTTCC
TCGTG
GATATGCACATGCAACACATGGAACGGTTGCAGGTGCAGGTCACGGAGTATTACC
CAACC
AAGGGCACCTCCTCGCCAGCTGAAGCAGAGAAGAAGGAGGACAACAGGTATTCC
GATTTG
AAAACCATCATCTGCAACTATTCTGAGACAGGCCCCCGGAACCACCCTACAGCT
TCCAC
CAGGTGACCATTGACAAAGTCAGCCCCTATGGGTTTTTTGCACATGACCCTGTGA
ACCTG
CCCCGAGGGGGACCCAGTTCTGGAAAGGTTTCAGGCAACTCCTCCTTCCTCAGCA
ACAACG
TATGTGGAGAGGCCACGGTCCTGCCTATCTTGACTCTTCTCGACTCCCGAGTGA
GCTGC
CACTCCCAGGCTGACCTGCAGGGCCCCTACTCGGACCGAATCTCCCCCGGCAG
AGACGT
AGCATCACGCGAGACAGTGACACACCTCTGTCCCTGATGTGGTCAACCACGAG
GAGCTG
GAGAGGTCTCCAAGTGGCTTCAGCATCTCCCAGGACAGAGATGATTATGTGTTCC
GCCCC
AATGGGGGGTTCGAGCTGGATGAGGGAGAAGCGGTACCTCGCCGAGGGTGAGAC
GGACACA
GACACGGACCCCTTCACGCCAGCGGCTCCATGCCTCTGTCGTCCACAGGGGAT
GGGATT

TCTGATTCAGTATGGACCCCTTCCAATAAGCCCATTAA

SEQ ID 3 – Kv7,3 A315S

>ENA|AAC96101|AAC96101.1 Homo sapiens (human) canal de potasio A315S

ATGGGGCTCAAGGCGCGCAGGGCGGCGGGGGCGGCTGGCGGCGGCGGCGACG
GGGGCGGC
GGAGGCGGCGGGGCGGCTAACCCAGCCGAGGGGACGCGGCGGCGGCCGGC
GACGAGGAG
CGGAAAGTGGGGCTGGCGCCCGGCGACGTGGAGCAAGTCACCTTGGCGCTCGG
GGCCGGA
GCCGACAAAGACGGGACCCTGCTGCTGGAGGGCGGCGGCCGCGACGAGGGGC
AGCGGAGG
ACCCCGCAGGGCATCGGGCTCCTGGCCAAGACCCCGCTGAGCCGCCCAGTCAA
GAGAAAC
AACGCCAAGTACCGGCGCATCCAACTTTGATCTACGACGCCCTGGAGAGACCG
CGGGGC
TGGGCGCTGCTTTACCACGCGTTGGTGTTCTGATTGTCCTGGGGTGCTTGATTG
TGGCT
GTCCTGACCACATTCAAGGAGTATGAGACTGTCTCGGGAGACTGGCTTCTGTTAC
TGGAG
ACATTTGCTATTTTCATCTTTGGAGCCGAGTTTGCTTTGAGGATCTGGGCTGCTGG
ATGT
TGCTGCCGATACAAAGGCTGGCGGGGCCGACTGAAGTTTGCCAGGAAGCCCCTG
TGCATG
TTGGACATCTTTGTGCTGATTGCCTCTGTGCCAGTGGTTGCTGTGGGAAACCAAG
GCAAT

GTTCTGGCCACCTCCCTGCGAAGCCTGCGCTTCCTGCAGATCCTGCGCATGCTG
CGGATG
GACCGGAGAGGTGGCACCTGGAAGCTTCTGGGCTCAGCCATCTGTGCCCACAGC
AAAGAA
CTCATCACGGCCTGGTACATCGGTTTCCTGACACTCATCCTTTCTTCATTTCTTGT
CTAC
CTGGTTGAGAAAGACGTCCCAGAGGTGGATGCACAAGGAGAGGAGATGAAAGAG
GAGTTT
GAGACCTATGCAGATGCCCTGTGGTGGGGCCTGATCACACTGTCCACCATTGGCT
ATGGA
GACAAGACACCCAAAACGTGGGAAGGCCGTCTGATTGCCGCCACCTTTTCCTTAA
TTGGC
GTCTCCTTTTTTGCCCTTCCAGCGGGCATCCTGGGGTCCGGGCTGGCCCTCAAG
GTGCAG
GAGCAACACCGTCAGAAGCACTTTGAGAAAAGGAGGAAGCCAGCTGCTGAGCTC
ATTCAG
GCTGCCTGGAGGTATTATGCTACCAACCCCAACAGGATTGACCTGGTGGCGACAT
GGAGA
TTTTATGAATCAGTCGTCTCTTTTCCTTTCTTCAGGAAAGAACAGCTGGAGGCAGC
ATCC
AGCCAAAAGCTGGGTCTCTTGGATCGGGTTCGCCTTTCTAATCCTCGTGGTAGCA
ATACT
AAAGGAAAGCTATTTACCCCTCTGAATGTAGATGCCATAGAAGAAAGTCCTTCTAA
AGAA
CCAAAGCCTGTTGGCTTAAACAATAAAGAGCGTTTCCGCACGGCCTTCCGCATGA
AAGCC
TACGCTTTCTGGCAGAGTTCTGAAGATGCCGGGACAGGTGACCCCATGGCGGAA
GACAGG

GGCTATGGGAATGACTTCCCCATCGAAGACATGATCCCCACCCTGAAGGCCGCC
ATCCGA
GCCGTCAGAATTCTACAATTCCGTCTCTATAAAAAAAATTCAAGGAGACTTTGAG
GCCT
TACGATGTGAAGGATGTGATTGAGCAGTATTCTGCCGGGCATCTCGACATGCTTT
CCAGG
ATAAAGTACCTTCAGACGAGAATAGATATGATTTTCACCCCTGGACCTCCCTCCAC
GCCA
AAACACAAGAAGTCTCAGAAAGGGTCAGCATTACCTTCCCATCCCAGCAATCTC
CCAGG
AATGAACCATATGTAGCCAGACCATCCACATCAGAAATCGAAGACCAAAGCATGAT
GGGG
AAGTTTGTAAAAGTTGAAAGACAGGTTTCAGGACATGGGGAAGAAGCTGGACTTCC
TCGTG
GATATGCACATGCAACACATGGAACGGTTGCAGGTGCAGGTCACGGAGTATTACC
CAACC
AAGGGCACCTCCTCGCCAGCTGAAGCAGAGAAGAAGGAGGACAACAGGTATTCC
GATTTG
AAAACCATCATCTGCAACTATTCTGAGACAGGCCCCCGGAACCACCCTACAGCT
TCCAC
CAGGTGACCATTGACAAAGTCAGCCCCTATGGGTTTTTTGCACATGACCCTGTGA
ACCTG
CCCCGAGGGGGACCCAGTTCTGGAAAGGTTTCAGGCAACTCCTCCTTCCTCAGCA
ACAACG
TATGTGGAGAGGCCACGGTCCTGCCTATCTTGACTCTTCTCGACTCCCGAGTGA
GCTGC
CACTCCCAGGCTGACCTGCAGGGCCCCTACTCGGACCGAATCTCCCCCGGCAG
AGACGT

AGCATCACGCGAGACAGTGACACACCTCTGTCCCTGATGTCCGTCAACCACGAG
GAGCTG
GAGAGGTCTCCAAGTGGCTTCAGCATCTCCCAGGACAGAGATGATTATGTGTTCCG
GCCCC
AATGGGGGGTTCGAGCTGGATGAGGGAGAAGCGGTACCTCGCCGAGGGTGAGAC
GGACACA
GACACGGACCCCTTCACGCCAGCGGCTCCATGCCTCTGTCGTCCACAGGGGAT
GGGATT
TCTGATTCAGTATGGACCCCTTCCAATAAGCCCATTAA

SEQ ID 4 – Kv7,3 A315V

>ENA|AAC96101|AAC96101.1 Homo sapiens (human) canal de potasio A315V
ATGGGGCTCAAGGCGCGCAGGGCGGCGGGGGCGGCTGGCGGCGGCGGCGACG
GGGGCGGC
GGAGGCGGCGGGGCGGCTAACCCAGCCGGAGGGGACGCGGCGGCGGCCGGC
GACGAGGAG
CGGAAAGTGGGGCTGGCGCCCGGCGACGTGGAGCAAGTCACCTTGGCGCTCGG
GGCCGGA
GCCGACAAAGACGGGACCCTGCTGCTGGAGGGCGGCGGCCGCGACGAGGGGC
AGCGGAGG
ACCCGCGAGGGCATCGGGCTCCTGGCCAAGACCCCGCTGAGCCGCCAGTCAA
GAGAAAC
AACGCCAAGTACCGGCGCATCCAACTTTGATCTACGACGCCCTGGAGAGACCG
CGGGGC
TGGGCGCTGCTTTACCACGCGTTGGTGTTCCTGATTGTCTGGGGTGCTTGATTC
TGGCT

GTCCTGACCACATTCAAGGAGTATGAGACTGTCTCGGGAGACTGGCTTCTGTTAC
TGGAG
ACATTTGCTATTTTCATCTTTGGAGCCGAGTTTGCTTTGAGGATCTGGGCTGCTGG
ATGT
TGCTGCCGATACAAAGGCTGGCGGGGCCGACTGAAGTTTGCCAGGAAGCCCCTG
TGCATG
TTGGACATCTTTGTGCTGATTGCCTCTGTGCCAGTGGTTGCTGTGGGAAACCAAG
GCAAT
GTTCTGGCCACCTCCCTGCGAAGCCTGCGCTTCCTGCAGATCCTGCGCATGCTG
CGGATG
GACCGGAGAGGTGGCACCTGGAAGCTTCTGGGCTCAGCCATCTGTGCCCACAGC
AAAGAA
CTCATCACGGCCTGGTACATCGGTTTCCTGACACTCATCCTTTCTTCATTTCTTGT
CTAC
CTGGTTGAGAAAGACGTCCCAGAGGTGGATGCACAAGGAGAGGAGATGAAAGAG
GAGTTT
GAGACCTATGCAGATGCCCTGTGGTGGGGCCTGATCACACTGGTCACCATTGGC
TATGGA
GACAAGACACCCAAAACGTGGGAAGGCCGTCTGATTGCCGCCACCTTTTCCTTAA
TTGGC
GTCTCCTTTTTTTGCCCTTCCAGCGGGCATCCTGGGGTCCGGGCTGGCCCTCAAG
GTGCAG
GAGCAACACCGTCAGAAGCACTTTGAGAAAAGGAGGAAGCCAGCTGCTGAGCTC
ATTCAG
GCTGCCTGGAGGTATTATGCTACCAACCCCAACAGGATTGACCTGGTGGCGACAT
GGAGA
TTTTATGAATCAGTCGTCTCTTTTCCTTTCTTCAGGAAAGAACAGCTGGAGGCAGC
ATCC

AGCCAAAAGCTGGGTCTCTTGGATCGGGTTCGCCTTTCTAATCCTCGTGGTAGCA
ATACT
AAAGGAAAGCTATTTACCCCTCTGAATGTAGATGCCATAGAAGAAAGTCCTTCTAA
AGAA
CCAAAGCCTGTTGGCTTAAACAATAAAGAGCGTTTCCGCACGGCCTTCCGCATGA
AAGCC
TACGCTTTCTGGCAGAGTTCTGAAGATGCCGGGACAGGTGACCCCATGGCGGAA
GACAGG
GGCTATGGGAATGACTTCCCCATCGAAGACATGATCCCCACCCTGAAGGCCGCC
ATCCGA
GCCGTCAGAATTCTACAATTCCGTCTCTATAAAAAAAATTCAAGGAGACTTTGAG
GCCT
TACGATGTGAAGGATGTGATTGAGCAGTATTCTGCCGGGCATCTCGACATGCTTT
CCAGG
ATAAAGTACCTTCAGACGAGAATAGATATGATTTTCACCCCTGGACCTCCCTCCAC
GCCA
AAACACAAGAAGTCTCAGAAAGGGTCAGCATTACCTTCCCATCCCAGCAATCTC
CCAGG
AATGAACCATATGTAGCCAGACCATCCACATCAGAAATCGAAGACCAAAGCATGAT
GGGG
AAGTTTGTAAAAGTTGAAAGACAGGTTGAGGACATGGGGAAGAAGCTGGACTTCC
TCGTG
GATATGCACATGCAACACATGGAACGGTTGCAGGTGCAGGTACGGAGTATTACC
CAACC
AAGGGCACCTCCTCGCCAGCTGAAGCAGAGAAGAAGGAGGACAACAGGTATTCC
GATTTG
AAAACCATCATCTGCAACTATTCTGAGACAGGCCCCCGGAACCACCCTACAGCT
TCCAC

CAGGTGACCATTGACAAAGTCAGCCCCTATGGGTTTTTTGCACATGACCCTGTGA
ACCTG
CCCCGAGGGGGACCCAGTTCTGGAAAGGTTCAAGGCAACTCCTCCTTCCTCAGCA
ACAACG
TATGTGGAGAGGCCACGGTCCTGCCTATCTTGACTCTTCTCGACTCCCGAGTGA
GCTGC
CACTCCCAGGCTGACCTGCAGGGCCCCTACTCGGACCGAATCTCCCCCGGCAG
AGACGT
AGCATCACGCGAGACAGTGACACACCTCTGTCCCTGATGTGGTCAACCACGAG
GAGCTG
GAGAGGTCTCCAAGTGGCTTCAGCATCTCCCAGGACAGAGATGATTATGTGTTCC
GCCCC
AATGGGGGGTTCGAGCTGGATGAGGGAGAAGCGGTACCTCGCCGAGGGTGAGAC
GGACACA
GACACGGACCCCTTCACGCCCAGCGGCTCCATGCCTCTGTCTCCACAGGGGAT
GGGATT
TCTGATTCAGTATGGACCCCTTCCAATAAGCCCATTAA

SEQ ID 5 – Kv7,3 A315C

>ENA|AAC96101|AAC96101.1 Homo sapiens (human) canal de potasio A315C
ATGGGGCTCAAGGCGCGCAGGGCGGCGGGGGCGGCTGGCGGCGGCGGCGACG
GGGGCGGC
GGAGGCGGCGGGGGCGGCTAACCCAGCCGGAGGGGACGCGGCGGCGGCCGGC
GACGAGGAG
CGGAAAGTGGGGCTGGCGCCCGGCGACGTGGAGCAAGTCACCTTGGCGCTCGG
GGCCGGA

GCCGACAAAGACGGGACCCTGCTGCTGGAGGGCGGCGGCCGCGACGAGGGGC
AGCGGAGG
ACCCCGCAGGGCATCGGGCTCCTGGCCAAGACCCCGCTGAGCCGCCAGTCAA
GAGAAAC
AACGCCAAGTACCGGCGCATCCAACTTTGATCTACGACGCCCTGGAGAGACCG
CGGGGC
TGGGCGCTGCTTTACCACGCGTTGGTGTTCCTGATTGTCCTGGGGTGCTTGATTG
TGGCT
GTCCTGACCACATTCAAGGAGTATGAGACTGTCTCGGGAGACTGGCTTCTGTTAC
TGGAG
ACATTTGCTATTTTCATCTTTGGAGCCGAGTTTGCTTTGAGGATCTGGGCTGCTGG
ATGT
TGCTGCCGATACAAAGGCTGGCGGGGCGGCGACTGAAGTTTGCCAGGAAGCCCCTG
TGCATG
TTGGACATCTTTGTGCTGATTGCCTCTGTGCCAGTGGTTGCTGTGGGAAACCAAG
GCAAT
GTTCTGGCCACCTCCCTGCGAAGCCTGCGCTTCCTGCAGATCCTGCGCATGCTG
CGGATG
GACCGGAGAGGTGGCACCTGGAAGCTTCTGGGCTCAGCCATCTGTGCCCACAGC
AAAGAA
CTCATCACGGCCTGGTACATCGGTTTCCTGACACTCATCCTTTCTTCATTTCTTGT
CTAC
CTGGTTGAGAAAGACGTCCCAGAGGTGGATGCACAAGGAGAGGAGATGAAAGAG
GAGTTT
GAGACCTATGCAGATGCCCTGTGGTGGGGCCTGATCACACTGTGCACCATTGGC
TATGGA
GACAAGACACCCAAAACGTGGGAAGGCCGTCTGATTGCCGCCACCTTTTCCTTAA
TTGGC

GTCTCCTTTTTTGCCCTTCCAGCGGGCATCCTGGGGTCCGGGCTGGCCCTCAAG
GTGCAG
GAGCAACACCGTCAGAAGCACTTTGAGAAAAGGAGGAAGCCAGCTGCTGAGCTC
ATTCAG
GCTGCCTGGAGGTATTATGCTACCAACCCCAACAGGATTGACCTGGTGGCGACAT
GGAGA
TTTTATGAATCAGTCGTCTCTTTTCCTTTCTTCAGGAAAGAACAGCTGGAGGCAGC
ATCC
AGCCAAAAGCTGGGTCTCTTGGATCGGGTTCGCCTTTCTAATCCTCGTGGTAGCA
ATACT
AAAGGAAAGCTATTTACCCCTCTGAATGTAGATGCCATAGAAGAAAGTCCTTCTAA
AGAA
CCAAAGCCTGTTGGCTTAAACAATAAAGAGCGTTTCCGCACGGCCTTCCGCATGA
AAGCC
TACGCTTTCTGGCAGAGTTCTGAAGATGCCGGGACAGGTGACCCCATGGCGGAA
GACAGG
GGCTATGGGAATGACTTCCCCATCGAAGACATGATCCCCACCCTGAAGGCCGCC
ATCCGA
GCCGTCAGAATTCTACAATTCCGTCTCTATAAAAAAAAAATTCAAGGAGACTTTGAG
GCCT
TACGATGTGAAGGATGTGATTGAGCAGTATTCTGCCGGGCATCTCGACATGCTTT
CCAGG
ATAAAGTACCTTCAGACGAGAATAGATATGATTTTCACCCCTGGACCTCCCTCCAC
GCCA
AAACACAAGAAGTCTCAGAAAGGGTCAGCATTACCTTCCCATCCCAGCAATCTC
CCAGG
AATGAACCATATGTAGCCAGACCATCCACATCAGAAATCGAAGACCAAAGCATGAT
GGGG

AAGTTTGTAAAAGTTGAAAGACAGGTTTCAGGACATGGGGAAGAAGCTGGACTTCC
TCGTG
GATATGCACATGCAACACATGGAACGGTTGCAGGTGCAGGTCACGGAGTATTACC
CAACC
AAGGGCACCTCCTCGCCAGCTGAAGCAGAGAAGAAGGAGGACAACAGGTATTCC
GATTTG
AAAACCATCATCTGCAACTATTCTGAGACAGGCCCCCGGAACCACCCTACAGCT
TCCAC
CAGGTGACCATTGACAAAGTCAGCCCCTATGGGTTTTTTGCACATGACCCTGTGA
ACCTG
CCCCGAGGGGGACCCAGTTCTGGAAAGGTTTCAGGCAACTCCTCCTTCCTCAGCA
ACAACG
TATGTGGAGAGGCCACGGTCCTGCCTATCTTGACTCTTCTCGACTCCCGAGTGA
GCTGC
CACTCCCAGGCTGACCTGCAGGGCCCCTACTCGGACCGAATCTCCCCCGGCAG
AGACGT
AGCATCACGCGAGACAGTGACACACCTCTGTCCCTGATGTGGTCAACCACGAG
GAGCTG
GAGAGGTCTCCAAGTGGCTTCAGCATCTCCCAGGACAGAGATGATTATGTGTTCC
GCCCC
AATGGGGGGTTCGAGCTGGATGAGGGAGAAGCGGTACCTCGCCGAGGGTGAGAC
GGACACA
GACACGGACCCCTTCACGCCAGCGGCTCCATGCCTCTGTGTCGTCCACAGGGGAT
GGGATT
TCTGATTCAGTATGGACCCCTTCCAATAAGCCCATTAA

SEQ ID 6 – Kv7,3 A315N

>ENA|AAC96101|AAC96101.1 Homo sapiens (human) canal de potasio A315N

ATGGGGCTCAAGGCGCGCAGGGCGGCGGGGGCGGCTGGCGGCGGCGGCGACG
GGGGCGGC
GGAGGCGGCGGGGCGGCTAACCCAGCCGAGGGGACGCGGCGGCGGCCGGC
GACGAGGAG
CGGAAAGTGGGGCTGGCGCCCGGCGACGTGGAGCAAGTCACCTTGGCGCTCGG
GGCCGGA
GCCGACAAAGACGGGACCCTGCTGCTGGAGGGCGGCGGCCGCGACGAGGGGC
AGCGGAGG
ACCCCGCAGGGCATCGGGCTCCTGGCCAAGACCCCGCTGAGCCGCCCAGTCAA
GAGAAAC
AACGCCAAGTACCGGCGCATCCAACTTTGATCTACGACGCCCTGGAGAGACCG
CGGGGC
TGGGCGCTGCTTTACCACGCGTTGGTGTTCTGATTGTCCTGGGGTGCTTGATTC
TGGCT
GTCCTGACCACATTCAAGGAGTATGAGACTGTCTCGGGAGACTGGCTTCTGTTAC
TGGAG
ACATTTGCTATTTTCATCTTTGGAGCCGAGTTTGCTTTGAGGATCTGGGCTGCTGG
ATGT
TGCTGCCGATACAAAGGCTGGCGGGGCCGACTGAAGTTTGCCAGGAAGCCCCTG
TGCATG
TTGGACATCTTTGTGCTGATTGCCTCTGTGCCAGTGGTTGCTGTGGGAAACCAAG
GCAAT
GTTCTGGCCACCTCCCTGCGAAGCCTGCGCTTCCTGCAGATCCTGCGCATGCTG
CGGATG
GACCGGAGAGGTGGCACCTGGAAGCTTCTGGGCTCAGCCATCTGTGCCCACAGC
AAAGAA

CTCATCACGGCCTGGTACATCGGTTTCCTGACACTCATCCTTTCTTCATTTCTTGT
CTAC
CTGGTTGAGAAAGACGTCCCAGAGGTGGATGCACAAGGAGAGGAGATGAAAGAG
GAGTTT
GAGACCTATGCAGATGCCCTGTGGTGGGGCCTGATCACACTGAACACCATTGGCT
ATGGA
GACAAGACACCCAAAACGTGGGAAGGCCGTCTGATTGCCGCCACCTTTTCCTTAA
TTGGC
GTCTCCTTTTTTGCCCTTCCAGCGGGCATCCTGGGGTCCGGGCTGGCCCTCAAG
GTGCAG
GAGCAACACCGTCAGAAGCACTTTGAGAAAAGGAGGAAGCCAGCTGCTGAGCTC
ATTCAG
GCTGCCTGGAGGTATTATGCTACCAACCCCAACAGGATTGACCTGGTGGCGACAT
GGAGA
TTTTATGAATCAGTCGTCTCTTTTCCTTTCTTCAGGAAAGAACAGCTGGAGGCAGC
ATCC
AGCCAAAAGCTGGGTCTCTTGGATCGGGTTCGCCTTTCTAATCCTCGTGGTAGCA
ATACT
AAAGGAAAGCTATTTACCCCTCTGAATGTAGATGCCATAGAAGAAAGTCCTTCTAA
AGAA
CCAAAGCCTGTTGGCTTAAACAATAAAGAGCGTTTCCGCACGGCCTTCCGCATGA
AAGCC
TACGCTTTCTGGCAGAGTTCTGAAGATGCCGGGACAGGTGACCCCATGGCGGAA
GACAGG
GGCTATGGGAATGACTTCCCCATCGAAGACATGATCCCCACCCTGAAGGCCGCC
ATCCGA
GCCGTCAGAATTCTACAATTCCGTCTCTATAAAAAAAATTCAAGGAGACTTTGAG
GCCT

TACGATGTGAAGGATGTGATTGAGCAGTATTCTGCCGGGCATCTCGACATGCTTT
CCAGG
ATAAAGTACCTTCAGACGAGAATAGATATGATTTTCACCCCTGGACCTCCCTCCAC
GCCA
AAACACAAGAAGTCTCAGAAAGGGTCAGCATTACCTTCCCATCCCAGCAATCTC
CCAGG
AATGAACCATATGTAGCCAGACCATCCACATCAGAAATCGAAGACCAAAGCATGAT
GGGG
AAGTTTGTAAAAGTTGAAAGACAGGTTTCAGGACATGGGGAAGAAGCTGGACTTCC
TCGTG
GATATGCACATGCAACACATGGAACGGTTGCAGGTGCAGGTCACGGAGTATTACC
CAACC
AAGGGCACCTCCTCGCCAGCTGAAGCAGAGAAGAAGGAGGACAACAGGTATTCC
GATTG
AAAACCATCATCTGCAACTATTCTGAGACAGGCCCCCGGAACCACCCTACAGCT
TCCAC
CAGGTGACCATTGACAAAGTCAGCCCCTATGGGTTTTTTGCACATGACCCTGTGA
ACCTG
CCCCGAGGGGGACCCAGTTCTGGAAAGGTTTCAGGCAACTCCTCCTTCCTCAGCA
ACAACG
TATGTGGAGAGGCCACGGTCCTGCCTATCTTGACTCTTCTCGACTCCCGAGTGA
GCTGC
CACTCCCAGGCTGACCTGCAGGGCCCCTACTCGGACCGAATCTCCCCCGGCAG
AGACGT
AGCATCACGCGAGACAGTGACACACCTCTGTCCCTGATGTGGTCAACCACGAG
GAGCTG
GAGAGGTCTCCAAGTGGCTTCAGCATCTCCCAGGACAGAGATGATTATGTGTTCC
GCCCC

AATGGGGGGTTCGAGCTGGATGAGGGAGAAGCGGTACCTCGCCGAGGGTGAGAC
GGACACA
GACACGGACCCCTTCACGCCCAGCGGCTCCATGCCTCTGTCGTCCACAGGGGAT
GGGATT
TCTGATTCAGTATGGACCCCTTCCAATAAGCCCATTAA

SEQ ID 7 – Kv7,3 A315Q

>ENA|AAC96101|AAC96101.1 Homo sapiens (human) canal de potasio A315Q
ATGGGGCTCAAGGCGCGCAGGGCGGCGGGGGCGGCTGGCGGCGGCGGCGACG
GGGGCGGC
GGAGGCGGCGGGGCGGCTAACCCAGCCGGAGGGGACGCGGCGGCGGCCGGC
GACGAGGAG
CGGAAAGTGGGGCTGGCGCCCGGCGACGTGGAGCAAGTCACCTTGGCGCTCGG
GGCCGGA
GCCGACAAAGACGGGACCCTGCTGCTGGAGGGCGGCGGCCGCGACGAGGGGC
AGCGGAGG
ACCCCGCAGGGCATCGGGCTCCTGGCCAAGACCCCGCTGAGCCGCCAGTCAA
GAGAAAC
AACGCCAAGTACCGGCGCATCCAACTTTGATCTACGACGCCCTGGAGAGACCG
CGGGGC
TGGGCGCTGCTTTACCACGCGTTGGTGTTCTGATTGTCTGGGGTGCTTGATTG
TGGCT
GTCCTGACCACATTCAAGGAGTATGAGACTGTCTCGGGAGACTGGCTTCTGTTAC
TGGAG
ACATTTGCTATTTTCATCTTTGGAGCCGAGTTTGCTTTGAGGATCTGGGCTGCTGG
ATGT

TGCTGCCGATACAAAGGCTGGCGGGGCCGACTGAAGTTTGCCAGGAAGCCCCTG
TGCATG
TTGGACATCTTTGTGCTGATTGCCTCTGTGCCAGTGGTTGCTGTGGGAAACCAAG
GCAAT
GTTCTGGCCACCTCCCTGCGAAGCCTGCGCTTCCTGCAGATCCTGCGCATGCTG
CGGATG
GACCGGAGAGGTGGCACCTGGAAGCTTCTGGGCTCAGCCATCTGTGCCCACAGC
AAAGAA
CTCATCACGGCCTGGTACATCGGTTTCCTGACACTCATCCTTTCTTCATTTCTTGT
CTAC
CTGGTTGAGAAAGACGTCCCAGAGGTGGATGCACAAGGAGAGGAGATGAAAGAG
GAGTTT
GAGACCTATGCAGATGCCCTGTGGTGGGGCCTGATCACACTGCAGACCATTGGC
TATGGA
GACAAGACACCCAAAACGTGGGAAGGCCGTCTGATTGCCGCCACCTTTTCCTTAA
TTGGC
GTCTCCTTTTTTGCCCTTCCAGCGGGCATCCTGGGGTCCGGGCTGGCCCTCAAG
GTGCAG
GAGCAACACCGTCAGAAGCACTTTGAGAAAAGGAGGAAGCCAGCTGCTGAGCTC
ATTCAG
GCTGCCTGGAGGTATTATGCTACCAACCCCAACAGGATTGACCTGGTGGCGACAT
GGAGA
TTTTATGAATCAGTCGTCTCTTTTCCTTTCTTCAGGAAAGAACAGCTGGAGGCAGC
ATCC
AGCCAAAAGCTGGGTCTCTTGGATCGGGTTCGCCTTTCTAATCCTCGTGGTAGCA
ATACT
AAAGGAAAGCTATTTACCCCTCTGAATGTAGATGCCATAGAAGAAAGTCCTTCTAA
AGAA

CCAAAGCCTGTTGGCTTAAACAATAAAGAGCGTTTCCGCACGGCCTTCCGCATGA
AAGCC
TACGCTTTCTGGCAGAGTTCTGAAGATGCCGGGACAGGTGACCCCATGGCGGAA
GACAGG
GGCTATGGGAATGACTTCCCCATCGAAGACATGATCCCCACCCTGAAGGCCGCC
ATCCGA
GCCGTCAGAATTCTACAATTCCGTCTCTATAAAAAAAATTCAAGGAGACTTTGAG
GCCT
TACGATGTGAAGGATGTGATTGAGCAGTATTCTGCCGGGCATCTCGACATGCTTT
CCAGG
ATAAAGTACCTTCAGACGAGAATAGATATGATTTTCACCCCTGGACCTCCCTCCAC
GCCA
AAACACAAGAAGTCTCAGAAAGGGTCAGCATTACCTTCCCATCCCAGCAATCTC
CCAGG
AATGAACCATATGTAGCCAGACCATCCACATCAGAAATCGAAGACCAAAGCATGAT
GGGG
AAGTTTGTAAAAGTTGAAAGACAGGTTTCAGGACATGGGGAAGAAGCTGGACTTCC
TCGTG
GATATGCACATGCAACACATGGAACGGTTGCAGGTGCAGGTCACGGAGTATTACC
CAACC
AAGGGCACCTCCTCGCCAGCTGAAGCAGAGAAGAAGGAGGACAACAGGTATTCC
GATTG
AAAACCATCATCTGCAACTATTCTGAGACAGGCCCCCGGAACCACCCTACAGCT
TCCAC
CAGGTGACCATTGACAAAGTCAGCCCCTATGGGTTTTTTGCACATGACCCTGTGA
ACCTG
CCCCGAGGGGGACCCAGTTCTGGAAAGGTTTCAGGCAACTCCTCCTTCCTCAGCA
ACAACG

TATGTGGAGAGGCCACGGTCCTGCCTATCTTGACTCTTCTCGACTCCCGAGTGA
GCTGC
CACTCCCAGGCTGACCTGCAGGGCCCCTACTCGGACCGAATCTCCCCCGGCAG
AGACGT
AGCATCACGCGAGACAGTGACACACCTCTGTCCCTGATGTGGTCAACCACGAG
GAGCTG
GAGAGGTCTCCAAGTGGCTTCAGCATCTCCCAGGACAGAGATGATTATGTGTTG
GCCCC
AATGGGGGGTTCGAGCTGGATGAGGGAGAAGCGGTACCTCGCCGAGGGTGAGAC
GGACACA
GACACGGACCCCTTCACGCCAGCGGCTCCATGCCTCTGTGTCGCCACAGGGGAT
GGGATT
TCTGATTCAGTATGGACCCCTTCCAATAAGCCCATTAA

SEQ ID 8 – Kv7,3 A315Y

>ENA|AAC96101|AAC96101.1 Homo sapiens (human) canal de potasio A315Y
ATGGGGCTCAAGGCGCGCAGGGCGGCGGGGGCGGCTGGCGGCGGCGGCGACG
GGGGCGGC
GGAGGCGGCGGGGCGGCTAACCCAGCCGAGGGGACGCGGCGGCGGCCGGC
GACGAGGAG
CGGAAAGTGGGGCTGGCGCCCGGCGACGTGGAGCAAGTCACCTTGGCGCTCGG
GGCCGGA
GCCGACAAAGACGGGACCCTGCTGCTGGAGGGCGGCGGCCGCGACGAGGGGC
AGCGGAGG
ACCCCGCAGGGCATCGGGCTCCTGGCCAAGACCCCGCTGAGCCGCCAGTCAA
GAGAAAC

AACGCCAAGTACCGGCGCATCCAAACTTTGATCTACGACGCCCTGGAGAGACCG
CGGGGC
TGGGCGCTGCTTTACCACGCGTTGGTGTTCCTGATTGTCCTGGGGTGCTTGATTG
TGGCT
GTCCTGACCACATTCAAGGAGTATGAGACTGTCTCGGGAGACTGGCTTCTGTTAC
TGGAG
ACATTTGCTATTTTCATCTTTGGAGCCGAGTTTGCTTTGAGGATCTGGGCTGCTGG
ATGT
TGCTGCCGATACAAAGGCTGGCGGGGCCGACTGAAGTTTGCCAGGAAGCCCCTG
TGCATG
TTGGACATCTTTGTGCTGATTGCCTCTGTGCCAGTGGTTGCTGTGGGAAACCAAG
GCAAT
GTTCTGGCCACCTCCCTGCGAAGCCTGCGCTTCCTGCAGATCCTGCGCATGCTG
CGGATG
GACCGGAGAGGTGGCACCTGGAAGCTTCTGGGCTCAGCCATCTGTGCCCACAGC
AAAGAA
CTCATCACGGCCTGGTACATCGGTTTTCTGACACTCATCCTTTCTTCATTTCTTGT
CTAC
CTGGTTGAGAAAGACGTCCCAGAGGTGGATGCACAAGGAGAGGAGATGAAAGAG
GAGTTT
GAGACCTATGCAGATGCCCTGTGGTGGGGCCTGATCACACTGTACACCATTGGCT
ATGGA
GACAAGACACCCAAAACGTGGGAAGGCCGTCTGATTGCCGCCACCTTTTCCTTAA
TTGGC
GTCTCCTTTTTTGGCCTTCCAGCGGGCATCCTGGGGTCCGGGCTGGCCCTCAAG
GTGCAG
GAGCAACACCGTCAGAAGCACTTTGAGAAAAGGAGGAAGCCAGCTGCTGAGCTC
ATTCAG

GCTGCCTGGAGGTATTATGCTACCAACCCCAACAGGATTGACCTGGTGGCGACAT
GGAGA
TTTTATGAATCAGTCGTCTCTTTTCCTTTCTTCAGGAAAGAACAGCTGGAGGCAGC
ATCC
AGCCAAAAGCTGGGTCTCTTGGATCGGGTTCGCCTTTCTAATCCTCGTGGTAGCA
ATACT
AAAGGAAAGCTATTTACCCCTCTGAATGTAGATGCCATAGAAGAAAGTCCTTCTAA
AGAA
CCAAAGCCTGTTGGCTTAAACAATAAAGAGCGTTTCCGCACGGCCTTCCGCATGA
AAGCC
TACGCTTTCTGGCAGAGTTCTGAAGATGCCGGGACAGGTGACCCCATGGCGGAA
GACAGG
GGCTATGGGAATGACTTCCCCATCGAAGACATGATCCCCACCCTGAAGGCCGCC
ATCCGA
GCCGTCAGAATTCTACAATTCCGTCTCTATAAAAAAAATTCAAGGAGACTTTGAG
GCCT
TACGATGTGAAGGATGTGATTGAGCAGTATTCTGCCGGGCATCTCGACATGCTTT
CCAGG
ATAAAGTACCTTCAGACGAGAATAGATATGATTTTCACCCCTGGACCTCCCTCCAC
GCCA
AAACACAAGAAGTCTCAGAAAGGGTCAGCATTACCTTCCCATCCCAGCAATCTC
CCAGG
AATGAACCATATGTAGCCAGACCATCCACATCAGAAATCGAAGACCAAAGCATGAT
GGGG
AAGTTTGTAAAAGTTGAAAGACAGGTTTCAGGACATGGGGAAGAAGCTGGACTTCC
TCGTG
GATATGCACATGCAACACATGGAACGGTTGCAGGTGCAGGTCACGGAGTATTACC
CAACC

AAGGGCACCTCCTCGCCAGCTGAAGCAGAGAAGAAGGAGGACAACAGGTATTCC
GATTTG
AAAACCATCATCTGCAACTATTCTGAGACAGGCCCCCGGAACCACCCTACAGCT
TCCAC
CAGGTGACCATTGACAAAGTCAGCCCCTATGGGTTTTTTGCACATGACCCTGTGA
ACCTG
CCCCGAGGGGGACCCAGTTCTGGAAAGGTTCAAGGCAACTCCTCCTTCCTCAGCA
ACAACG
TATGTGGAGAGGCCACGGTCCTGCCTATCTTGACTCTTCTCGACTCCCGAGTGA
GCTGC
CACTCCCAGGCTGACCTGCAGGGCCCCTACTCGGACCGAATCTCCCCCGGCAG
AGACGT
AGCATCACGCGAGACAGTGACACACCTCTGTCCCTGATGTGGTCAACCACGAG
GAGCTG
GAGAGGTCTCCAAGTGGCTTCAGCATCTCCCAGGACAGAGATGATTATGTGTTCC
GCCCC
AATGGGGGGTTCGAGCTGGATGAGGGAGAAGCGGTACCTCGCCGAGGGTGAGAC
GGACACA
GACACGGACCCCTTCACGCCCAGCGGCTCCATGCCTCTGTCTCCACAGGGGAT
GGGATT
TCTGATTCAGTATGGACCCCTTCCAATAAGCCCATTAA

SEQ ID 9 – tipo silvestre Kv7,3

>sp|O43525|KCNQ3_HUMAN canal dependiente de voltaje de potasio miembro 3 OS
de subfamilia KQT=Homo sapiens OX=9606 GN=KCNQ3 PE=1 SV=2
MGLKARRAAGAAGGGGDGGGGGGGAANPAGGDAAAAGDEERKVGLAPGDVEQVT
LALGAG

ADKDGTLLEGGGRDEGQR RTPQGIGLLAKTPLSRPVKRNNAKYRRIQT LIYDALERP
RG
WALLYHALVFLIVLGCLILAVLTTFKEYETVSGDWLLLLLETFAIFIFGAEFALRIWAAGC
CCRYKGWRGRLKFARKPLCMLDIFVLIASVPVAVGNQGNVLATSLRSLRFLQILRML
RM
DRRGGTWKLLGSAICAHSKELITAWYIGFLTILSSFLVYLVEKDVPEVDAQGEEMKEE
F
ETYADALWWGLITLATIGYGDKTPKTWEGRLIAATFSLIGVSFFALPAGILGSGLALKVQ
EQHRQKHFEKRRKPAAELIQAAWRYYATNPNRIDLVATWRFYESVVSFPFFRKEQLE
AAS
SQKLGLLDRVRLSNPRGSNTKGKLFTPLNVDAIEESPSKEPKPVGLNNKERFRTAFRM
KA
YAFWQSSSEDAGTGDPMAEDRGYGNDFPIEDMIPTLKAAIRAVRILQFRLYKKKFKETL
RP
YDVKDVIEQYSAGHLDMLSRIKYLQTRIDMIFTGPPSTPKHKKSQKGS AFTFPSQQS
PR
NEPYVARPSTSEIEDQSMMGKFVKVERQVQDMGKKLDFLVDMMHMQHMERLQVQVT
EYYPT
KGTSSPAEAEKKEDNRYSDLKTIICNYSETGPPEPPYSFHQVTIDKVSPYGFFAHDPV
NL
PRGGPSSGKVQATPPSSATTYVERPTVLPILTLLDSRVSCHSQADLQGPYSDRISPRQ
RR
SITRDSDTPLSLMSVNHEELERSPSGFSISQDRDDYVFGPNGGSSWMREKRYLAEGE
TDT
DTPFTPSGSMPLSSTGDGISDSVWTPSNKPI

SEQ ID 10 – Kv7,3 A315T

>sp|O43525|KCNQ3_HUMAN canal dependiente de voltaje de potasio miembro 3 OS
de subfamilia KQT=Homo sapiens OX=9606 GN=KCNQ3 PE=1 SV=2 A315T
MGLKARRAAGAAGGGGDGGGGGGGAANPAGGDAAAAGDEERKVGLAPGDVEQVT
LALGAG
ADKDGTLLEGGGRDEGQRRTPQGIGLLAKTPLSRPVKRNNAKYRRIQTLIYDALERP
RG
WALLYHALVFLIVLGCLILAVLTTFKEYETVSGDWLLLLLETFAIFIFGAEFALRIWAAGC
CCRYKGWRGRLKFARKPLCMLDIFVLIASVPVAVGNQGNVLATSLRSLRFLQILRML
RM
DRRGGTWKLLGSAICAHSKELITAWYIGFLTILSSFLVYLVEKDVPEVDAQGEEMKEE
F
ETYADALWWGLITLTIGYGDKTPKTWEGRLIAATFSLIGVSFFALPAGILGSGGLALKVQ
EQHRQKHFEKRRKPAAELIQAAWRYATNPNRIDLVAWRFYESVVSFPFFRKEQLE
AAS
SQKLGLLDRVRLSNPRGSNTKGKLFTPLNVDAIEESPSKEPKPVGLNNKERFRTAFRM
KA
YAFWQSSSEDAGTGDPMAEDRGYGNDFPIEDMIPTLKAAIRAVRILQFRLYKKKFKETL
RP
YDVKDVIEWQYSAGHLDMLSRIKYLQTRIDMIFTPGPPSTPKHKKSQKGSFTFPSQQS
PR
NEPYVARPSTSEIEDQSMMGKFVKVERQVQDMGKKLDFLVDMMHMQHMERLQVQVT
EYYPT
KGTSSPAEAEKKEDNRYSDLKTIICNYSETGPPEPPYSFHQVTIDKVSPYGFFAHPV
NL
PRGGPSSGKVQATPPSSATTYVERPTVLPILTLLDSRVSCHSQADLQGPYSDRISPRQ
RR

SITRDSDTPLSLMSVNHEELERSPSGFSISQDRDDYVFGPNGGSSWMREKRYLAEGE
TDT

DTDPFTPSGSMPLSSTGDGISDSVWTPSNKPI

SEQ ID 11 – Kv7,3 A315S

>sp|O43525|KCNQ3_HUMAN canal dependiente de voltaje de potasio miembro 3 OS
de subfamilia KQT=Homo sapiens OX=9606 GN=KCNQ3 PE=1 SV=2 A315S

MGLKARRAAGAAGGGGGGGGGGAANPAGGDAAAAGDEERKVGLAPGDVEQVT
LALGAG

ADKDGTLLEGGGRDEGQRRTPQGIGLLAKTPLSRPVKRNNAKYRRIQTLIYDALERP
RG

WALLYHALVFLIVLGCLILAVLTTFKEYETVSGDWLLLLLETFAIFIFGAEFALRIWAAGC
CCRYKGWRGRLKFARKPLCMLDIFVLIASVPVAVGNQGNVLATSLRSLRFLQILRML
RM

DRRGGTWKLLGSAICAHSKELITAWYIGFLTILSSFLVYLVEKDVPEVDAQGEEMKEE
F

ETYADALWWGLITLSTIGYGDKTPKTWEGRLIAATFSLIGVSFFALPAGILGSGGLALKVQ
EQHRQKHFEKRRKPAAELIQAAWRYATNPNRIDLVATWRFYESVVSFPFFRKEQLE
AAS

SQKLGLLDRVRLSNPRGSNTKGKLFTPLNVDAIEESPSKEPKPVGLNNKERFRTAFRM
KA

YAFWQSSSEDAGTGDPMAEDRGYGNDFPIDMIPTLKAIRAVRILQFRLYKKKFKETL
RP

YDVKDVIEWQYSAGHLDMLSRIKYLQTRIDMIFTPGPPSTPKHKKSQKGSFTFPSQQS
PR

NEPYVARPSTSEIEDQSMMGKFVKVERQVQDMGKKLDFLVDMMHMQHMERLQVQVT
EYYPT

KGTSSPAEAEKKEDNRYSDLKTIICNYSETGPPEPPYSFHQVTIDKVSPYGFFAHPV
NL
PRGGPSSGKVQATPPSSATTYVERPTVLPILTLLDSRVSCHSQADLQGPYSRISPRQ
RR
SITRDSDTPLSLMSVNHEELERSPSGFSISQDRDDYVFGPNGGSSWMREKRYLAEGE
TDT
DTPFTPSGSMPLSSTGDGISDSVWTPSNKPI

SEQ ID 12 – Kv7,3 A315V

>sp|O43525|KCNQ3_HUMAN canal dependiente de voltaje de potasio miembro 3 OS
de subfamilia KQT=Homo sapiens OX=9606 GN=KCNQ3 PE=1 SV=2 A315V
MGLKARRAAGAAGGGDGGGGGGGAANPAGGDAAAAGDEERKVGLAPGDVEQVT
LALGAG
ADKDGTLLEGGGRDEGQRRTPQGIGLLAKTPLSRPVKRNNAKYRRIQTLIYDALERP
RG
WALLYHALVFLIVLGCLILAVLTTFKEYETVSGDWLLLLLETFAIFIFGAEFALRIWAAGC
CCRYKGWRGRLKFARKPLCMLDIFVLIASVPVAVGNQGNVLATSLRSLRFLQILRML
RM
DRRGGTWKLLGSAICAHSKELITAWYIGFLTILSSFLVYLVEKDVPEVDAQGEEMKEE
F
ETYADALWWGLITLVTIGYGDKTPKTWEGRLIAATFSLIGVSFFALPAGILGSGGLALKVQ
EQHRQKHFEKRRKPAAELIQAAWRYATNPNRIDLVATWRFYESVVSFPFRKEQLE
AAS
SQKLGLLDRVRLSNPRGSNTKGKLF TPLNVDAIEESPSKEPKPVGLNNKERFRTAFRM
KA
YAFWQSSSEDAGTGDPMAEDRGYGNDFPIEDMIPTLKAAIRAVRILQFRLYKKKFKETL
RP

YDVKDVIEQYSAGHLDMLSRIKYLQTRIDMIFTPGPPSTPKHKKSQKGSFTFPSQQS
PR
NEPYVARPSTSEIEDQSMMGKFVKVERQVQDMGKKLDFLVDMMHMQHMERLQVQVT
EYYPT
KGTSSPAEAEKKEDNRYSDLKTIICNYSETGPPEPPYSFHQVTIDKVSPYGFFAHDPV
NL
PRGGPSSGKVQATPPSSATTYVERPTVLPILTLLDSRVSCHSQADLQGPYSDRISPRQ
RR
SITRSDTPLSLMSVNHEELERSPSGFSISQDRDDYVFGPNGGSSWMREKRYLAEGE
TDT
DTPFTPSGSMPLSSTGDGISDSVWTPSNKPI

SEQ ID 13 – Kv7,3 A315C

>sp|O43525|KCNQ3_HUMAN canal dependiente de voltaje de potasio miembro 3 OS
de subfamilia KQT=Homo sapiens OX=9606 GN=KCNQ3 PE=1 SV=2 A315C
MGLKARRAAGAAGGGGDGGGGGGGAANPAGGDAAAAGDEERKVGLAPGDVEQVT
LALGAG
ADKDGTLLEGGGRDEGQRRTPQGIGLLAKTPLSRPVKRNNAKYRRIQTLIYDALERP
RG
WALLYHALVFLIVLGCLILAVLTTFFKEYETVSGDWLLLLLETFAIFIFGAEFALRIWAAGC
CCRYKGWRGRLKFARKPLCMLDIFVLIASVPVAVGNQGNVLATSLRSLRFLQILRML
RM
DRRGGTWKLLGSAICAHSKELITAWYIGFLTILSSFLVYLVEKDVPEVDAQGEEMKEE
F
ETYADALWWGLITLCTIGYGDKTPKTWEGRLIAATFSLIGVSFFALPAGILGSGGLALKVQ
EQHRQKHFEKRRKPAAELIQAAWRYATNPNRIDLVATWRFYESVVSFPFFRKEQLE
AAS

SQKLGLLDRVRLSNPRGSNTKGKLFTPLNVDAIEESPSKEPKPVGLNNKERFRTAFRM
KA
YAFWQSSSEDAGTGDPMAEDRGYGNDFPIEDMIPTLKAAIRAVRILQFRLYKKKFKETL
RP
YDVKDVIEQYSAGHLDMLSRIKYLQTRIDMIFTPGPPSTPKHKKSQKGSFTFPSQQS
PR
NEPYVARPSTSEIEDQSMMGKFVKVERQVQDMGKKLDFLVDMMHMQHMERLQVQVT
EYYPT
KGTSSPAEAEKKEDNRYSDLKTIICNYSETGPPEPPYSFHQVTIDKVSPYGFFAHPV
NL
PRGGPSSGKVQATPPSSATTYVERPTVLPILTLLDSRVSCHSQADLQGPYSDRISPRQ
RR
SITRSDTPLSLMSVNHEELERSPSGFSISQDRDDYVFGPNGGSSWMREKRYLAEGE
TDT
DTPFTPSGSMPLSSTGDGISDSVWTPSNKPI

SEQ ID 14 – Kv7,3 A315N

>sp|O43525|KCNQ3_HUMAN canal dependiente de voltaje de potasio miembro 3 OS
de subfamilia KQT=Homo sapiens OX=9606 GN=KCNQ3 PE=1 SV=2 A315N
MGLKARRAAGAAGGGGDGGGGGGGAANPAGGDAAAAGDEERKVGLAPGDVEQVT
LALGAG
ADKDGTLLEGGGRDEGQRRTPQGIGLLAKTPLSRPVKRNNAKYRRIQTLIYDALERP
RG
WALLYHALVFLIVLGCLILAVLTTFKEYETVSGDWLLLLLETFAIFIFGAEFALRIWAAGC
CCRYKGWRGRLKFARKPLCMLDIFVLIASVPVAVGNQGNVLATSLRSLRFLQILRML
RM

DRRGGTWKLLGSAICAHSKELITAWYIGFLTILSSFLVYLVEKDVPEVDAQGEEMKEE
 F
 ETYADALWWGLITLNTIGYGDKTPKTWEGRLIAATFSLIGVSFFALPAGILGSGGLALKVQ
 EQHRQKHFEKRRKPAAELIQAAWRYATNPNRIDL VATWRFYESVVSFPFFRKEQLE
 AAS
 SQKLGLLDRVRLSNPRGSNTKGKLFTPLNVDAIEESPSKEPKPVGLNNKERFRTAFRM
 KA
 YAFWQSSSEDAGTGDPMAEDRGYGNDFPIEDMIPTLKAAIRAVRILQFRLYKKKFKETL
 RP
 YDVKDVIEQYSAGHLDMLSRIKYLQTRIDMIFTPGPPSTPKHKKSQKGS AFTFPSQQS
 PR
 NEPYVARPSTSEIEDQSMMGKFVKVERQVQDMGKKLDFL VDMHMQHMERLQVQVT
 EYYPT
 KGTSSPAEAEKKEDNRYSDLKTIICNYSETGPPEPPYSFHQVTIDKVSPYGFFAHPV
 NL
 PRGGPSSGKVQATPPSSATTYVERPTVLPILTLLDSRVSCHSQADLQGPYSDRISPRQ
 RR
 SITRDSDTPLSLMSVNHEELERSPSGFSISQDRDDYVFGPNGGSSWMREKRYLAEGE
 TDT
 DTD PFTPSGSMPLSSTGDGISDSVWTPSNKPI

SEQ ID 15 – Kv7,3 A315Q

>sp|O43525|KCNQ3_HUMAN canal dependiente de voltaje de potasio miembro 3 OS
 de subfamilia KQT=Homo sapiens OX=9606 GN=KCNQ3 PE=1 SV=2 A315Q
 MGLKARRAAGAAGGGGDGGGGGGGAANPAGGDAAAAGDEERKVGLAPGDVEQVT
 LALGAG

ADKDGTLLEGGGRDEGQRRTPQGIGLLAKTPLSRPVKRNNAKYRRIQTLIYDALERP
RG
WALLYHALVFLIVLGCLILAVLTTFFKEYETVSGDWLLLLLETFAIFIFGAEFALRIWAAGC
CCRYKGWRGRLKFARKPLCMLDIFVLIASVPVAVGNQGNVLATSLRSLRFLQILRML
RM
DRRGGTWKLLGSAICAHSKELITAWYIGFLTILSSFLVYLVEKDVPEVDAQGEEMKEE
F
ETYADALWWGLITLQTIGYGDKTPKTWEGRLIAATFSLIGVSFFALPAGILGSGGLALKV
Q
EQHRQKHFEKRRKPAAELIQAAWRYYATNPNRIDLVATWRFYESVVSFPFFRKEQLE
AAS
SQKLGLLDRVRLSNPRGSNTKGKLFTPLNVDAIEESPSKEPKPVGLNNKERFRTAFRM
KA
YAFWQSSSEDAGTGDPMAEDRGYGNDFPIEDMIPTLKAAIRAVRILQFRLYKKKFKETL
RP
YDVKDVIEWQYSAGHLDMLSRIKYLQTRIDMIFTPGPPSTPKHKKSQKGSFTFPSQQS
PR
NEPYVARPSTSEIEDQSMMGKFVKVERQVQDMGKKLDFLVDMMHMQHMERLQVQVT
EYYPT
KGTSSPAEAEKKEDNRYSDLKTIICNYSETGPPEPPYSFHQVTIDKVSPYGFFAHPV
NL
PRGGPSSGKVQATPPSSATTYVERPTVLPILTLLDSRVSCHSQADLQGPYSDRISPRQ
RR
SITRDSDTPLSLMSVNHEELERSPSGFSISQDRDDYVFGPNGGSSWMREKRYLAEGE
TDT
DTPFTPSGSMPLSSTGDGISDSVWTPSNKPI

SEQ ID 16 – Kv7,3 A315Y

>sp|O43525|KCNQ3_HUMAN canal dependiente de voltaje de potasio miembro 3 OS
de subfamilia KQT=Homo sapiens OX=9606 GN=KCNQ3 PE=1 SV=2 A315Y
MGLKARRAAGAAGGGGDGGGGGGGAANPAGGDAAAAGDEERKVGLAPGDVEQVT
LALGAG
ADKDGTLLEGGGRDEGQRRTPQGIGLLAKTPLSRPVKRNNAKYRRIQTLIYDALERP
RG
WALLYHALVFLIVLGCLILAVLTTFKEYETVSGDWLLLLLETFAIFIFGAEFALRIWAAGC
CCRYKGWRGRLKFARKPLCMLDIFVLIASVPVAVGNQGNVLATSLRSLRFLQILRML
RM
DRRGGTWKLLGSAICAHSKELITAWYIGFLTILSSFLVYLVEKDVPEVDAQGEEMKEE
F
ETYADALWWGLITLYTIGYGDKTPKTWEGRLIAATFSLIGVSFFALPAGILGSGLALKVQ
EQHRQKHFEKRRKPAAELIQAAWRYYATNPNRIDL VATWRFYESVVSFPFFRKEQLE
AAS
SQKLGLLDRVRLSNPRGSNTKGKLFTPLNVDAIEESPSKEPKPVGLNNKERFRTAFRM
KA
YAFWQSSSEDAGTGDPMAEDRGYGNDFPIEDMIPTLKAAIRAVRILQFRLYKKKFKETL
RP
YDVKDVIEWEQYSAGHLDMLSRIKYLQTRIDMIFTPGPPSTPKHKKSQKGS AFTFPSQQS
PR
NEPYVARPSTSEIEDQSM MGKFKVERQVQDMGKKLDFL VDMHMQHMERLQVQVT
EYYPT
KGTSSPAEAEKKEDNRYSDLKTIICNYSETGPPEPPYSFHQVTIDKVSPYGFFAHPV
NL
PRGGPSSGKVQATPPSSATTYVERPTVLPILTLLDSRVSCHSQADLQGPYSDRISPRQ
RR

SITRDSDTPLSLMSVNHEELERSPSGFSISQDRDDYVFGPNGGSSWMREKRYLAEGE

TDT

DTDPFTPSGSMPLSSTGDGISDSVWTPSNKPI